

Université de Montréal

**Étude moléculaire de la présentation des superantigènes.**

par  
Georges Azar

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Microbiologie et Immunologie

Avril, 2006

© Georges Azar, 2006



W

4

U58

2006

v. 095

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude moléculaire de la présentation des superantigènes.**

présentée par :

Georges Azar

évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Idriss Djilali-Saiah, président-rapporteur

Dr. Jacques Thibodeau, directeur de recherche

Dr. Walid Mourad, membre du jury

Dr. François Denis, examinateur externe

Dr. Idriss Djilali-Saiah, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Les superantigènes (SAg) sont de puissants mitogènes pour les lymphocytes T. La simple exposition à ces molécules cause des maladies allant de l'empoisonnement alimentaire au choc toxique. De plus, ils causent l'aggravement de certaines conditions autoimmunes. Les SAg nécessitent une présentation par les molécules du complexe majeure d'histocompatibilité (CMH) de classe II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Bien qu'en général, leur présentation ne semble pas restreinte par les CMH II, les SAg sont sensibles à l'hétérogénéité des complexes CMH II-peptide retrouvés en surface des CPA.

Moins connus que les SAg bactériens, les SAg endogènes ont été au centre de nos intérêts. Nous avons concentré nos recherches sur la caractérisation des événements moléculaires régissant la présentation efficace de ces SAg. Nos efforts de caractérisation du SAg endogène humain, nouvellement décrit et encodé par le gène *env* du rétrovirus endogène humain, HERV-K18.1, nous ont permis de conclure qu'il était exempt des caractéristiques des SAg.

D'autre part, nous avons profité d'un modèle d'expression de molécules HLA-DR1 non-permissives à la présentation du SAg viral (vSAg) du *murine mammary tumor virus* (MMTV) pour déterminer les conditions moléculaires minimales permettant la présentation réussie du vSAg par les molécules de CMH II. Nos recherches nous ont permis de mettre en évidence le rôle de la machinerie cellulaire d'apprêtement et de chargement des peptides (incluant la chaîne invariante et DM), dans la production de molécules de CMH II permissives à la présentation du vSAg. L'effet de la cargaison peptidique des CMH II sur la réussite de la présentation du vSAg est discuté. De plus, grâce à nos expériences de ciblage aux compartiments intracellulaires des CMH II et du vSAg, nous avons pu conclure que l'interaction vSAg – CMH II-peptide se ferait à la surface cellulaire. Malgré un rôle bien établi de DM et Ii, nous n'avons trouvé aucun effet significatif de l'expression de DO sur la présentation des SAg en général. A la lumière de nos recherches, nous discutons les

rôles possibles des vSAg dans l'étiologie des maladies autoimmunes et dans le cancer du sein chez l'humain. Nous proposons une zone d'interaction du vSAg de MMTV sur les molécules de CMH II et abordons son mode de présentation en transfert.

**Mots-clés** : Superantigènes, MMTV, Lymphocytes B, apprêtement de l'antigène, peptides, CMH de classe II, diabète autoimmun, HERV.

---

## Abstract

Superantigens (SAGs) are powerful T cell mitogens. They cause serious pathological conditions, from food poisoning to toxic shock to individuals coming in contact with them. They also have been shown to reactivate and exacerbate certain autoimmune conditions. For efficient immune activation, SAGs require major histocompatibility complex (MHC) class II presentation at the surface of antigen presenting cells (APC). Although their presentation seems to be unrestricted by the MHC II molecules, SAGs seem to be sensitive to the heterogeneity of the pool of MHC II-pep complexes found at the surface of APCs.

Less known than their bacterial counterparts, endogenous SAGs have been at the center of our research. We have concentrated our work on the depiction of the molecular events governing the successful presentation of these endogenous SAGs. Our efforts to further characterize the newly described human endogenous SAG encoded by the *env* gene of HERV-K18.1, have allowed us to conclude that it was devoid of SAG activity.

On the other hand, we have taken advantage of a model of HLA-DR1 expression, non permissive for viral SAG (vSAG) presentation, to determine the minimal molecular requirements for a successful vSAG presentation. Our work allowed us to determine the role of the MHC II peptide processing and loading machinery (including the chaperones DM and Ii) in the production of MHC II-peptide complexes competent for vSAG presentation. The effect of the loaded peptide in the MHC II groove on successful vSAG presentation is discussed. Through alternative intracellular targeting of the vSAG and MHC II molecules, we present evidence of productive vSAG interaction only with fully matured MHC II-peptide complexes at the cell surface of APCs. In spite of a well established role of DM and Ii, we found that DO's expression did not significantly affect SAG presentation in general. Finally, we discuss the possible implications of vSAGs in the etiology of autoimmune diseases and in human breast cancer. Also, based on our observations, we offer a new explanation of the paracrine transfer form of vSAG presentation and we propose a probable

region of interaction of the murine mammary tumor virus (MMTV) vSAg with MHC class II molecules.

**Keywords :** Superantigen, MMTV, B cells, Antigen processing, peptides, MHC class II, autoimmune diabetes, IDDM, HERV.



## Table des matières

CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE .....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Les molécules du CMH.....	2
1.2.1 Locus du CMH.....	3
1.2.2 CMH de classe I.....	5
1.2.3 Les molécules de CMH de classe II.....	7
1.2.4 La chaîne invariante .....	13
1.2.4.1 Domaines fonctionnels de la chaîne invariante.....	14
1.2.5 Assemblage et transport des molécules de classe II.....	16
1.2.6 Chargement des peptides sur les molécules de CMH II .....	19
1.2.6.1 Génération des ligands peptidiques.....	19
1.2.6.2 Nature de l'interaction CMH II-peptide.....	22
1.2.6.3 Rôle de DM dans le chargement peptidique .....	25
1.2.6.4 Effets de HLA-DO sur le chargement des peptides .....	28
1.3 Les lymphocytes T .....	30
1.3.1 Le récepteur T (TcR).....	31
1.3.2 Le répertoire T.....	33
1.3.3 L'activation des lymphocytes T.....	36
1.4 Superantigènes .....	38
1.4.1 Superantigènes bactériens .....	42
1.4.2 Superantigènes rétroviraux.....	54
1.5 Rétrovirus endogènes (ERV) .....	60
1.5.1 Effets .....	61
1.6 Hypothèse et Rationale .....	62

CHAPITRE 2 - ARTICLE .....	65
HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS IDDMK <sub>1,2</sub> 22 AND MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS SUPERANTIGENS DIFFER IN THEIR ABILITY TO STIMULATE MURINE T CELL HYBRIDOMAS.....	66
2.1 RÉSUMÉ .....	67
2.2 SUMMARY .....	68
2.3 INTRODUCTION .....	69
2.4 RESULTS AND DISCUSSION .....	71
2.5 CONCLUDING REMARKS .....	74
2.6 MATERIALS AND METHODS.....	75
2.7 ACKNOWLEDGEMENTS .....	78
2.8 FIGURES .....	79
2.9 REFERENCES.....	87
CHAPITRE 3 – ARTICLE .....	93
A DEFECTIVE VIRAL SUPERANTIGEN-PRESENTING PHENOTYPE IN HLA-DR TRANSFECTANTS IS CORRECTED BY CIITA.....	94
3.1 RÉSUMÉ .....	95
3.2 ABSTRACT .....	96
3.3 INTRODUCTION .....	97
3.4 MATERIAL AND METHODS .....	100
3.5 RESULTS .....	105
3.6 DISCUSSION .....	112
3.7 ACKNOWLEDGEMENTS .....	117
3.8 REFERENCES.....	118
3.9 FOOTNOTES .....	131
3.10 FIGURES .....	132

CHAPITRE 4 – ARTICLE .....	146
HLA-DO MODULATION OF THE PEPTIDE REPERTOIRE DOES NOT INHIBIT SUPERANTIGEN PRESENTATION.....	147
4.1 RÉSUMÉ .....	148
4.2 ABSTRACT .....	149
4.3 INTRODUCTION .....	150
4.4 MATERIAL AND METHODS .....	153
4.5 RESULTS .....	156
4.6 DISCUSSION .....	159
4.7 ACKNOWLEDGEMENTS .....	163
4.8 REFERENCES.....	164
4.8 FIGURES .....	174
CHAPITRE 5 – CONCLUSION .....	186
5.1 Superantigènes endogènes et autoimmunité .....	187
5.2 Cancer du sein et MMTV.....	190
5.3 Comment MMTV évite de causer l’autoimmunité et le choc toxique? .....	191
5.4 Conditions pour une présentation efficace d’un SAg endogène .....	192
5.4.1 Effets de Ii.....	193
5.4.2 Effets de DM.....	194
5.4.3 Est-ce une question de peptide? .....	195
5.4 Le phénomène de transfert du vSAg de MMTV.....	196
5.5 Modèle d’interaction des vSAg de MMTV avec les CMH II.....	198

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 Liste des SAg les mieux connus avec quelques propriétés biochimiques ...41

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure 1.1	La présentation antigénique par les CMH II .....	2
Figure 1.2	Locus du CMH humain .....	4
Figure 1.3	Sources potentielles des peptides présentés par les CMH I .....	6
Figure 1.4	L'expression de CIITA et des CMH II .....	9
Figure 1.5	Régulation de la transcription du gène <i>MHC2TA</i> .....	10
Figure 1.6	Les quatre isoformes de la chaîne invariante humaine .....	14
Figure 1.7	Les étapes de dégradation de Ii .....	18
Figure 1.8	La niche peptidique du complexe HLA-DR1 – HA <sub>306-318</sub> .....	24
Figure 1.9	Complexe CMH – pep – TcR .....	33
Figure 1.10	Maturation des thymocytes .....	35
Figure 1.11	Représentation schématique de la présentation des SAg .....	42
Figure 1.12	Modélisation des interactions SAg – CMH $\alpha$ – TcR .....	46
Figure 1.13	Modélisation des interactions TcR – SAg – CMH II $\beta$ .....	47
Figure 1.14	Modèle de la réticulation de deux CMH II par SEA .....	49
Figure 1.15	Structure et caractéristiques du produit de l' <i>orf</i> de MMTV .....	56

### Chapitre 2

Figure 1	Alignment of IDDMK <sub>1,222</sub> ORF-related sequences .....	80
Figure 2	Raji IDDM 4F6 does not stimulate T cell hybridomas expressing TcRs related to the human V $\beta$ 7.....	82
Figure 3	MTV7 transfected Raji successfully activate T cell hybridomas.....	84
Figure 4	V $\beta$ -specific activation of T cell hybridomas by vSAg-transfected Raji cells ..	86

### Chapitre 3

Figure 1	DR <sup>+</sup> HeLa cells do not present vSAGs .....	133
Figure 2	Compact SDS-resistant DR molecules on transfected HeLa cells .....	135
Figure 3	INF- $\gamma$ restores presentation of vSAG7 by HeLa cells .....	137
Figure 4	Raji cells present vSAGs .....	139
Figure 5	Co-expression of DM and Ii rescues vSAG7 presentation by HeLa DR1 cells .....	141
Figure 6	An ectopic endosomal sorting motif in the DR $\beta$ tail allows vSAG presentation .....	143
Figure 7	Sorting vSAG7 to endosomes destroys its activity .....	145

### Chapitre 4

Figure 1	DO induced surface CLIP upregulation .....	175
Figure 2	DO effect on cell surface SAg binding .....	177
Figure 3	DO expression doesn't significantly affect bSAg presentation to a panel of T-cell hybridomas .....	179
Figure 4	Soluble SAg binding and presentation by splenocytes is independent of DO expression .....	181
Figure 5	Endogenous vSAGs presentation is independent from DO expression .....	183
Table 1	Relative effect of DO expression on CLIP upregulation .....	185

### Chapitre 5

Figure 5.1	Schématisation de la zone d'interaction potentielle du vSAG avec HLA-DR .....	198
------------	--	-----

## Liste des Abréviations :

ABC : *ATP Binding Cassette*

Ac : Anticorps

AcM : Anticorps monoclonal

Ag : Antigène

AIRE : gène de la régulation de l'autoimmunité (*Autoimmune Regulator gene*)

AST : Antigènes spécifiques aux tissus

BcR : Récepteur B (*B cell receptor*)

CD : Cellule Dendritique

CG : Centre germinatif

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

cTEC : Cellules épithéliales thymique du cortex (*cortex Thymic epithelial cells*)

CTL : Lymphocyte T cytotoxique (*Cytotoxic T Lymphocyte*)

EAE : Encéphalomyélite autoimmune expérimentale

ERV : Rétrovirus Endogène (*Endogenous Retrovirus*)

HA : Hémagglutinine du virus de l'influenza

HERV : Rétrovirus Endogène Humain (*Human Endogenous Retrovirus*)

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance (*High-performance liquid chromatography*)

IDDM : *Insulin dependent diabetes mellitus*

IFN- $\gamma$  : Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

KO : *Knock out*

L. B : Lymphocyte B

L. T : Lymphocyte T

LTRs : *Long terminal repeats*

M $\emptyset$  : Macrophage

MIIC : Compartiments CMH II (*MHC II compartments*)

MBP : *Myelin Basic Protein*

Mls : *Minor lymphocyte stimulating antigen*

MMTV : *Mouse Mammary Tumor Virus*

mTEC : Cellules épithéliales thymique de la médulla.

ORF : cadre de lecture ouvert (*open reading frame*)

PC : Pro-protéines convertases

Pep : Peptide

PI : Ile de pathogénéicité (*Pathogenicity Island*)

PNA : Agglutinine d'arachide (*Peanut agglutinin*)

PTSAg : *Pyrogenic Toxin Superantigen*

R.E. : Réticulum endoplasmique

SAg : Superantigène

SI : Synapse Immunologique

TAP : *Transporter for Antigen Processing*

TcR : Récepteur des cellules T (*T cell receptor*)

TfR1 : Récepteur de la transferrine 1 (*Transferrin receptor 1*) ou CD71

TGN : Réseau trans-Golgi (*Trans-Golgi network*)

TGF- $\beta$  : Facteur transformant de croissance beta (*transforming growth factor beta*)

TNF- $\alpha$  : *tumor necrosis factor alpha*

VIF : Virus de l'immunodéficience féline

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine



*à Téta Espérance,*

*à Nicole et Alberto, à Soraya et Carl,*

*à Rym,*

*à Thomas.*

## Remerciements

La famille on la subi, les amis on les choisi, j'ai été très choyé d'avoir le meilleur dans les deux. Mes parents, Albert et Nicole qui pour nous, ont sacrifié beaucoup et qui pendant 11 ans, sans relâche, n'ont arrêté de m'aider et de croire en moi. Rares étaient les journées que j'ai passées sans rappel de leur support et leur amour inconditionnel. Même la famille que j'ai choisie, celle du laboratoire Thibodeau, je n'aurais pu faire un meilleur choix. Un merci particulier à Dr. Jacques Thibodeau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa patience et ses secrets de druide qu'il m'a toujours transmis.

Merci à mes professeurs, Libanais et Canadiens, ces gens qui donnent sans compter avec courage et générosité immesurables.

Merci au Canada et au Québec en particulier, qui m'a adopté et investi en moi comme un fils, j'espère que j'en serai digne.

Un grand merci à mon frère Carl pour m'avoir aidé et pour avoir supporté mes humeurs pendant la rédaction de cette thèse.

Merci à mes amis qui m'ont soutenu et encouragé avec beaucoup d'impatience tout au long de mon parcours et qui ont un grand mérite dans tous mes accomplissements. Un merci spécial à Dany, Dimitri, Chadi, Fouad, Jimmy, Michèle et Cyrinne ; vous m'avez tous permis de préserver un minimum de sainteté d'esprit.

Merci aux membres du Jury pour avoir lu et corrigé cette thèse.

## CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE

### 1.1 Introduction

Essentiellement, le système immunitaire défend l'organisme en faisant la différence entre le soi et le non soi. Ceci se fait par le biais d'un système généralisé de récepteurs et ligands. A plusieurs niveaux, le système exploite la spécificité de l'interaction récepteur spécifique/ligand afin de mettre en branle tout un système de signalisation intra- (phosphorylations protéiques menant ultimement à l'activation ou la répression de gènes d'intérêt) et inter-cellulaire (cytokines, chemokines). L'événement déclencheur de la réponse immune adaptative est la reconnaissance de l'antigène (Ag). L'Ag est généralement une protéine que les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) s'efforceront de dégrader en petits fragments peptidiques. Le système immunitaire est doté, entre autres, d'une famille de molécules capables de lier ces peptides et de les acheminer jusqu'à la surface cellulaire pour les présenter aux lymphocytes T et activer ceux qui leurs sont spécifiques. Ces molécules sont communément appelées CMH pour complexe majeur d'histocompatibilité. Deux classes de CMH sont ainsi capables de présenter ces peptides antigéniques à l'intérieur d'une niche qui leur est spécialement conçue. Les molécules de CMH de classe I (CMH I) généralement chargées de la présentation des peptides d'origine endogène, et les molécules de CMH de classe II (CMH II), qui présentent les peptides d'origines exogène ou endogène captés par les CPAs. Ces deux classes de molécules ont chacune un schéma d'expression très différent : Les CMH I sont des molécules ubiquitaires, se retrouvant à la surface de toutes les cellules nucléées du corps, tandis que les CMH II se retrouvent exprimées soit uniquement à la surface de quelques cellules spécialisées (i.e. cellules dendritiques (CD), macrophages (MØ), et lymphocytes B (L.B)) ou suite à une induction sur la plupart des tissus par l'IFN- $\gamma$ .

Une présentation antigénique efficace est normalement atteinte grâce à un système reposant sur trois éléments principaux :

- 1- Les molécules présentatrices (CMH) sur les CPAs.
- 2- L'antigène, sa reconnaissance, sa capture et son apprêtement.

3- Les récepteurs sur les cellules effectrices (lymphocytes T (L.T)) menant à l'élimination de l'Ag.

Ces trois éléments sont sujets à de nombreux contrôles, à différents niveaux, servant à éviter le sabotage par les organismes infectieux, à s'assurer qu'aucun pathogène ne passe inaperçu et à détecter les cellules tumorales tout en évitant les réponses autoimmunes.

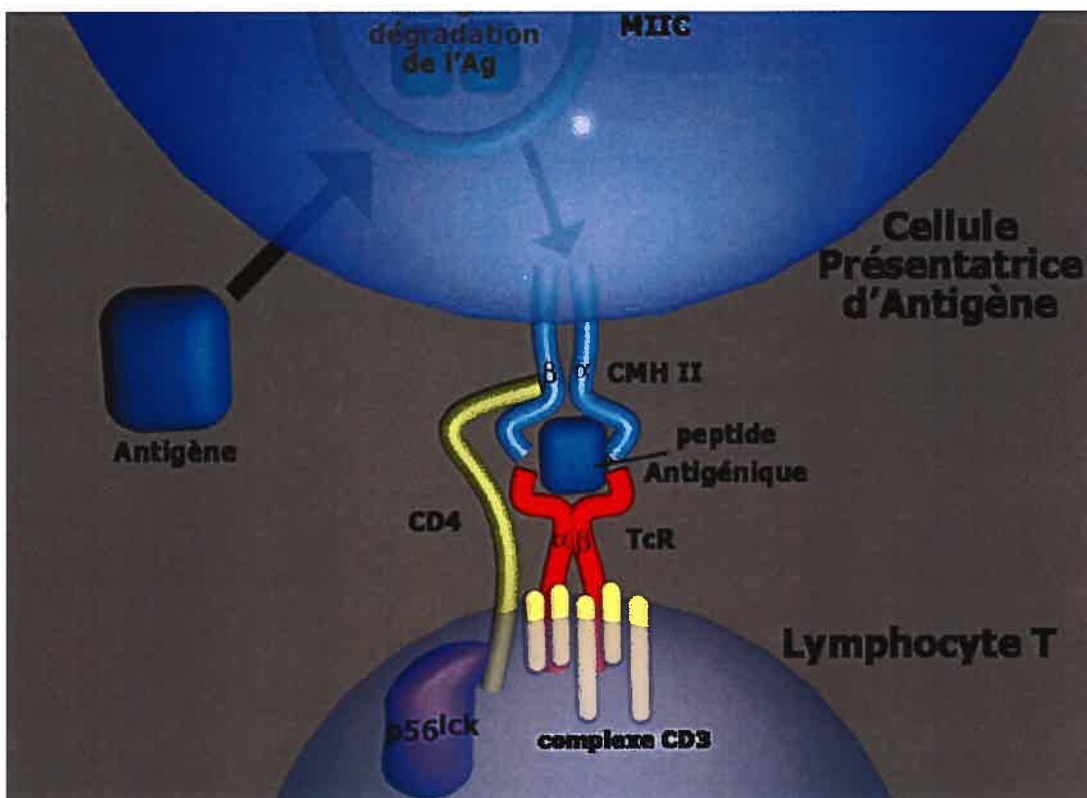


Figure 1.1 Représentation schématique de la présentation antigénique par les molécules de CMH II à un lymphocyte T auxiliaire CD4+.

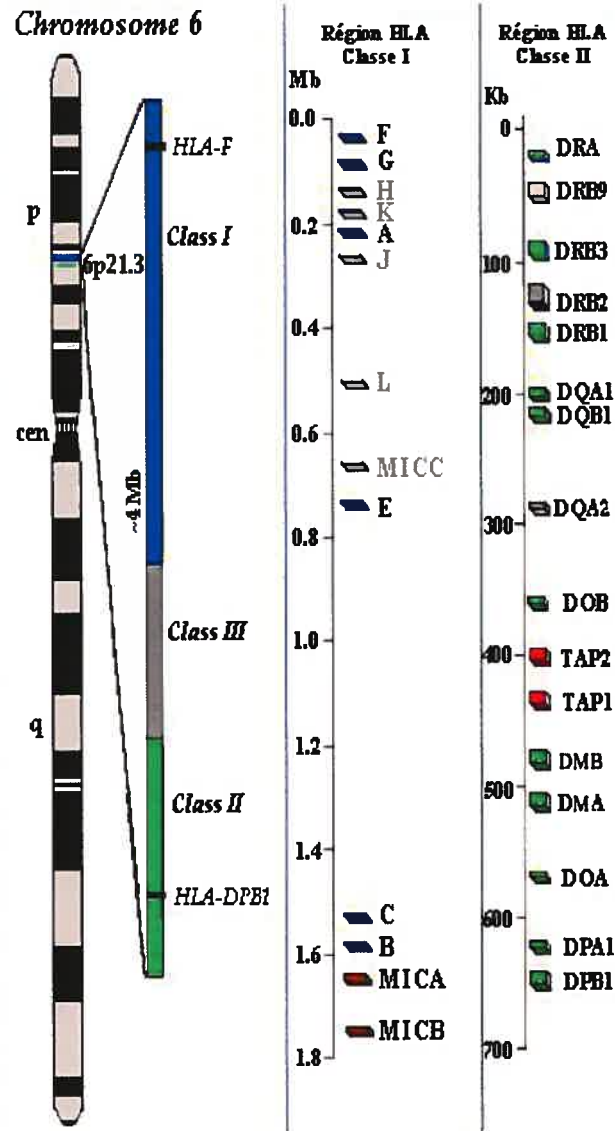
## 1.2 Les molécules du CMH

En plus d'être des gènes les plus polymorphiques du génome (HLA-B compte plus de 500 allèles à lui seul), le complexe HLA (CMH humain, voir plus loin) est associé aux maladies plus que toute autre région génomique chez l'humain, surtout en ce qui concerne l'infection et l'autoimmunité (1).

### 1.2.1 Locus du CMH

Le locus du CMH a été localisé sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3) chez l'homme et 17 chez la souris. Chez l'homme ce locus d'environ  $4 \times 10^6$  de paires de bases, code pour 224 gènes dont la majorité ne sont reliés à aucune fonction immune. Ces gènes se retrouvent divisés en 11 groupements génétiques dont les plus grands et parmi les plus exprimés, ceux des ARNt et des histones. Ces deux groupements se retrouvent rapprochés afin de maximiser leur niveau de transcription, et en se regroupant autour d'eux, les gènes du CMH deviennent inclus dans une région chromosomique à haute fréquence d'expression (2). Le fait que les pressions sélectives aient regroupé ces gènes autour d'une même région à haute fréquence d'expression souligne l'importance de ces groupements génétiques, même si leurs fonctions ne sont pas directement reliées.

Le locus des CMH est divisé en trois régions : Les CMH de classe II, III et I (respectivement en allant du centromère vers le télomère) (Fig. 1.2). La région des classes I code pour les molécules de CMH de classe I (HLA-A, B et C). Ces molécules sont responsables de la présentation de peptides endogènes aux lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Les molécules de CMH de classe II classiques (HLA-DR, DP, DQ), codées dans la région des classes II, sont responsables de présentation de peptides aux Lymphocytes T CD4+. Parmi les gènes encodés dans cette région du locus des CMH, on compte aussi les gènes *TAP1/TAP2*, *LMP2/LMP7* et les gènes *DOA*, *DOB*, *DMA* et *DMB* codant pour HLA-DO et HLA-DM, deux molécules de CMH II baptisées non-classiques puisqu'elles ne se retrouvent presque jamais en surface, et sont incapables de présentation antigénique par elles mêmes. Quoique moins impliqués dans la présentation antigénique, les gènes retrouvés dans la région III codent pour, entre autres, le « *tumor necrosis factor*  $\alpha$  » (TNF- $\alpha$ ) et quelques composantes du système du complément (3).



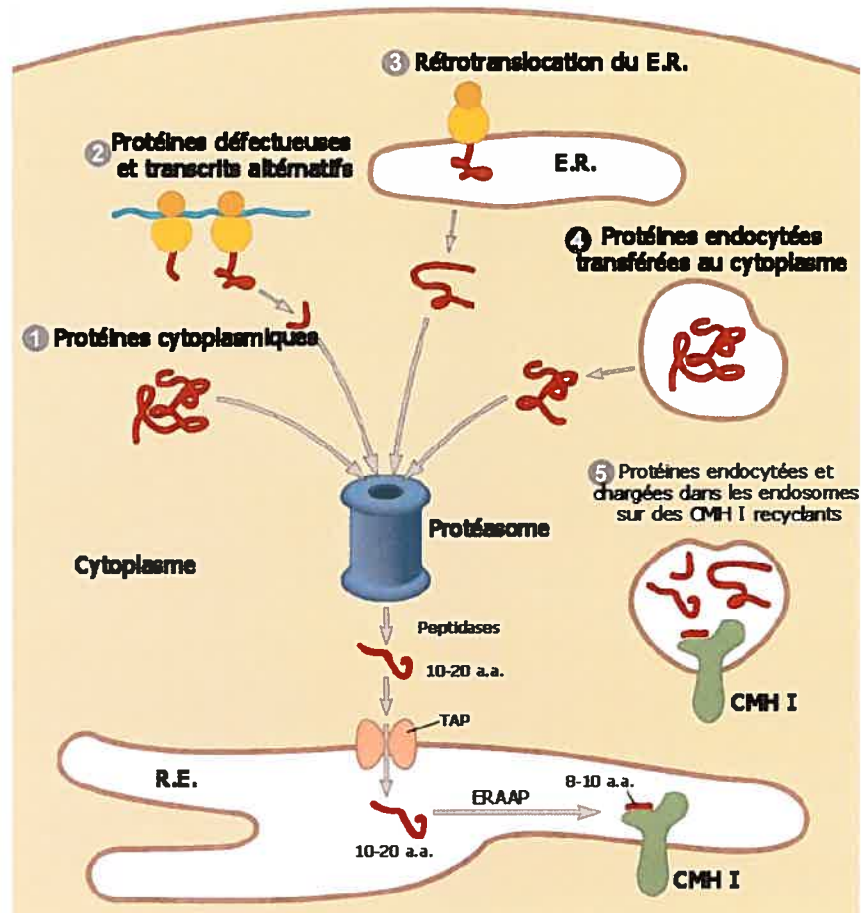
**Figure 1.2 Locus du complexe majeur d'histocompatibilité humain.** Représentation schématique du chromosome 6 portant le locus du CMH humain. Y sont détaillées, à l'échelle, les régions des HLA classes I et II. (Image modifiée du site de dbMHC : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc/>)

### 1.2.2 CMH de classe I

Les molécules de CMH I sont formées de deux chaînes polypeptidiques différentes : la chaîne  $\alpha$  (~44 kDa) hautement polymorphique, encodée par les gènes de la région des classes I du locus du CMH, et la  $\beta_2$ microglobuline ( $\beta_2$ -m, 12 kDa) invariante, encodée à l'extérieur du locus des CMH (chromosome 2 chez la souris et 15 chez l'homme). La chaîne lourde, ou chaîne  $\alpha$ , est composée de trois domaines extra cellulaires ( $\alpha_1$  à  $\alpha_3$ ), un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine cytoplasmique totalisant environ 275 acides aminés (a.a.).  $\alpha_3$  est un domaine Ig hautement conservé chez toutes les molécules de classe I. Les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  forment ensemble le site de liaison peptidique. Ce domaine est composé de 180 a.a. formant un plancher en feuillets  $\beta$  entouré de deux hélices  $\alpha$ . Le site de liaison peptidique ou encore la niche peptidique ainsi formée peut accommoder un peptide linéaire de 8 à 10 a.a.

Durant sa formation dans le réticulum endoplasmique (R.E.), la chaîne  $\alpha$  doit être stabilisée par l'action des chaperons du R.E., Bip et calnexine, avant d'interagir correctement avec la  $\beta_2$ -m. Une fois les deux chaînes de la molécule de classe I réunies, la calnexine est relâchée et un autre chaperon se lie au complexe, la calréticuline. L'association de la calréticuline permet le recrutement de ERp57 (qui catalyse la formation des ponts disulfures entre les domaines au niveau des domaines  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  (4,5)) et de la tapasine. La tapasine fera le pont avec le complexe de chargement (TAP1, TAP2). Les molécules TAP (Transporter for Antigen Processing) font partie de la famille des « ATP binding cassette » (ABC) et sont responsables du transport des peptides de taille inférieure à 12 a.a. du cytosol au lumen du R.E. Grâce à la tapasine, la molécule de classe I nouvellement synthétisée conserve une conformation capable de lier ces peptides et ainsi compléter sa maturation et sa sortie du R.E. pour présenter son cargo à la surface cellulaire aux lymphocytes T CD8+. Sans chacun de ces chaperons, et en absence de lien peptidique

stable, les molécules de CMH de classe I seraient mal formées, instables, s'agrègeraient sans quitter le R.E. et seraient détruites (4,6).



**Figure 1.3 Sources potentielles des peptides présentés par les CMH I.** 1) protéines cytoplasmiques endogènes ou virales, 2) protéines défectueuses et transcrits incomplets (incluant les DRiPs (*defective ribosomal proteins*) et les produits de transcriptions cryptiques), 3) protéines provenant du R.E. et retransloquées au cytoplasme et 4) protéines internalisées par la voie endocyttaire se retrouvant par la suite dans le cytoplasme. Ces 4 premières sources de peptides sont protéasome et TAP et ERAAP (*ER aminopeptidase associated with antigen processing*) dépendantes. 5) La seule voie indépendante de la génération de peptides par le protéasome, implique plutôt une digestion protéique lysosomale menant à un chargement peptidique TAP indépendant. (Figure adaptée de (7)). Pour plus de détails sur la voie d'apprêtement des peptides présentés par les CMH I voir (8)



Dans le cytoplasme, la majorité des protéines cellulaires seront dégradées par le protéasome. Les peptides ainsi générés seront transloqués via TAP au R.E. et pourront être logés dans la niche des molécules de classe I. Ainsi les CMH I chargés de peptides accomplissent leur fonction en aidant les L.T cytotoxiques CD8+ à reconnaître et éliminer les cellules produisant des protéines anormales ou étrangères résultant de mutations ou d'infections. (Pour une revue plus complète sur la voie des CMH I se référer à (4,9,10)).

### 1.2.3 Les molécules de CMH de classe II

Les molécules de CMH de classe II sont des hétérodimères transmembranaires de 55-60 kDa. Elles sont formées de deux chaînes,  $\alpha$  (32-34 kDa) et  $\beta$  (29-32 kDa), associées de manière non-covalente et classiquement très polymorphiques, surtout au niveau de la chaîne  $\beta$ . On compte trois isotypes de CMH II chez l'homme (HLA-DR, DP, et DQ) et deux chez la souris (IA et IE). Structurellement, les deux chaînes sont très semblables, et la différence de poids moléculaire serait principalement le résultat de glycosylation différentielle. Chacune des deux chaînes forme deux domaines extracellulaires d'environ 90 a.a. chacun avec un domaine hydrophobe transmembranaire et une courte queue cytoplasmique à leur extrémité C-terminale. La structure tridimensionnelle des molécules de classe II rappelle celle des classe I surtout en ce qui a trait à la niche peptidique qui est aussi formée par 8 feuillets  $\beta$  encadrés par deux hélices  $\alpha$  formées par chacune des deux chaînes. Cette niche peptidique est ouverte des deux bords et permet d'accueillir des peptides de tailles variables puisque leurs extrémités peuvent dépasser des côtés ouverts de la niche (11,12). Le polymorphisme de la chaîne  $\beta$  des CMH II se concentre dans cette région et serait responsable pour la spécificité peptidique de chaque allotype de classe II différent (13).

Les molécules de CMH II jouent un rôle de présentation de peptides antigéniques similaire à celui des CMH I, par contre leur cargaison est acquise dans des compartiments spécialisés de la voie endocytaire et est indépendante du protéasome. Malgré des

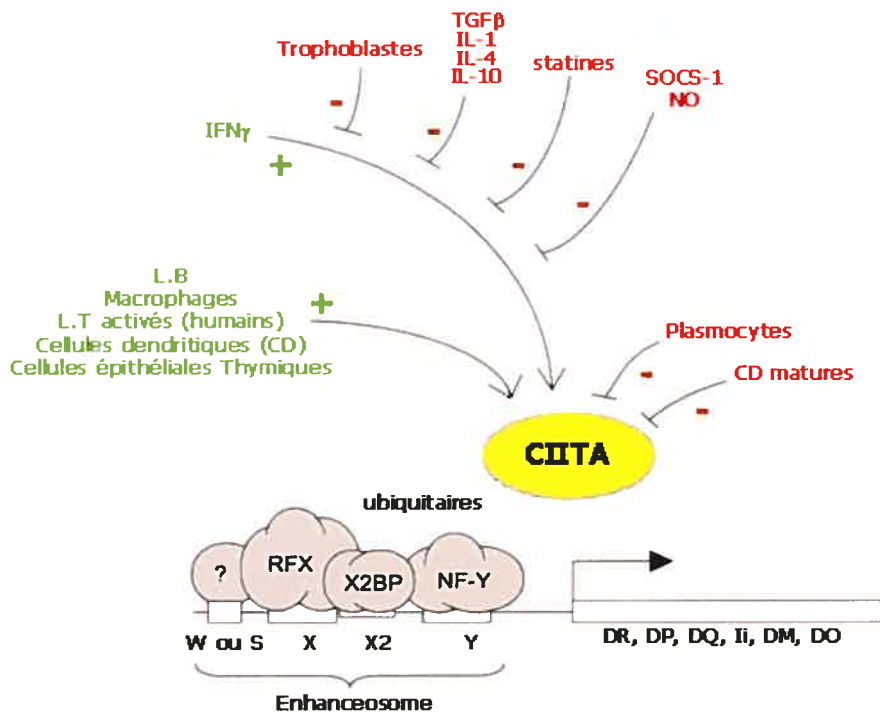
similitudes structurelles et fonctionnelles assez prononcées entre les molécules de CMH I et II, c'est de la localisation et l'origine du répertoire peptidique disponible pour le chargement, que la différence et la complémentation des fonctions apparaissent entre ces deux classes de molécules. Une des différences majeures se retrouve au niveau de leur distribution cellulaire. L'expression des CMH I est dépendante d'une génération peptidique constitutive via un complexe enzymatique constitutif - le protéasome - et est donc ubiquitaire. Par contre, la présentation par les CMH II est dépendante d'une voie endocytaire de génération peptidique qui se retrouve constitutive seulement chez certaines populations cellulaires très spécialisées ; les L.B, les cellules dendritiques (CD), les macrophages (MØ) et l'épithélium thymique. De par l'expression des molécules de classe II à la surface cellulaire, ces cellules sont nommées de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Il est important de noter que cette voie de présentation antigénique est normalement inductible par l'IFN- $\gamma$  dans la majorité des tissus (voir plus loin).

### 1.2.3.1 Régulation de l'expression des molécules de CMH II

Comparé aux CMH I, la régulation de l'expression des CMH II est plus complexe. En effet, les niveaux d'expression des CMH II varient selon l'état de différenciation ou d'activation des CPA. L'expression des CMH de classe II est restreinte aux CPA et aux L.T (humains) activés. Pour le reste des cellules, l'expression des CMH II est inductible par le biais de plusieurs facteurs dont l'IFN- $\gamma$  est le plus puissant. L'effet de l'IFN- $\gamma$  peut être inhibé par l'IFN- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-4 et la TGF- $\beta$  (14).

La régulation principale de l'expression des CMH II se fait au niveau transcriptionnel (15). Les promoteurs des gènes du CMH II sont caractérisés par des boîtes (S (ou W), X, X<sub>2</sub> et Y) reconnues chacune par des complexes ubiquitaires de protéines régulatrices tels que RFX, X<sub>2</sub>BP, et NFY (voir figure 1.3) (14). Le complexe macromoléculaire formé par l'engagement de ces boîtes est appelé « *MHC II enhanceosome* ». L'« *enhanceosome* » par lui même n'est pas suffisant pour activer la

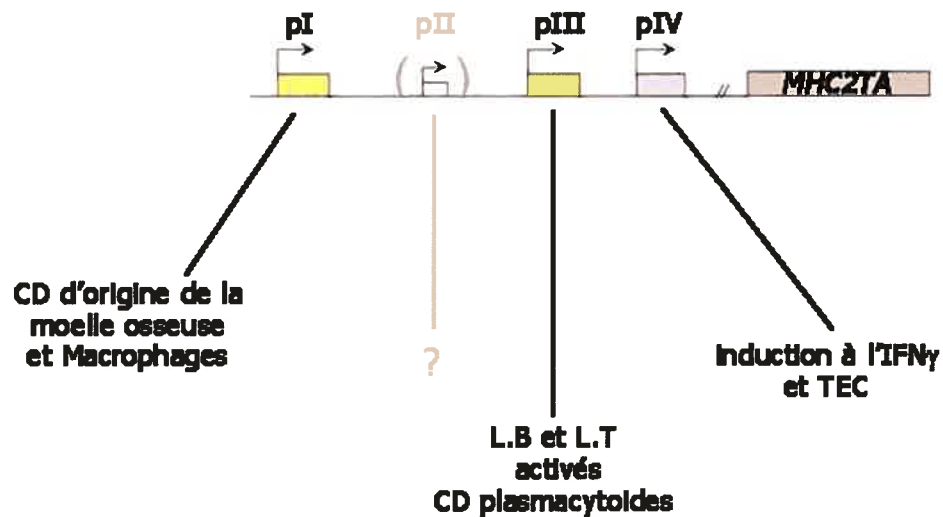
transcription. En revanche, c'est à ce dernier que viendra se rattacher CIITA (class II transactivator) pour lancer l'expression des gènes de classe II. CIITA est un activateur qui ne lie pas l'ADN, et qui a la capacité d'acétyler les histones (Histone Acétylase Transférase, HAT) permettant le relâchement de la chromatine pour faciliter la transcription des gènes. De plus, une fois en interaction avec le « *enhanceosome* », il recrute d'autres protéines HAT (p300, CBP et pCAF) (14).



**Figure 1.4** Schéma représentant les éléments influençant positivement (vert) ou négativement (rouge) l'expression de CIITA et des molécules de classe II. CIITA est exprimé de façon inductible (voie de l'IFN- $\gamma$ ) ou de façon constitutive chez les L.B, macrophages, cellules dendritiques et cellules épithéliales thymiques. De plus CIITA peut être induit ou réprimé suite à l'activation (L.T activés humains) ou la maturation de certaines cellules (plasmocytes, CD matures). (Image modifiée de LeibundGut-Landmann *et al.* (14)).

Étant donné la nature ubiquitaire des complexes protéiques liant les boîtes des régions promotrices (S, X, X<sub>2</sub> et Y) des classes II, c'est la présence de CIITA qui dicterait le schéma d'expression des CMH II à travers les cellules de l'organisme. Donc la

régulation de l'expression des CMH II passe par celle de CIITA qui est elle aussi principalement transcriptionnelle. La régulation de la transcription de *MHC2TA* (le gène codant pour CIITA) est spécifique au type cellulaire et passe par 4 séquences promotrices pI à pIV, en amont du codon d'initiation (voir figure 1.5). pII est la région la moins active des 4 régions promotrices et est unique à l'humain. Son fonctionnement reste encore mal compris. Le promoteur pI serait le promoteur principal pour lancer l'expression de CIITA dans les cellules dendritiques (CD). pIII est le promoteur de *MHC2TA* utilisé par les L.B, les L.T activés et les CD plasmacytoïdes. pIV est le promoteur inducible par l'IFN- $\gamma$ . Outre le rôle essentiel pour l'expression des molécules de classe II, CIITA augmente l'expression des CMH I et de la  $\beta$ 2-m puisque l'expression de ces gènes dépend de la formation du même « *enhanceosome* » sur leurs boîtes (S, X, X<sub>2</sub> et Y) promotrices. Par contre, CIITA n'est pas essentiel pour l'expression des CMH I ou de  $\beta$ 2-m, la formation de l'« *enhanceosome* » suffit pour assurer leur transcription.



**Figure 1.5 Régulation de la transcription de gène *MHC2TA* dans les différentes cellules.** (CD : cellules dendritiques, L.B et L.T : lymphocytes B et T, TEC : Cellules épithéliales thymiques) (Image modifiée de LeibundGut-Landmann *et al.* (14)).

### 1.2.3.2 Distribution de l'expression de CIITA et des CMH II

- 1- Les L.B : les L.B expriment CIITA à l'aide du promoteur pIII (Figure 1.5) (16)
- 2- Les CD : On peut distinguer deux groupes de CD en fonction du promoteur utilisé pour exprimer CIITA. Les CD d'origine de la moelle osseuse (monocytes, splénocytes...) utilisent pI et à une fréquence beaucoup moindre pIII (17), par contre les CD plasmacytoïdes utilisent exclusivement pIII. (18)
- 3- Les L.T activés : Chez l'homme, l'activation des L.T engendre l'expression de CMH II à la surface. Ceci est dû à une induction de l'expression de CIITA. Chez la souris cette observation est confirmée mais les niveaux de CIITA induits sont plus faibles et incapables de mener une expression détectable de CMH II à la surface. L'expression de CIITA induite par l'activation des L.T passe par le promoteur pIII de *MHC2TA*.
- 4- Les cellules stimulées par L'IFN- $\gamma$  : En réponse à l'IFN- $\gamma$ , les cellules CMH II<sup>-</sup> qui y sont exposées produisent et présentent à leur surface des molécules de CMH II grâce à l'activation de la transcription du gène *MHC2TA* via le promoteur pIV. Cette activation mènerait à la production de CIITA et la transactivation des gènes de CMH II incluant Ii, DM, DO $\alpha$  et beaucoup moins DO $\beta$  (19). L'activation de *MHC2TA* par l'IFN- $\gamma$  est indirecte et passe via la production d'IRF-1 (*interferon response factor-1*) qui est elle même induite par l'IFN- $\gamma$ . Cette cascade expliquerait le délai de l'induction des CMH II par l'IFN- $\gamma$  (voir chapitre 3) (14,20).

- 5- Les Macrophages : Le traitement des MØ par l'IFN- $\gamma$  mène à une production de CIITA via pIV mais surtout via pI (20). On a d'ailleurs observé que la production de CIITA via pIV serait transitoire tandis que celle via pI est de plus longue durée. Chez les souris ayant une délétion du promoteur pIV, on n'observe aucune perte de CMH II sur les MØ induits à l'IFN- $\gamma$  démontrant que pI est le promoteur principalement sollicité chez ces cellules. L'activation de ce promoteur par l'IFN- $\gamma$  demeure cependant mal caractérisée (21).

La régulation ne signifie pas uniquement une activation de l'expression de CIITA, mais aussi son inhibition (figure 1.4). Plusieurs mécanismes sont utilisés pour s'assurer de l'arrêt de la production des CMH II. Dans le cas des CD, durant leur maturation suite à la rencontre de l'Ag, elles arrêtent de produire des CMH II *de novo*. Ceci fait suite à une inactivation rapide de *MHC2TA* par déacétylation des histones à proximité (17). Pour les L.B, lors de leur différenciation en plasmocytes, la région pIII du promoteur de *MHC2TA* devient complètement dénudée de facteurs de transcription (22,23), ce qui explique l'arrêt de production de CIITA et par le fait même celle des CMH II. Les travaux du groupe de Calame impliquent la protéine Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) dans la répression transcriptionnelle de *MHC2TA* (24). En effet, Blimp-1 recrute la déacétylase d'histone 2 (*histone deacetylase 2*, HDAC2) (25) et la transférase de groupement méthyle G9a (26) à l'« *enhanceosome* ». Ces deux composantes agissent sur la Lysine 9 (K9) de l'histone H3. En fait, les modifications (acétylation et méthylation) post-traductionnelles des histones sont reconnus pour modifier (activer et réprimer respectivement) la régulation des gènes (27).

En ce qui concerne l'induction par l'IFN- $\gamma$ , elle peut être contrecarrée par l'intermédiaire de cytokines antagonistes comme l'IL-1, 4 et 10 ainsi que l'IFN- $\alpha$  et surtout le TGF- $\beta$  (figure 1.4). De plus, l'induction par l'IFN- $\gamma$  de la production de classe II sur les tissus CMH II est un phénomène transitoire. En effet, il y aurait un système de rétro-

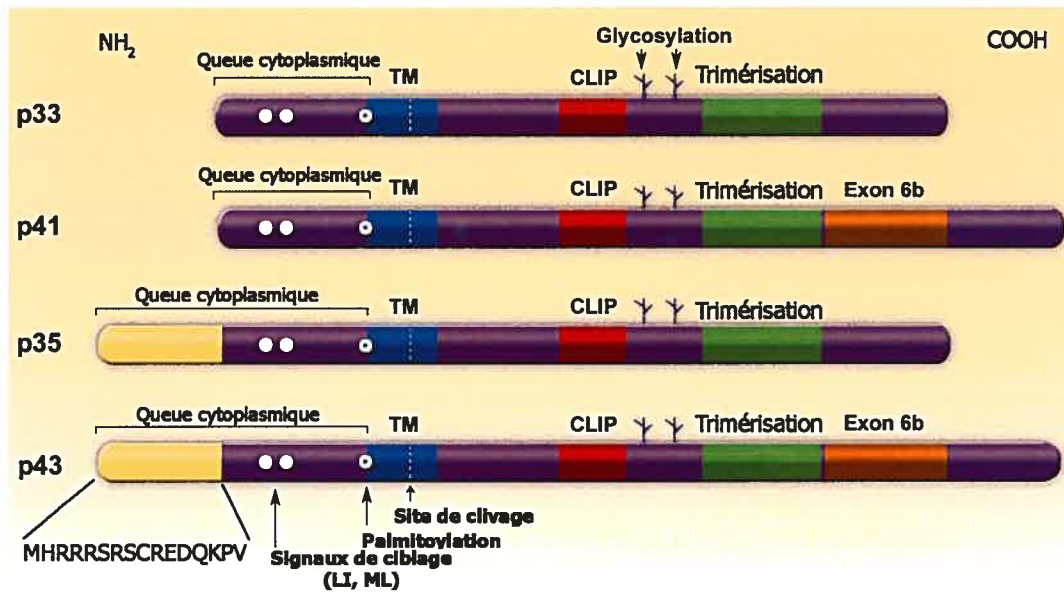
contrôle permettant d'arrêter l'expression des CMH II. L'IFN- $\gamma$ , tout en activant l'expression de *MHC2TA* via pIV, active aussi SOCS-1 (*suppressor of cytokine signaling-1*), une protéine qui inhibe la transmission du signal du récepteur de l'IFN- $\gamma$  en inhibant l'activité kinase de Jak-2 (28,29).

Tous ces moyens de régulation sont induits lors de la maturation des cellules en question, ou par l'action de cytokines. Il existe un dernier mécanisme de suppression de CIITA qui serait plutôt constitutif et servirait à éviter une induction par l'IFN- $\gamma$  au niveau des trophoblastes. Ce mécanisme demeure mal caractérisé et est controversé dans la littérature ; trois pistes de repression d'expression (*silencing*) sont proposées. Le premier mécanisme, repose sur une hyperméthylation au niveau de pIV empêchant l'attachement d'IRF-1 (30,31). D'autre part, les travaux de Greisson *et al.* montrent l'existence d'un ARNm non traduit qui inhiberait les promoteurs pIII et pIV de CIITA possiblement par un mécanisme d'hybridation complémentaire ARN-ADN, indépendant de la méthylation (32,33). Finalement, le groupe de Holtz rejette l'hypothèse de l'hyperméthylation des histones au niveau de pIV et favorise plutôt un mécanisme de déacétylation des histones causant l'enroulement compact de la chromatine rendant le promoteur inaccessible aux protéines de transcription (34,35). Quelque soit le mécanisme utilisé, l'inhibition de l'expression de CIITA aide le fœtus à échapper au système immunitaire de la mère en évitant une réponse allogénique envers les molécules de classe II à la surface des trophoblastes (34).

#### 1.2.4 La chaîne invariante

La chaîne invariante (Ii) est une protéine transmembranaire de type II non polymorphique. On lui connaît 4 isoformes chez l'humain transcrites du même gène résultants d'épissage alternatif ou d'initiation de traduction différentielle. La forme majeure de Ii est de 33kDa, compte 216 a.a. et est désignée p33. L'initiation de la traduction au

niveau d'un deuxième codon AUG rajoute 16 a.a. au domaine cytoplasmique de *Ii* ramenant son poids moléculaire à 35 kDa, d'où l'isoforme p35. p41 et p43, des formes moins communes, sont le résultat du rajout d'un exon, par épissage alternatif de l'ARN, à l'extrémité C-terminale codant pour 64 a.a. à p33 ou p35 respectivement (voir figure 1.6) (36,37). p35 et p43 n'existent ni chez la souris ni le rat.



**Figure 1.6 Les quatre isoformes de la chaîne invariante humaine :**

Les différents domaines fonctionnels sont indiqués : la queue cytoplasmique, le domaine transmembranaire, CLIP, et le domaine de trimérisation. La séquence de l'extension de la queue cytoplasmique est aussi indiquée. On y distingue le motif de rétention dans le R.E. (Arg-X-Arg) et la sérine 8. On retrouve aussi les deux sites de glycosylation au niveau des résidus Asn 114 et 120 (en p33).

#### 1.2.4.1 Domaines fonctionnels de la chaîne invariante

Dans le R.E., grâce au domaine de trimérisation (Figure 1.6), les molécules de chaînes invariantes néo-synthétisées s'associent en trimères formant un échafaudage qui permet le recrutement de trois hétérodimères  $\alpha/\beta$  de classe II. À cause de la prévalence des isoformes p33 et p35 dans les CPA humaines, on retrouve surtout des homotrimères de p33 ou des trimères formés à la fois par p33 et p35 (38). Ainsi *Ii* agit en premier lieu comme



molécule chaperonne qui favorise le bon repliement des hétérodimères  $\alpha/\beta$  nouvellement synthétisés (39). En effet, l'absence de Ii dans certains systèmes cellulaires résulte en une agrégation des CMH II dans le R.E. et une diminution des niveaux de leur expression en surface, indiquant des problèmes d'assemblage, de sortie du R.E. et de transport à travers la cellule (40-43). Il est à noter que l'expression de Ii n'est pas essentielle à l'expression des CMH II en surface et que la dépendance des CMH II pour Ii est relative aux allèles de classe II étudiés et aux différents types cellulaires (44).

L'association de la chaîne invariante avec les molécules de CMH II se fait principalement via le domaine CLIP qui se loge dans la niche peptidique empêchant sa fermeture sur elle même et prévenant son le chargement de peptides ou polypeptides du soi, natifs au R.E. (45). D'autres régions de Ii contribuent aussi à stabiliser l'interaction avec les CMH II dont le domaine transmembranaire (46).

Les Asn 114 et 120 (positions relatives à la forme p33) sont glycosylées (voir figure 1.6). La présence de résidus glycosylés à ce niveau sur la chaîne invariante protège cette dernière d'une dégradation prématurée dans les endosomes précoces et assure la libération des CMH II de Ii dans des compartiments propices à l'échange peptidique pour un peptide antigénique (47).

Dans leur queue cytoplasmique, toutes les formes de Ii possèdent un signal de ciblage conservé chez les espèces mammifères. Ce signal est composé de 2 motifs di-leucine LI et ML et est essentiel pour le ciblage endo/lysosomal du complexe  $(\alpha\beta Ii)_3$  (48-50). Cependant, on observe une fraction de complexes CMH II/Ii arrivés par la voie de défaut en surface qui sont rapidement réinternalisés vers les endosomes (51,52). L'internalisation rapide du complexe dépend des vésicules de clathrine et se fait grâce aux mêmes motifs di-leucine de la queue de Ii (voir plus loin « transport des molécules de classe II »).

Les formes de Ii (p35 et p43) résultant de l'initiation de la traduction au niveau du codon AUG alternatif, en 5' par rapport à celui de p33, ont une extension cytoplasmique de 16 a.a. comportant un motif RXR. Lorsqu'il est accessible, ce motif est responsable de la rétention dans le R.E. (53) (revu par Michelsen *et al.* (54)). Les molécules Ii nouvellement synthétisées forment des trimères qui, selon la disponibilité, sont des homotrimères de p33 ou encore des trimères mixtes de p33 et p35. Les homotrimères de p33 sont libres de quitter le R.E. puisqu'ils sont dépourvus de signal de rétention. Par contre les complexes contenant au moins une seule molécule de p35 se retrouvent retenus dans le R.E. jusqu'à ce que le ou les motifs de rétention soient masqués. Les travaux de notre laboratoire ont démontré que l'interaction avec des molécules de CMH II est suffisante pour masquer le signal de rétention et permettre au complexe de quitter le R.E. C'est la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  qui serait responsable du masquage (55,56). Le signal de rétention de p35 pourrait servir à favoriser la rencontre entre les CMH II néosynthétisées et les trimères de Ii au niveau du R.E.

De plus, la queue cytoplasmique de Ii semble promouvoir la fusion des endosomes qui en sont riches, en de large compartiments, impliquant la chaîne invariante dans la régulation de la vacuolation et de la morphologie des compartiments endosomaux (57,58). Cette fonction pourrait avoir des conséquences sur la voie de présentation antigénique par les CMH II, que le motif de rétention unique à p35 peut contribuer à moduler.

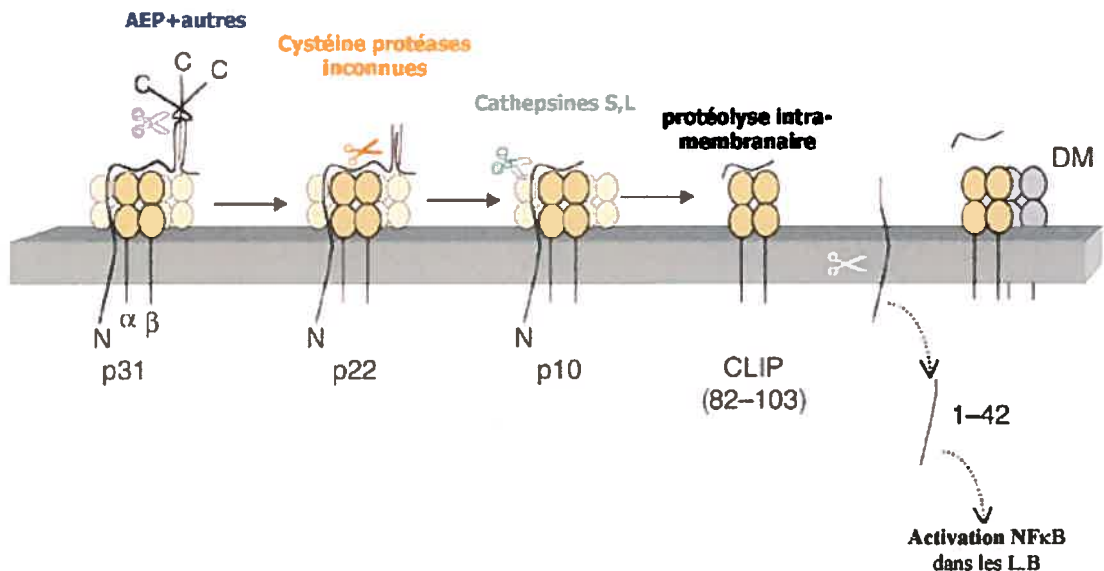
### **1.2.5 Assemblage et transport des molécules de classe II**

Dans le R.E., les chaînes de CMH II s'associent à un trimère de Ii (59) pour former un complexe nonamérique et migrer vers l'appareil de Golgi. Cette interaction assure une conformation optimale des molécules de classe II et favorise leur sortie du R.E. En effet, il a été montré qu'en absence de Ii, une partie importante des molécules de classe II synthétisées dans le R.E. y sont retenues et s'y agrègent (40,41,60). Une fois les nonamères ( $\alpha\beta Ii$ )<sub>3</sub> formés, ces derniers quittent le R.E. et traversent l'appareil de Golgi pour atteindre

le réseau trans-Golgi (TGN). Les protéines sortant de ce réseau suivent une des deux voies, endocytaire ou la voie de défaut lorsqu'elles sont destinées à être secrétées ou exprimées à la membrane plasmique. Les deux motifs de type di-leucine (LI, ML) se trouvant dans la queue cytoplasmique de Ii dirigent le complexe vers la voie endocytaire (48). À cette étape, il n'est toujours pas clair si le complexe  $\alpha\beta$ Ii se dirige directement aux endosomes (61) ou s'il transite par la surface avant d'atteindre les compartiments endosomaux de chargement peptidique (52,62). On trouve dans la littérature des évidences supportant les deux modèles quoique personne ne dispute l'arrivée de complexes  $\alpha\beta$ Ii à la surface malgré les motifs di-leucine de la queue de Ii. Il est actuellement accepté que le chemin suivi par les molécules nouvellement synthétisées, dépend des CPA étudiées. Récemment, deux équipes indépendantes ont démontré que la livraison des complexes classe II-Ii aux endosomes relève d'une voie dépendante de clathrine via AP-2 et que l'absence des autres protéines adaptatrices pouvant reconnaître et interagir avec les 2 motifs di-leucine sur Ii (AP-1 et de façon moindre AP-3) n'aurait aucun effet détectable sur le transport des complexes  $\alpha\beta$ Ii dans les modèles cellulaires étudiés, dont HeLa CIITA<sup>+</sup> (63,64). À la lumière de ces nouvelles études, il semblerait que les complexes de classe II-Ii transitent par la surface avant d'être internalisés vers les endosomes précoces dans des vésicules de clathrine, suite au recrutement d'AP-2 à la membrane cellulaire.

La voie endocytaire n'est pas unique aux CPA. Par contre les CPA ont la particularité d'intégrer la voie des CMH II à la voie endocytaire transformant cette dernière en voie d'apprêtement et de chargement de peptides antigéniques. En gros, la voie endocytaire est formée de compartiments vésiculaires communément appelés endosomes. C'est vers ces compartiments que les cellules acheminent le matériel internalisé du milieu externe, normalement pour des fins de dégradation et de digestion. Selon les capacités des différentes populations cellulaires, l'internalisation peut prendre différentes formes (de pinocytose à phagocytose) et peut inclure différentes tailles de matériel internalisé allant de matériel liquide (incluant les protéines solubles) jusqu'à internalisation de cellules apoptotiques entières.

Dans le cas des CMH II, les endosomes font partie du chemin qu'elles traversent afin d'acquérir une cargaison peptidique et de parvenir à présenter ces peptides antigéniques en surface. Les premiers compartiments endosomaux rencontrés sont les endosomes précoces. Ces derniers exhibent une faible activité protéolytique et ont un pH interne légèrement acide. Les protéines qui s'y retrouvent, incluant les CMH II, ont un temps de résidence ne dépassant pas les quelques minutes (65), et se trouvent transportées vers les endosomes tardifs. Ces endosomes sont riches en différentes protéases et ont un pH interne plus acide. À cause de l'accumulation des molécules de classe II dans ce genre de compartiments, les endosomes tardifs sont nommés MIIC (*MHC class II compartments*) (65-67). Dès leur arrivée dans les MIIC, les complexes  $(\alpha\beta I_i)_3$  subissent l'action des protéases et la chaîne invariante se fait dégrader séquentiellement de façon C- vers N-terminale. La dégradation de  $I_i$  débute par l'action de l'AEP (asparginyl endopeptidase) sur le résidu Asn 155 (68) qui sépare le domaine de trimérisation du restant de la chaîne invariante  $I_{ip22}$ .  $I_{ip22}$  étant l'intermédiaire de 22kDa de  $I_i$  demeurant associé aux molécules de CMH II (voir Figure 1.7).



**Figure 1.7** Les étapes de dégradation de  $I_i$ . Pour les détails, voir le texte. (Image traduite de (69))

Au fur et à mesure que le complexe avance dans la voie endocytaire vers les endosomes (MIIC) plus tardifs, plusieurs autres protéases, sous l'effet du pH réduit, passent de leurs formes zymogènes (précurseur inactif) à leurs formes actives (70,71). Ainsi, suite à l'action de certaines cystéines protéases encore non identifiées, Iip22 est dégradée en Iip10 qui reste attachée à sa molécule de classe II via CLIP. Jusque là, Ii conserve sa queue cytoplasmique et ses signaux de ciblage permettant au complexe  $\alpha\beta$ Ii de demeurer dans les MIIC. La digestion de Iip22 en Iip10 rend le côté N-terminal de CLIP accessible (47) aux cathepsines S (CD et L.B (72,73)), L (cellules épithéliales thymiques TEC (74)) et F (avec S et L dans les MØ (75)) qui libéreront les molécules de CMH II de Ii en ne laissant que le CLIP protégé par la niche peptidique. À ce moment les complexes  $\alpha\beta$ -CLIP ne sont plus retenus par les motifs di-leucine de la queue cytoplasmique de Ii et sont libres de quitter les MIIC pour aller à la surface cellulaire. Afin d'accomplir leur rôle de présentation de peptides antigéniques, ces complexes doivent, avant de quitter les MIIC, échanger le CLIP pour des peptides générés dans les endosomes. Quelques allotypes de CMH II sont capables de relâcher spontanément le CLIP comme HLA-DR4 et DR5 (44), alors que d'autres sont entièrement dépendants de la catalyse de cette réaction par HLA-DM (H-2M chez la souris).

## **1.2.6 Chargement des peptides sur les molécules de CMH II**

### **1.2.6.1 Génération des ligands peptidiques**

Tout comme la dégradation de la chaîne invariante, les protéines internalisées passent par la voie endocytaire afin d'être dégradées en peptides. C'est une course qui a lieu entre l'effort de création d'épitopes antigéniques capables d'interagir avec la niche peptidique et celui de la dégradation complète des protéines internalisées. Tout comme dans le cas de la chaîne invariante, on suspecte une dégradation protéique séquentielle accompagnant l'acquisition progressive des activités protéolytiques dans les compartiments endosomaux de plus en plus tardifs et aussi accompagnant une dénaturation structurelle de

plus en plus prononcée avec les changements des conditions réductrices (concentrations élevées en cystéines (76,77)), de pH et, dans le cas de certaines protéines, la disponibilité d'enzymes hydrolysant les ponts disulfures (par exemple : GILT (78)). En effet, tous ces facteurs contribuent de façon importante et déterminante à la production de certains épitopes.

Dépendamment de la voie d'entrée empruntée par les Ag jusqu'aux compartiments endosomaux, leur dégradation et la génération de certains peptides diffèrent. La différence réside dans l'accessibilité ou non de certaines régions des protéines antigéniques à l'effet des protéases. Pour qu'un peptide soit présenté, il faut qu'il soit disponible lorsque les CMH II sont capables de le lier ; en d'autres termes, il faut qu'il survive à la dégradation protéique et qu'il soit sous forme linéaire, accessible lorsque la niche des CMH II est libérée de CLIP et prête à le recevoir. Prenons l'exemple des épitopes susceptibles à la dégradation dès les endosomes précoces. Cette situation rend leur présentation quasi impossible puisque les CMH II se retrouvant dans ces compartiments sont rares et sont généralement chargés de CLIP. La possibilité de présenter ces peptides est assurée, surtout quand ces derniers sont spécifiques à la fonction de la CPA en question (le cas des L.B et la reconnaissance par le BcR (récepteur des L.B)) ou encore quand ils sont spécifiquement reconnus comme étrangers et potentiellement pathogènes (la reconnaissance et la capture par des récepteurs de surface FcR ou encore TLRs (*Toll like receptors*)). Une étude en particulier montre que la capture récepteur-spécifique (Ig de surface BcR) de l'Ag (toxine tétanique TT) affecte le schéma de sa dégradation et la nature du peptide ultimement présenté par les molécules de CMH II à la surface (79). D'autre part, les travaux d'Amigorena *et al.* et Bonnerot *et al.* de 1998 adressent le ciblage vers les endosomes tardifs/lysosomes des antigènes capturés par les L.B via leurs récepteurs Fc (FcR) (80,81). Ils démontrent que les complexes immuns (CI) capturés par les Fc $\gamma$ RI et III sont acheminés vers les lysosomes dans les L.B et les CD. Dans les L.B, ce ciblage est dépendant du recrutement de la tyrosine kinase syk aux motifs ITAM de la chaîne  $\gamma$  des FcR impliqués. Dans les CD, le ciblage aux lysosomes se fait indépendamment de syk, par contre, la

maturation de ces cellules nécessite le recrutement de syk aux ITAM des Fc $\gamma$ R (82,83). Cet accès direct aux lysosomes augmente l'efficacité de la présentation antigénique aux L.T. Un troisième membre de la famille des Fc $\gamma$ R a été décrit comme inhibiteur à la présentation et la maturation des CD ainsi que la prolifération des L.B suite à l'engagement de leur BcR (84). Ces études prises ensembles montrent l'existence de cheminements distincts de dégradation antigénique selon les récepteurs de surface engagés par l'Ag d'intérêt. La publication récente de Bergtold *et al.* (85) supporte cette observation et prouve que Fc $\gamma$ RIIB joue le rôle d'inhibiteur de présentation de l'antigène, de son apprêtement et de sa dégradation. Il serait responsable de faire échapper l'Ag à la dégradation lysosomale. Fc $\gamma$ RIIB ciblerait l'Ag à un nouveau compartiment des CD duquel il sera recyclé intact à la surface pour servir à être reconnu par le bon BcR et amener à une réponse humorale T indépendante (85). D'autres exemples non moins importants d'endocytose de l'Ag via un récepteur particulier sont connus aussi, citons les TLR, les lectines de surface des CD et les récepteurs du complément CR2. En bref, l'engagement des TLR mène à la maturation des phagosomes en phagolysosomes. Les CD provenant de souris MYD88<sup>-/-</sup> ont été trouvées beaucoup moins efficaces dans l'ingestion, la présentation et l'activation des L.T CD4<sup>+</sup> par des Ag bactériens comparés aux CD de souris dont la voie des TLR est intacte (86-88). De plus, une étude par le groupe de Rolf Steinmen a montré que le récepteur de surface DEC-205 des CD améliore de 100 à 1000 fois l'efficacité de la présentation des Ag solubles par les voies de CMH I et II (89) grâce à sa capacité d'être internalisé via les vésicules de clathrine.

L'endocytose récepteur-spécifique de l'Ag porte donc un avantage très important, surtout lorsque l'Ag se retrouve en faibles concentrations (90). Elle permet de concentrer ce dernier dans les MIIC en rendant sa capture et sa présentation à la surface plus rapide et beaucoup plus efficace (jusqu'à 1000 fois) (89). Les voies disponibles aux peptides antigéniques pour accéder aux niches peptidiques des CMH II sont donc diverses, et ceci est à l'avantage d'une présentation peptidique des plus variées et des plus ciblées possible.

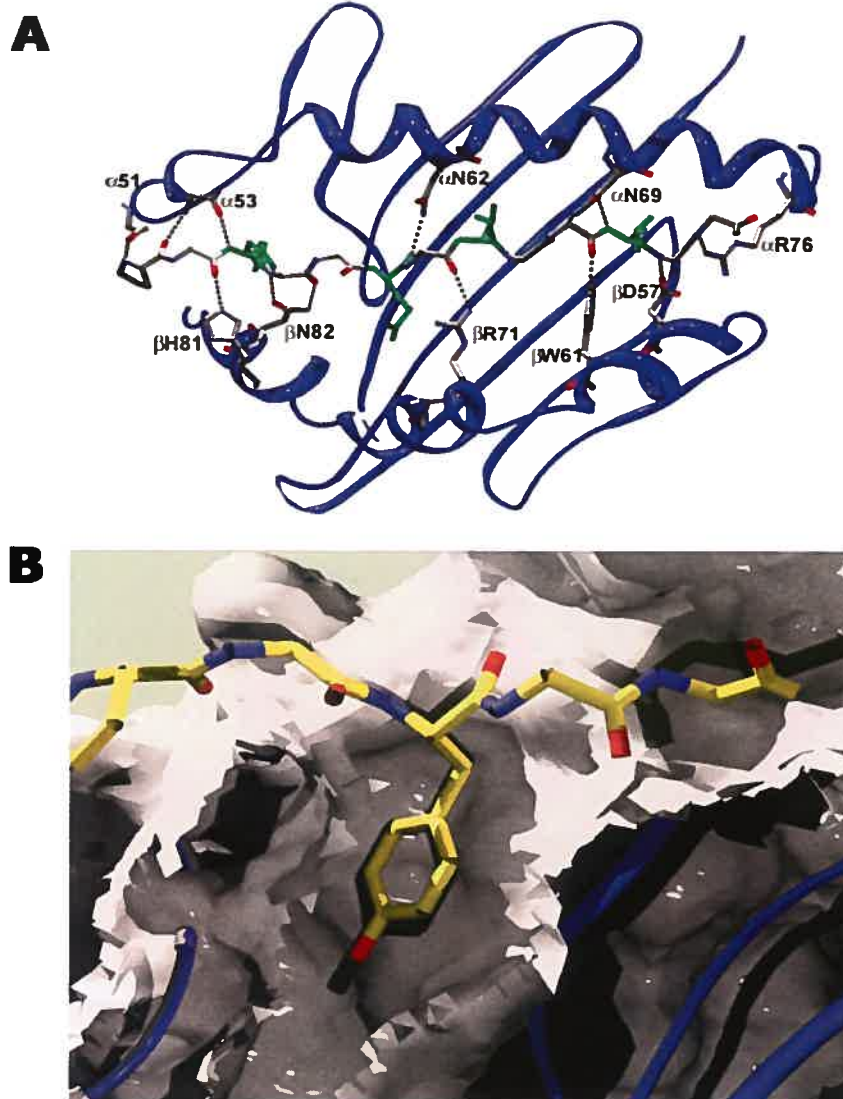
### 1.2.6.2 Nature de l'interaction CMH II-peptide

Dès la première cristallisation d'un complexe CMH II-peptide (HLA-DR1-HA<sub>306-318</sub>) (91), il fut évident que 2 genres d'interactions sont impliquées entre la niche peptidique et le peptide. Le cristal a permis d'identifier 5 poches d'ancrage, dans la niche, servant à accommoder les acides aminés en position P1, P4, P6, P7 et P9 du peptide (de N-terminal à C-terminal). De plus, on a démontré l'existence d'une douzaine de ponts hydrogènes formés entre des résidus des hélices  $\alpha$  des deux chaînes entourant la niche et le peptide (91) (figure 1.8). Ceci, rajouté au fait que les résidus des hélices  $\alpha$  sont conservés à travers les espèces et que le polymorphisme allélique des CMH II se concentre dans le plancher de la niche peptidique au niveau des poches d'ancrage, explique l'identification des poches comme étant les éléments conférant la spécificité des CMH II à leurs ligands peptidiques. De leur côté, les ponts hydrogènes seraient responsables de la stabilité et de la longévité du complexe CMH II – peptide. Dans la majorité des études effectuées sur le chargement peptidique des CMH II (autant humains que murins), un biais vers l'extrémité N-terminale du peptide a été observé. En effet, la production de complexes CMH II – peptides SDS-stables et compacts dépend de la stabilité de l'ancrage de l'acide aminé en position N-terminale du peptide dans la poche P1 (92,93). La stabilité SDS de ces complexes ne signifie pas nécessairement une stabilité cinétique (94). Afin d'activer efficacement les L.T, il ne suffit pas seulement de former des CMH II – peptide compacts, mais il faut aussi que ces complexes persistent assez longtemps à la surface pour qu'ils soient reconnus, d'où l'importance de la demi-vie exprimée en fonction du taux de dissociation du peptide (*off-rate*). Une fois un peptide lié à la niche, donc compatible avec les poches d'ancrage, le taux de dissociation du peptide est faiblement influencé par l'interaction des poches avec le peptide même, par contre les ponts hydrogènes affectent dramatiquement le « *off-rate* » et donc influencent la longévité des complexes CMH II – peptides. Le biais N-terminal, en



terme de contribution énergétique dans la liaison CMH II – peptide, est aussi vrai pour les interactions avec les poches d’ancrage que pour les ponts hydrogènes (92); généralement, les ponts hydrogènes en extrémité N-terminale contribuent significativement plus à la stabilité et la longévité des complexes que ceux en extrémité C-terminale.

Le fait que les taux d’association ( $K_a$ ) et de dissociation ( $K_d$ ) soient très lents (95,96), de l’ordre de quelques centaines d’heures, démontre le besoin de catalyseurs pour assurer une liaison de peptide efficace mais aussi pour dissocier le CLIP (et autres). La diminution du pH dans les compartiments endosomaux représente une partie de la solution. Il a été montré que des pH de 2,5 à une température de 37°C suffisent pour l’élution des peptides des CMH II (97), mais ces conditions de pH ne sont pas physiologiques. En effet les conditions endosomales de pH affectent la conformation des CMH II et les aident à adopter la conformation ouverte (98-100) sans toutefois être capables de détruire les ponts hydrogènes et dégager les peptides (CLIP et autres). Pour répondre à ce besoin, les CPA font appel à DM.



**Figure 1.8 La niche peptidique du complexe HLA-DR1 – HA<sub>306-318</sub>**

A) Représentation de la vue de haut ; en vert on voit les résidus avec leurs chaînes latérales interagissant avec les poches d'ancrage majeures P1, P4, P6 et P9. L'extrémité N-terminale du peptide se retrouve à gauche. Sont montrés aussi les résidus conservés des hélices  $\alpha$  des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  formant des ponts H avec le peptide. B) On montre la tyrosine en position 3 du peptide HA (PKYVKQNTLKLAT) occupant la poche profonde P1 de la niche de HLA-DR1 (image adaptée de (92)).

### 1.2.6.3 Rôle de DM dans le chargement peptidique

Le mode le plus simple de chargement des CMH II par des peptides se fait à la surface et nécessite la disponibilité du peptide en question dans le milieu extracellulaire. En effet, ce mode de chargement est couramment employé, dans des procédures expérimentales et est connu sous le nom de « *peptide pulsing* ». Quoique inefficace (besoin de concentrations élevées de peptide et non de protéine native) ce mode de présentation est documenté *in vivo* autant pour les CMH II que les CMH I (101,102). Il serait en fait aidé par la présence de protéases extracellulaires aidant à former les ligands peptidiques (101,103), la présence de molécules de CMH II vides et en conformation réceptive (104), et aussi par la présence du catalyseur de l'échange peptidique DM fonctionnel en surface (105). Malgré cela, ce mode de capture et de présentation de peptides exogènes demeure probablement le moins efficace. En plus ce mode de présentation semble aboutir à des isomères conformationnels des complexes CMH – peptide non conventionnels pouvant conduire à l'autoimmunité (106,107), (revue dans (108)).

DM est un hétérodimère formé d'une chaîne  $\alpha$  (30-31 kDa lorsque glycosylée) et d'une chaîne  $\beta$  (33-35 kDa après glycosylation). DM (HLA-DM chez l'homme et H2-M chez la souris) est une molécule de classe II non-classique, similaire au niveau de sa structure (109,110) et des séquences (111), aux molécules classiques de CMH II. Les gènes *DMA* et *DMB*, codant pour les deux chaînes, sont situés dans la région des classe II du locus des CMH, et leur expression est sous le contrôle du transactivateur des classe II, CIITA. DM est peu polymorphique (112) et tel que révélé par les cristaux publiés des molécules HLA-DM et H2-M (109,110), DM est incapable de présentation peptidique (113), à cause du rapprochement des deux hélices  $\alpha$  bloquant sa niche peptidique. De plus, à la place de s'exprimer en surface, DM est généralement retrouvé concentré dans les MIIC et les lysosomes (114) à un ratio de DM : DR de 1 : 5 (115). Pour s'y rendre, DM ne dépend pas de la chaîne invariante mais porte dans la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$

un motif YPTL (116,117). Ce motif est un signal de localisation aux endosomes tardifs/lysosomes qui redirige l'expression de DM de la surface et l'accumule dans les MIIC (114,116-118). La mutation de ce motif de ciblage mène à une forte expression de DM en surface (116). Des études du ciblage intracellulaire de HLA-DM ont démontré que l'accumulation de DM dans les MIIC est dépendante des vésicules de clathrine suggérant que DM atteint les endosomes via la surface (119). Cependant, DM est détectée à la surface des cellules de Langerhans (120), des L.B et des CD immatures et semble y être fonctionnelle (105). L'interaction de DM avec les molécules de CMH II classiques a été observée grâce aux expériences de co-immunoprécipitation *in vitro* et *in vivo*. Ces études montrent que cette association est optimale à des conditions de bas pH, semblables à celle retrouvées dans les compartiments MIIC (121-123).

DM est une molécule déterminante pour assurer un échange peptidique efficace mais est aussi d'une grande influence sur le répertoire peptidique présenté. L'incidence de l'expression de DM est visible à au moins 4 niveaux différents :

- 1- Catalyseur d'échange peptidique : En présence de DM on a observé une relâche accélérée de CLIP, libérant ainsi la niche peptidique des CMH II néo-synthétisés (121,123,124). Des analyses cinétiques de l'échange peptidique en présence et en absence de DM confirment l'activité catalytique de DM (125). DM agit aussi sur les complexes CMH II – peptide déjà formés et accélère la relâche de la cargaison peptidique (126) pour permettre l'association de nouveaux peptides s'il y a lieu.
- 2- Editeur des peptides : Les études de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et de spectrométrie de masse (127,128) ainsi que les études utilisant des L.T peptides spécifiques (129) montrent une influence de DM sur le répertoire peptidique présenté à la surface. En effet, en présence ou absence de DM on peut voir augmenter la présentation de certains peptides et diminuer d'autres (130).

- 3- Chaperon moléculaire : Une fois la relâche de CLIP catalysée par DM (CLIP - CMH II *de novo* - ou autre - CMH II recyclés), ce dernier reste associé à la molécule de classe II vide et la stabilise dans une conformation dite « réceptive » ou « active » comparée à une conformation vide mais « inactive », donc incapable de lier des peptides. Dans les MIIC, les conditions acides tendent à causer l'agrégation des CMH II ayant la niche peptidique exposée (131). Les études ont montré que les complexes DM/CMH II vides évitent l'agrégation (132). Par cet effet, DM augmente la longévité des CMH II vides et les garde dans une conformation stable et réceptive permettant l'association à de nouveaux peptides pour la présentation en surface.
  
- 4- Changements conformationnels des complexes CMH II – peptide : La perte de stabilité SDS des complexes CMH II – peptide provenant de cellules déficientes en DM était la première indication d'un effet de DM sur la conformation des CMH II (133,134). Ces observations furent ultérieurement confirmées grâce à un anticorps monoclonal (AcM) conformationnel (16.23) reconnaissant une forme de CMH II dépendante de DM. Cet AcM est spécifique aux molécules HLA-DR3 provenant de cellules DM<sup>+</sup> et est incapable de reconnaître les mêmes molécules provenant de cellules DM<sup>-</sup> (135). Jusque là, il est impossible de séparer l'effet du répertoire peptidique de celui de l'interaction avec DM sur la conformation des CMH II. Mais, puisque le répertoire peptidique est sélectionné par DM, ces changements conformationnels relèvent donc des fonctions de cette dernière. La preuve que DM induit un changement conformationnel indépendant du peptide présenté fut rapportée par le groupe de Unanue (107). Ces travaux ont démontré l'existence de clones

T capables distinguer entre des iso-conformères CMH II – peptide formés en présence ou absence de DM.

#### 1.2.6.4 Effets de HLA-DO sur le chargement des peptides

HLA-DO ou H2-O chez la souris (DO) est un autre hétérodimère de classe II non-classique. Contrairement aux autres paires de gènes de CMH II, *DOA* et *DOB* sont séparés dans la région des CMH II (figure 1.2) (136,137) et leur expression est régulée différemment, au point où l'on croyait que leur produit ne formait pas un dimère fonctionnel (138). En effet, chez l'humain, la chaîne  $\alpha$  de DO (34 kDa, forme mature) est régulée comme les autres gènes de CMH II, par contre, la chaîne  $\beta$  (32 kDa, forme mature) est faiblement transcrite en présence de CIITA et n'est induite par l'IFN- $\gamma$  (138,139) qu'en cas d'exposition prolongée (140). Bien que les mécanismes qui régissent l'expression de DO $\beta$  soient encore méconnus, on suppose l'existence de facteurs additionnels responsables de cette régulation (140,141).

DO est exprimé principalement par les L.B et certaines cellules épithéliales thymiques, mais aussi par certaines populations de CD, ainsi que par un mélanome (113,136,137,141,142). Chez les L.B, DO n'est exprimé qu'une fois les cellules matures et que le BcR est fonctionnel (141). De plus, l'expression de DO est modulée selon le stade d'activation des L.B, son expression est diminuée dans les L.B des centres germinatifs (CG) relativement aux L.B naïfs ou mémoires (143-145). Cette modulation des niveaux de DO semble être post-transcriptionnelle puisque les niveaux d'ARNm ne semblent pas être altérés (145). On suppose que cette perte de DO se fait par dégradation ou encore par relargage en milieu externe.

Lors de leur synthèse, les chaînes de DO sont incapables de s'assembler correctement et de quitter le R.E. par elles-mêmes. En revanche, en co-expression avec DM, comme il est normalement le cas dans les L.B, un complexe DM $\alpha\beta$ /DO $\alpha\beta$  se forme tôt dans le R.E. et est maintenu durant et après le transport jusqu'aux MIIC (137,146). En

fait, DM est essentielle pour le repliement des deux chaînes de DO dans le R.E. Grâce au motif YPTL dans la queue de DM $\beta$ , DM dirige le complexe DM/DO vers les MIIC (147). La queue cytoplasmique de DO $\beta$  comporte un motif di-leucine fonctionnel (147,148) mais non essentiel au ciblage du complexe DM/DO aux compartiments lysosomaux (147).

Du côté fonctionnel, le rôle physiologique de DO demeure quelque peu controversé. Des études *in vitro* ont montré un effet inhibiteur de DO sur la fonction catalytique d'échange peptidique de DM sur les molécules de CMH II (146,149,150). De plus, les travaux de Liljedahl, Kropshofer et Van Ham (137,151,152) montrent un effet inhibiteur dépendant du pH. A pH >5, DO inhiberait DM mais à plus bas pH, DM regagne sa capacité de catalyser l'échange peptidique. Ces observations sont disputées par Lisa Denzin et Peter Cresswell, qui maintiennent que DO n'est pas affecté par le pH et que les complexes DM/DO sont complètement inactifs dans l'échange peptidique sur les CMH II (141). L'hypothèse du rôle inhibiteur de DO sur DM est supportée par le fait que les cellules DR<sup>+</sup> Ii<sup>+</sup> DM<sup>+</sup> transfectées avec DO accumulent de hauts niveaux de complexes DR-CLIP à la surface (141,146,150). Il faut toutefois souligner que dans ces systèmes, DO est surexprimé sous le contrôle de promoteurs viraux. Des analyses de spectrométrie de masse du répertoire de peptides présentés par des molécules DR3 de surface de cellules transfectées ou non avec DO montrent une divergence de 10% en terme de peptides uniques à chaque CPA (150,152). Ces études ont montré qu'une des caractéristiques des peptides divergents présentés par les cellules DO<sup>-</sup> est leur plus grande taille. Ainsi, en plus de modifier le répertoire de peptides présenté, DO biaiserait la présentation en faveur de peptides plus courts (152). DO, en inhibant DM dans les compartiments endosomaux précoces à pH >5.0, permet l'arrivée de molécules CMH II – CLIP dans les compartiments plus tardifs, plus riches en protéases et plus acides. Dans ces compartiments, DM regagne sa fonction et le répertoire peptidique disponible à être lié par les CMH II a atteint un état d'apprêtement plus avancé. Dans le complexe DM/DO, DO se retrouve à concentrer la fonction de DM sur le chargement de peptides provenant des compartiments endosomaux tardifs (lysosomes). À ces fonctions de DO se rajoute aussi celle de la redistribution des complexes DM/DO et

même DR à la membrane limitante des MVB (compartiments multi-vésiculaires; *multi-vesicular bodies*) (153). Cette fonction est directement reliée au motif di-leucine de la queue cytoplasmique de DO $\beta$ . En son absence, les complexes DO/DM se retrouvent éparpillés sur les vésicules internes, interagissant avec peu de CMH II (153). Ceci se reflète par une augmentation du nombre de complexes CMH II – CLIP à la surface des CPA.

La présentation antigénique est le pilier sur lequel repose une réponse immunitaire efficace. Il va sans dire que tous les processus de contrôle et d'intervention dans l'apprêtement et le chargement des peptides antigéniques dans la niche peptidique des CMH II qu'on vient d'énumérer affectent directement le résultat de la réponse que le système va monter face à l'antigène rencontré. Le fait qu'autant de points de contrôle et de cheminements différents existent est un indicateur de l'importance de cette voie de présentation de l'Ag, que ce soit pour éviter l'autoimmunité ou encore détecter et éliminer la menace d'une infection par un corps étranger ou un cancer incontrôlé. Le but ultime de la présentation antigénique revient à présenter le peptide antigénique au bon TcR afin d'activer ou tolérer un L.T.

### 1.3 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (L.T) sont les cellules principales de la réponse immunitaire spécifique. Ils sont divisés en deux groupes majeurs selon le déterminant cellulaire exprimé en surface, CD4 ou CD8. Les L.T CD8+, aussi nommés L.T cytotoxiques (CTL), ont le rôle d'éliminer les cellules infectées ou encore les cellules tumorales. Les L.T CD4+ sont généralement appelés L.T auxiliaires, leur rôle consiste à fournir les cytokines essentielles à la production d'anticorps par les L.B dans le cadre des réponses humorales L.T dépendantes. De même, les L.T CD4+ aident aussi les CTL à identifier leurs cellules cibles et à augmenter leurs capacités cytotoxiques. Par le biais de leur récepteur de surface (TcR) les L.T sont capables de balayer la surface des CPA à la recherche de leur ligand spécifique. Chaque TcR est capable de reconnaître une combinaison particulière de CMH –



peptide susceptible d'induire l'activation du L.T. Normalement un L.T CD8+ serait sélectionné au niveau du thymus à reconnaître et interagir avec des complexes CMH I – pep ; alors que les L.T CD4+, ils interagiraient avec des CMH II – peptide.

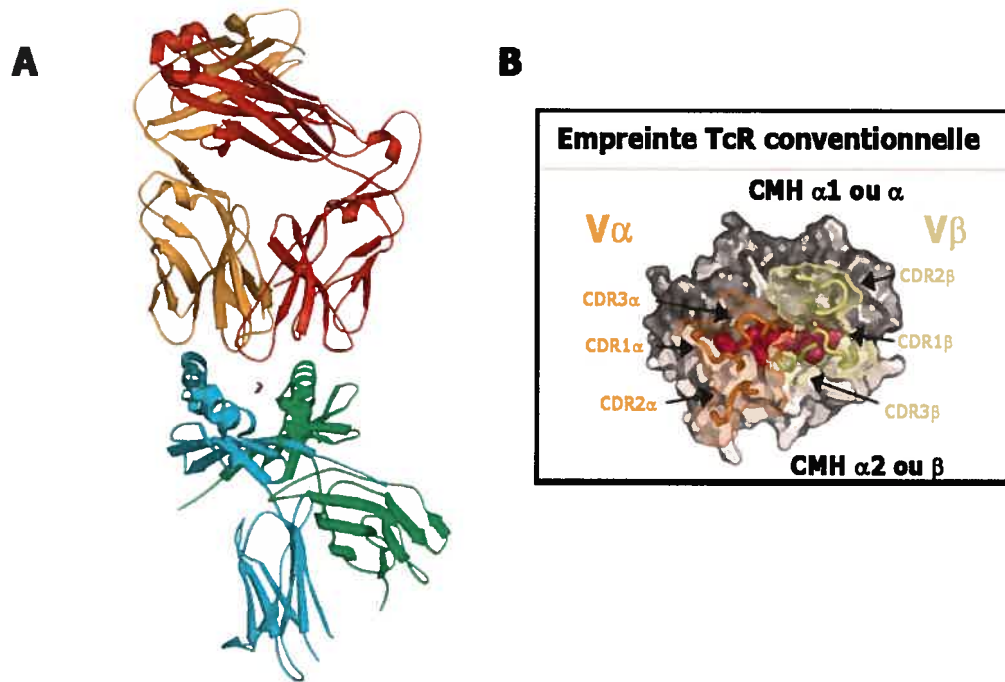
Le T des L.T fait référence au thymus, l'organe dans lequel la maturation des cellules précurseurs de la moelle osseuse mûrissent en L.T.

### 1.3.1 Le récepteur T (TcR)

Le TcR est un hétérodimère formé de deux chaînes génétiquement recombinées,  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Le bon engagement d'un complexe CMH – peptide par le TcR complémentaire permet la transmission d'un signal de survie ou d'activation et de production de cytokines ou de cytotoxicité par le L.T qui le porte. Chaque TcR lie son ligand à travers 6 boucles appelées CDR (complementarity determining region). Chaque chaîne du TcR forme 3 de ces boucles numérotées de CDR1 à 3  $\alpha$  ou  $\beta$  selon la chaîne. Ces 6 boucles forment le site de liaison au complexe CMH – peptide. Les séquences de CDR1 et de CDR2 sont codées dans le gène V de chaque chaîne du TcR et sont moins diversifiées, tandis que CDR3 est le résultat de recombinaison somatique de l'ADN impliquant la juxtaposition de  $V\alpha$  et  $J\alpha$  pour la chaîne  $\alpha$  et  $V\beta$ ,  $D\beta$  et  $J\beta$  pour la chaîne  $\beta$ . Cette capacité de générer une variété presque infinie de CDR3, se traduit par la responsabilité de cette région de la spécificité envers le peptide. Les boucles CDR1 et CDR2 interagiraient avec les deux hélices  $\alpha$  entourant la niche peptidique des molécules de CMH (figure 1.9). En effet, les cristaux TcR – CMH – peptide générés montrent que la majorité de ces interactions suivent une orientation commune dite classique ou conventionnelle (154,155) (figure 1.9 B). Cette orientation impose l'engagement des résidus conservés des hélices  $\alpha$  des CMH par les boucles encodées génétiquement CDR1 et CDR2, et laisse aux deux boucles hypervariables (CDR3) le soin d'interagir avec les peptides variés se retrouvant dans la niche des molécules de CMH (figure 1.9 B). Cette observation va dans le sens de la suggestion de Garcia *et al.*, qui stipule que la topologie de l'interaction TcR – CMH est le

résultat de la co-évolution de ces deux molécules (154), et que les TcR et les CMH sont prédisposés à interagir ensemble (156,157) puisque leur interaction repose sur des composantes peu variables, et déterminées génétiquement. Ainsi, les résidus conservés des hélices des CMH recrutent les TcR via les boucles CDR1 et 2, positionnant le TcR de façon optimale pour permettre l'interaction du peptide avec les régions CDR3 (158) par des contacts qui détermineront par leur stabilité l'activation ou non du L.T (159).

La façon par laquelle le TcR communique aux complexes d'activation du L.T qu'il a trouvé son ligand demeure au niveau des spéculations. L'hypothèse la plus acceptée pour l'instant est celle de la propagation d'un changement conformationnel de la pointe des CDRs à travers toute la molécule, induit par l'interaction avec le ligand et aboutissant jusqu'à l'interface TcR-CD3 $\epsilon$  pour déclencher les premiers événements de l'activation du L.T (159,160). D'autre part, il a été montré qu'une signalisation faible affecte dramatiquement la sélection thymique et peut changer une sélection négative en une positive (161). Si l'hypothèse de la propagation d'un changement conformationnel à travers le TcR est vraie, un mauvais recrutement de ce dernier sur les complexes CMH – peptide pourrait mener à une signalisation aberrante, et modifier le résultat de l'activation aussi bien au thymus qu'en périphérie (155). Cette explication trouve un peu de support dans le fait que, jusque là tous les TcR auto-immuns cristallisés avec leurs ligands montrent un engagement décentralisé et significativement divergent ( $>80^\circ$ ) du modèle conventionnel établi avec des peptides antigéniques (154,155).



**Figure 1.9 Complexe CMH – peptide – TcR**

A) Représentation schématique du cristal de l'interaction d'un TcR avec son ligand (CMH II – pep). En bleu, la chaîne  $\beta$  de la molécule de CMH II, en vert la chaîne  $\alpha$  et le peptide en violet. Le TcR, en rouge la chaîne  $\beta$  et en orange la chaîne  $\alpha$ . On voit bien les deux CDR3 par dessus la niche peptidique juste par dessus le peptide. Les boucles CDR1 et 2 des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TcR se retrouvent en interaction avec les hélices  $\alpha$  des chaînes  $\beta$  et  $\alpha$  de la molécule de CMH II respectivement (image tirée de Sundberg *et al.* (162)).

B) Représentation de la niche peptidique d'une molécule de CMH comme vue par un TcR. Cette image représente l'empreinte commune aux douze TcR cristallisés en complexes avec leur ligand CMH – peptide respectif. Les zones d'interaction sont identifiées et colorées selon la chaîne du TcR impliquée. Le TcR est positionné en diagonal par rapport à l'axe de la niche peptidique des CMH, et centré sur le peptide (154,155). Cette position permet une plus grande couverture du peptide présenté, et cette couverture est assurée par les deux régions CDR3 du TcR. (Image modifiée de (154))

### 1.3.2 Le répertoire T

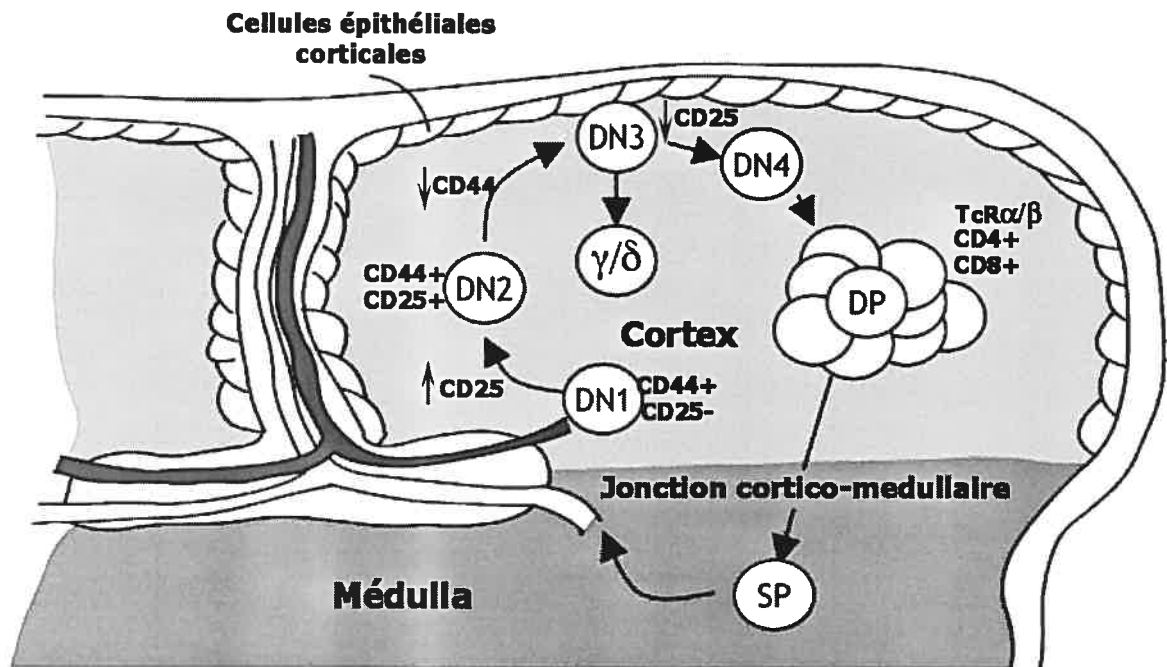
Les précurseurs des L.T sont originaires de la moelle osseuse d'où elles migrent jusqu'au thymus, où les L.T se développent et se font sélectionner en un groupe de cellules formant un répertoire varié pouvant reconnaître et répondre à tout antigène exogène tout en

évitant ou tolérant le soi. Cette éducation thymique est divisée en deux étapes de sélection ; la sélection positive et négative. Les cellules précurseuses arrivent au thymus dans un état appelé double négatif (DN) en référence à l'absence d'expression des molécules CD4 et CD8. Une fois dans le thymus et suite au réarrangement de la chaîne  $\beta$  de leur TcR, ces thymocytes prolifèrent et deviennent double positives (DP) CD4+/CD8+ (163). A fur et à mesure de leur développement, ces thymocytes finissent par réarranger la chaîne  $\alpha$  de leur TcR et expriment un TcR à la surface. A ce niveau, les thymocytes DP subissent un de deux destins : la mort par négligence ou la sélection positive.

Une fois au stade DP, les thymocytes ont une durée de vie moyenne de 3-4 jours (164). Ce temps leur est nécessaire afin de pouvoir réarranger la chaîne  $\alpha$  de leur TcR (165). Le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  ne s'arrête que lorsque le thymocyte réussit à exprimer un TcR $\alpha/\beta$  à la surface, capable d'interagir avec les molécules de CMH (166). Vu la relative rareté de l'événement malgré une capacité inhérente des TcR à interagir avec les CMH (157), ces 4 jours permettent de maximiser les chances de produire un TcR fonctionnel assurant la survie du thymocyte. En cas d'échec, le L.T meurt par négligence. Dans le cas contraire, l'interaction productive du TcR avec les rares CMH – peptide du soi portés par les cellules épithéliales du cortex thymique mène à une répression des gènes *rag* (pour arrêter les réarrangements), à la migration vers la médulla et la différenciation en L.T matures (164).

A partir du moment où les thymocytes expriment à leur surface un TcR fonctionnel, ils deviennent susceptibles à la sélection négative ou délétion thymique. La sélection négative est dépendante aussi des CPA exprimant des complexes CMH – peptide du soi. Normalement, dans le cortex, il y a peu de délétion de thymocytes par sélection négative puisque les cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC) sont des spécialisés dans la sélection positive (167). Des études ont montré des différences qualitatives dans le

répertoire de complexes CMH – peptide impliqués dans la sélection thymique en



**Figure 1.10 Maturation des thymocytes**

Les précurseurs des L.T arrivent de la moelle osseuse à la jonction cortico-médullaire du thymus, au stade DN1 (double négatif 1, CD44<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>). Ces cellules migrent vers les cellules épithéliales corticales et commencent à exprimer CD25 pour atteindre le stade DN2 et puis elles atteignent le stade DN3 et diminuent l'expression de CD44. C'est à ce moment qu'elles réarrangent la chaîne  $\beta$  de leur TcR. Si l'association de la chaîne  $\beta$  et du pre-TcR $\alpha$  se fait avec succès et se rend à la surface, les thymocytes diminuent l'expression de CD25 et atteignent le stade DN4. Par la suite, les DN4 prolifèrent et expriment CD4 et CD8 à leur surface. A ce stade DP, le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  a lieu. C'est à ce stade que les thymocytes subissent les sélections positive et négative. Les cellules continuent à interagir avec les cellules thymiques en migrant à travers la médulla. Les cellules qui survivent aux sélections thymiques (<5%), diminuent l'expression d'un des deux corécepteurs, deviennent SP (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) et quittent le thymus pour aller en périphérie en tant que L.T matures. (Image modifiée de Starr *et al.* (164)).

termes des peptides présentés ainsi que de la stabilité SDS des complexes à la surface entre les CPA retrouvés dans le cortex et la médulla (168). D'ailleurs, au niveau de la médulla, la

sélection négative est effectuée grâce aux mTEC qui ont la capacité de produire de façon ectopique des protéines provenant de presque tous les tissus de l'organisme et de les présenter dans le contexte du CMH (AST : antigènes spécifiques aux tissus) (169,170). On a trouvé que les mTEC exprimaient de hauts niveaux du gène AIRE (*autoimmune regulator protein*) qui serait responsable de l'expression thymique des AST, en son absence une autoimmunité spécifique aux organes se développe (170,171).

Donc, à part l'expression d'un TcR fonctionnel par les thymocytes, la sélection négative nécessite l'expression des Ag du soi (AST) et leur présentation dans le contexte du CMH. Dans la littérature on trouve des preuves de sélection négative de thymocytes au stade DP à faibles niveaux de TcR, dans le cortex. Ce phénomène nécessite une plus grande affinité du TcR (comparé à la délétion dans la médulla) pour les complexes CMH – peptide portés par les CPA du cortex pour transmettre un signal assez fort et éliminer le thymocyte par apoptose (172,173). En bref, la sélection positive implique une interaction de faible affinité entre le TcR et ces ligands (CMH–pep du soi) tandis que les interactions de forte affinité se traduisent en sélection négative. Le modèle récoltant le plus de support actuellement, est probablement celui de la cinétique d'interaction. Un TcR interagissant avec son ligand à haute affinité, le fait plus longtemps (du à un taux de dissociation lent) que l'interaction de faible affinité. Ainsi le temps d'interaction entre le TcR et son ligand déterminerait le résultat de la sélection. (revu (164,174))

### 1.3.3 L'activation des lymphocytes T

En l'espace de quelques secondes après l'engagement du complexe CMH – peptide, une cascade de phosphorylation intracellulaire est déclenchée par le TcR (175,176). Ces signaux préliminaires, bien que suffisants pour induire une réponse cytotoxique, ne le sont pas pour induire une prolifération des L.T. Cette fonction requiert un engagement du TcR et une signalisation soutenue dépassant l'heure (177,178). Ce même engagement polarise le L.T et induit la formation d'une synapse immunologique (SI) à l'interface L.T – CPA

(179). Cette structure de surface, au niveau des L.T, implique une restructuration du cytosquelette, le repositionnement de l'appareil de Golgi et du centre d'organisation des microtubules (MTOC) (180). La formation et le rôle des SI sont actuellement le sujet d'études intensives. Ce que l'on retient par contre, c'est que la SI augmente l'engagement des TcR et la transmission des signaux en recrutant et rapprochant physiquement les molécules de costimulation et de signalisation des TcR (179). D'autre part, on soupçonne à la SI un rôle modulateur de l'activation des L.T puisqu'elle facilite aussi l'endocytose des TcR qui s'y retrouvent et recrute la molécule inhibitrice CTLA-4. La fonction de la SI la plus clairement prouvée est associée à la restructuration du cytosquelette et des microtubules permettant le ciblage de la relâche des cytokines ou des effecteurs cytotoxiques à l'interface T – CPA (181).

L'initiation de l'activation d'un L.T ainsi que la façon par laquelle le signal se répand à travers le TcR échappent toujours à notre compréhension. Par contre, au niveau moléculaire un modèle assez complet décrivant la cascade d'événements nécessaire à la transmission du signal et l'activation du L.T, est établi. Brièvement, le TcR s'associe à un complexe protéique (CD3  $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$  et  $\eta$ ) ayant des domaines cytoplasmiques comportant des motifs tyrosine d'activation ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motifs*). Dès l'engagement du TcR avec son ligand, il y a phosphorylation de p56 Lck. La phosphorylation des ITAM des CD3 par Lck et Fyn, des tyrosines kinases de la famille des src, suit. Ceci mobilise et mène à l'activation de Zap70 et des kinases de la famille des syk (182). Les syk kinases iront, par la suite, phosphoryler SLP-76 et LAT (183) qui à leur tour recruteront des intermédiaires additionnels et activeront les molécules liant les GTP (Ras, Rac et Rho). Ces molécules activeront les MAP kinases (JNK, ERK et p38) et augmenteront le flux de  $Ca^{2+}$  et l'activation de PKC (184). Ensembles, l'activation des MAP kinases et l'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, favorisent l'activation et le transport vers le noyau des facteurs de transcription NFAT, AP1 et NF $\kappa$ B, menant ultimement à la production d'IL-2 et à la prolifération cellulaire. Dépendamment de la longévité du signal, de la costimulation qui l'accompagne et de l'environnement dans lequel il a lieu, le résultat

de l'activation du L.T diffère entre la prolifération, l'induction de l'apoptose et la différenciation en cellule mémoire.

#### 1.4 Superantigènes

Selon Bayliss M. (185), les premiers rapports impliquant les entérotoxines de *Staphylococcus aureus* dans l'empoisonnement alimentaire remonteraient à 1930 lorsque Dak et collaborateurs ainsi que Jordan, les ont décrites comme toxines filtrables et thermostables (186,187). Le terme « superantigène » (SAg) n'est apparu que lorsque Philippa Marrack et John Kappler ont voulu décrire la réponse des L.T, excessive et restreinte uniquement par la partie V $\beta$  du TcR, face à des toxines bactériennes (188,189). Pourtant, la découverte et la description des premiers effets « superantigéniques » datent des années 70 (190), et ce ne fut pas les toxines bactériennes qui étaient sous investigation, mais plutôt une série d'antigènes hérités, chez la souris, de façon mendélienne (191,192). Ces derniers ont porté le nom de MIs (*minor lymphocyte stimulating antigens*), et malgré leur description fonctionnelle durant les années 70, les gènes les encodant sont restés méconnus jusqu'à 20 ans plus tard. C'est en 1991 que plusieurs groupes ont publié simultanément que ces SAg seraient encodés par un cadre de lecture ouvert (ORF) porté par des rétrovirus murins (MMTV (*murine mammary tumor virus*)) intégrés dans le génome de leur hôte (193-195).

Les premiers superantigènes identifiés étaient donc d'origine bactérienne. Ces protéines sont capables de lier les molécules de CMH de classe II et d'interagir avec une grande proportion de L.T ayant en commun la même chaîne V $\beta$  du TcR. Puisqu'il existe un nombre restreint de V $\beta$  (25 chez la souris et 50-100 chez l'homme), un SAg donné peut activer 1-25% du répertoire T total comparé à  $1/10^4$  à  $1/10^6$  pour un complexe CMH – peptide (188,196,197). D'où l'appellation de superantigène (189).

Depuis, on a trouvé des SAg chez une batterie de microorganismes, mais aussi chez certaines plantes. Actuellement on reconnaît plusieurs organismes producteurs de



SAGs notamment les staphylocoques (188,198), les streptocoques (198-200), les mycobactéries (201), les mycoplasmes (202,203), *Yersinia* (204), le virus de la rage (205,206), le rétrovirus de souris MMTV (207), EBV (208), *Toxoplasma gondii* (209) et la plante *Urtica dioica* (ortie dioïque) (210-212) (Tableau 1).

Les SAGs sont divisés en deux groupes majeurs selon leur origine : les SAGs bactériens (bSAGs) et les SAGs viraux (vSAGs). Les bSAGs sont de loin mieux connus et plus étudiés que leurs correspondants viraux. Chez les bSAGs, on distingue les SAGs pyrogènes (PTSAGs ou *pyrogenic toxin Superantigen*), des SAGs non pyrogènes. Les PTSAGs sont représentés par les enterotoxines de *Staphylococcus aureus* (SEA-SEL excluant SEF, et TSST-1) et les exotoxines de *Streptococcus pyogenes* (SPEA, SPEC, SPEG, SPEH, SPEJ, SMEZ-2 et SSA). Les SAGs non pyrogènes sont les toxines produites par *Clostridium perfringens* (CPE), *Mycoplasma arthridis* (MAM) et *Yersinia pseudotuberculosis* (YPM).

Les vSAGs quant à eux sont encore moins étudiés dû au fait qu'ils sont, entre autres, difficiles à produire et à purifier. On connaît surtout les vSAGs rétroviraux encodés par MMTV. Certains rapports dans la littérature proposent des équivalents aux vSAGs murins chez l'homme sous la forme de protéines encodées par certains rétrovirus endogènes humains (HERVs : HERV-K18 et HERV-W). Quelques autres évidences ont été avancées par rapport à d'autres virus codant pour des SAGs notamment dans le cas du virus de la rage et sa protéine N (nucléo-capside) (205,213). Il est à noter que dans les cas des vSAGs de HERV-K18 et HERV-W ainsi que de la protéine N du virus de la rage, les résultats sont quelque peu controversés et la nature superantigénique de ces protéines reste à confirmer.

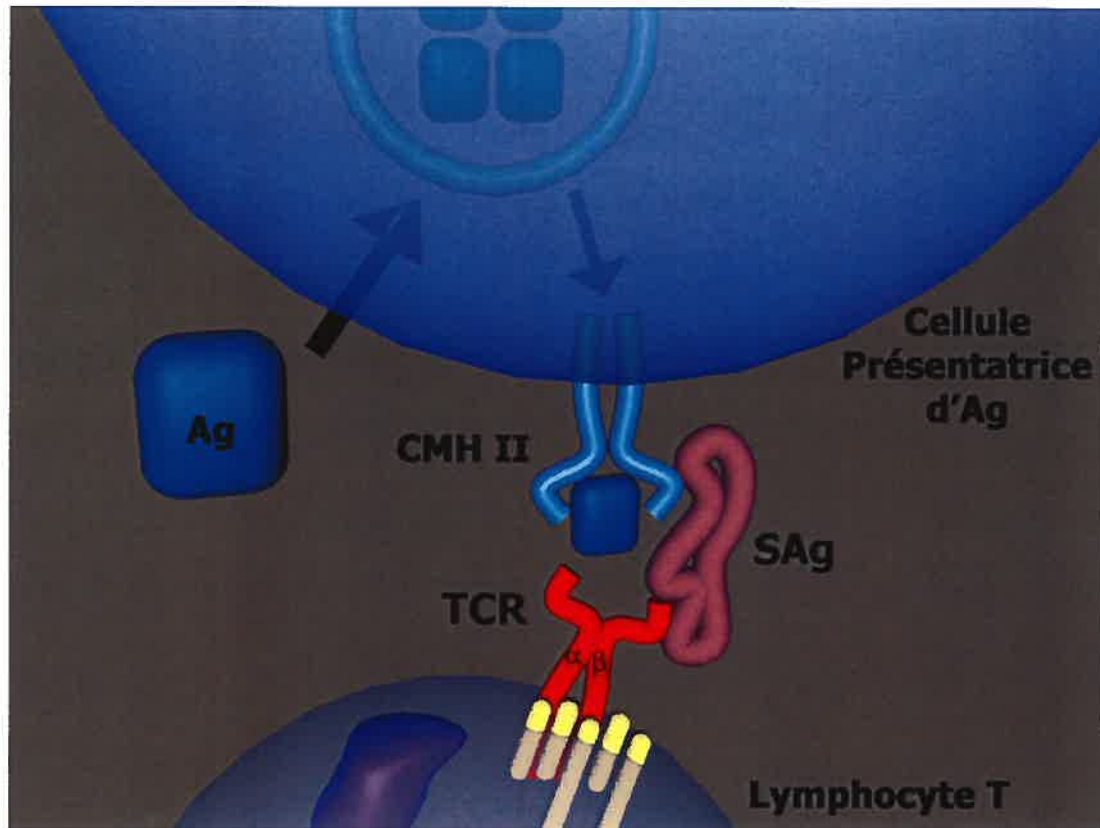
Tous les SAGs partagent 4 caractéristiques principales qui les définissent :

1. Ils échappent à la restriction stricte des CMH II en interagissant avec elles principalement à l'extérieur de leur niche peptidique.

2. Ils induisent une forte prolifération polyclonale et spécifique à la partie variable de la chaîne  $\beta$  du TcR des L.T, pouvant atteindre 20-25% du répertoire T.
3. Contrairement aux Ags classiques, les SAgs ne nécessitent pas d'apprêtement pour être présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).
4. Ils sont de puissants mitogènes à de très faibles concentrations ( $10^{-12}$  M ou encore  $\sim 20$  fg/mL dans le cas de SMEZ-2).

Superantigène	Origine	PM(kDa)	Interaction		
			CMH II	Vβ humain	Vβ murin
SEA	<i>Staphylococcus aureus</i>	27.1	α et β	1, 5, 3, 6, 3, 6, 4, 7, 3, 7, 4, 9, 16, 21, 3, 22, 23	1, 3, 10, 11, 17
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i>	28.4	α	1, 3, 2, 6, 4, 12, 14, 15, 17, 20	7, 8, 1, 8, 2, 8, 3
SEC1	<i>Staphylococcus aureus</i>	27.5	α	3, 2, 6, 4, 6, 9, 12, 15	3, 8, 2, 8, 3, 11
SEC2	<i>Staphylococcus aureus</i>	27.6	α	12, 13, 14, 15, 17, 20	3, 8, 2, 10, 17
SEC3	<i>Staphylococcus aureus</i>	27.6	α	3, 5, 12, 13, 2	7, 8, 2
SED	<i>Staphylococcus aureus</i>	26.9	α et β	1, 5, 3, 6, 9, 7, 4, 8, 12	3, 11, 17
SEE	<i>Staphylococcus aureus</i>	26.8	α et β	5, 6, 3, 6, 4, 8	11, 15, 17
SEG	<i>Staphylococcus aureus</i>	27	α	13, 6, 14	
SEH	<i>Staphylococcus aureus</i>	25.1	β	Vα10	
SEI	<i>Staphylococcus aureus</i>	24.9	β	1, 5, 5, 3, 23	
SEJ	<i>Staphylococcus aureus</i>	31.2	β	?	
SEK	<i>Staphylococcus aureus</i>	30	β	5, 1, 5, 2, 6, 7	
SEL	<i>Staphylococcus aureus</i>	26.8	β	5, 7, 22	
SEM	<i>Staphylococcus aureus</i>	24.8	β	18, 21, 3	
TSST-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	21.9	α	2, 8	15, 16
SPE-A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	26	α	2, 8, 12, 12, 2, 14, 15	8, 1, 8, 2
SPE-B	<i>Streptococcus pyogenes</i>		β	2, 8	
SPE-C	<i>Streptococcus pyogenes</i>	24.4	β	1, 2, 3, 2, 12, 5, 15, 5, 1, 10	
SPE-G	<i>Streptococcus pyogenes</i>	24.6	β	2, 4, 6, 9, 9, 12, 3	
SPE-H	<i>Streptococcus pyogenes</i>	23.6	β	2, 7, 3, 9, 23	
SPE-I	<i>Streptococcus pyogenes</i>	26	β	5, 3, 6, 9, 9, 18, 22	
SPE-J	<i>Streptococcus pyogenes</i>	24.6	β	2, 8	
SPE-L	<i>Streptococcus pyogenes</i>	27.4	β	1, 1	
SPE-M	<i>Streptococcus pyogenes</i>	26.2	β	1, 1	
SSA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	28	α	1, 3, 15, 17, 19	
SMEZ	<i>Streptococcus pyogenes</i>	24.3	β	2, 4, 7, 3, 8	
SMEZ-2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	24.1	β	4, 8	
MAM	<i>Mycoplasma arthritidis</i>		α et β	3, 17, 5, 1, 7, 8, 12, 20	5, 1, 6, 8, 1, 8, 2, 8, 3
YPM	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>			3, 9, 13, 1, 13, 2, 13, 3	7, 8, 1, 8, 2, 8, 3
CPET	<i>Clostridium perfringens</i>			6, 9, 18, 21, 22, 24	
vSag7	MMTV	45 - 18.5			6, 7, 8, 1, 9, 15, 17
protéine N	virus de la rage			8	6, 7
EBV/HERV K18 orf	Epstein Barr Virus? HERV K18			9, 13	
CMV	Cytomegalovirus			12	
Agglutinine urticaire (UDA)	<i>Urtica dioica</i>		CMH I et CMH II		8, 3

**Tableau 1.1 : Liste des SAg les mieux connus avec quelques propriétés biochimiques.** Information compilée de (197,214) et complétée avec les informations sur MAM (215,216), sur YPM (217), sur UDA (218), sur EBV/HERV K18 (chapitre 2) (219,220). De même, en ce qui concerne vSAg7, le tableau est mis à jour en fonction des résultats obtenus à travers l'étude présentée au chapitre 2 de cette thèse (219).



**Figure 1.11 Représentation schématique de la présentation des SAg.** Contrairement à la présentation du peptide antigénique, le SAg ne nécessite généralement aucun apprêtement intracellulaire. Selon le mode d'interaction avec les CMH II, les SAg sont plus ou moins sensibles aux peptides dans la niche.

#### 1.4.1 Superantigènes bactériens

Au sein de la famille des PTSAgs (*Pyrogenic Toxin Superantigens*) bactériens, TSST-1 est unique à plusieurs points de vue. Cette protéine est la seule capable de traverser

intacte les surfaces mucoales (221,222), en plus d'être le seul PTSAg connu pouvant réactiver l'arthrite induite par la paroi bactérienne (BCWIA= *bacterial cell wall induced arthritis*) (223). D'autre part, seuls les SPEs (*Streptococcal pyrogenic enterotoxins*) ont la capacité d'induire une nécrose des tissus du myocarde (224).

Bien que tous les bSAGs connus aient des effets indéniables sur le système immunitaire, ajoutés à de multiples autres effets biologiques (vomissement, diarrhée, choc toxique, etc.) il est difficile d'expliquer l'avantage qu'ils confèrent aux bactéries. Il est peu probable que la fonction primaire des bSAGs soit d'induire le choc toxique et de tuer l'hôte puisque ceci résulterait en un effet négatif sur la transmission de la bactérie et sa survie. Par contre, en sachant que l'activation des L.T CD4<sup>+</sup> par les SAG résulte en la production excessive de cytokines Th1 (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-12) (225,226), l'hôte ne peut développer une réponse humorale convenable. Généralement, suite à l'activation des L.T et de la relâche des cytokines, il y a prolifération V $\beta$  spécifique suivie d'une inhibition de la production d'IL-2 (227), de l'anergie des L.T impliqués (228), et d'une délétion V $\beta$  spécifique. Il faut se rappeler aussi que les SAGs font partie de tout un arsenal de molécules utilisées par les bactéries pour déjouer le système immunitaire.

Par contre la diversité et la mobilité des éléments génétiques qui les encodent laisse sous-entendre une évolution accélérée (229). Il est probable que tous les SAG proviennent d'un seul gène ancestral étant donné le degré d'homologie et d'apparentée phylogénique. Plus spécifiquement, il est communément accepté que les SAG de *Staphylococcus aureus* proviennent d'un même gène ancestral et que la transmission horizontale ainsi que l'évolution verticale de ces gènes soient responsables de leur diversité (230).

Malgré une faible homologie au niveau des séquences primaires d'acides aminés, on remarque que la pression évolutive a maintenu l'architecture des SAG afin de conserver l'interaction avec les TcR et les CMH II (225,231), tout en maximisant la variation antigénique de ces molécules. SMEZ est le parfait exemple illustrant cette stratégie

d'évasion. A travers ces différentes variantes, SMEZ maintient sa spécificité V $\beta$  mais mute seulement les régions exposées. En effet, l'architecture commune de toutes ces toxines englobe 2 domaines A et B. Le domaine A (C-terminal) est formé d'une hélice  $\alpha$  centrale reposant sur un feuillet  $\beta$  de 4 branches formant un motif  $\beta$ *grasp*. Ce motif est retrouvé chez d'autres protéines impliquées dans des interactions protéine – protéine comme l'ubiquitine (232), les protéines G (233) et L (234) des streptocoques et les domaines de liaison des immunoglobulines (Ig). Le domaine B (N-terminal) est formé par un tonneau  $\beta$  de 5 feuillets  $\beta$ . Ce domaine rappelle le tonneau  $\beta$  caractéristique des domaines de liaison des oligosaccharides et des oligonucléotides (OB-fold : *Oligosaccharide/oligonucleotide binding fold*). Ce motif est retrouvé chez les nucléases, la protéine ribosomale S17 de *Bacillus stearothermophilus*, ainsi que chez la toxine AB<sub>5</sub> de *Staphylococcus aureus* (231,235).

#### 1.4.1.1 Interactions avec les molécules de CMH II

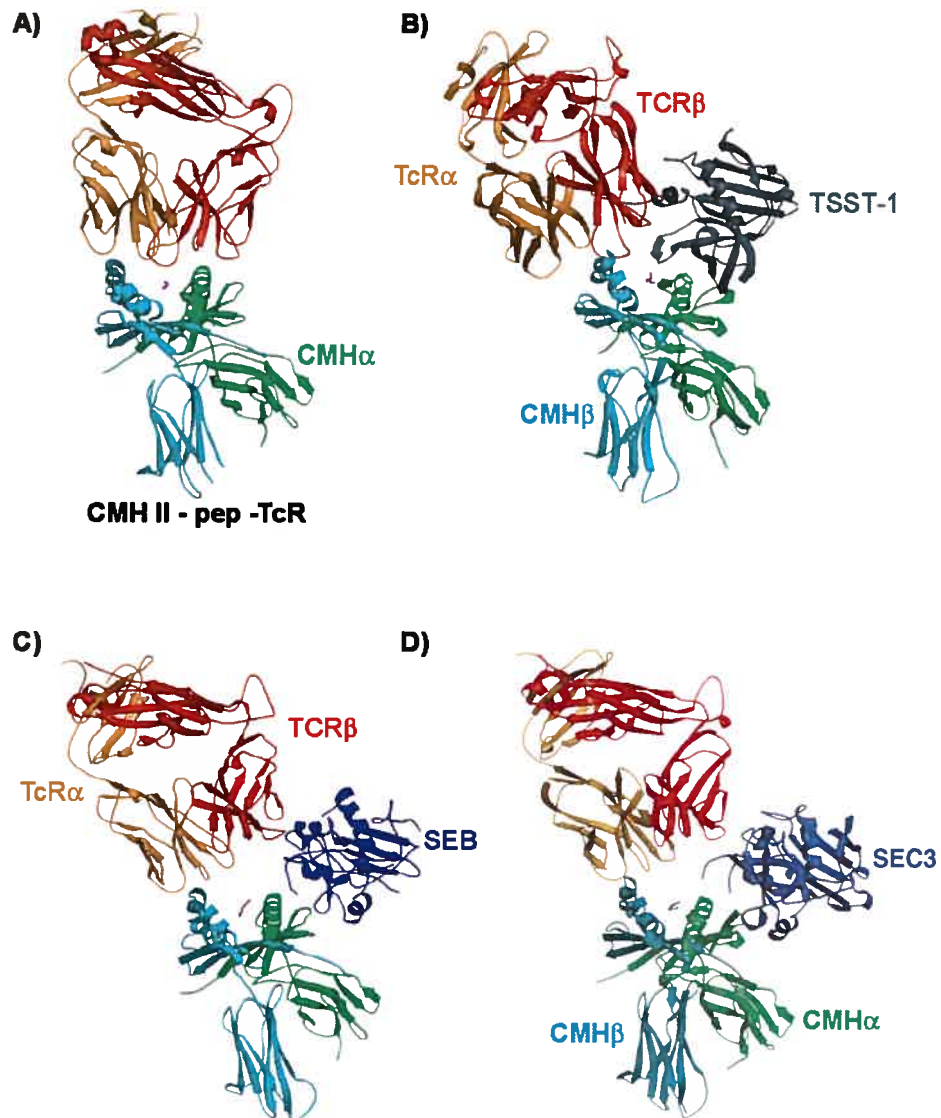
Malgré une structure tridimensionnelle conservée par la majorité des bSAGs, leur présentation par les CMH II peut être divisée en 3 groupes différents. i) Les SAGs qui interagissent avec la chaîne  $\alpha$  des CMH II (SEB) (Figure 1.12), ii) les SAGs qui interagissent avec la chaîne  $\beta$  (SEH) (Figure 1.13), iii) et les SAGs capables d'interagir avec deux molécules de classe II soit en liant la chaîne  $\alpha$  d'une molécule et la chaîne  $\beta$  de l'autre (SEA), ou 2 chaînes  $\alpha$  (SED) ou encore deux chaînes  $\beta$  (SPE-C) (Figure 1.14).

##### i) Interaction avec la chaîne $\alpha$

Le groupe de bSAG formant une liaison de faible affinité (0,4 – 0,7  $\mu$ M) avec la chaîne  $\alpha$  des CMH II (236) comprend SEB, SEC, TSST-1, SSA et SPE-A (Tableau 1). Les structures tridimensionnelles des co-cristaux SAG – CMH II ont déjà été résolues pour SEB, SEC<sub>3</sub> et TSST-1 (237-239) (Figure 1.12). Des cristaux publiés, on retient que SEB et SEC interagissent avec les CMH II de manière similaire, liant la molécule de classe II à

l'extérieur, au niveau de l'hélice  $\alpha 1$  (Figure 1.12 C et D). Le co-cristal SEB – HLA-DR1 montre que SEB lie la molécule de CMH II par son domaine N-terminal. Deux interactions majeures sont impliquées dans cette liaison : un pont salin se forme entre Glu 67 de SEB et Lys39 de HLA-DR $\alpha$  et les chaînes latérales des résidus Phe 44, Leu 45, et Phe 47 de SEB s'insèrent dans la région hydrophobe entre le feuillet  $\beta$  et l'hélice  $\alpha 1$  de la chaîne  $\alpha$  de HLA-DR1 (239).

En revanche et malgré une approche similaire du côté de la chaîne  $\alpha$  des CMH II, la structure du co-cristal TSST-1 – HLA-DR1 est significativement différente. Toujours à travers son domaine N-terminal, TSST-1 semble interagir avec les hélices  $\alpha$  des deux chaînes et établi des liens avec le peptide dans la niche (Figure 1.12 B). Les analyses fonctionnelles sur la présentation et à moindre échelle sur la liaison, montrent que contrairement à SEB, TSST-1 est particulièrement sensible à la nature et à la taille du peptide dans la niche des CMH II (240,241).

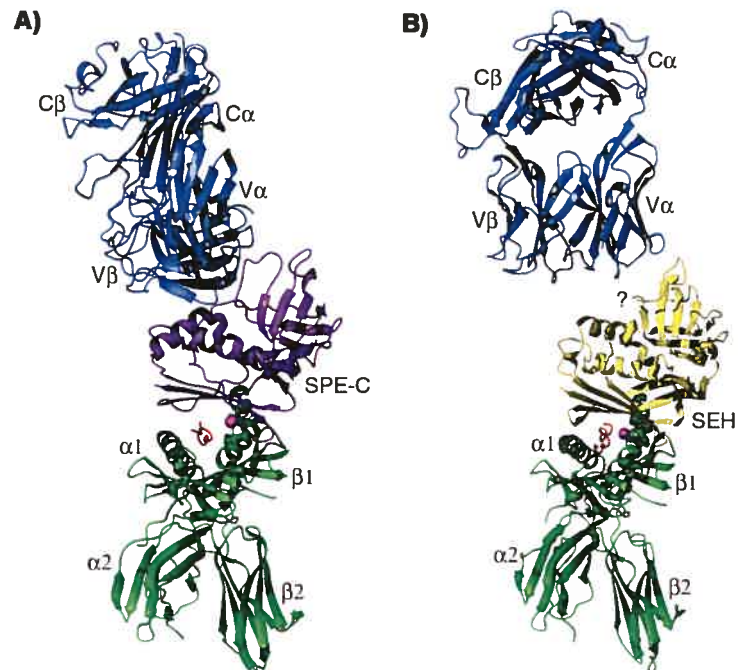


### Figure 1.12 Modélisation des interactions SAg – CMH $\alpha$ – TcR

A) Complexe CMH II – pep – TcR (ici TcR HA1.7 avec HLA-DR et HA (p306-318)). La chaîne  $\alpha$  du TcR est en jaune, la chaîne  $\beta$  en rouge, le peptide en rose et en vert et bleu les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des CMH II, respectivement. Les modèles tri-moléculaires sont prédits par superposition des co-cristaux SAg – CMH II et SAg – TcR. B) on remarque que TSST-1 (gris) s'étend par dessus la niche peptidique et contacte le peptide. C) SEB en bleu ; l'interaction se fait entièrement à l'extérieur de la molécule de classe II (ici HLA-DR1) et est indépendante du peptide. D) SEC<sub>3</sub> en bleu ; la structure de ce complexe rappelle celle de SEB. A), B) et C) sont tirées de (162). D) est tirée de (242)



Il est à noter que des études de mutagenèse détruisant le site de liaison de l'ion de Zinc entre les deux domaines des SAg SPE-A et SEC, n'ont montré aucun effet sur l'activation des L.T suggérant que dans le cas des ces deux SAg, l'ion ne soit pas impliqué dans la liaison des CMH II (243).



**Figure 1.13 Modélisation des interactions TcR – SAg – CMH II $\beta$**

Les molécules de CMH II sont schématisées en vert, en bleu le TcR. Les différentes chaînes sont indiquées. En rose l'ion de Zinc joignant le SAg à l'His81 de la chaîne CMH II  $\beta$  (HLA-DR2a à SPE-C en A), et en B) SEH à HLA-DR1). Figure tirée de (214).

### ii) Interaction avec la chaîne CMH II $\beta$

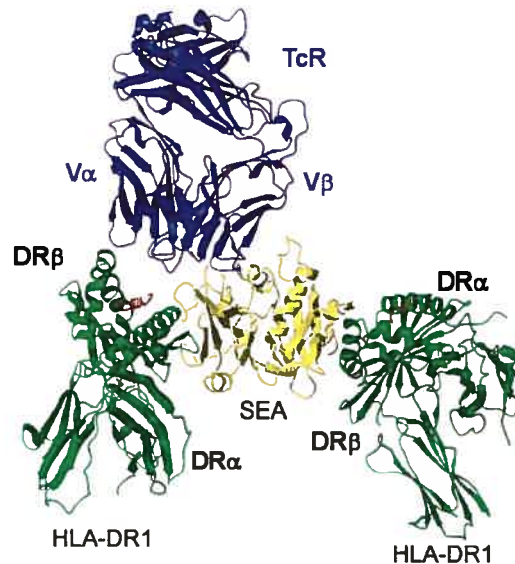
Le groupe de SAg interagissant exclusivement avec la chaîne  $\beta$  des CMH II comprend SEH, SPE-C, SPE-G – J, SPE-L SPE-M, SMEZ et SMEZ-2 (Tableau 1) (214). De ce groupe uniquement les co-cristaux de SEH – HLA-DR1 (244) et SPE-C – HLA-DR2a (245) ont été résolus, mais on suppose que ce mode d'interaction s'applique à tous les membres du groupe (214). L'interaction avec la chaîne  $\beta$  est dépendante de la stabilisation par l'ion de Zinc conférant au complexe CMH II – SAg une grande affinité

allant de 0.5 à 70 nM. L'ion de Zinc fait un pont entre le résidu His81 de la chaîne  $\beta$  des CMH II et l'His206 et l'Asp208 de SEH et fait l'équivalent avec SPE-C en impliquant les résidus His167, His201 et Asp203. Les SAg de ce groupe lient surtout l'hélice  $\beta$ 1 et s'étalent audessus de la niche peptidique en interagissant avec le peptide. D'après les études des structures des complexes SEH – HLA-DR1 et SPE-C – HLA-DR2a, les interactions avec le peptide n'impliquent pas les chaînes latérales de ce dernier, suggérant un effet minime du peptide sur la présentation de ces SAg (214). Les études fonctionnelles manquent encore pour élucider l'effet réel que les peptides liés par les CMH II peuvent avoir sur la présentation de ces SAg (Voir chapitre 3 et 5).

### iii) Réticulation de deux molécules de CMH II

SEA, SED, SEE et MAM forment le groupe des SAg capables de lier simultanément 2 molécules de classe II à la surface de la CPA. SEA est le SAg le mieux étudié de ce groupe. Il porte en fait, deux sites de liaison aux CMH II, un semblable à celui de SEB impliquant une interaction à faible affinité entre le domaine N-terminal du SAg et la chaîne  $\alpha$  de la molécule de classe II et l'autre à affinité élevée, proche de celle de SEH impliquant le domaine C-terminal avec la chaîne  $\beta$  et dépendant d'un ion Zinc (246,247). La mutation de l'un des deux sites d'interaction diminue les niveaux d'activation des L.T indiquant que la réticulation de deux molécules de classe II est nécessaire pour une activation optimale des L.T (247,248). De plus, la réticulation des molécules de CMH II à la surface est essentielle pour l'induction de l'expression des cytokines par les L.B et les monocytes (247,248). Petersson *et al.* ont publié en 2002 le seul co-cristal représentant le mutant SEA<sub>D227A</sub> interagissant de son domaine N-terminal avec la chaîne  $\alpha$  de HLA-DR1 (249) (Figure 1.14). SED et SEE sont supposés interagir avec les molécules de classe II de la même manière que SEA (214,250). De plus, SED semble pouvoir réticuler deux CMH II en liant deux chaînes  $\alpha$ , ou encore deux chaînes  $\beta$ . Le lien de deux chaînes  $\beta$  nécessite la formation à l'aide des ions de Zinc d'un homodimère SED/SED (250). En ce qui concerne

l'activation des L.T, la liaison simultanée d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  de deux CMH II par molécule de SED reste la structure optimale (250).



**Figure 1.14** Modèle de la réticulation de deux CMH II par SEA.

Cette figure tirée de (249), est un modèle produit en combinant le co-cristal HLA-DR1 – SEA<sub>D227A</sub> (les deux molécules de la partie gauche de la figure) la partie droite de la figure a été modélisée en superposant le cristal de SEH – HLA-DR1 à SEA. La position du TcR est prédite à partir de celle du cristal de SEB – TcR $\beta$  (249).

Le groupe de Walid Mourad a récemment publié le premier cristal montrant la réticulation de deux molécules de CMH II par un superantigène (216). MAM en dimérisant, est capable de réticuler deux CMH II.

#### 1.4.1.2 Interactions avec le TcR

Les évidences biochimiques ont permis de décrire l'interaction des SAg avec les TcR. En effet, en 1998 Leder *et al.* ont déterminé que l'affinité de l'interaction de SEB et SEC<sub>3</sub> – TcRV $\beta$  ( $K_D$  de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ M) mime celle mesurée pour les complexes CMH-peptide – TcR. Plus récemment, le groupe de Mariuzza a mesuré la dissociation des complexes SAg – TcR et a trouvé qu'elle se rapprochait de celle des complexes CMH-peptide – TcR

(251,252). Ces travaux suggèrent que les SAg activeraient les L.T de la même façon que les complexes CMH-peptide et possiblement par le recrutement en série des TCR.

Encore une fois l'étude de la structure de l'interaction SAg – TcR fait appel aux co-cristaux. Dans la littérature, il n'existe encore que cinq co-cristaux SAg – TcR (la chaîne V $\beta$ ) (SEB, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>, SPE-A et SPE-C) (214). Mais de ces cinq modèles, on remarque que les SAg contactent tous la boucle CDR2 et la région HV4 (hyper-variable 4) de la chaîne  $\beta$  du TcR (214). Seul le co-cristal de SPE-C – TcRV $\beta$ 2.1 montre l'implication supplémentaire de résidus sur les boucles CDR1 et CDR3 dans l'interaction (Figure 1.13) (214). Ceci reflète bien la nature de l'interaction avec les CMH II ; les SAg liant les CMH II sur l'extérieur de la chaîne  $\alpha$  (comme SEB et SEC (Figure 1.12)) permettent au TcR $\alpha$  de contacter la chaîne  $\beta$  de la molécule de classe II. Par contre, les SAg liant les CMH II à la façon de SEH et de SPE-C en s'étirant par dessus la niche peptidique, empêchent le rapprochement TcR – CMH et se retrouvent à engager de plus grandes portions du TcR dont les deux chaînes sont probablement sollicitées. La forte corrélation entre l'enrichissement de V $\alpha$ 10 observé suite à une stimulation par SEH sous-entend une interaction directe avec la chaîne  $\alpha$  du TcR (253) et supporte les conclusions tirées de l'analyse de l'interaction de SPE-C avec le TcR. Dans le cas de l'activation par SEA, la chaîne  $\alpha$  du TcR pourrait jouer un rôle important d'après les rapports des groupes de Thibodeau et de Mariuzza (254,255). Il faut noter que ces observations ont été faites en utilisant un mutant DR $\alpha$ <sub>K39A</sub>, forçant une interaction de SEA avec la chaîne CMH II  $\beta$  semblable à celle de SEH. Il devient ainsi clair que le mode d'interaction avec les molécules de classe II dicte celui de l'interaction avec le TcR, et ceci aurait pour but de compenser pour le degré d'affinité et la stabilité de la liaison SAg – CMH II.

#### 1.4.1.3 Effets biologiques des bSAg

En faisant le pont entre les molécules de classe II et le TcR, les SAg activent les L.T et induisent une relâche de cytokines pro-inflammatoires dont TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  et IL-2,

recrutant d'autres L.T et B au site (256). L'activation des L.B qui suivra entraînera la relâche d'encore plus de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 (257). C'est à cette relâche massive de TNF- $\alpha$  qu'est imputée la responsabilité de plusieurs des manifestations cliniques du syndrome de choc toxique (258). Suite à l'activation, la relâche des cytokines et la prolifération initiale des L.T portant les V $\beta$  spécifiques aux SAg, il y a inhibition de production de certaines cytokines comme l'IL-2 (227), un état d'anergie s'établi (228) suivi d'une délétion de ces lymphocytes T (259).

### **i) Syndrome du choc toxique**

Cette condition aiguë est caractérisée par une fièvre élevée, une hypotension, une détresse respiratoire, des éruptions cutanées, une défaillance de plusieurs organes pouvant mener à la mort des individus atteints (256,260). Elle est causée par les PTSAg et est directement reliée à la relâche massive des cytokines, en particulier le TNF- $\alpha$ . Deux formes du syndrome du choc toxique, reliées à l'origine de la maladie, sont connues : le choc toxique Staphylococcique et le choc toxique Streptococcique. Le premier comporte aussi deux formes, une menstruelle et l'autre non-menstruelle. La forme menstruelle du choc toxique staphylococcique est associée à l'utilisation des tampons et implique uniquement TSST-1 (261). Ceci est probablement dû à l'unique capacité de TSST-1 de traverser les parois mucosales. Dans le cas du choc toxique non-menstruel, SEB, SEC et TSST-1 sont impliqués. Cette condition se développe chez les grands brûlés, après opérations chirurgicales, chez les patients atteints de SIDA, et suite à l'utilisation contraceptive du diaphragme (261). Il est à noter que 93% des cas de chocs toxiques staphylococciques enregistrés aux Etats-Unis entre 1979 et 1996 sont du type menstruel (261,262). Le choc toxique streptococcique est relié à une infection par *Streptococcus pyogenes* accompagné par une nécrose des tissus autour des sites d'infection. SPE-A et SPE-C ont été associés à des formes particulièrement sévères de chocs toxiques (261).

## ii) Empoisonnement alimentaire

Les entérotoxines staphylococciques (SE) sont les causes les plus communes de l'empoisonnement alimentaire chez l'humain. SEA, SEB et SED sont les toxines associées le plus souvent à cette condition. L'empoisonnement alimentaire s'établit rapidement après l'ingestion de nourriture contaminée (2 à 6 h) et s'accompagne de nausée, maux de ventre, de vomissement et de diarrhée. Dans une épidémie de gastroentérite aux Etats-Unis causée par du lait au chocolat contaminé avec SEA, on a trouvé qu'aussi peu que 200 ng de la toxine suffisait pour induire le vomissement (263). A la différence des SE, TSST-1 est incapable d'induire l'empoisonnement alimentaire, probablement à cause de sa sensibilité aux protéases gastrointestinales (221). Il semblerait que les fonctions induisant le vomissement et la superantigénicité des SE soient indépendantes (264) et que le vomissement semble causé par une relâche d'histamine et de leukotriènes par les mastocytes et non par la relâche de cytokines par les L.T (265).

## iii) Anergie et délétion des L.T

Les SAg se sont avérés très utiles pour étudier le destin des L.T activés *in vivo*. Les études de White *et al.* (189) ont montré que les souris exposées à SEB dès la naissance montrent une absence totale de L.T matures  $V\beta 3^+$  et  $V\beta 8^+$ . Ce fut le premier rapport démontrant un lien direct entre la tolérance induite et la délétion des L.T réactifs. Les souris adultes thymectomisées ont prouvé que l'anergie et la délétion par SEB ne sont pas dépendantes d'un thymus intact, et que malgré l'activation des L.T  $CD4^+$  et  $CD8^+$ , seuls les  $CD4^+$  entrent en anergie (259,266).

## iv) Maladies autoimmunes

Les maladies autoimmunes sont caractérisées par une perte de la tolérance envers le soi et par le développement d'une réponse immune dirigée contre un ou plusieurs auto-antigènes. Il est généralement bien accepté que les maladies autoimmunes soient le résultat

d'une combinaison d'éléments de susceptibilité génétique et de facteurs environnementaux (267). Cette hypothèse est supportée par le fait que plusieurs facteurs génétiques ont une association avec la susceptibilité, ou la protection contre, le développement de certaines maladies autoimmunes (268-270). Mais cette association n'est pas absolue puisque, dans plusieurs cas, des jumeaux identiques sont discordants face à la maladie suggérant l'implication de facteurs environnementaux (271). De ces facteurs, les infections bactériennes, virales ou parasitaires semblent être des candidats principaux comme déclencheurs de l'autoimmunité chez les individus susceptibles, puisque les infections induisent souvent de fortes réponses inflammatoires dans plusieurs organes (267). Les SAg aussi sont susceptibles d'induire l'activation des clones T autoréactifs et de favoriser l'établissement de l'autoimmunité. D'ailleurs, bien qu'il n'existe pas encore de preuves directes reliant l'étiologie de maladies autoimmunes aux SAg, on a déjà attribué un rôle exacerbant aux SAg dans certains cas d'autoimmunité. Les SAg peuvent contribuer à l'autoimmunité en assurant l'activation et la prolifération des clones T autoréactifs et en favorisant la sécrétion d'auto-Ac et d'interleukines suite à l'activation des L.B ou d'autres CPA, par le pont moléculaire formé par le SAg avec les L.T. Dans le cas de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), un modèle de la sclérose en plaque, l'administration de SEB aux souris PL/J induit la paralysie, et cause une rechute chez les animaux en rémission (272,273). MAM aussi a été montré très efficace pour exacerber l'arthrite induite par l'administration du collagène, un modèle murin de l'arthrite rhumatoïde (274).

#### **v) Maladies de la peau**

Le syndrome d'épidermolyse staphylococcique aigu est associé aux toxines staphylococciques ETA et ETB. La capacité de ces toxines d'induire cette maladie est indépendante de leurs fonctions superantigéniques (275,276). Les SAg semblent être impliqués aussi dans au moins deux autres affections de la peau, le psoriasis et la dermatite atopique (225).

## 1.4.2 Superantigènes rétroviraux

### 1.4.2.1 Caractéristiques du vSAg de MMTV

Le SAg rétroviral (vSAg) le mieux caractérisé est le produit d'un cadre de lecture ouvert (ORF : *open reading frame*) encodé dans le LTR de l'extrémité 3' du provirus de MMTV. Sa découverte remonte aux observations des réactions lymphocytaires mixtes provenant de 2 souris pourtant compatibles au niveau du CMH. Ce n'est qu'en 1973 que Festenstein décrivit les Mls (*minor lymphocyte stimulating Ag*) comme étant les Ag responsables de cette exception aux règles d'histocompatibilité préétablies (190). La caractérisation biochimique et immunologique tarda à se réaliser et ce n'est qu'en 1991 qu'on apprit que ces Mls étaient encodés par l'ORF de MMTV (207,277-279). Des expériences de traduction *in vitro* en présence de membranes microsomales de l'ARNm du *orf*, ont montré que le vSAg est une protéine de type II, avec sa portion N-terminale dans le cytoplasme (280-282). La caractérisation biochimique du vSAg demeure difficile à cause des très bas niveaux d'expression, même lorsque transfecté. Il est à noter que le produit de ce cadre de lecture n'est pas détecté dans le virion (283).

L'*orf* de MMTV encodant le vSAg produit une protéine d'environ 320 a.a. (323 a.a. pour vSAg7) dont la masse prédite serait de 38 kDa (Figure 1.15) (197). Le vSAg produit dans un système de cellules d'insectes correspond à une protéine de 45 kDa suggérant une glycosylation sur un maximum de 4 des 5 sites potentiels (Figure 1.15) (284-288). Les travaux de Mc Mahon *et al.* suggèrent que la glycosylation du vSAg est importante pour sa stabilité (288).

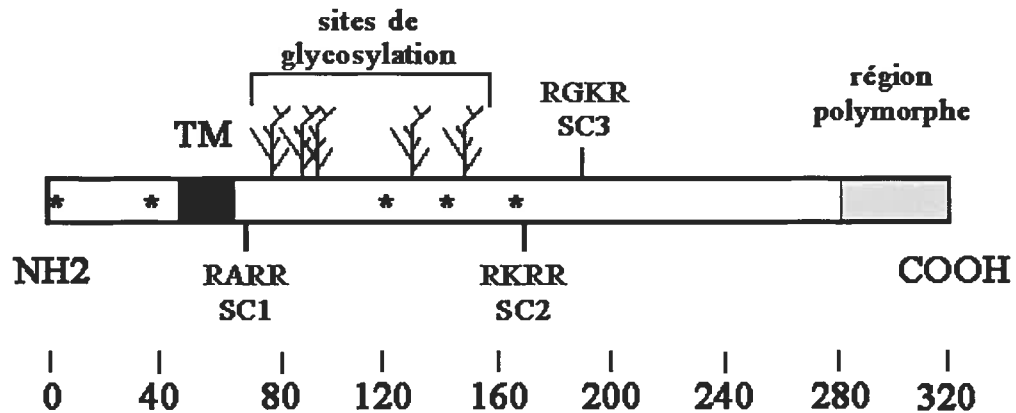
Quatre groupes ont rapporté des Ac reconnaissant les produits du *orf* de MMTV (284,285,289,290). Avec leur AcM VS7, Winslow *et al.* (285) sont les seuls à avoir rapporté la détection du vSAg (Mls-1 ou vSAg7) à la surface des L.B primaires activés (et non à l'état de repos). Le groupe de Huber suivit, à l'aide de leur AcM 3B12 (290) en



déTECTANT vSAg7 à la surface de l'hybridome B Mtv7<sup>+</sup>, LBBA. Malgré le fait que 3B12 inhibe l'activation des L.T, la détection du vSAg à la surface des L.B primaires, même activés, restait impossible. Mis à part à la surface des cellules CH12 (une lignée B de souris) et à l'aide de l'AcM VS7, nous avons aussi réussi à détecter le vSAg à la surface d'une seule lignée B (Raji) mais jamais à la surface d'autres cellules capables de le présenter et d'activer les L.T. Les travaux de Winslow *et al.* (286) ont montré que le vSAg se retrouve en surface, a une taille de 18.5 kDa et est reconnu par l'AcM (VS7) dirigé contre la partie C-terminale de la protéine. De plus, ils avaient réussi à immunoprécipiter la forme 18.5 kDa du vSAg de la surface à l'aide d'un AcM dirigé contre la partie N-terminale de la molécule. Ces évidences montraient que le vSAg subit une digestion séparant la protéine en une moitié cytoplasmique et l'autre extracellulaire mais que ces deux parties restent liées de façon non covalente à la surface des cellules. Le fait que le vSAg pouvait être transféré d'une cellule CMH II<sup>-</sup> à une autre CMH II<sup>+</sup> tout en passant à travers une membrane semi-perméable (291-293) suggérait qu'une forme soluble du vSAg était produite.

En analysant la séquence primaire du vSAg, on remarque la présence de motifs tétra- et dibasiques permettant un clivage par les pro-protéines convertases (PC) comme les furines. Les furines reconnaissent et clivent les motifs RXXR (294) qu'on retrouve à trois reprises dans la séquence de vSAg7 (Figure 1.15). Il a été montré que des cellules déficientes en furines sont incapables de présenter correctement le vSAg (295), quoique d'autres protéases, comme la cathepsine L, peuvent compenser pour l'absence de furines et cliver le vSAg pour permettre sa présentation et son transfert (296). Finalement, le vSAg possède 5 codons initiateurs potentiels (Figure 1.15). Les premières études de caractérisation avaient abordé la question de l'importance de ces ATG et avaient déterminé que les vSAg perdaient leur capacité stimulatrices lorsque amputés de plus de 38 a.a. à l'extrémité de leur queue cytoplasmique (280,297). Malgré le fait que cette queue ne contienne aucun motif de ciblage reconnu jusqu'à présent, on pense que la perte des résidus

hydrophobes de la queue cytoplasmique altèrent le ciblage intracellulaire des vSAg les conduisant à la dégradation (197).



**Figure 1. 15 Structure et caractéristiques du produit de l'orf de MMTV.** En bref, on note 5 sites potentiels de glycosylation, 3 sites de clivage reconnus (SC1-3) par les protéines convertases (e.g. Furines) et 5 codons d'initiation potentiels ATG (\*) dans le même cadre de lecture. Le vSAg mesure ~ 320 a.a., possède une courte queue cytoplasmique N-terminale et une région C-terminale hautement polymorphe responsable de la spécificité envers les chaînes V $\beta$  du TcR. (Image tirée de (197,296))

#### 1.4.2.2 Interactions avec CMH II

L'interaction des vSAg avec les CMH II est prouvée par le fait que des AcM dirigés contre les molécules de classe II inhibent la présentation des vSAg. De plus, les études de présentation des vSAg par des souris congéniques pour le CMH, montrent une hiérarchie de présentation selon le CMH II exprimé. Les molécules I-E sont les meilleures présentatrices. En leur absence, l'hiérarchie s'établit de la façon suivante: I-A<sup>k</sup> > I-A<sup>b</sup> > I-A<sup>d</sup> >> I-A<sup>s</sup> >> I-A<sup>q</sup> (197). On trouve aussi une hiérarchie avec les CMH II humains : HLA-DR1 > DR4 >>> DRw53 (298). HLA-DP et DQ seraient moins sollicités pour la présentation du vSAg (299,300). La difficulté de produire le vSAg de façon recombinante, a empêché l'avancement des études de liaison et la production de co-cristaux CMH II – vSAg. En utilisant des mutants de HLA-DR1, Thibodeau *et al.* ont montré que les résidus importants

pour la présentation des bSAg (SEA, SEB et TSST-1) n'affectaient pas celle des vSAg suggérant une interaction différente avec les CMH II (300).

En plus du mode et des sites d'interaction, une dimension additionnelle se rajoute aux caractéristiques de l'interaction des vSAg avec les CMH II. De par leur nature, les vSAg sont produits simultanément avec les molécules de classe II par les cellules qui les présentent. Les vSAg sont ainsi exposés aux CMH II dès le R.E. D'ailleurs, le groupe de Huber avait proposé une interaction entre le vSAg et les CMH II rappelant celle de Ii par l'intermédiaire du CLIP (301). Cette proposition venait contredire les travaux de Grigg *et al.* publiés 3 ans plus tôt (302), selon lesquels, le vSAg mature atteindrait la surface indépendamment des molécules de classe II. Le vSAg interagirait donc uniquement avec des CMH II SDS-stables et résistants à l'endoH (voir Chapitre 3).

D'autre part, plusieurs études *in vivo* (292,303) et *in vitro* (291,293) relatent le transfert d'une forme soluble des vSAg d'une cellule CMH II<sup>-</sup> vers une CPA CMH II<sup>+</sup> pour assurer sa présentation et l'activation subséquente des L.T. Ce transfert ne nécessite pas de contact direct entre les cellules productrices du vSAg et les cellules présentatrices, puisqu'il est possible à travers une membrane semi-perméable (291). De plus, le transfert est conditionnel à l'activation protéolytique du vSAg (furines et /ou autres) par la cellule productrice, probablement pour permettre à la forme soluble de quitter la cellule. Par contre, le transfert du vSAg est efficace sur des cellules fixées, indiquant une interaction de surface avec les CMH II sans besoin d'internalisation (293). Il est à noter que le fragment du vSAg transféré ainsi que les conditions permettant à ce dernier d'être présenté ou pas par la cellule acceptrice n'ont toujours pas été caractérisés. Bien que le transfert en tant que tel ne soit pas nécessairement similaire au mode de présentation directe des vSAg, il reste qu'il est un mode de présentation possible et strictement extracellulaire.

### 1.4.2.3 Interaction avec le TcR

La caractérisation de l'interaction avec le TcR souffre aussi de la difficulté à produire les vSAg recombinants en assez grande quantité pour la cristallisation. La majorité de l'information recueillie sur les interactions vSAg-TcR proviennent d'analyses de séquences en corrélation avec les délétions V $\beta$  spécifiques dans les répertoires des souris exprimant les vSAg. Les indications les plus précises quant à la région du vSAg dictant la spécificité au TcR se limite à la région des 30 a.a. de l'extrémité C-terminale de la molécule (304). Du côté du TcR, en comparant la séquence des TcRV $\beta$ 8.2 répondant au vSAg encodé par *Mtv7* à celles des TcRV $\beta$ 8.2<sup>a,b</sup> et TcRV $\beta$ 17 non-réactifs, on a localisé les a.a. responsables de la perte de réactivité dans la région latérale CDR4, loin des sites d'interaction TcR – CMH – peptide (305-307). De plus, les études de Hermann *et al.* (308) ont localisé les a.a. importants pour l'interaction avec le vSAg à la face latérale de la chaîne  $\beta$  du TcR, dans la région HV4, qui est majoritairement impliquée dans l'interaction avec les bSAg. Ces observations ont été confirmées par des études impliquant les TcR humains dans lesquelles HV4 était prédite aussi comme la région d'interaction avec les vSAg (298).

### 1.4.2.3 Fonctions du vSAg dans le cycle de vie de MMTV et effets biologiques

MMTV est un rétrovirus du type B existant sous deux formes distinctes, une impliquant des virions infectieux et l'autre sous forme de provirus intégré dans le génome de son hôte. Le cycle de vie du virus exogène débute à l'allaitement des souriceaux (le lait de la mère contenant  $10^{12}$  particules virales/mL (309)). Le virus traverse, par la suite, la paroi intestinale via les cellules M pour infecter les L.B naïfs (310,311) et les cellules dendritiques (CD) immatures (312) dans les plaques de Peyer. Le récepteur viral semble être le récepteur de la transferrine 1 (TfR1 ou CD71) murin (313), mais la population cible du virus MMTV, les L.B naïfs n'expriment presque pas de TfR1 à leur surface (314). De plus MMTV a été rapporté capable d'infecter les cellules humaines (315) dont le récepteur orthologue à TfR1 est incapable de médier l'infection (313). Ces observations prises

ensembles, suggèrent l'existence d'un autre récepteur utilisé par MMTV, à distribution plus large. *In vivo*, l'infection des L.B et des CD par MMTV est de faible efficacité. Durant les premiers jours, on retrouve seulement  $1/10^4$  L.B infectés (283). Les L.B sont considérés comme la cible majeure de MMTV puisque, malgré une même efficacité d'infection des CD, les souris déficientes en L.B ne transmettent pas le virus (309,316).

À l'exception des lentivirus (VIH et VIF (virus de l'immunodéficience féline)), et comme tout autre rétrovirus, MMTV a besoin d'activer sa population cellulaire cible afin d'établir une infection productive. C'est via TLR-4 que MMTV induit une activation des L.B et des DC, probablement pour les préparer à l'infection (310,317,318). Une fois infectés, les L.B expriment les protéines virales. L'expression du vSAg leur permet de recruter l'aide des L.T pour proliférer, augmentant ainsi de façon clonale la population infectée (319), permettant la différenciation en L.B mémoires. Cette étape d'expansion et de différenciation des L.B infectés est cruciale pour assurer l'infection des glandes mammaires et la transmission du virus à la prochaine génération (320-322). MMTV doit surmonter le problème de survivre jusqu'à la puberté de son hôte, période à laquelle les glandes mammaires se développent et deviennent susceptibles d'être infectées. La population cellulaire responsable de la transmission du virus aux cellules des glandes mammaires reste toujours non identifiée. En revanche, Golovkina *et al.* (323), ont démontré que le rôle des L.B ne s'arrêtait pas à assurer l'arrivée du virus aux glandes mammaires, mais qu'ils seraient essentiels à la propagation du virus à l'intérieur même de ces dernières. Les L.T et B ainsi qu'un SAg fonctionnel seraient tous essentiels pour l'établissement d'une infection productive au niveau des cellules mammaires de la souris, même suite à l'injection d'une préparation virale directement dans les glandes mammaires.

Chez les nouveaux nés infectés par le lait maternel, on observe une expansion de la population de L.T réactifs au vSAg dès le cinquième jour de vie. Cette expansion atteint un maximum au bout du neuvième jour pour décliner par la suite. La diminution graduelle des L.T portant les TcRV $\beta$  spécifiques envers le SAg exprimé par le virus, atteint une délé-

presque complète dans tous les tissus lymphoïdes au bout du quatrième mois de vie (197,324,325). En plus d'induire la délétion des L.T portant les V $\beta$  ciblés, les vSAg causent aussi un état d'anergie chez les L.T réactifs restant. Ignatowicz *et al.* ont montré que les L.T ayant échappé à la délétion par le vSAg, répondaient très faiblement après stimulation *in vitro* à l'aide d'Ac anti-V $\beta$  (326). Ces observations sont confirmées chez les souris adultes infectées par injection sous-cutanée de préparations virales (197,309), suggérant une délétion extrathymique des L.T réactifs au vSAg. Quant aux vSAg endogènes, ils induisent une délétion intrathymique complète des L.T exprimant les V $\beta$  qui leur sont spécifiques en moins de 10 jours (327). Ces délétions de L.T créent des trous dans les répertoires T caractéristiques du virus porté par la souris en question. L'activation des L.T par le vSAg étant essentielle pour établir une infection productive par MMTV, les souris portant des vSAg endogènes se trouvent ainsi protégés contre une infection ultérieure par le même virus exogène ou encore par un virus codant pour un vSAg ayant des spécificités V $\beta$  similaires (revu dans (309)).

### 1.5 Rétrovirus endogènes (ERV)

Normalement les virus sont de petits agents infectieux, parasites obligatoires, classifiés selon la nature de leur génome, de la symétrie de leur capsid et selon la présence ou absence d'une enveloppe. Ces virus nécessitent la machinerie protéique cellulaire hôte pour assurer la production de virions et la transmission horizontale par un nouveau cycle infectieux.

Les 20 dernières années de recherches ont montré, chez l'humain, l'existence d'une nouvelle classe de virus capables de se transmettre verticalement à travers la population hôte. Ils se retrouvent sous forme intégrée dans le génome et sont baptisés HERV (Human endogenous retroviruses). Malgré le fait que ces HERV se soient intégrés au génome depuis

~30 millions d'années (328,329), ces séquences comportent encore des éléments permettant de les apparenter clairement aux *rétroviridae*. On retrouve toujours d'ailleurs, les gènes classiques des rétrovirus : *gag*, *pol* et *env* entourés par des LTRs. Souvent, grâce au phénomène de recombinaison homologue, les LTRs se retrouvent à être des éléments solitaires (International human genome consortium (330)). Chez l'homme on estime que 42%-50% de l'euchromatine totale soit constituée de rétroéléments dont 8% à LTRs (HERV, LTR solitaires ou rétrotransposons) (331).

De par leur nature, les ERV font partie intégrante de l'héritage génétique de leur hôte puisque leur transmission à la descendance suit les règles classiques de la génétique mendélienne. C'est en se rendant compte de leur abondance dans le génome animal et de leur expression au niveau des cellules germinales, des tissus embryonnaires et dans certaines lignées cancéreuses qu'on s'est intéressé à mesurer leurs effets biologiques.

### 1.5.1 Effets

Plusieurs études ont souligné les effets pathogènes potentiels ou réels des HERV. Mais, on leur trouve aussi des rôles dans plusieurs mécanismes physiologiques. D'ailleurs on pense aujourd'hui que ces éléments rétroviraux auraient influencé l'évolution des espèces (332) en aidant à réguler l'expression de certains gènes et en interférant directement dans différents processus comme celui du rôle de la protéine d'enveloppe de HERV-W, dans l'immunosuppression de la réponse de la mère face au placenta de son fœtus, ainsi que dans la formation des syncytio-trophoblastes grâce à ses propriétés fusogéniques (332).

En fait, 4 mécanismes d'interférence sont attribués aux ERV intégrés dans les génomes animaux. (i) En premier lieu, ils agissent comme sites de recombinaison inter- et intra-chromosomaux induisant des aberrations et de la mobilité de certaines séquences génomiques. Ainsi les ERVs peuvent jouer le rôle de catalyseur de l'évolution des espèces en permettant une mobilité accrue et facilitant une restructuration génomique. (ii) Les

ERVs influencent aussi les schémas de régulation de l'expression de certains gènes se retrouvant à proximité des LTR solitaires. (iii) D'autre part, leur intégration par elle-même peut causer des mutations jusqu'à l'inactivation de gènes. (iv) Finalement, l'expression de certains gènes viraux peut avoir des conséquences, d'un côté néfastes pour l'organisme de l'hôte et de l'autre positives, lorsque autour de certaines protéines virales se développent des fonctions pathogènes ou utiles à l'hôte (Revu dans (329,333)).

### **1.6 Hypothèse et Rationale**

La présentation des SAg évite tout un système de régulation très complexe pour activer le système immunitaire. La présentation antigénique par les CMH II, répond à des étapes contrôlées à tous les niveaux allant de la biosynthèse des molécules de CMH II à leur transport intracellulaire, la rencontre de l'Ag, sa dégradation, sa présentation en surface des CPA, l'environnement inflammatoire, la migration des CPA jusqu'à l'engagement des complexes CMH II-peptide par les TcR qui leurs sont spécifiques menant à une cascade d'événements inter et intra-cellulaire finement régulés. Ces systèmes permettent d'assurer une réponse spécifique et efficace tout en évitant une suractivation ou l'autoimmunité. Les SAg semblent réussir à se faire présenter et activer le système immunitaire en ne répondant qu'à très peu de restrictions de présentation. Ils semblent avoir trouvé des moyens presque inconditionnels pour activer le bras spécifique du système immunitaire. Malgré ces capacités, il s'est avéré que la présentation des SAg se heurte quand même à certaines restrictions. Nos travaux se sont intéressés à un modèle déficient de présentation endogène du vSag de MMTV. Nous avons essayé d'identifier les facteurs régissant une présentation efficace tout en répondant aux questions que la nature endogène de ce SAg pose. Malgré le fait que les SAg de MMTV soient connus depuis maintenant un quart de siècle, on sait encore peu sur les conditions assurant leur présentation. Nous avons donc profité pour aborder quelques controverses laissées en suspens dans la littérature. Plus particulièrement, nous avons essayé de déterminer l'emplacement intracellulaire de l'interaction fonctionnelle du vSag avec les molécules de CMH II. De plus, nous avons



abordé la sensibilité du vSAg aux peptides présents dans la niche peptidique des molécules de CMH II qui le présentent. Les résultats de nos recherches ont fait l'objet d'une publication récente dans le *Journal of Immunology* (148) (Chapitre 3). Ce travail a été co-rédigé par Dr. Thibodeau et moi-même. À part pour les stimulations présentées dans le panneau C de la figure 1, j'ai effectué la totalité des expériences présentées dans ce travail ainsi que l'analyse et la production des figures.

D'autre part, les travaux du groupe de Bernard Conrad ont offert une théorie très séduisante reliant les secteurs de la recherche sur les HERV aux maladies autoimmunes par le biais d'un vSAg (220,334-337). Par ses deux premières publications sur le sujet, l'équipe de Conrad a proposé l'association de l'expression du produit d'un cadre de lecture ouvert se situant en 3' du gène *env* de HERV K-18 au déclenchement du diabète autoimmun ou diabète insulino-dépendant. Au départ, nous avions comme objectif de confirmer la nature du SAg impliqué afin de mettre en place un système permettant d'étudier les conditions d'expression et d'activation des L.T par ce premier SAg endogène humain. Nos travaux sur le sujet furent publiés dans le journal *Immunology Letters* (219) (Chapitre 2). Ma contribution à ce travail s'élève à la totalité du travail expérimental et la production des figures. De plus, j'ai participé à la rédaction du manuscrit.

Étant donné l'importance des molécules chaperonnes, Ii et DM, pour la présentation du vSAg de MMTV ainsi que pour la présentation de plusieurs autres SAg (MAM, SEA et TSST-1) nous avons étudié l'effet que DO pourrait avoir dans la dynamique de production de complexes CMH II-peptides permissifs à la présentation des SAg. La publication des travaux de Qi *et al.* (338) démontrant que H<sub>2</sub>O inhibait la présentation des bSAg nous a encouragé à approfondir nos études puisque nos résultats préliminaires semblaient contredire leurs conclusions. Nos travaux feront l'objet d'une publication qui sera soumise au *Journal of Immunology* sous peu (Chapitre 4). J'ai personnellement effectué toutes les expériences, les analyses, les figures et la rédaction de cet article.



**CHAPITRE 2 - ARTICLE**

**HUMAN ENDOGENOUS RETROVIRUS IDDMK<sub>1,2</sub>22 AND MOUSE MAMMARY  
TUMOR VIRUS SUPERANTIGENS DIFFER IN THEIR ABILITY TO  
STIMULATE MURINE T CELL HYBRIDOMAS.**

Georges A. Azar\* and Jacques Thibodeau\*<sup>†</sup>

\* Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et  
Immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec,  
Canada, H3C 3J7

Running title: Stimulation of T cell hybridomas by IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF.

Keywords: Superantigens, MHC class II, MMTV, diabetes, IDDM

Abbreviations: **HERV**: Human endogenous retroviruses; **ORF**: Open reading  
frame; **SAg**: Superantigen.

Footnote: This work was supported in part by the Association Diabète Québec.

<sup>†</sup> **Corresponding author**: Jacques Thibodeau,

**Tel:** (514) 343-6279

**Fax:** (514) 343-5701

**e-mail:** [REDACTED]

## 2.1 RÉSUMÉ

Récemment, un rétrovirus endogène humain (IDDMK<sub>1,22</sub>) nouvellement identifié et apparenté à HERV-K18, fut associé à l'établissement du diabète de type I (IDDM). Bien que le mécanisme soit encore mal défini, il fut postulé que le produit d'un cadre de lecture (ORF) placé à l'extrémité 3' du gène *env* de IDDMK<sub>1,22</sub> induirait une expansion des cellules T V $\beta$ 7 spécifique, et une infiltration de ces cellules au pancréas menant à la destruction autoimmune des cellules  $\beta$  productrices d'insuline chez les patients affectés. Depuis, cette activité de nature superantigénique ainsi que l'association du virus IDDMK<sub>1,22</sub> avec la pathologie du diabète autoimmun ont été défiées. Afin de fonctionnellement caractériser le supposé SAg encodé par IDDMK<sub>1,22</sub>, nous avons cloné, à partir d'ADN humain, la séquence de 462 pb identique à l'ORF déjà décrite. Ce fragment, IDDMK<sub>1,22</sub> ORF, fut transfecté dans la même lignée B humaine (Raji) originalement utilisée comme CPA pour démontrer la spécificité V $\beta$ 7. Le potentiel immuno-stimulateur de IDDMK<sub>1,22</sub> ORF a été testé sur des hybridomes T murins et comparé au mieux caractérisé *Mtv7* SAg du virus MMTV transfecté dans les mêmes conditions. Un panneau de 16 hybridomes T couvrant 14 V $\beta$  différents a été analysé. Nous n'avons détecté aucune production d'IL-2 induite par IDDMK<sub>1,22</sub> par ces hybridomes, ni par ceux qui expriment les V $\beta$  murins (mV $\beta$ 1, mV $\beta$ 4 et mV $\beta$ 10) les plus apparentés au V $\beta$ 7 humain. Selon les critères classiques de superantigénicité, nos résultats suggèrent que IDDMK<sub>1,22</sub> ORF est dépourvu d'activité superantigénique.

## 2.2 SUMMARY

Recently, a newly identified human HERV-K10-like endogenous retrovirus (IDDMK<sub>1,2</sub>22) has been implicated in the etiology of type I diabetes (IDDM). Although the exact mechanism remains unclear, it was postulated that the 3' end ORF product of the *env* gene of IDDMK<sub>1,2</sub>22 would trigger a V $\beta$ 7-specific human T cell expansion leading to their infiltration in the pancreas of afflicted patients and to the autoimmune destruction of the insulin-producing  $\beta$  cells. Since then, such superantigen (SAg)-like activity as well as the association between the IDDMK<sub>1,2</sub>22 virus and IDDM pathogenesis have been challenged. To further characterize functionally the putative IDDMK<sub>1,2</sub>22-encoded SAg, we have cloned from human DNA the identical 462bp ORF sequence originally described. The IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF fragment was transfected in the same human B cell line (Raji) originally used as APC to demonstrate the V $\beta$ 7 specificity. The immunostimulatory potential of IDDM ORF was tested on murine T cell hybridomas and compared to the well-characterized mouse mammary tumor virus *Mtv7* SAg transfected in the same conditions. A panel of 16 T cell hybridomas encompassing 14 different V $\beta$ s was analyzed. We have failed to detect IDDMK<sub>1,2</sub>22-induced IL-2 production from any of these hybridomas, even those bearing the murine V $\beta$ 1 (mV $\beta$ 1), mV $\beta$ 4 or mV $\beta$ 10 TcR  $\beta$  chains which are most closely related to the human V $\beta$ 7 (hV $\beta$ 7). Our results suggest that IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF is devoid of superantigenic activity as defined by classical criteria.

## 2.3 INTRODUCTION

Superantigens (SAGs) are microbial mitogenic proteins that bind MHC molecules outside the peptide-binding groove and activate up to 20% of the T cell repertoire in a V $\beta$ -specific manner [1-4]. T cell proliferation is accompanied by a massive production of cytokines such as TNF- $\alpha$  that account for the toxicity of SAG proteins [5;6]. The best-characterized SAGs are those secreted by *Staphylococcus aureus* as well as the product of the 3' LTR ORF of the mouse mammary tumor viruses (MMTV) [3;4;7].

Detection of V $\beta$ -specific T cell amplification in patients has been taken as evidence for the involvement of SAG-producing pathogens in some autoimmune diseases [3;4]. For example, following the onset of autoimmune arthritis, a hV $\beta$ 14<sup>+</sup> T cell enrichment has been reported in afflicted joints [8]. Also, exposure of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) susceptible rodents to staphylococcal enterotoxin B (SEB) triggers a V $\beta$ -specific T cell expansion causing the relapse of the autoimmune pathological condition [9;10].

The etiology of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is still elusive and it has been speculated that SAGs could be held responsible for the T cell-mediated autoimmune destruction of the insulin producing  $\beta$  cells in the pancreas [11;12]. Indeed, using islet cell membrane preparations from afflicted patients, Conrad and collaborators showed a V $\beta$ 7-specific T cell expansion from the peripheral blood of healthy donors [13]. More recently, the same group identified IDDMK<sub>1,222</sub> as a novel human endogenous retrovirus (HERV), closely related to HERV K10 and to MMTV, and which encodes in its 3' *env* gene what appears to be the functional V $\beta$ 7-specific SAG [14]. However, the exact nature of IDDMK<sub>1,222</sub> and its association to IDDM has been disputed as this virus was found to be either ubiquitously expressed [15-18] or undetectable at all in patients [19;20]. Despite the lack of epidemiological relationship between IDDM and expression of IDDMK<sub>1,222</sub>, the superantigenic nature of the 3' ORF product might still be relevant to

homeostasis of the T cell repertoire. Nonetheless, Lapatschek et al. concluded that the ORF gene does not encode for a functional SAg since transfected A20 cells did not stimulate human or murine primary T cells in a V $\beta$ -specific manner [21]. Although presentation of SAg is not generally MHC restricted, the possibility remains that the class II molecules expressed on A20 cells may not be permissive for binding IDDMK<sub>1,22</sub> ORF SAg. As a matter of fact, MHC class II allelic and isotypic polymorphisms have been shown to modulate the binding of SAg [22-25]. To further characterize the activity of the IDDMK<sub>1,22</sub> ORF SAg on T cell activation, we have cloned from the *env* gene the minimal stimulatory sequence that was shown to stimulate human V $\beta$ <sup>7+</sup> T cells [14]. To ascertain efficient presentation by MHC class II molecules, the ORF sequence was transfected into the human B cell line Raji that was originally used to characterize the superantigenic properties of IDDMK<sub>1,22</sub>. The activity of IDDMK<sub>1,22</sub> SAg was tested on murine T cell hybridomas and compared to the well-characterized *mtv7* SAg. From our results, we conclude that IDDMK<sub>1,22</sub> ORF protein does not exhibit classical functional characteristics of SAg.



## 2.4 RESULTS AND DISCUSSION

### Cloning and expression of the IDDMK<sub>1,22</sub> ORF sequence

Different human cell lines (HeLa, T2, Raji, LG2) were used to amplify by PCR the exact ORF SAg sequence. Using primers encompassing both the start and stop codons of the 462 bp minimal sequence published previously [14], we have amplified and cloned DNA fragments obtained from each cell line. A total of 12 clones were sequenced, partially or entirely, and their predicted primary amino acid sequences were compared to the one of the IDDMK<sub>1,22</sub> SAg (Fig.1). One clone, called LG2.9, encodes a protein identical to IDDMK<sub>1,22</sub> ORF. The other clones were all different although five major recurrent amino acid substitutions were noted at positions 48, 78, 115, 123 and 140. In structural terms, the most dramatic substitutions were the replacement of proline 115 by threonine, and glycine 123 by the charged glutamic acid. These variations were found in more than one cell line suggesting that they are not the result of Taq polymerase errors. The activity of these mutant forms of the ORF SAg could be investigated once the superantigenic characteristics of IDDMK<sub>1,22</sub> ORF product are well established.

The LG2.9 ORF DNA fragment was cloned into the mammalian expression vector SR $\alpha$ puro (SR $\alpha$  IDDM) and stably transfected in Raji cells (Raji IDDM). Since no antibody against IDDM ORF is available, we controlled the transfection efficiency using the GFP gene cloned into SR $\alpha$ puro (SR $\alpha$  GFP) and transfected in the same conditions (Raji GFP). According to the flow cytometry analysis of Raji GFP, we estimated that 48% of the cells stably expressed the protein of interest (Fig.2A). The Raji IDDM population was cloned by limiting dilution to select by Northern blotting for cells expressing high levels of viral SAg (vSAg). Fig.2B shows a strong specific ORF mRNA signal in clone Raji IDDM 4F6 as compared to the cells transfected with the vector alone (Raji SR $\alpha$ ). Assuming that high mRNA levels correlate with high protein expression, the clone Raji IDDM 4F6 was used to characterize functionally the IDDM ORF product.

### **IDDMK<sub>1,2</sub>22 SAg does not stimulate murine T cell hybridomas**

The SAg activity of IDDM ORF is poorly characterized and contradictory results have been obtained using primary human T cells [14;21]. In addition, using murine splenocytes, Lapatschek and collaborators could not demonstrate any V $\beta$ -specific proliferation in response to A20 murine B cells transfected with IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF. However, its activity on primary V $\beta$ 1<sup>+</sup> murine T cells could not be assessed directly as no specific antibody is yet available [21]. This mV $\beta$ 1 element is particularly interesting since it is the most closely related to the hV $\beta$ 7 that was shown to recognize IDDM ORF (Fig 2C) [26]. For the *mtv7* SAg, strong structural conservation between responding human and mV $\beta$ s has been described [27]. Thus, to further characterize the potential SAg activity of IDDM ORF, Raji IDDM 4F6 was used as APC in co-cultures with those murine T cell hybridomas expressing mV $\beta$ s related to the human V $\beta$  7: KSEA 1.8 (mV $\beta$ 1), I1B3 (mV $\beta$ 1 and 8), B4V4D8.22 (mV $\beta$ 4), and 17BBM 151.12 (mV $\beta$ 1 and 10). I1B3 and 17BBM 151.12 express a common TcR V $\beta$ 1 chain encoded by the BW5147 fusion thymoma parent [28]. Three different stimulators to effectors ratios were tested. Figure 2D shows that Raji IDDM 4F6 cells could not stimulate T cells above background levels defined as the IL-2 secretion obtained using Raji SR $\alpha$  cells.

We verified that Raji IDDM 4F6 cells were not simply deficient in their capacity to form conjugates with those particular T cell hybridomas by using bSAs as controls (Fig.2D). Indeed, KSEA 1.8, I1B3 and 17BBM 151.12 were successfully stimulated by SEA bound to Raji SR $\alpha$  or Raji IDDM 4F6. Since B4V4D8.22 was not stimulated by SEA, SEB or TSST-1 (not shown), we used PHA to demonstrate its ability to secrete IL-2.

We then eliminated the possibility that our Raji cells could be deficient in the presentation of endogenous retroviral SAs in general. To test this hypothesis, cells

transfected with the *mtv7* SAg in SR $\alpha$  (Raji MTV7) were subjected to limiting dilution and one clone, Raji MTV7 2H8, was further characterized. Expression of *mtv7* vSAg was measured at the cell surface by flow cytometry using the VS7 vSAg-specific antibody (Fig 3A) [29]. As shown in Fig 3B, Raji MTV7 2H8 cells efficiently stimulated V $\beta$ 6<sup>+</sup> (Kmls 13.11) and V $\beta$ 8<sup>+</sup> (KR3<sup>+</sup>) T cell hybridomas as high levels of IL-2 were produced when compared to the stimulation obtained using APCs transfected with the vector alone. These data confirm the efficient transfection and expression of endogenous SAGs in these conditions and the capacity of Raji cells to present to T cells. Altogether, these results cast doubts on the SAg nature of IDDM.

Still, in an attempt to uncover potential IDDM ORF-specific V $\beta$  chains, we tested the reactivity of a panel of T cell hybridomas bearing mV $\beta$ 3, 5, 6, 8, 11, 15 and 17 TcRs (Fig.4A) as well as mV $\beta$ 2, 9, 12 and 16 (not shown). Although all responded to control bSAGs or to *mtv7* SAg, Raji IDDM 4F6 could not by itself stimulate any of these T cell hybridomas above the background level observed with Raji SR $\alpha$  alone. The inability of Raji IDDM 4F6 to stimulate T cells could not be attributed to clonal aberrations as 4F6 displayed high levels of surface HLA-DR molecules (Fig.4B) and the bulk population of Raji IDDM was just as inefficient as Raji IDDM 4F6 in stimulating T cell hybridomas (not shown).

On the other hand, *mtv7* SAg activated RG17 (mV $\beta$ 6<sup>+</sup>) and KJ16 (mV $\beta$ 8<sup>+</sup>) hybridomas, as expected. Also, a strong stimulation was observed using KOX 15.8.3 (mV $\beta$ 15<sup>+</sup>) and 26.6 (mV $\beta$ 17<sup>+</sup>) T cells. To our knowledge, this is the first description of a mV $\beta$ 15<sup>+</sup> and mV $\beta$ 17<sup>+</sup> T cell response to *mtv7* SAg. The use of a human APC could explain this observation. Xenogenic isotypes and alleles of class II molecules expressed on Raji cells might increase the strength of TcR-MHC contacts for such V $\beta$ s with, presumably, low affinity for vSAGs [30;31].

Altogether, these results suggest that IDDM ORF does not encode for a typical SAg and confirm the negative results obtained by Lapatchek and collaborators using primary human and mouse T cells [21].

## 2.5 CONCLUDING REMARKS

Based on the general accepted criteria defining SAgS [32-34], the IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF product does not seem to be part of this family of proteins. Indeed, its recombinant form expressed in class II<sup>+</sup> cells could not stimulate T cell hybridomas in a V $\beta$ -restricted fashion. The possibility remains that non-V $\beta$  elements of the TcR such as the alpha chain, or polymorphisms in those particular V $\beta$ s tested here could impose structural constraints precluding efficient recognition of SAg/class II complexes. Examples of such skewing of the T cell response have been documented previously [35-37]. However, since none of the 16 hybridomas tested here have been stimulated and that primary human or mouse T cells could not be reproducibly activated with similar constructs in another study [21], we conclude that IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF is not a potent SAg, if at all. On the other hand, the *mtv7* SAg stimulated 4 out of 7 V $\beta$ s and 7 out of 10 hybridomas tested. Nevertheless, given the high number of endogenous retroviruses inserted in the human genome, it will be interesting to assess the stimulatory activity of IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF-related sequences.

## 2.6 MATERIALS AND METHODS

### Cells and antibodies:

The human Burkitt lymphoma B cell line Raji (ATCC CCL 86), the EBV-transformed B cell line LG2 (obtained from Larry Stern) and the hybrid T2 (ATCC CRL 1992) were cultured in RPMI 1640 medium with 10% FBS (Gibco BRL, USA) and 4 $\mu$ M 2-Mercapthoethanol. The epithelial HeLa cells (ATCC CCL-2) were cultured as above but in DMEM medium. All transfected cells were kept under selection with 2 $\mu$ g/mL of puromycin (Sigma-Aldrich, Ont. Canada).

Murine T cell hybridomas were grown in DMEM (Kmls 12.6 (mV $\beta$ 6) [22], Kmls 13.11 (mV $\beta$ 6) [22], 26.6 (mV $\beta$ 17) a kind gift from Dr. Christophe Benoît, I1B3 (mV $\beta$ 1, mV $\beta$ 8) [38;39], K25-49.16 (mV $\beta$ 3) [22;40], KJ16 (mV $\beta$ 8) a kind gift from Dr. Brigitte Huber, KOX 15-8.3 (mV $\beta$ 15) [22], KSEA 1.8/4.9.3 (mV $\beta$ 1) [22]) or RPMI 1640 (11.40 (mV $\beta$ 11) [41], V $\beta$ 5 #11 (mV $\beta$ 5) [42], RG 17 (mV $\beta$ 6) and KR3<sup>+</sup> (mV $\beta$ 8) a kind gift from Dr. Rafick-Pierre Sékaly. 1D1-E7 (mV $\beta$ 16), 1HB99.20 (mV $\beta$ 12 and 1) [40], 17 BBM-151.12 (mV $\beta$ 10 and 1) [40], 4B18-10 (mV $\beta$ 9), B4V4D8.22 (mV $\beta$ 4) and B4B30.12 (mV $\beta$ 2) (a generous gift from Dr. Patrice Hugo). TcR expression at the surface of these hybridomas was monitored by flow cytometry using the H57-597 (ATCC HB-218) monoclonal antibody (mAb) (not shown). H57-597 mAb (IgG) recognizes all murine alpha beta TcR [43].

The VS7 mAb against the C-terminal part of *mtv7* SAg was a kind gift from Dr G. Winslow [29]. L243 (ATCC HB-55) mAb (IgG2a) binds a specific DR $\alpha$  conformational determinant [44].

### PCR and sequencing:

The IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF was cloned from genomic DNA extracted as described [45]. Briefly, cells were lysed in 1% Triton X-100 and treated with proteinase K. After protein

extraction with phenol/chloroform, nucleic acids were precipitated with ethanol. The primers used for PCR were inspired from the original IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF published sequence [14] (5'end primer: GCA AAG AAA AGC *GGA* *TCC* ACG GAG ATG; 3'end primer: *AA AGG ATC CTA* ATC TAT AAT AGT TCC G). Both primers contained a BamHI restriction site (*italic character*) as well as the initiation and termination codons (**bold characters**). PCR products of the expected 494bp size were isolated on agarose gel, cloned into the BamHI site of pBluescript KS<sup>+</sup> vector (Stratagene, CA), and sequenced using the T7 polymerase.

### **Plasmids and Transfection:**

The SR $\alpha$ IDDM construct was generated by subcloning the LG2.9 DNA fragment into the mammalian expression vector SR $\alpha$ puro (kindly provided by Dr. François Denis). Control SR $\alpha$ MTV7 and SR $\alpha$ GFP constructs were obtained from François Denis and Sophie Gratton, respectively.

Stable transfectants were generated by electroporation. Briefly, 10<sup>7</sup> Raji cells in 500 $\mu$ l of RPMI containing 20% FBS and 15 $\mu$ g of plasmid DNA were electroporated in a 0.4 cm cuvette at 960  $\mu$ F, 300V using the BIO-RAD gene pulser<sup>TM</sup>(Biorad, CA). After 24 hours at 37°C, cells were grown for 3 weeks under selection using 0.2 $\mu$ g/mL puromycin. Clones were obtained by limiting dilutions in 96 well plates.

### **Northern blot analysis**

Total RNA was isolated using Trizol (Gibco BRL, NY, USA) and analysed by Northern blotting as described previously [42]. As probe for the detection of IDDMK<sub>1,2</sub>22 ORF mRNA, we used the LG2.9 insert purified from agarose gels after  $\alpha$ P<sup>32</sup> labelling using the Ready-to-Go labelling kit (Pharmacia Biotech, NJ, USA). The GAPDH cDNA was kindly provided by Dr. Pierre Belhumeur.

**Flow Cytometry Analysis:**

Cells were washed in PBS and incubated with primary antibodies in complete cell culture medium. After 30 min. at 4°C, cells were washed twice in PBS and incubated for another 30 min. at 4°C with a FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (GAM-FITC) (Cedarlane, Canada) in PBS. Cells were washed twice and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson, CA). As negative control, cells were stained using GAM-FITC alone.

**T cell stimulation assays**

Raji cells were co-cultured in the presence of  $6 \times 10^4$  T cell hybridomas at different APC to hybridoma ratios (1:1, 1:3 or 1:10). For bacterial SAg presentation, cells were co-cultured at a ratio of 1:3 in the presence of 1 µg/mL SEB, 1 µg/mL TSST-1 (Toxin technology, FL USA) or 100 ng/mL SEA (a generous gift from Dr. R.P. Sekaly). PHA stimulation was achieved by culturing the T cell hybridoma B4V4D8.22 with 100 µg/mL PHA (a kind gift from Dr. R.P. Sékaly). 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 (ATCC TIB-214) as measured by  $H^3$ -thymidine incorporation or by dosage of hexoseaminidase as described previously [42]

## **2.7 ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Drs Rafick Sékaly, Patrice Hugo, Philippa Marrack, John Kappler, Brigitte Huber, Diane Mathis and Christophe Benoit for providing T cell hybridomas and reagents. We thank M. Serge Sénéchal for helping with flow cytometry and Dr José Menezes for the use of the Beta plate counter. This work was supported by a grant to JT and a studentship to GA from the Association Diabète Québec. JT holds a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) fellowship.



## 2.8 FIGURES

**Figure 1. Alignment of IDDMK<sub>1,222</sub> ORF-related sequences.** Twelve DNA clones were completely or partially sequenced and the predicted amino acid sequences were compared to the IDDMK<sub>1,222</sub> SAg originally described [14]. The LG2.9 clone, despite a T to C silent mutation at nucleotide 291, was found to encode for a protein identical to the IDDM<sub>1,222</sub> ORF. Dots correspond to identical amino acids while discontinued lines indicate unsequenced regions. The individual names refer to the human cell line from which the DNA fragment was amplified.

```

                *      20      *      40      *      60
IDDMKSag : MVTPTWMDNPIEVYVNDVWVPGPTDDRCPAKPEEEMMINISIGYHYPPICLGRAPGCLMPAVQN
LG2.9    : .....
LG2.12   : -----
HELA1.2  : -----E.....R.....T.....
HELA2.2  : -----R.....
HELA5.2  : -----K.....R.....
HELA6.2  : -----
HELA10.1 : .....E.....R.....
HELA10.2 : -----
HELA28.1 : .E.....H.....
T2.3     : .....I.....I.....R.....
T2.1     : -----
RAJI3    : -----
    
```

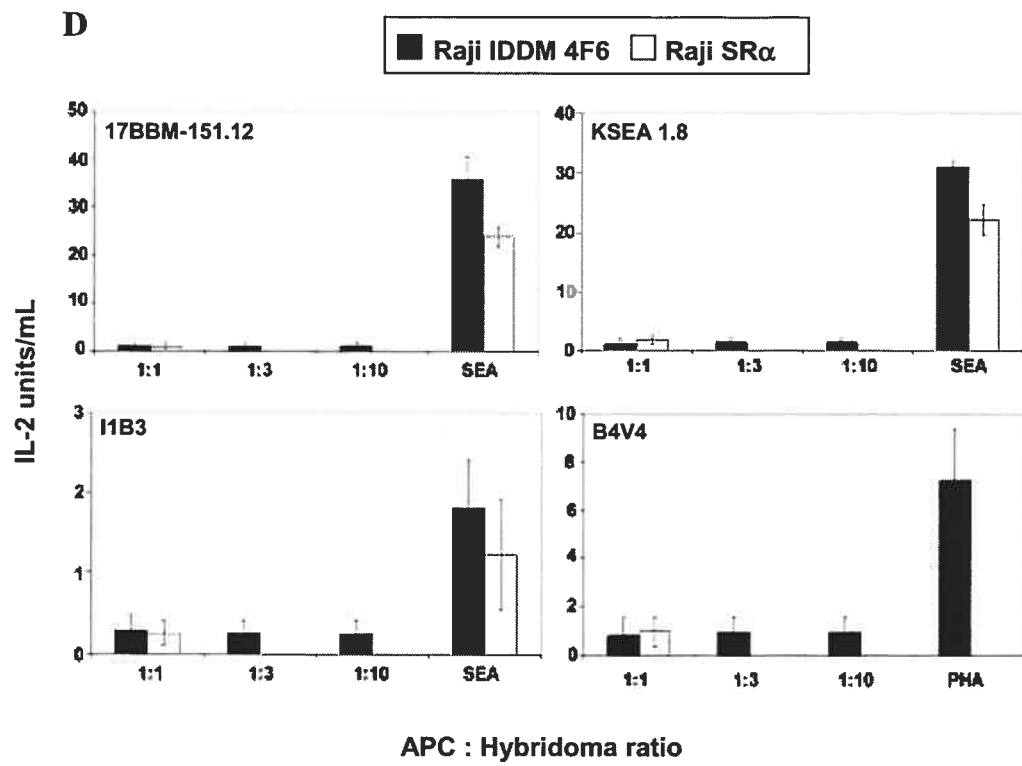
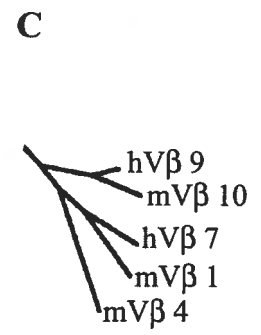
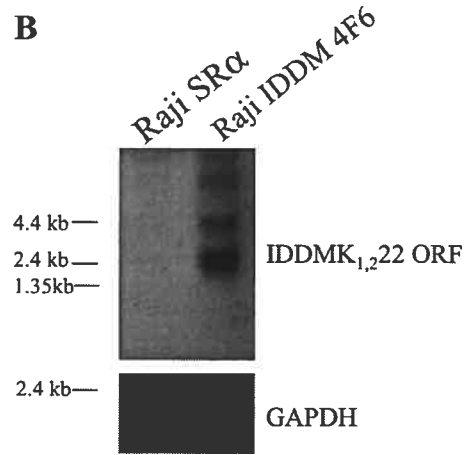
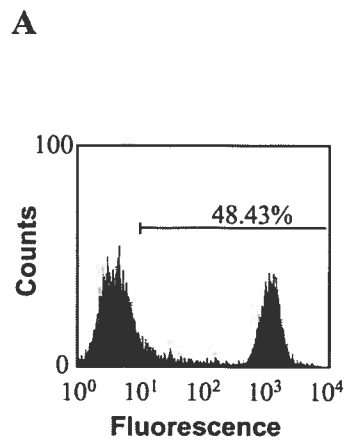
```

                *      80      *      100     *      120     *
IDDMKSag : WLVEVPTVSPNSRFTYHMVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSLKFRPKGKTCPKI PKGSKNTEVLVWEE
LG2.9    : .....
LG2.12   : -----P.....E.....
HELA1.2  : .....I..I.....P.....E.....
HELA2.2  : .....I.....E.....
HELA5.2  : .....I.....P.....E.....
HELA6.2  : -----P.....
HELA10.1 : .....I.....P.....E.....
HELA10.2 : .....I.....P.....
HELA28.1 : .....I.....P.....
T2.3     : -----C.....
T2.1     : -----E.....
RAJI3    : -----E.....
    
```

```

                140      *
IDDMKSag : CVANSVVILQNNFPGTIID-----
LG2.9    : -----
LG2.12   : .....A.....
HELA1.2  : .....A.....
HELA2.2  : R...A.....
HELA5.2  : .....
HELA6.2  : .....
HELA10.1 : R...A.....
HELA10.2 : .....
HELA28.1 : .....A.....S.....
T2.3     : -----
T2.1     : .....
RAJI3    : -----
    
```

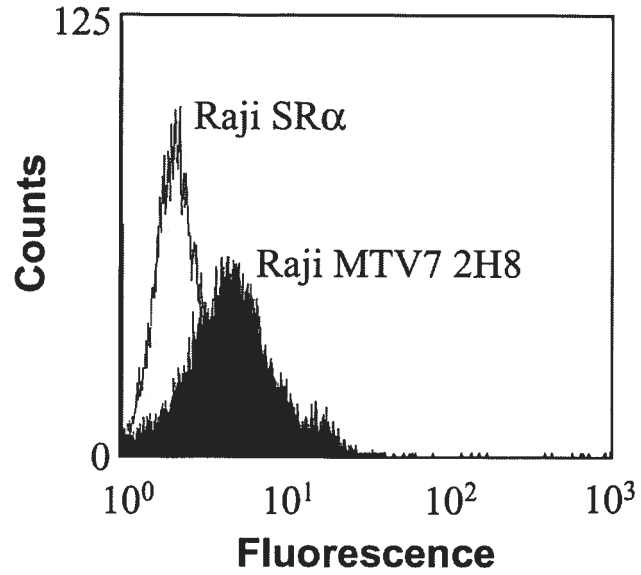
**Figure 2. Raji IDDM 4F6 does not stimulate T cell hybridomas expressing TcRs related to the human V $\beta$ 7. (A)** GFP fluorescence of Raji cells stably transfected with the SR $\alpha$  GFP vector (Raji GFP). After 3 weeks of selection, transfected cells were analyzed by flow cytometry. Marker indicates the percentage of transfected cells stably expressing the GFP protein. **(B)** High levels of IDDMK ORF mRNA expression in transfected Raji cells. Twenty  $\mu$ g of total mRNA was analyzed by Northern blotting using the IDDMK<sub>1,222</sub>-specific probe. Constitutively expressed Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was analyzed on a separate blot and used as semi-quantitative control. **(C)** Dendrogram illustrating the degree of homology between human V $\beta$ 7 (hV $\beta$ ) and different mV $\beta$ s. Inspired from Clark and collaborators [26]. **(D)** Stimulation of T cell hybridomas 17BBM-151.12, KSEA 1.8, I1B3 and B4V4D8.22 by IDDM ORF-transfected cells. SEA (0.1 $\mu$ g/mL) was used as control except for B4V4, which was stimulated with 100 $\mu$ g/mL PHA in the absence of APCs. Three different APC to T cell hybridoma ratios were tested and IL-2 secretion was quantified as a measure of T cell activation.



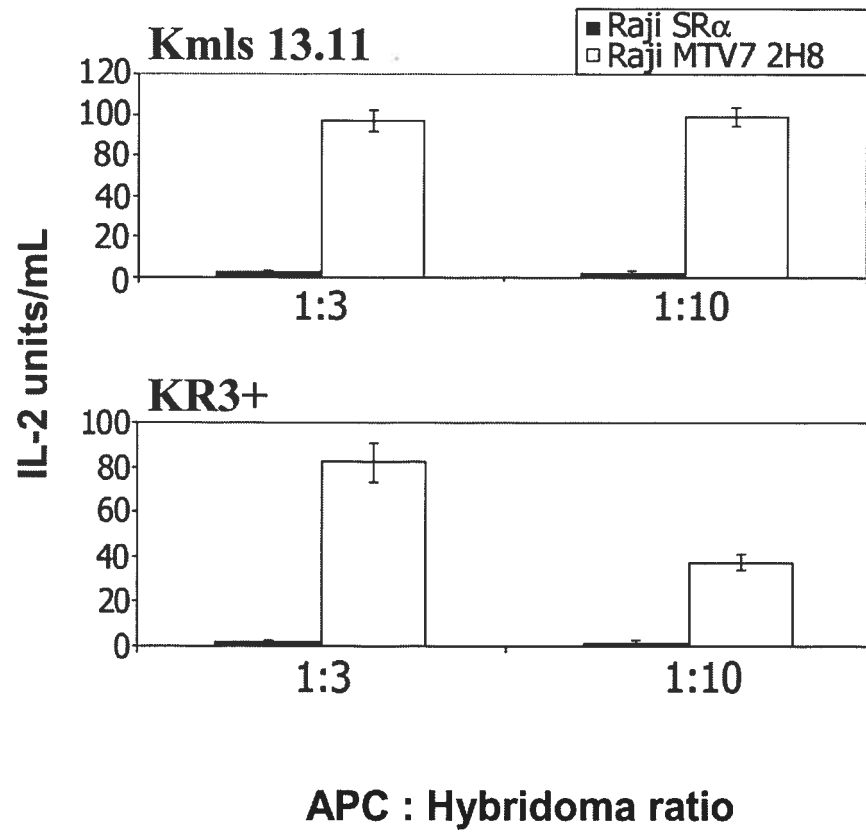
**Figure 3. MTV7 transfected Raji successfully activate T cell hybridomas.**

(A) The expression of transfected *mtv7* SAg in clone Raji MTV 2H8 (filled histogram) was monitored by surface staining using the VS7 antibody followed by a FITC-coupled goat anti-mouse secondary antibody. Control Raji SR $\alpha$  (open histogram) was stained in the same conditions. (B) *Mtv7* SAg transfected in Raji cells stimulates T cell hybridomas Kmls 13.11 (V $\beta$ 6) and KR3<sup>+</sup> (V $\beta$ 8). Two different APC to T cell hybridoma ratios were tested and IL-2 secretion was quantified as a measure of T cell activation.

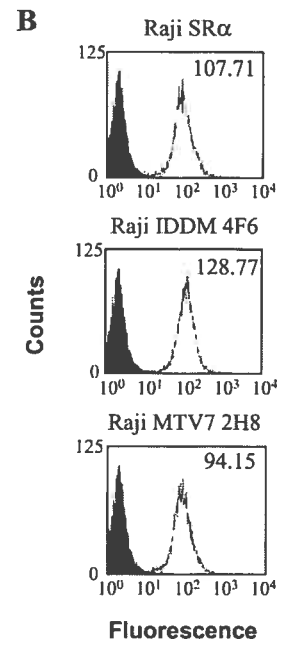
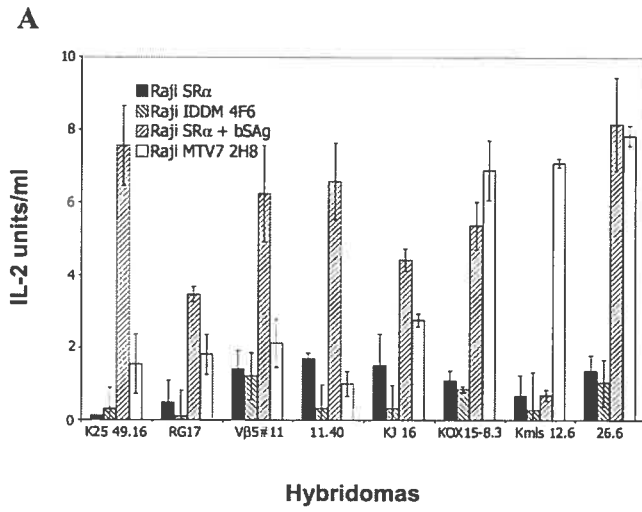
**A**



**B**



**Figure 4. V $\beta$ -specific activation of T cell hybridomas by vSAg-transfected Raji cells.** (A) APCs were co-cultured with T cell hybridomas at a ratio of 1:1 and IL-2 secretion was measured after 24h. Bacterial SAgS were used as positive controls for the T cell activation. Hybridomas 11.40, 26.6, K25-49.16 and V $\beta$ 5#11 were stimulated with 0.1  $\mu$ g/mL SEA while hybridomas KJ16 and RG17, were stimulated with 1  $\mu$ g/mL SEB. KOX 15-8.3 was stimulated with 1 $\mu$ g/mL TSST-1. (B) Expression of HLA-DR at the surface of transfected cells was monitored by flow cytometry using the L243 antibody followed by FITC-coupled goat anti-mouse secondary antibody. Negative control (filled histogram) represents Raji SR $\alpha$  cells stained with secondary antibody alone. Numbers indicate the mean fluorescence value for the transfected cells (open histograms).





## 2.9 REFERENCES

1. **Marrack,P. and Kappler,J.**, The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990. **248**: 705-711.
2. **Lavoie,P.M., Thibodeau,J., Erard,F., and Sekaly,R.P.**, Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunol.Rev.* 1999. **168**: 257-269.
3. **Papageorgiou,A.C. and Acharya,K.R.**, Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol.* 2000. **8**: 369-375.
4. **Fraser,J., Arcus,V., Kong,P., Baker,E., and Proft,T.**, Superantigens - powerful modifiers of the immune system. *Mol.Med.Today* 2000. **6**: 125-132.
5. **Marrack,P., Blackman,M., Kushnir,E., and Kappler,J.**, The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *J.Exp.Med.* 1990. **171**: 455-464.
6. **Miethke,T., Wahl,C., Heeg,K., Echtenacher,B., Krammer,P.H., and Wagner,H.**, T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 1992. **175**: 91-98.
7. **Shoukry,N.H., Lavoie,P.M., Thibodeau,J., D'Souza,S., and Sekaly,R.P.**, MHC class II-dependent peptide antigen versus superantigen presentation to T cells. *Hum.Immunol.* 1997. **54**: 194-201.
8. **Paliard,X., West,S.G., Lafferty,J.A., Clements,J.R., Kappler,J.W., Marrack,P., and Kotzin,B.L.**, Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 1991. **253**: 325-329.
9. **Schiffenbauer,J., Johnson,H.M., Butfiloski,E.J., Wegrzyn,L., and Soos,J.M.**, Staphylococcal enterotoxins can reactivate experimental allergic encephalomyelitis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993. **90**: 8543-8546.

10. **Brocke,S., Gaur,A., Piercy,C., Gautam,A., Gijbels,K., Fathman,C.G., and Steinman,L.,** Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 1993. **365**: 642-644.
11. **Luppi,P. and Trucco,M.,** Superantigens in insulin-dependent diabetes mellitus. *Springer Semin.Immunopathol.* 1996. **17**: 333-362.
12. **Eisenbarth,G.S.,** Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N.Engl.J.Med.* 1986. **314**: 1360-1368.
13. **Conrad,B., Weidmann,E., Trucco,G., Rudert,W.A., Behboo,R., Ricordi,C., Rodriquez-Rilo,H., Finegold,D., and Trucco,M.,** Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* 1994. **371**: 351-355.
14. **Conrad,B., Weissmahr,R.N., Boni,J., Arcari,R., Schupbach,J., and Mach,B.,** A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 1997. **90**: 303-313.
15. **Badenhoop,K., Donner,H., Neumann,J., Herwig,J., Kurth,R., Usadel,K.H., and Tonjes,R.R.,** IDDM patients neither show humoral reactivities against endogenous retroviral envelope protein nor do they differ in retroviral mRNA expression from healthy relatives or normal individuals. *Diabetes* 1999. **48**: 215-218.
16. **Lan,M.S., Mason,A., Coutant,R., Chen,Q.Y., Vargas,A., Rao,J., Gomez,R., Chalew,S., Garry,R., and Maclaren,N.K.,** HERV-K10s and immune-mediated (type 1) diabetes. *Cell* 1998. **95**: 14-16.
17. **Murphy,V.J., Harrison,L.C., Rudert,W.A., Luppi,P., Trucco,M., Fierabracci,A., Biro,P.A., and Bottazzo,G.F.,** Retroviral superantigens and type 1 diabetes mellitus. *Cell* 1998. **95**: 9-11.
18. **Lower,R., Tonjes,R.R., Boller,K., Denner,J., Kaiser,B., Phelps,R.C., Lower,J., Kurth,R., Badenhoop,K., Donner,H., Usadel,K.H., Miethke,T., Lapatschek,M., and Wagner,H.,** Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not

depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K. *Cell* 1998. **95**: 11-14.

19. **Muir,A., Ruan,Q.G., Marron,M.P., and She,J.X.,** The IDDMK(1,2)22 retrovirus is not detectable in either mRNA or genomic DNA from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1999. **48**: 219-222.
20. **Kim,A., Jun,H.S., Wong,L., Stephure,D., Pacaud,D., Trussell,R.A., and Yoon,J.W.,** Human endogenous retrovirus with a high genomic sequence homology with IDDMK(1,2)22 is not specific for Type I (insulin-dependent) diabetic patients but ubiquitous. *Diabetologia* 1999. **42**: 413-418.
21. **Lapatschek,M., Durr,S., Lower,R., Magin,C., Wagner,H., and Miethke,T.,** Functional analysis of the env open reading frame in human endogenous retrovirus IDDMK(1,2)22 encoding superantigen activity. *J.Virol.* 2000. **74**: 6386-6393.
22. **Herman,A., Croteau,G., Sekaly,R.P., Kappler,J., and Marrack,P.,** HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells. *J.Exp.Med.* 1990. **172**: 709-717.
23. **Mollick,J.A., Chintagumpala,M., Cook,R.G., and Rich,R.R.,** Staphylococcal exotoxin activation of T cells. Role of exotoxin-MHC class II binding affinity and class II isotype. *J.Immunol.* 1991. **146**: 463-468.
24. **Scholl,P.R., Sekaly,R.P., Diez,A., Glimcher,L.H., and Geha,R.S.,** Binding of toxic shock syndrome toxin-1 to murine major histocompatibility complex class II molecules. *Eur.J.Immunol.* 1990. **20**: 1911-1916.
25. **Scholl,P.R., Diez,A., Karr,R., Sekaly,R.P., Trowsdale,J., and Geha,R.S.,** Effect of isotypes and allelic polymorphism on the binding of staphylococcal exotoxins to MHC class II molecules. *J.Immunol.* 1990. **144**: 226-230.
26. **Clark,S.P., Arden,B., Kabelitz,D., and Mak,T.W.,** Comparison of human and mouse T-cell receptor variable gene segment subfamilies. *Immunogenetics* 1995. **42**: 531-540.

27. **Labrecque,N., McGrath,H., Subramanyam,M., Huber,B.T., and Sekaly,R.P.,** Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigen: V beta restriction and conserved evolutionary features. *J.Exp.Med.* 1993. **177:** 1735-1743.
28. **White,J., Kappler,J., and Marrack,P.,** Production and characterization of T cell hybridomas. *Methods Mol.Biol.* 2000. **134:** 185-193.
29. **Winslow,G.M., Marrack,P., and Kappler,J.W.,** Processing and major histocompatibility complex binding of the MTV7 superantigen. *Immunity.* 1994. **1:** 23-33.
30. **Surman,S., Deckhut,A.M., Blackman,M.A., and Woodland,D.L.,** MHC-specific recognition of a bacterial superantigen by weakly reactive T cells. *J.Immunol.* 1994. **152:** 4893-4902.
31. **Nguyen,P., Woodland,D.L., and Blackman,M.A.,** MHC bias of Mls-1 recognition is not influenced by thymic positive selection. *Cell Immunol.* 1996. **167:** 224-229.
32. **Fleischer,B.,** Too many superantigens. In **Thibodeau,J. and Sékaly,R.P. (Eds.)** *Bacterial Superantigens: Structure, Function and Therapeutic Potential.* R.G. Landes Company, Austin 1995, pp 25-33.
33. **Fleischer,B., Necker,A., Leget,C., Malissen,B., and Romagne,F.,** Reactivity of mouse T-cell hybridomas expressing human Vbeta gene segments with staphylococcal and streptococcal superantigens. *Infect.Immun.* 1996. **64:** 987-994.
34. **Fleischer,B.,** Stimulation of human T cells by microbial 'superantigens'. *Immunol.Res.* 1991. **10:** 349-355.
35. **Cazenave,P.A., Marche,P.N., Jouvin-Marche,E., Voegtle,D., Bonhomme,F.,  
Bandeira,A., and Coutinho,A.,** 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* 1990. **63:** 717-728.

36. **Woodland,D.L., Smith,H.P., Surman,S., Le,P., Wen,R., and Blackman,M.A.,** Major histocompatibility complex-specific recognition of Mls-1 is mediated by multiple elements of the T cell receptor. *J.Exp.Med.* 1993. **177:** 433-442.
37. **Pullen,A.M., Bill,J., Kubo,R.T., Marrack,P., and Kappler,J.W.,** Analysis of the interaction site for the self superantigen Mls-1a on T cell receptor V beta. *J.Exp.Med.* 1991. **173:** 1183-1192.
38. **Lamarre,D., Capon,D.J., Karp,D.R., Gregory,T., Long,E.O., and Sekaly,R.P.,** Class II MHC molecules and the HIV gp 120 envelope protein interact with functionally distinct regions of the CD4 molecule. *EMBO J.* 1989. **8:** 3271-3277.
39. **Fleury,S., Lamarre,D., Meloche,S., Ryu,S.E., Cantin,C., Hendrickson,W.A., and Sekaly,R.P.,** Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 1991. **66:** 1037-1049.
40. **Callahan,J.E., Herman,A., Kappler,J.W., and Marrack,P.,** Stimulation of B10.BR T cells with superantigenic staphylococcal toxins. *J.Immunol.* 1990. **144:** 2473-2479.
41. **Woodland,D.L., Happ,M.P., Gollob,K.J., and Palmer,E.,** An endogenous retrovirus mediating deletion of alpha beta T cells? *Nature* 1991. **349:** 529-530.
42. **Thibodeau,J., Labrecque,N., Denis,F., Huber,B.T., and Sekaly,R.P.,** Binding sites for bacterial and endogenous retroviral superantigens can be dissociated on major histocompatibility complex class II molecules. *J.Exp.Med.* 1994. **179:** 1029-1034.
43. **Kubo,R.T., Born,W., Kappler,J.W., Marrack,P., and Pigeon,M.,** Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine alpha beta T cell receptors. *J.Immunol.* 1989. **142:** 2736-2742.
44. **Fu,X.T. and Karr,R.W.,** HLA-DR alpha chain residues located on the outer loops are involved in nonpolymorphic and polymorphic antibody-binding epitopes. *Hum.Immunol.* 1994. **39:** 253-260.

45. **Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T.**, Analysis and cloning of Eukaryotic genomic DNA. In **Ford,N., Nolan,C., and Ferguson,M.** (Eds.) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1987.

**CHAPITRE 3 – ARTICLE**

**A DEFECTIVE VIRAL SUPERANTIGEN-PRESENTING PHENOTYPE IN HLA-DR TRANSFECTANTS IS CORRECTED BY CIITA<sup>1</sup>**

Georges A. Azar\*, Rafick-Pierre Sékaly<sup>#</sup> and Jacques Thibodeau\*

\*Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada, H3C-3J7,

<sup>#</sup>Laboratoire d'Immunologie, Centre de recherches du CHUM, Hôtel-Dieu, Montréal, Québec, Canada, H2X-1P1.

**Running title :** Presentation of viral superantigens by human cells.

**Keywords :** MHC, Superantigen, B cells, Antigen processing, peptides.



### 3.1 RÉSUMÉ

L'activation des lymphocytes T par le superantigène (vSAg) du virus MMTV requiert l'association aux molécules de CMH de classe II. La localisation intracellulaire de l'interaction fonctionnelle entre les molécules de CMH II et les vSAGs est encore matière à débat. Afin de résoudre cette question, nous avons essayé les cellules épithéliales humaines HeLa exprimant HLA-DR1. Nous avons été surpris de constater que ces cellules ont échoué la présentation de vSAG7 et vSAG9 à une série d'hybridomes T murins. Le problème n'est pas relié à un défaut d'apprêtement du vSAG puisque les HeLa sont capables d'activer efficacement les lymphocytes T suite au transfert du vSAG à des lymphocytes B. Cependant, des HeLa DR1<sup>+</sup> devenaient capable de présenter directement le vSAG une fois traitées à l'IFN- $\gamma$ . De plus, la transfection de CIITA suffit pour rétablir la présentation. Des expériences de reconstitution ont démontré la nécessité de co-exprimer HLA-DM et la chaîne invariante (Ii) pour atteindre une présentation efficace du vSAG. Étonnamment, l'inclusion d'un motif di-leucine dans la queue cytoplasmique de DR $\beta$  compense pour la nécessité de HLA-DM et permet une présentation efficace du vSAG en présence de Ii. Un signal de transport équivalent a été inclus dans vSAG7 en remplaçant sa queue cytoplasmique par celle de Ii. Le transfert ainsi que la présentation directe de cette chimère Ii/vSAG7 ont été abolis par son ciblage vers les endosomes. Pris ensemble, nos résultats suggèrent que les complexes DR-vSAG fonctionnels se formeraient après les stades les plus tardifs de la maturation des molécules de classe II, probablement à la surface cellulaire.

### 3.2 ABSTRACT

Activation of T lymphocytes by mouse mammary tumor virus superantigen<sup>3</sup> (vSAg) requires binding to MHC class II molecules. The sub-cellular location where functional interactions occur between MHC class II molecules and vSAGs is still a matter of debate. To gain further insight into this issue, we have used human epithelial HeLa cells expressing HLA-DR1. Surprisingly, the human cells were unable to present transfected vSag7 or vSag9 to a series of murine T cell hybridomas. The defect is not related to a lack of vSAG processing as these cells can indirectly activate T cells following co-culture in the presence of B lymphocytes. However, after IFN- $\gamma$  treatment, the HeLa DR1<sup>+</sup> cells became apt at directly presenting the vSAG. Furthermore, transfection of CIITA was sufficient to restore presentation. Reconstitution experiments demonstrated the necessity of co-expressing HLA-DM and invariant chain (Ii) for efficient vSAG presentation. Interestingly, inclusion of a di-leucine motif in the DR $\beta$  cytoplasmic tail bypassed the need for HLA-DM expression and allowed the efficient presentation of vSag7 in the presence of Ii. A similar trafficking signal was included in vSag7 by replacing its cytoplasmic tail with the one of Ii. However, sorting of this chimeric Ii/vSAG molecule to the endocytic pathway completely abolished both its indirect and direct presentation. Altogether, our results suggest that functional vSAGs-DR complexes form after the very late stages of class II maturation, most probably at the cell surface.

### 3.3 INTRODUCTION

Superantigens (SAGs) are small bacterial (bSAGs) or viral (vSAGs) proteins that bind MHC class II molecules and activate up to 20% of the T cell repertoire in a V $\beta$ -specific manner (for reviews see (1-3)). SAGs have long been implicated in various diseases as well as autoimmune conditions (4,5). They have proven to be useful tools for the appreciation of structural heterogeneity amongst class II molecules at the surface of APCs (6).

MHC class II  $\alpha/\beta$  heterodimers assemble in the endoplasmic reticulum (ER), where they swiftly associate with the invariant chain (Ii) (for reviews see (7-9)). This chaperone occupies the peptide-binding groove of the newly synthesized class II molecules, preventing the binding of endogenous ER peptides and polypeptides (10-12). Ii is a type II membrane protein containing endosomal targeting signals through which the class II/Ii complex gets delivered to peptide-rich endosomes (13-15). As opposed to B cells, DCs from mice deficient for Ii express high levels of class II molecules at their surface (16,17). Also, in the absence of Ii, class II molecules are efficiently expressed at the plasma membrane of transfected cells (18,19). However, in these conditions, intracellular trafficking of class II molecules varies between cell lines (20).

Once in the endocytic pathway, proteinases sequentially digest Ii except for the CLIP fragment which remains in the peptide-binding groove of the MHC class II molecule (reviewed in (21)). The exchange of CLIP for an antigenic peptide that will be presented at the cell surface is promoted by HLA-DM (DM) (22,23). This non-classical class II molecule exhibits very little polymorphism and resides in the endocytic pathway (24-26). A cytoplasmic YXXL sorting motif allows DM to accumulate principally in late vesicles (27-29). The activity of DM is not restricted to CLIP removal as numerous studies have highlighted its capacity to edit the global peptide repertoire by favouring those of higher

affinity (30-33). Beyond its effect on peptide editing, DM could also play an important direct role in fine-tuning the conformation of class II molecules (34-36).

Bacterial SAGs do not require processing and bind MHC class II molecules outside their peptide binding groove (37-39). However, it is now well established that the class II-bound peptides modulate the interaction of SEA, TSST-1 and MAM with their receptor (40-45). Accordingly, chaperones involved in peptide binding to class II molecules can have a profound effect on SAg presentation (34,46,47). Bacterial SAGs bind to MHC class II molecules  $\alpha$  and/or  $\beta$  chains in numerous fashions and the three-dimensional structure of many complexes revealed direct contacts between SAGs and the peptide (48-51)

The best studied vSAGs are the ones produced by MMTV. Still, their crystal structure remains to be determined. MMTV is a type B retrovirus, transmitted horizontally through the milk of infected mothers or vertically once integrated in the germ line (reviewed in (52)). They produce vSAGs that are necessary for viral infectivity and virus spread (53,54). These are type II transmembrane proteins encoded by an open reading frame in the 3' long terminal repeat (LTR) (55-59). The mature MTV vSAG is a 45 KDa glycoprotein that needs to be activated through proteolytic processing (60). The nature of the active fragment remains ill-defined as redundancy has been reported regarding the potency of the furin cleavage sites in activating vSAGs (61). Also, cathepsin L was shown to liberate a 27 KDa fragment which could explain the activity of vSAGs in furin-deficient cells or following mutagenesis of the furin recognition motifs (62,63). In addition to activating the vSAG, processing would explain the paracrine transfer of a soluble active C-terminal fragment to class II-positive APCs (64-66).

The exact binding site(s) of MMTV SAg on class II molecules remain(s) obscure (67-69). Also, the intracellular trafficking of vSAGs and the site of class II encounter are still matters of debate. A thorough biochemical analysis of their maturation allowed the group of Pullen to conclude that vSAGs reach the plasma membrane via the default exocytic pathway, independently of MHC class II expression (70). Class II-vSAG complexes were

found exclusively at the plasma membrane and not in the endocytic pathway or the ER. Their observations imply an exclusive association of the vSAg with mature, peptide-loaded, SDS-stable class II molecules. Accordingly, it was later proposed that successful presentation of vSAg7 is conditional to the existence of a diverse class II-bound peptide repertoire (71). Indeed, endogenous vSAg-induced T cell deletion was not taking place in modified mice expressing class II molecules almost exclusively loaded with CLIP (DM KO) or loaded with a covalently linked peptide (E $\alpha$ <sup>52-68</sup>).

These results contrast with those obtained *in vitro* by the group of Huber and which suggest that class II-vSAg interactions occur in the ER through a CLIP-like region of vSAg occupying the peptide-binding groove (72). In accordance with such an interaction early in the biosynthetic pathway, they reported that a DM-deficient human B cell line was as potent as its wild-type counterpart in stimulating T cells upon transfection of a vSAg.

Here, we show that DR-transfected cell lines differ dramatically in their ability to present MMTV vSAGs and that the mere expression of class II molecules is not sufficient to support presentation to T cell hybridomas. We report that CIITA expression rescues the presentation of vSAg7 by HeLa cells and that the presentation-competent phenotype is dependent on the co-expression of DR, Ii and DM. The need for class II molecules to access the endocytic pathway coupled to the inactivation of vSAGs in these compartments support a model where both ligands traffic independently inside the cell. Also, functional complexes most probably form at the plasma membrane and only after class II molecules have acquired some presentation-permissive peptides.

### 3.4 MATERIAL AND METHODS

#### Plasmids and mutagenesis

In Figure 1C, HeLa, 4N5 and DAP cells were transfected with *mtv7*- or *mtv9*-encoding pH $\beta$ -Apr1-Neo plasmids (73,74). Elsewhere, vSag7 was expressed following transfection of SR $\alpha$ MTV7 expressing the gene for puromycin resistance (obtained from Dr François Denis).

pBudDM has been described previously (75). Ii was expressed from pREP4 Iip35 as previously described (76). The chimeric RSV.3 DR $\beta$ /DOcyto (DR-LL) has been described previously (77).

Ii-vSag7 chimeric cDNAs were obtained by the PCR overlap extension technique (78). We exchanged the vSag7 cytoplasmic tail coding sequence for the one of either the p33 or p35 Ii isoforms to obtain p33cyto-vSag7 and p35cyto-vSag7, respectively. A first fragment was amplified from pBluescript (pBS) MTV7 using the Universal primer and a fusion primer covering the end of the vSag transmembrane and the beginning of the cytoplasmic tail of both isoforms of Ii (5' AGC AAT TGC AGC CTC ATT TGC TGC). The second fragment was amplified from pBS KS<sup>+</sup> Iip33 or pBS KS<sup>+</sup> Ii p35 (76) using the complementary fusion primer and the Reverse primer. The two overlapping PCR products were mixed, and a final PCR was performed using the flanking Universal and Reverse primers. A *EcoRI*-*XbaI* fragment from the final PCR product was cloned into the SR $\alpha$  vector (79) and sequenced.

## Antibodies

The VS7 mAb against the C-terminal part of *mtv7* SA<sub>g</sub> was a kind gift from Dr G. Winslow (80). L-243 (ATCC HB-55) mAb (IgG<sub>2a</sub>) binds a specific DR $\alpha$  conformational determinant (81). 2.06 is directed against a common epitope on the  $\beta$  chain of the three HLA-D isotypes but binds preferentially to the DR $\beta$  chain (82). XD5 (IgG<sub>1</sub>) recognizes a linear epitope in the  $\beta$ 1 domain of all class II molecules (83). BU-45 (IgG<sub>1</sub>) is a mAb specific to the C-terminal portion of the human Ii (84). Pin.1 (IgG<sub>1</sub>) (85) recognizes both Ii p33 and 35 cytoplasmic tails. CerCLIP.1 (IgG<sub>1</sub>) is directed against the N-terminal segment of CLIP (PharMingen, San Diego, CA). MaP.DM1 (IgG<sub>1</sub>) is directed against the luminal portion of HLA-DM (PharMingen International, Oakville, Canada). 1a3 mAb is specific for a monomorphic region of all HLA-DQ (86).

## Cells and transfections

The human Burkitt lymphoma B-cell line Raji (ATCC CCL 86), the EBV-transformed BJAB (87) and the murine B-cell lymphoma CH12 (65) were cultured in RPMI 1640 medium with 10% FBS (Gibco BRL, USA) and 4 $\mu$ M 2-ME. The human epithelial HeLa cells (ATCC CCL-2), the HEK 293T cells (obtained from Dr. E. Cohen, Université de Montréal, Canada), the murine fibroblast cell line DAP (ATCC CRL-1949) and the DR1<sup>+</sup> M1 fibroblast line (4N5) (88) (a kind gift of Dr E. Long, National Institutes of Health, Bethesda, MD) were cultured in DMEM.

Murine T cell hybridomas were grown DMEM containing 10% FBS and 4 $\mu$ M 2-ME (Kmls13.11 (mV $\beta$ 6) (89), I1B3 (mV $\beta$ 1 and mV $\beta$ 8) (90)). KR3<sup>+</sup> (mV $\beta$ 8.1) (91) and V $\beta$ 5#11 (mV $\beta$ 5) (68) were grown in RPMI 1640.

Stable Raji transfectants were obtained by electroporation as previously described (92). Briefly, 10<sup>7</sup> Raji cells in 500 $\mu$ l of RPMI 1640 containing 20% FBS and 15 $\mu$ g of plasmid

DNA were electroporated using the BIO-RAD gene pulser<sup>TM</sup> (Biorad, CA). After 24 hours at 37°C, cells were grown for 3 weeks under selection using 0.2µg/mL puromycin. Clones were obtained by limiting dilutions in 96 well plates.

DAP cells were serially transfected with HLA-DR1 and vSAg7 to give rise to DAP DR1 vSAg7 clone 3A5 as described (74). These cells were transfected with SRα p33cyto-MTV7 or p35cyto-MTV7 plasmids using Fugene 6. 4N5 were super-transfected using the calcium phosphate method as previously described (74,93).

HeLa DR1 cells were kept under selection for DR1 expression by adding 500µg/mL of Geneticin (G418-sulfate) (Invitrogen, Canada). They were stably transfected with SRα MTV7 using Fugene6 (Roche Diagnostics, Canada) to obtain the HeLa DR1 vSAg7. Cells were then transfected with pBud DM and/or with pREP4 Iip35. Selection was applied 48h post transfection (puromycin 0,2 µg/mL; Zeocin 160 µg/mL; hygromycin 55µg/mL). HeLa CIITA cells (94) were transfected with SRα MTV7 to obtain the HeLa CIITA vSAg7 cells.

HeLa DR-LL cells (HeLa DRα<sup>TM</sup>+DR/DOβcyto (77)) were supertransfected with SRα MTV7 with or without pREP4 Iip35 as described above, in order to get HeLa DR-LL vSAg7 and HeLa DR-LL vSAg7 Ii cells. For transient expression, HEK 293T cells were transfected with the calcium phosphate precipitation method using 10µg of SRα p33cyto-MTV7 or p35cyto-MTV7 plasmids. Cells were analyzed 48h post-transfection.

### **Western blots**

Total lysates were prepared by sonication of 10<sup>7</sup> cells in 1mL of lysis solution (20mM tris HCl pH7.0, 150 mM NaCl). After sonication, Triton X-100 was added to a final concentration of 1% as described previously (76). The lysate equivalent of 250x10<sup>3</sup> cells was loaded onto 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to Hybond ECL Nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech, U.K.) and incubated with primary antibodies in PBS containing 5% (w/v) skimmed dry milk and 0.1% Tween 20. Primary antibody was



probed with HRP-conjugated secondary antibody (BIO/CAN Scientific, Mississauga, Canada) and revealed by enhanced chemi-luminescence ECL (Amersham Biosciences).

### **Northern blot analysis**

Total RNA was isolated using Trizol (Gibco BRL, NY, USA) and analyzed as described previously (65,95). The entire cDNA for vSag7 was purified and labelled with  $\alpha P^{32}$  using the Ready-to-Go labelling kit (Pharmacia Biotech, NJ, USA). The control GAPDH cDNA was kindly provided by Dr. Pierre Belhumeur (University of Montreal, Canada).

### **Flow cytometry analysis and fluorescence microscopy**

Cells were washed in PBS and incubated with primary antibodies in complete cell culture medium or PBS. After 30 min. at 4°C, cells were washed twice in PBS and incubated for another 30 min. at 4°C with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Cedarlane, Canada) in PBS. Cells were washed twice and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson, CA). Intracellular staining for HLA-DM and Ii was carried out on cells fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with saponin (76,77) using MaP.DM1 or BU45 mAbs and the goat anti-mouse IgG.

### **T cell stimulation assays**

vSag7-expressing APCs were co-cultured at different ratios with  $5 \times 10^4$  T cell hybridomas. 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 (ATCC TIB-214) as measured by  $^3H$ -thymidine incorporation (68). For indirect presentation, expressing cells (donors) were co-cultured with BJAB or CH12 cells (acceptors) and responder T-cell hybridomas at ratios of 1:1:1.

**IFN $\gamma$  treatment**

About  $2 \times 10^6$  HeLa DR1 vSAg7 cells were cultured in media supplemented with different concentrations of recombinant human IFN- $\gamma$  (0.5-5 ng/mL) (Pharmingen, Canada) for 5 days before the T-cell stimulation assays.

### 3.5 RESULTS

#### **HLA-DR1 expression by human epithelial cells does not support vSAg presentation**

Transfected mouse fibroblasts expressing HLA-DR molecules are capable of vSAg presentation (95). Moreover, the responsive human V $\beta$  repertoire was similar to the one described in the mouse (74). In the process of characterizing the molecular interactions between DR and SAg, we generated vSAg7<sup>+</sup> populations of DR1-transfected HeLa cells (HeLa DR1 vSAg7). To our surprise, these transfectants could not present the vSAg7 to the murine T cell hybridomas Kmls 13.11 (mV $\beta$  6) and KR3<sup>+</sup> (mV $\beta$  8) (Fig.1A). The negative result obtained with HeLa was unexpected as expression of the exact same class II  $\alpha\beta$  cDNAs in DAP cells triggered a strong T cell response. We used three different APC:hybridoma ratios and control DAP DR1 vSAg7 cells were effective at all concentrations.

We addressed the possibility that the MTV vSAg expression or activity was much reduced in human cells as compared to mouse cells. Since the vSAg7-specific VS7 mAb staining was negative on both populations when analyzed by flow cytometry (data not shown), we capitalized on the ability of vSAg-producing cells to transfer the activity to vSAg-negative APCs (65,66). Figure 1B shows that in the presence of vSAg7-negative CH12 murine B cells, HeLa DR1 MTV7 cells can trigger a T stimulation as efficient as DAP DR1 vSAg7 cells. Although the exact mechanism remains to be characterized, such indirect presentation is likely the result of a successful paracrine transfer (64-66) and strongly suggests that not only do HeLa cells express the vSAg, it is also processed adequately.

We extended our initial observation to vSAg9 produced by MMTV9 (96). New independent transfections were obtained for both vSAg7 and vSAg9 and clones were

picked. As compared to DR<sup>+</sup> DAP cells expressing vSAG7 or 9, none of the vSAG<sup>+</sup> HeLa clones could stimulate the specific hybridomas (Fig. 1C) while all triggered an efficient response in the indirect co-culture assay (data not shown). These results confirm that HeLa DR1 cells cannot present vSAGs.

To rule out that this lack of presentation was due to the epithelial nature of HeLa cells and to determine if this phenomenon could be observed in other cell types, we used the DR1<sup>+</sup> M1 fibroblasts called 4N5 (88). Figure 1C (left panel) shows that 4N5 cells stably transfected with vSAG7 were unable to stimulate the Kmls 13.11 T cell hybridoma.

A trivial explanation for the defect observed with HeLa would be that these cells do not express sufficient levels of class II molecules (97). However, surface stainings with the pan-DR L-243 mAb showed that both DAP and HeLa cells express significant and comparable levels of class II molecules (Fig. 1D). In addition, an independent vSAG<sup>+</sup> DAP cell population expressing much lower levels of class II molecules triggers an efficient response from those T cell hybridomas (data not shown). Interestingly, although the DR expression is quantitatively very similar, the 2.06 mAb staining is much stronger on DAP cells (Fig. 1D). The 2.06 mAb binds to the  $\beta$  chain of all human class II isotypes but would not recognize class II superdimers (98). The significance of this result is not clear but it further supports the notion that class II molecules are qualitatively somewhat different between various cell lines (6,46,89).

The presentation of vSAGs was suggested to be dependent on a diverse repertoire of class II-bound peptides (99). Since a fraction of the class II molecules in HeLa and DAP cells are bound with large polypeptides in the absence of Ii, we verified if HeLa cells express some SDS-stable compact heterodimers containing short peptides and migrating at 55 KDa on immunoblots (10,46,100). Figure 2A shows that non-boiled lysates prepared from both HeLa DR1 and DAP DR1 cells contain stable dimers recognized by the DR $\beta$ -specific XD5 mAb. Although such analysis does not give insights on the diversity of the

peptide bound to DR, it rules out the absence of compact forms as a possible explanation for the behaviour of HeLa cells. Importantly, DAP, HeLa and M1 cells transfected with DR1 are all very efficient in stimulating the V $\beta$ 8<sup>+</sup> I1B3 murine T cell hybridoma in the presence of the bSAg SEB, ruling out a general antigen presentation defect (Fig. 2B).

### **IFN- $\gamma$ rescues endogenous vSAg presentation by HeLa cells.**

The ability to present MTV SAg is certainly not restricted to the mouse system as class II positive monkey (COS) and hamster (CHO) cells have been successfully used in the past (62,66). Thus, we specifically addressed the role of the class II Ag processing machinery in vSAg presentation. The class II pathway is constitutively active only in professional APCs but is strongly inducible in nearly all cells by IFN- $\gamma$ . This pleiotropic cytokine affects all aspects of antigen processing and presentation as it regulates the expression of more than 200 genes (101). We treated the inept HeLa DR1 vSAg7 cells for 5 days with IFN- $\gamma$  and analyzed class II expression by flow cytometry (Fig. 3A). High levels of endogenous HLA-DM and -DQ were observed while HLA-DR was clearly up-regulated due to expression of the homozygous endogenous HLA-DRB\* 0102 genes (102). These cells were capable of endogenous vSAg7 presentation to Kmls 13.11 and KR3<sup>+</sup> T cell hybridomas (Fig. 3B and data not shown). This increased presentation could be caused by up-regulation of critical molecules involved either in the class II maturation or in the processing of the vSAg. Although the latter possibility cannot be formally excluded, it does not concur with the fact that HeLa DR1 vSAg7 cells do not need this cytokine to produce functional vSAg7 and that IFN- $\gamma$  did not increase presentation in the presence of BJAB (Fig. 3C).

### **Transfection of CIITA allows vSAg presentation by HeLa cells**

As a first step in deciphering the mechanism of IFN- $\gamma$  action and knowing that in its life cycle the MMTV primarily infects B lymphocytes, we tested the endogenous

presentation via the human Raji B cell line (54,103,104). These cells express all of the class II processing machinery under the control of the class II transactivator CIITA. The expression of this essential co-activator is constitutive in professional APCs and is induced by IFN- $\gamma$  in almost all other cells (105). The vSag7-encoding construct was electroporated in Raji cells and total mRNA from the stably transfected clone 2H8 was analyzed for SAg expression. Figure 4A shows that overall, the B cell transfectant expresses much less vSag7-specific mRNA than do the HeLa DR1 cells. However, functional assays showed that Raji cells are fully capable of presenting the vSag7 to the two T cell hybridomas (Fig. 4B). vSag surface expression was detected on Raji 2H8 by flow cytometry using the VS7 mAb (Fig. 4C). We were unable to detect vSag7 expression on HeLa cells. However, other potent cell lines present vSag7 but do not stain with the VS7 mAb (see below), suggesting that many factors contribute to the display of the epitope. Taken together, these results suggest that besides class II molecules, expression of additional genes under the control of CIITA is required for vSag presentation.

To narrow down on the molecules capable of restoring efficient presentation, we super-transfected CIITA into vSag7-expressing HeLa cells. These cells became fully apt at presenting the endogenous vSag to Kmls 13.11 (Fig 4D). To relate to our HLA-DR transfectants and given the fact that CIITA up-regulates expression of all classical class II isotypes (Fig.3A), it became important to assess the relative importance of DR for the presentation of vSag7 by HeLa CIITA cells. The anti-DR mAb L-243 almost completely inhibited T cell activation in a dose dependent manner (Fig. 4E). DP- and DQ-specific mAbs did not affect the level of stimulation, confirming that the isotypes do not efficiently present vSags ((95) and data not shown). Taken together, these results suggest the direct implication of the MHC class II Ag processing machinery in vSag presentation.

### **Co-expression of Ii and HLA-DM is sufficient to restore vSag presentation by HeLa DR1<sup>+</sup> cells**

CIITA was shown to affect the expression of a large panel of genes implicated in diverse functions such as cell migration, differentiation and proliferation (106). Although many different mechanisms could potentially contribute to the CIITA-mediated enhanced vSag presentation, we focused our efforts on the role of the intracellular class II chaperones. HLA-DM and Ii are strongly up-regulated by CIITA and play a crucial role in the trafficking of class II molecules and in the selection of their peptide repertoire. First, we stably transfected DM into HeLa DR1 vSag7 (HeLa DR1 DM vSag7). Even though vSag7 transfer to BJAB remained high, this new population could not directly activate the two T cell hybridomas (Fig. 5A,B). Similar results were obtained using cells transfected with Ii and sorted for high levels of CLIP surface expression (HeLa DR1 Ii vSag7) (Fig. 5C). However, when Ii and DM were co-transfected (HeLa DR1 Ii DM vSag7), the stimulation increased dramatically and this for both T cell hybridomas used (Fig. 5A). An efficient stimulation was also observed using independent transfections where vSag7 and DM were co-transfected into HeLa DR1 Ii cells (data not shown). Altogether, these results strongly point to a role of class II-bound peptides in vSags presentation.

### **An ectopic endosomal sorting motif in the tail of DR $\beta$ rescues vSag presentation**

In light of the functional role of HLA-DM, we hypothesized that class II molecules must travel to the endocytic compartments to acquire the capacity to present vSags. Sorting of class II to endosomes is assured by Ii, which bears two leucine-based motifs in its cytoplasmic tail (15,107). We reasoned that the need for Ii could be bypassed by introducing such a signal in the tail of HLA-DR. To achieve this, we replaced the cytoplasmic tail of DR $\beta$  by the one of HLA-DO $\beta$ . This chimeric molecule (DR1-LL) contains a functional di-leucine motif which results in accumulation not only at the plasma membrane, but also in Lamp-1<sup>+</sup> intracellular compartments (77). However, the HeLa DR1-

LL vSAg7 cells did not stimulate T cell hybridomas despite the efficient transfer of the activity to a B cell line (Fig. 6). Interestingly, co-expression of Ii in these cells allowed the efficient direct presentation of vSAg7. These cells express class II levels similar to their non-stimulating counterpart (Fig. 6A). Also, the cell surface staining with CerCLIP.1 demonstrates that they express copious amounts of CLIP-class II complexes. These results confirm that class II molecules must travel to late endocytic compartments before acquiring the ability to present vSAGs.

### **Sorting vSAg7 to the endocytic pathway abrogates its activity**

Given the importance of targeting the class II molecules to the endocytic pathway, we investigated the possibility of increasing the efficiency of presentation by sorting the vSAg7 to endosomes. Just like Ii, the endogenous MMTV superantigens are type II transmembrane proteins (59). Thus, we swapped the cytoplasmic tail of vSAg for the one of Iip33 or p35 and tested the capacity of these chimeric molecules to activate T cells. For these experiments, we used DAP cells which are fully competent for both presentation and transfer of vSAGs. Surprisingly, the stably transfected p33 cyto-vSAg7 and p35 cyto-vSAg7 chimeric molecules could not stimulate T cells, even when co-cultured in the presence of BJAB (Figure 7A). Using the Ii-specific Pin.1 mAb on immunoblots, we found that the chimeric molecules migrated at the expected molecular weight of about 45 KDa and no degradation products were detected (Fig. 7B and data not shown). The chimeric molecules were almost undetectable by flow cytometry and fluorescence microscopy, suggesting that the vSAg portion imparts instability to the constructs (data not shown).

To circumvent the problem of low protein expression, we turned to transient overexpression in human HEK 293T cells. Two days after transfection in the absence of class II molecules, cells were split and tested either in a functional transfer assay (data not shown) or analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry (Fig. 7C,D). As



opposed to wild-type vSAg7, the chimeric molecules were not transferred from 293T cells to BJAB. Pin.1 staining showed that the chimeric p33 cyto-vSAg7 molecule was expressed and transported to punctate vesicles scattered in the cytoplasm. Importantly, to demonstrate the specificity of this distribution, we tested a similar construct between Iip35 and vSAg7 (p35 cyto-vSAg7). As expected from the fact that this Ii isoform is retained in the ER in the absence of DR (108), the staining was diffuse and did not show any defined vesicles (Fig. 7C). Altogether, these results suggest that the small amount of vSAg destined to T cell stimulation must not be sorted to the endocytic pathway, even in the presence of class II molecules.

### 3.6 DISCUSSION

Structure-function aspects of SAGs have been mostly studied in the past using MHC class II transfected cells. For example, by analogy to the hierarchy described for the H-2 gene products, murine DAP cells have been used to demonstrate isotypic variations in the capacity of human class II molecules to present vSAGs (95). These cells do not express Ii or DM but still present vSAGs very efficiently when transfected with HLA-DR. However, the situation turned out to be very different when we tried to use a series of HeLa cell transfectants for the study of the vSAG binding site on those exact same class II molecules. In such conditions, we found that the human epithelial cell line is incapable of presenting endogenous vSAGs. It has been reported that MMTV preferentially infects immature DCs as well as B cells and that both APCs lead to V $\beta$ -specific T-cell activation (109). Accordingly, when the prototypic human B cell line Raji was tested for endogenous vSAG7 presentation, efficient T cell stimulation was measured. We identified CIITA as being responsible for activating the class II processing pathway and for the efficient vSAG presentation. This effect was mainly due to the up-regulation of HLA-DM and Ii. From our results, we cannot rule out additional CIITA-mediated effects on the processing or sorting of vSAGs as this transactivator was shown to modulate the expression of more than 50 genes in B cells (110). However, given the fact that all other CIITA-negative vSAG<sup>+</sup> HeLa transfectants very efficiently transferred the activity, this hypothesis is unlikely. Comparing the ability of primary B cells from CIITA<sup>-</sup> versus CIITA<sup>+</sup> class II<sup>-</sup> mice to transfer vSAG might shed light into this issue.

The presentation efficiency of HeLa CIITA and Raji most certainly relies in part in their very high levels of surface class II as compared to the DR/DM/Ii transfectants. Also, the relative expression of class II, Ii and DM is most probably optimal under CIITA control as compared to the situation in HeLa cells where transfected molecules are transcribed from a variety of promoters and by different vectors integrated randomly at various copy numbers.

Our results clearly showed that expression of DM and Ii was sufficient to rescue vSAg presentation in HeLa DR1 cells. This finding is reminiscent of the important peptide/class II conformation for the binding of bacterial SAGs (44). For example, TSST-1 binding to class II is greatly augmented by the transfection of Ii and DM in DR<sup>+</sup> T2 cells (41,46). Indeed, the group of Woodland demonstrated unambiguously that TSST-1 binding is affected by the class II-bound peptides (42,43). Interestingly, it was recently shown that the presentation of both vSAGs and TSST-1 is diminished in mice deficient for DM or Ii, suggesting that a diverse class II peptide repertoire is needed for these SAGs to bind APCs (71). At first glance, our results are in line with these *in vivo* studies. At the surface of chaperone-negative HeLa DR cells, the class II molecules are loaded with large ER polypeptides which could interfere with binding of vSAGs (46). However, polypeptides are also found in class II molecules expressed at the surface of DAP cells (10). Still, in both cell lines, there are clearly some SDS-stable compact forms migrating at 55 Kda, which most certainly correspond to class II molecules loaded with some relatively short peptides (Fig. 2). Cell-type differences may explain the fact that mouse cells display some permissive peptide(s) or polypeptide(s) allowing vSAG presentation. Mass spectrometry analyses will give clues as to the degree of heterogeneity of these class II ligands.

The need for a diverse peptide repertoire could explain why co-expression of Ii, which displaces large polypeptides found in the ER, did not restore vSAG presentation in DR<sup>+</sup> HeLa cells. As for DM KO mice, this configuration results in the display of class II molecules bound almost exclusively with the CLIP peptide. Introducing DM in these cells could restore presentation through CLIP displacement and the binding of vSAG-permissive peptides. However, the group of Huber reported that DM-negative B cells expressing copious amounts of DR3-CLIP complexes are still capable of presenting endogenous vSAGs (72). Also, the surprising finding reported here that a di-leucine motif in the tail of DR could restore presentation warrants evaluating alternative explanations to the need for

displacing CLIP. Indeed, the majority if not the totality of class II molecules on the HeLa DR1-LL Ii cells are loaded with the CLIP peptide and present vSAGs. As both lines are expressing DR-CLIP at their surface, what differentiates these complexes between HeLa DR Ii and HeLa DR1-LL Ii cells? Possibly the isoform of CLIP found on HeLa DR Ii cells (or on APCs from DM KO mice) is not permissive for vSAG binding. CLIP is usually found as a nested set of peptides on class II molecules and N- or C-terminal extensions outside the peptide binding groove have been shown to inhibit SEB binding to class II molecules (111). HeLa cells, which are devoid of cathepsin S (112), may generate a form of CLIP incompatible with vSAG binding. This may explain why replacing in Ii the core CLIP sequence with a variety of defined DR-binding motifs did not restore vSAGs binding (data not shown). To allow presentation, non-permissive CLIPs must be either displaced by DM or, in the context of the DR1-LL construct, be trimmed to competent forms by lysosomal exopeptidases. We have previously shown that this chimeric DR1-LL accumulates in large quantities in endocytic vesicles containing markers of late endosomes (77). Despite a prolonged stay in these vesicles, these molecules recycle as they are found in large amounts at the cell surface. HPLC analysis of the peptides found in DR versus DR1-LL would help resolve the issue of CLIP heterogeneity. Alternatively to the trimming of CLIP, the trafficking of DR1-LL through late vesicles might allow binding of some functionally-relevant peptides following long-standing exposure to acidic pH. Such a mechanism could explain the indispensable need for Ii, which will incorporate in DR the more easily exchangeable CLIP peptide. In this context, it will be interesting to test the presentation of vSAG by HeLa cells expressing Ii and an allele such as DR4 which releases CLIP spontaneously (113). If DR1-LL could also bypass the need for DM in the presentation of DM-dependent nominal antigens remains to be tested.

Although its influence seems clear in many experimental systems, it is still possible that DM plays a role beyond its peptide editing activity. Looking at bacterial superantigen, antibody or T cell receptor recognition of class II molecules, recent evidences strongly suggest that DM might directly influence the structure of class II molecules (34-36).

However, the mechanism underlying this new DM attribute remains unknown. In the case of vSAg presentation by HeLa cells, a contact-induced, peptide-independent role of DM on the structure of DR would be difficult to reconcile with the fact that a LL motif on DR compensates for the absence of the non-classical class II chaperone. Also, the cell-type dependency for DM is intriguing. If one considers a role for DM on the structure of class II molecules, then what could be compensating for DM and Ii in DAP, COS and CHO cells, which all stimulate T cells upon transfection of vSAGs and DR? The most likely explanation is that in these permissive cells, HLA-DR could undergo a conformation modification mediated by some enzymes, tetraspans, chaperones or severe pH conditions. For example, as opposed to HeLa cells, murine cells allow class II molecules to accumulate in the endocytic pathway in the absence of Ii (20). In non-permissive cells, DM could affect the sorting of DR by dragging some molecules to the highly acidic lysosomes before their dissociation. Nevertheless, our observations describe the essential role of the endocytic pathway in the presentation of endogenous vSAGs. These results are in line with those of Golovkina *et al.* (71) showing the importance of peptides in vSAG presentation and those of Pullen's group (70) showing that vSAGs interact with mature class II molecules and only at the cell surface.

On the other hand, our results contrast with those of Huber and collaborators describing a DM-independent vSAG presentation pathway. The straightforward model that they proposed suggests that vSAGs bear an essential and specific motif that interacts with newly formed class II heterodimers in a CLIP-like manner (72). We cannot formally rule out that DR and vSAGs associate in the ER of HeLa cells in the absence of Ii and DM but these complexes are non-functional. Also, vSAG molecules following DR (especially DR-LL) to endosomes would most probably be degraded as previously suggested (70). Indeed, replacing the cytoplasmic tail of vSAG for the one of Iip33 completely abolished the ability of the vSAG to stimulate T cells in direct or transfer assays (Fig. 7). This last result suggests that if vSAGs gain access to the endocytic pathway, their passage must be swift and probably not compatible with their intercalation in a putative class II-Ii-MTV nonamer. In

furin-negative cells, it was proposed that alternative cleavage by cathepsins could generate an active form of vSAg (62,63). HEK 293T cells are furin-negative and the efficient transfer of vSAg is in accordance with the existence of alternative cleavage sites. However, the fact that a soluble fragment is not released from cells expressing the chimeric Ii-vSAg suggests that the cleavage does not occur in endosomes. Alternatively, the transferred C-terminal part of the open reading frame product may need to remain associated to the N-terminal part of the vSAg and be re-expressed at the surface, a step that is precluded by the endosomal retention motif in our chimera. Finally, the binding of vSAg in an Ii-like fashion would imply a direct competition between the two molecules for class II binding. However, DAP cells expressing high levels of Ii $\Delta$ 20 (which lacks endosomal sorting motifs and stays associated with DR from the ER to the cell surface) stimulate T cells as efficiently as their Ii-negative counterpart (Thibodeau and Sékaly, unpublished results). In conclusion, our results support a model in which vSAGs travel on their own to the plasma membrane where they encounter mature class II molecules. Binding and presentation of the vSAG depend on the nature of the stably-bound class II peptides, which are acquired in various compartments and which may be homogeneous under certain experimental conditions.

### **3.7 ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Alexandre Brunet for helping with the characterization of chimeric molecules. We also thank Drs F. Denis, G. Winslow, O. Bakke, D.L. Hardie, I.C. MacLennan, P. Cresswell, E.O. Long, P. Belhumeur, J. Kappler, P. Marrack and E. Cohen for plasmids, antibodies, hybridomas and cell lines.

### 3.8 REFERENCES

1. Papageorgiou, A. C. and K. R. Acharya. 2000. Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol.* 8:369-375.
2. Marrack, P. and J. Kappler. 1990. The Staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248:705-711.
3. Fraser, J., V. Arcus, P. Kong, E. Baker, and T. Proft. 2000. Superantigens - powerful modifiers of the immune system. *Mol.Med.Today* 6:125-132.
4. Kotzin, B. L., D. Y. M. Leung, J. Kappler, and P. Marrack. 1993. Superantigens and their potential role in human disease. *Adv.Immunol.* 54:99-166.
5. Llewelyn, M. and J. Cohen. 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect.Dis.* 2:156-162.
6. Thibodeau, J., I. Cloutier, P. M. Lavoie, N. Labrecque, W. Mourad, T. Jardetzky, and R.-P. Sekaly. 1994. Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding. *Science* 266:1874-1878.
7. Castellino, F., G. M. Zhong, and R. N. Germain. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: Invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum.Immunol.* 54:159-169.
8. Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.
9. Wolf, P. R. and H. L. Ploegh. 1995. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 11:267-306.
10. Busch, R., I. Cloutier, R.-P. Sekaly, and G. J. Hammerling. 1996. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15:418-428.
11. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-618.



12. Romagnoli, P. and R. N. Germain. 1994. 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.
13. Bakke, O. and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
14. Lotteau, V., L. Teyton, A. Peleraux, T. Nilsson, L. Karlsson, S. L. Schmid, V. Quaranta, and P. A. Peterson. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600-605.
15. Pieters, J., O. Bakke, and B. Dobberstein. 1993. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J.Cell Sci.* 106 ( Pt 3):831-846.
16. Viville, S., J. J. Neefjes, V. Lotteau, A. Dierich, M. Lemeur, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635-648.
17. Rovere, P., F. Forquet, V. S. Zimmermann, J. Trucy, P. Ricciardi-Castagnoli, and J. Davoust. 1997. Dendritic cells from mice lacking the invariant chain express high levels of membrane MHC class II molecules in vivo. *Adv.Exp.Med.Biol.* 417:195-201.
18. Sekaly, R.-P., C. Tonnelle, M. Strubin, B. Mach, and E. O. Long. 1986. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J.Exp.Med.* 164:1490-1504.
19. Miller, J. and R. N. Germain. 1986. Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain. *J.Exp.Med.* 164:1478-1489.
20. Simonsen, A., F. Momburg, J. Drexler, G. J. Hammerling, and O. Bakke. 1993. Intracellular distribution of the MHC class II molecules and the associated invariant chain (Ii) in different cell lines. *Int.Immunol.* 5:903-917.
21. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.* 24:264-268.

22. Denzin, L. K. and P. Cresswell. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-165.
23. Sherman, M. A., D. A. Weber, and P. E. Jensen. 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3:197-205.
24. Sanderson, F., M. J. Kleijmeer, A. Kelly, D. Verwoerd, A. Tulp, J. J. Neefjes, H. J. Geuze, and J. Trowsdale. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266:1566-1569.
25. Karlsson, L., A. Péléraux, R. Lindstedt, M. Liljedahl, and P. A. Peterson. 1994. Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells. *Science* 266:1569-1573.
26. Sanderson, F., S. H. Powis, A. P. Kelly, and J. Trowsdale. 1994. Limited polymorphism in HLA-DM does not involve the peptide binding groove. *Immunogenetics* 39:56-58.
27. Copier, J., M. J. Kleijmeer, S. Ponnambalam, V. Oorschot, P. Potter, J. Trowsdale, and A. Kelly. 1996. Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J.Immunol.* 157:1017-1027.
28. Lindstedt, R., M. Liljedahl, A. Peleraux, P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1995. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* 3:561-572.
29. Marks, M. S., P. A. Roche, E. van Donselaar, L. Woodruff, P. J. Peters, and J. S. Bonifacino. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the  $\beta$  chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J.Cell Biol.* 131:351-369.
30. Sloan, V. S., P. Cameron, G. Porter, M. Gammon, M. Amaya, E. Mellins, and D. M. Zaller. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR. *Nature* 375:802-806.
31. Kropshofer, H., A. B. Vogt, G. Moldenhauer, J. Hammer, J. S. Blum, and G. J. Hammerling. 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* 15:6144-6154.

32. Van Ham, S. M., U. Grueneberg, G. Malcherek, I. Broeker, A. Melms, and J. Trowsdale. 1996. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J.Exp.Med.* 184:2019-2024.
33. Weber, D. A., B. D. Evavold, and P. E. Jensen. 1996. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 274:618-620.
34. Albert, L. J., L. K. Denzin, B. Ghumman, N. Bangia, P. Cresswell, and T. H. Watts. 1998. Quantitative defect in staphylococcal enterotoxin A binding and presentation by HLA-DM-deficient T2.Ak cells corrected by transfection of HLA-DM genes. *Cell.Immunol.* 183:42-51.
35. Verreck, F. A., C. A. Fargeas, and G. J. Hammerling. 2001. Conformational alterations during biosynthesis of HLA-DR3 molecules controlled by invariant chain and HLA-DM. *Eur.J.Immunol.* 31:1029-1036.
36. Pu, Z., S. B. Lovitch, E. K. Bikoff, and E. R. Unanue. 2004. T cells distinguish MHC-peptide complexes formed in separate vesicles and edited by H2-DM. *Immunity.* 20:467-476.
37. Cole, B. C., B. A. Araneo, and G. J. Sullivan. 1986. Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*. IV. Murine T hybridoma cells exhibit differential accessory cell requirements for activation by *M. arthritidis* T cell mitogen, concanavalin A, or hen egg-white lysozyme. *J.Immunol.* 136:3572-3578.
38. Fleischer, B. and H. Schrezenmeier. 1988. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J.Exp.Med.* 167:1697-1707.
39. Dellabona, P., J. Peccoud, J. Kappler, P. Marrack, C. Benoist, and D. Mathis. 1990. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 62:1115-1121.

40. Kozono, H., D. Parker, J. White, P. Marrack, and J. Kappler. 1995. Multiple binding sites for bacterial superantigens on soluble class II major histocompatibility complex molecules. *Immunity* 3:187-196.
41. Von Bonin, A., S. Ehrlich, G. Malcherek, and B. Fleischer. 1995. Major histocompatibility complex class II-associated peptides determine the binding of the superantigen toxic shock syndrome toxin-1. *Eur.J.Immunol.* 25:2894-2898.
42. Wen, R., G. A. Cole, S. Surman, M. A. Blackman, and D. L. Woodland. 1996. Major histocompatibility complex class II-associated peptides control the presentation of bacterial superantigens to T cells. *J.Exp.Med.* 183:1083-1092.
43. Wen, R., D. R. Broussard, S. Surman, T. L. Hogg, M. A. Blackman, and D. L. Woodland. 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. *Eur.J.Immunol.* 27:772-781.
44. Woodland, D. L., R. Wen, and M. A. Blackman. 1997. Why do superantigens care about peptides? *Immunol.Today* 18:18-22.
45. Etongue-Mayer, P., M. A. Langlois, M. Ouellette, H. Li, S. Younes, R. Al Daccak, and W. Mourad. 2002. Involvement of zinc in the binding of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen to the proximity of the HLA-DR binding groove regardless of histidine 81 of the beta chain. *Eur.J.Immunol.* 32:50-58.
46. Lavoie, P. M., J. Thibodeau, I. Cloutier, R. Busch, and R. P. Sekaly. 1997. 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.
47. Langlois, M. A., P. Etongue-Mayer, M. Ouellette, and W. Mourad. 2000. Binding of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen to human MHC class II molecules via its N terminus is modulated by invariant chain expression and its C terminus is required for T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 30:1748-1756.

48. Kim, J., R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1994. Crystallographic structure of toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a human class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science* 266:1870-1874.
49. Li, Y., H. Li, N. Dimasi, J. K. McCormick, R. Martin, P. Schuck, P. M. Schlievert, and R. A. Mariuzza. 2001. Crystal structure of a superantigen bound to the high-affinity, zinc-dependent site on MHC class II. *Immunity*. 14:93-104.
50. Petersson, K., M. Hakansson, H. Nilsson, G. Forsberg, L. A. Svensson, A. Liljas, and B. Walse. 2001. Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence. *EMBO J.* 20:3306-3312.
51. Zhao, Y., Z. Li, S. J. Drozd, Y. Guo, W. Mourad, and H. Li. 2004. Crystal structure of Mycoplasma arthritis mitogen complexed with HLA-DR1 reveals a novel superantigen fold and a dimerized superantigen-MHC complex. *Structure.(Camb.)* 12:277-288.
52. Acha-Orbea, H., W. Held, G. A. Waanders, A. N. Shakhov, L. Scarpellino, R. K. Lees, and H. R. MacDonald. 1993. Exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus superantigens. *Immunol.Rev.* 131:5-25.
53. Held, W., A. N. Shakhov, S. Izui, G. A. Waanders, L. Scarpellino, H. R. MacDonald, and H. Acha-Orbea. 1993. Superantigen-reactive CD4+ T cells are required to stimulate B cells after infection with mouse mammary tumor virus. *J.Exp.Med.* 177:359-366.
54. Held, W., G. A. Waanders, A. N. Shakhov, L. Scarpellino, H. Acha-Orbea, and H. R. MacDonald. 1993. Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumour virus infection and allows virus transmission. *Cell* 74:529-540.
55. Choi, Y., J. W. Kappler, and P. Marrack. 1991. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumour virus. *Nature* 350:203-207.

56. Woodland, D. L., F. E. Lund, M. P. Happ, M. A. Blackman, E. Palmer, and R. B. Corley. 1991. Endogeneous superantigen expression is controlled by mouse mammary tumor proviral loci. *J.Exp.Med.* 174:1255-1258.
57. Beutner, U., W. N. Frankel, M. S. Cote, J. M. Coffin, and B. T. Huber. 1992. Mls-1 is encoded by the long terminal repeat open reading frame of the mouse mammary tumor provirus mtv-7. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:5432-5436.
58. Knight, A. M., G. B. Harrison, R. J. Paese, P. J. Robinson, and P. J. Dyson. 1992. Biochemical analysis of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat product. Evidence for the molecular structure of an endogenous superantigen. *Eur.J.Immunol.* 22:879-882.
59. Korman, A. J., P. Bourgarel, T. Meo, and G. E. Rieckhof. 1992. The mouse mammary tumour virus long terminal repeat encodes a type II transmembrane glycoprotein. *EMBO J.* 11:1901-1905.
60. Park, C. G., M.-Y. Jung, Y. Choi, and G. M. Winslow. 1995. Proteolytic processing is required for viral superantigen activity. *J.Exp.Med.* 181:1899-1904.
61. Reilly, M., D. Mix, and G. M. Winslow. 2000. Detection of viral superantigen-class II MHC interactions at the cell surface. *Mol.Immunol.* 37:987-993.
62. Mix, D. and G. M. Winslow. 1996. Proteolytic processing activates a viral superantigen. *J.Exp.Med.* 184:1549-1554.
63. Denis, F., N. H. Shoukry, M. Delcourt, J. Thibodeau, N. Labrecque, H. McGrath, J. S. Munzer, N. G. Seidah, and R. P. Sekaly. 2000. Alternative proteolytic processing of mouse mammary tumor virus superantigens. *J.Virol.* 74:3067-3073.
64. Speiser, D. E., R. Schneider, H. Hengartner, H. R. MacDonald, and R. M. Zinkernagel. 1989. Clonal deletion of self-reactive T cells in irradiation bone marrow chimeras and neonatally tolerant mice. Evidence for intercellular transfer of Mlsa. *J.Exp.Med.* 170:595-600.
65. Delcourt, M., J. Thibodeau, F. Denis, and R. P. Sekaly. 1997. Paracrine transfer of mouse mammary tumor virus superantigen. *J.Exp.Med.* 185:471-480.

66. Reilly, M., D. Mix, A. A. Reilly, Y. Yang, X, and G. M. Winslow. 2000. Intercellular transfer of a soluble viral superantigen. *J.Virol.* 74:8262-8267.
67. Torres, B. A., N. D. Griggs, and H. M. Johnson. 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.
68. Thibodeau, J., N. Labrecque, F. Denis, B. T. Huber, and R.-P. Sekaly. 1994. Binding sites for bacterial and endogenous retroviral superantigens can be dissociated on major histocompatibility complex class II molecules. *J.Exp.Med.* 179:1029-1034.
69. Mottershead, D. G., P.-N. Hsu, R. G. Urban, J. L. Strominger, and B. T. Huber. 1995. Direct binding of the Mtv7 superantigen (Mls-1) to soluble MHC class II molecules. *Immunity* 2:149-154.
70. Grigg, M. E., C. W. McMahon, S. Morkowski, A. Y. Rudensky, and A. M. Pullen. 1998. Mtv-1 superantigen trafficks independently of major histocompatibility complex class II directly to the B-cell surface by the exocytic pathway. *J.Virol.* 72:2577-2588.
71. Golovkina, T. V., Y. Agafonova, D. Kazansky, and A. Chervonsky. 2001. Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens. *J.Immunol.* 166:2244-2250.
72. Hsu, P. N., B. P. Wolf, N. Sutkowski, B. Mclellan, H. L. Ploegh, and B. T. Huber. 2001. Association of mouse mammary tumor virus superantigen with MHC class II during biosynthesis. *J.Immunol.* 166:3309-3314.
73. Gunning, P., J. Leavitt, G. Muscat, S. Y. Ng, and L. Kedes. 1987. A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:4831-4835.
74. Labrecque, N., H. McGrath, M. Subramanyam, B. T. Huber, and R.-P. Sekaly. 1993. Human T cells respond to mouse mammary tumour virus encoded superantigen:V $\beta$  restriction and conserved evolutionary features. *J.Exp.Med.* 177:1735-1743.

75. Faubert, A., A. Samaan, and J. Thibodeau. 2002. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J.Biol.Chem.* 277:2750-2755.
76. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
77. Brunet, A., A. Samaan, F. Deshaies, T. J. Kindt, and J. Thibodeau. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
78. Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
79. Takebe, Y., M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida, and N. Arai. 1988. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol.Cell Biol.* 8:466-472.
80. Winslow, G. M., P. Marrack, and J. W. Kappler. 1994. Processing and major histocompatibility complex binding of the MTV7 superantigen. *Immunity* 1:23-33.
81. Fu, X. T. and R. W. Karr. 1994. HLA-DR alpha chain residues located on the outer loops are involved in nonpolymorphic and polymorphic antibody-binding epitopes. *Hum.Immunol.* 39:253-260.
82. Charron, D. J. and H. O. McDevitt. 1979. Analysis of HLA-D region-associated molecules with monoclonal antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76:6567-6571.
83. Radka, S. F., C. E. Machamer, and P. Cresswell. 1984. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and western blotting. *Hum.Immunol.* 10:177-188.



84. Wraight, C. J., P. Van Endert, P. Moller, J. Lipp, N. R. Ling, I. C. MacLennan, N. Koch, and G. Moldenhauer. 1990. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J.Biol.Chem.* 265:5787-5792.
85. Roche, P. A., M. S. Marks, and P. Cresswell. 1991. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354:392-394.
86. Shookster, L., T. Matsuyama, G. Burmester, and R. Winchester. 1987. Monoclonal antibody 1a3 recognizes a monomorphic epitope unique to DQ molecules. *Hum.Immunol.* 20:59-70.
87. Menezes, J., W. Leibold, G. Klein, and G. Clements. 1975. Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)- negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV- genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine.* 22:276-284.
88. Roche, P. A., C. L. Teletski, D. R. Karp, V. Pinet, O. Bakke, and E. O. Long. 1992. Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *EMBO J.* 11:2841-2847.
89. Herman, A., G. Croteau, R.-P. Sekaly, J. Kappler, and P. Marrack. 1990. HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells. *J.Exp.Med.* 172:709-717.
90. Lamarre, D., D. J. Capon, D. R. Karp, T. Gregory, E. Long, and R. P. Sekaly. 1989. Class II MHC molecules and the HIV gp120 envelope protein interact with functionally distinct regions of the CD4 molecule. *EMBO J.* 8:3271-3277.
91. Kanagawa, O. and R. Maki. 1989. Inhibition of MHC class II-restricted T cell response by Lyt-2 alloantigen. *J.Exp.Med.* 170:901-912.
92. Azar, G. A. and J. Thibodeau. 2002. 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.

93. Graham, F. L. and A. J. van der Eb. 1973. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54:536-539.
94. Khalil, H., F. Deshaies, A. Bellemare-Pelletier, A. Brunet, A. Faubert, G. A. Azar, and J. Thibodeau. 2002. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO $\beta$  in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-382.
95. Subramanyam, M., B. Mclellan, N. Labrecque, R.-P. Sekaly, and B. T. Huber. 1993. Presentation of the Mls-1 superantigen by human HLA class II molecules to murine T cells. *J.Immunol.* 151:2538-2545.
96. Scherer, M. T., L. Ignatowicz, A. Pullen, J. Kappler, and P. Marrack. 1995. The use of mammary tumor virus (Mtv)-negative and single-Mtv mice to evaluate the effects of endogenous viral superantigens on the T cell repertoire. *J.Exp.Med.* 182:1493-1504.
97. Lund, F. E., T. Randall, D. L. Woodland, and R. B. Corley. 1993. MHC class II limits the functional expression of endogenous superantigens in B cells. *J.Immunol.* 150:78-86.
98. Roucard, C., F. Garban, N. A. Mooney, D. J. Charron, and M. L. Ericson. 1996. Conformation of human leukocyte antigen class II molecules. Evidence for superdimers and empty molecules on human antigen presenting cells. *J.Biol.Chem.* 271:13993-14000.
99. Golovkina, T., Y. Agafonova, D. Kazansky, and A. Chervonsky. 2001. Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens. *J.Immunol.* 166:2244-2250.
100. Busch, R., I. Y. Vturina, J. Drexler, F. Momburg, and G. J. Hammerling. 1995. Poor loading of major histocompatibility complex class II molecules with endogenously synthesized short peptides in the absence of invariant chain. *Eur.J.Immunol.* 25:48-53.
101. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 15:749-795.

102. Stumptner-Cuvelette, P., S. Morchoisne, M. Dugast, S. Le Gall, G. Raposo, O. Schwartz, and P. Benaroch. 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:12144-12149.
103. Acha-Orbea, H. and H. R. MacDonald. 1995. Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annu.Rev.Immunol.* 13:459-486.
104. Golovkina, T. V., A. Chervonsky, J. P. Dudley, and S. R. Ross. 1992. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 69:637-645.
105. Steimle, V., C.-A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106-109.
106. Nagarajan, U. M., A. Bushey, and J. M. Boss. 2002. Modulation of gene expression by the MHC class II transactivator. *J.Immunol.* 169:5078-5088.
107. Odorizzi, C. G., I. S. Trowbridge, L. Xue, C. R. Hopkins, C. D. Davis, and J. F. Collawn. 1994. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J.Cell Biol.* 126:317-330.
108. Newcomb, J. R. and P. Cresswell. 1993. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J.Immunol.* 151:4153-4163.
109. Vacheron, S., S. A. Luther, and H. Acha-Orbea. 2002. Preferential infection of immature dendritic cells and B cells by mouse mammary tumor virus. *J.Immunol.* 168:3470-3476.
110. Nagarajan, U. M., A. Bushey, and J. M. Boss. 2002. Modulation of gene expression by the MHC class II transactivator. *J.Immunol.* 169:5078-5088.
111. Vogt, A. B., L. J. Stern, C. Amshoff, B. Dobberstein, G. J. Hammerling, and H. Kropshofer. 1995. Interference of distinct invariant chain regions with superantigen

- contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR. *J.Immunol.* 155:4757-4765.
112. Bania, J., E. Gatti, H. Lelouard, A. David, F. Cappello, E. Weber, V. Camosseto, and P. Pierre. 2003. Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6664-6669.
113. Stebbins, C. C., G. E. Loss, Jr., C. G. Elias, A. Chervonsky, and A. J. Sant. 1995. 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.

### 3.9 FOOTNOTES

<sup>1</sup> This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research. RPS holds a Canadian Research Chair in human immunology. JT is supported by a Senior fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

<sup>2</sup> **Corresponding author:** Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C-3J7

**Tel:** (514) 343-6279;

**Fax:** (514) 343-5701

**e-mail:** [REDACTED]

<sup>3</sup> **Abbreviations:** SAg: *Superantigen*;

vSAg7: *viral superantigen 7*;

MTV7: *Mammary tumor virus superantigen 7*;

MMTV: *Mouse mammary tumor virus*;

DCs: *Dendritic cells*

Ii: *Invariant chain*

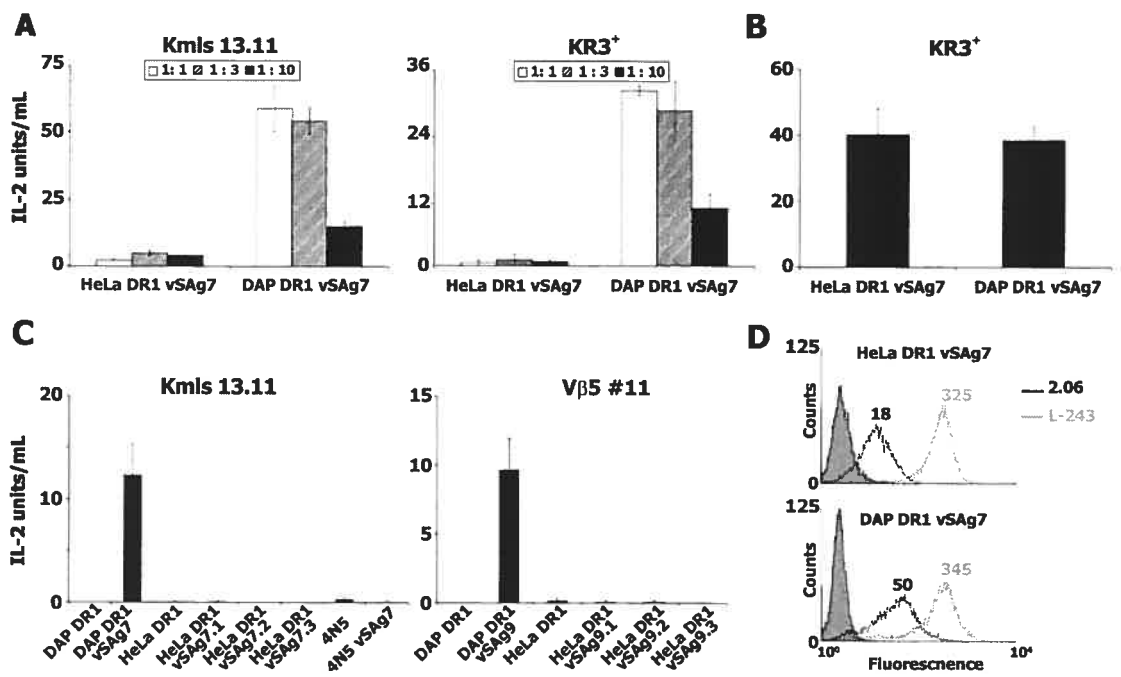
ER: *Endoplasmic reticulum*

DM: *HLA-DM or H2-M*

### 3.10 FIGURES

#### **Figure 1. DR<sup>+</sup> HeLa cells do not present vSAGs**

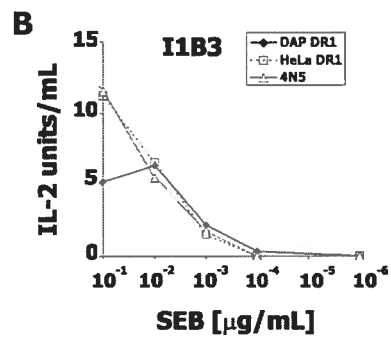
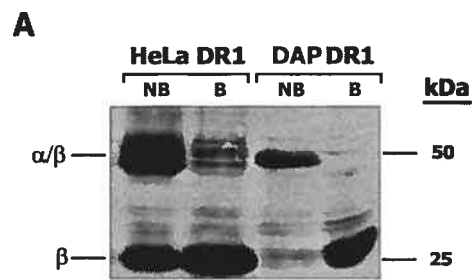
(A) Endogenous presentation of vSAG7 by DR1<sup>+</sup> HeLa and DAP cells to responsive mouse T cell hybridomas Kmls13.11 or KR3<sup>+</sup>. Different APC:hybridoma ratios were tested. (B) Assessment of vSAG7 expression by transfer of the activity from HeLa and DAP cells to vSAG<sup>-</sup> BJAB B cells. BJAB cells were co-cultured for 16-20h with the different vSAG-expressing cell lines in the presence of KR3<sup>+</sup>. (C) Endogenous presentation of vSAG7 or vSAG9 by DR<sup>+</sup> human (HeLa and 4N5) or murine (DAP) cell lines or clones to Kmls13.11 or Vβ5#11 hybridomas. (D) Flow cytometry analysis of HLA-DR1 levels of expression on the surface of HeLa and DAP stained with L-243 mAb (light gray) or 2.06 mAbs (black). The mean fluorescence value is indicated. The error bars indicate the standard deviation obtained for each condition performed in triplicate.



**Figure 2. Compact SDS-resistant DR molecules on transfected HeLa cells.**

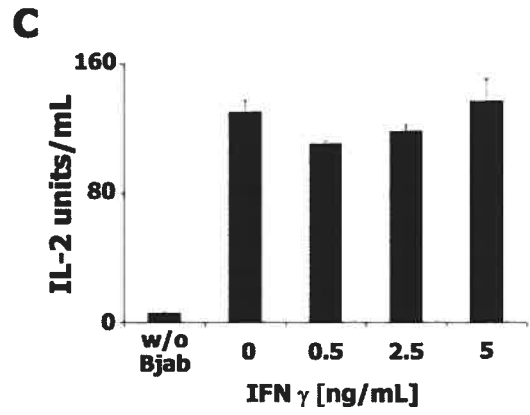
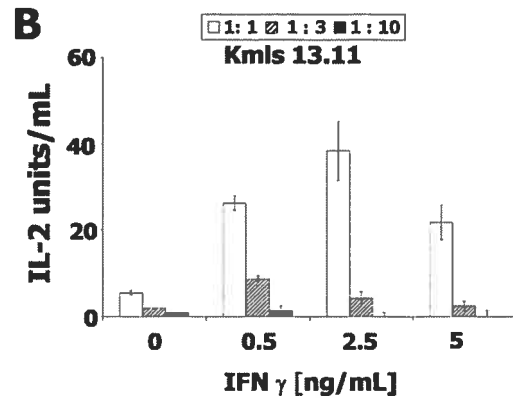
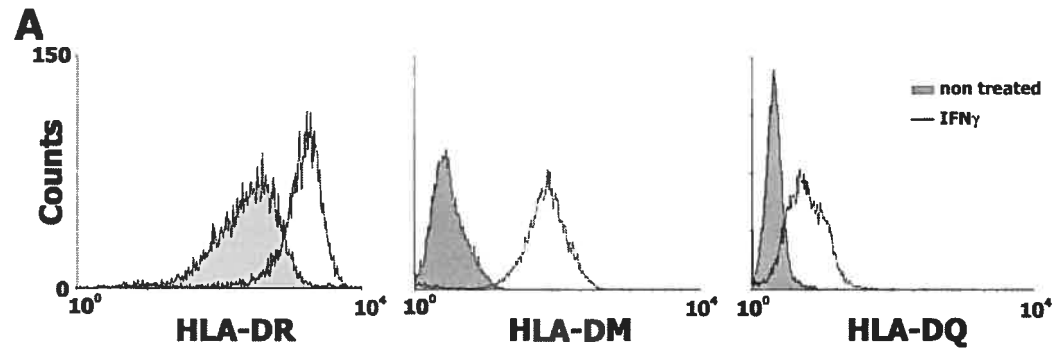
(A) Boiled (B) and non-boiled (NB) cell lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using XD5 mAb. (B) Dose-response stimulation of I1B3 murine T cell hybridoma by the bSAg SEB presented on DAP DR1 (◆), HeLa DR1 (◻) and 4N5(△) cells.





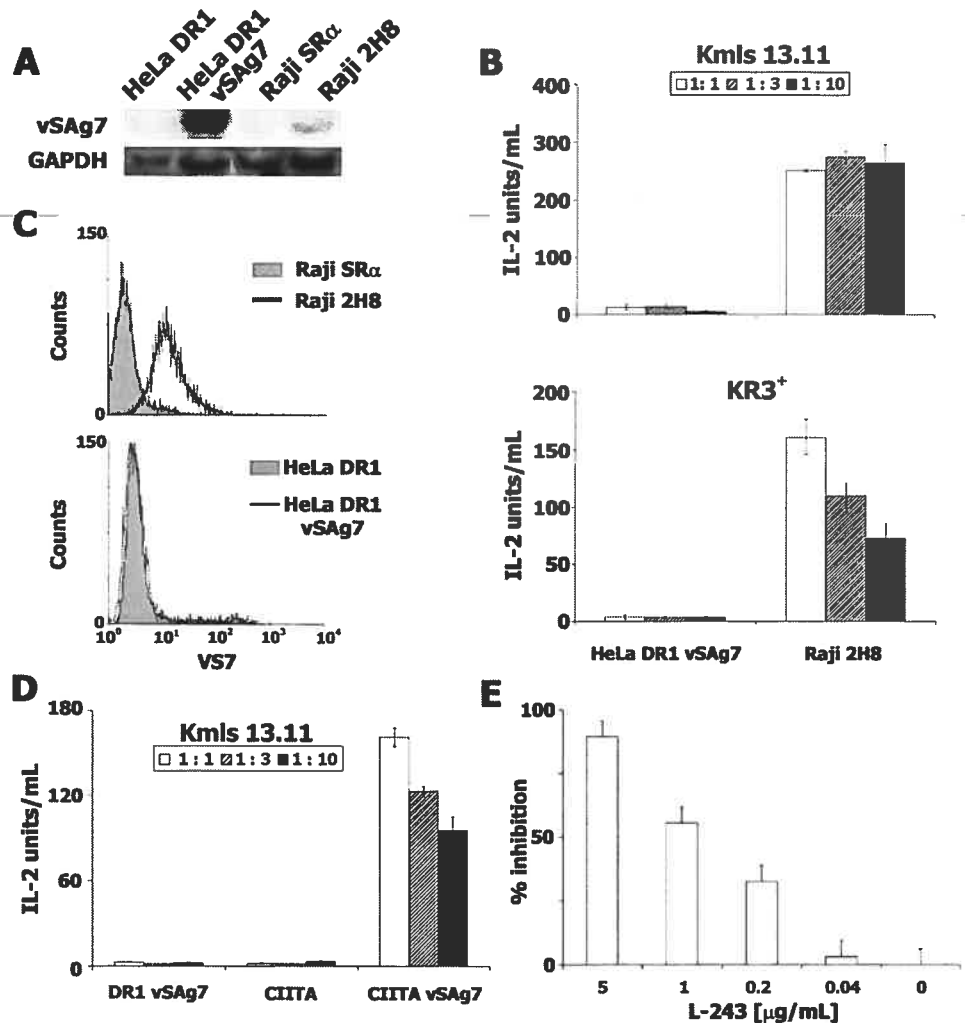
**Figure 3. INF- $\gamma$  restores presentation of vSAg7 by HeLa cells.**

(A) Flow cytometry analysis of HeLa DR1 vSAg7 cells treated (solid black line) or not (filled curve) with 2.5 ng/mL of recombinant human IFN- $\gamma$  for 5 days and stained for surface expression of DR (L-243) and DQ (1a3). Cells were permeabilized and stained for DM (Map.DM1). (B) HeLa DR1 vSAg7 cells were treated with IFN- $\gamma$  for 5 days and tested for their capacity to stimulate the Kmls13.11 T cell hybridoma at different APC : responder T cell ratios as indicated. (C) Effect of IFN- $\gamma$  on vSAg7 transfer from HeLa DR1 vSAg7 to BJAB. IL-2 production by the Kmls13.11 hybridoma was measured after transfer of vSAg7 with or without (w/o) BJAB.



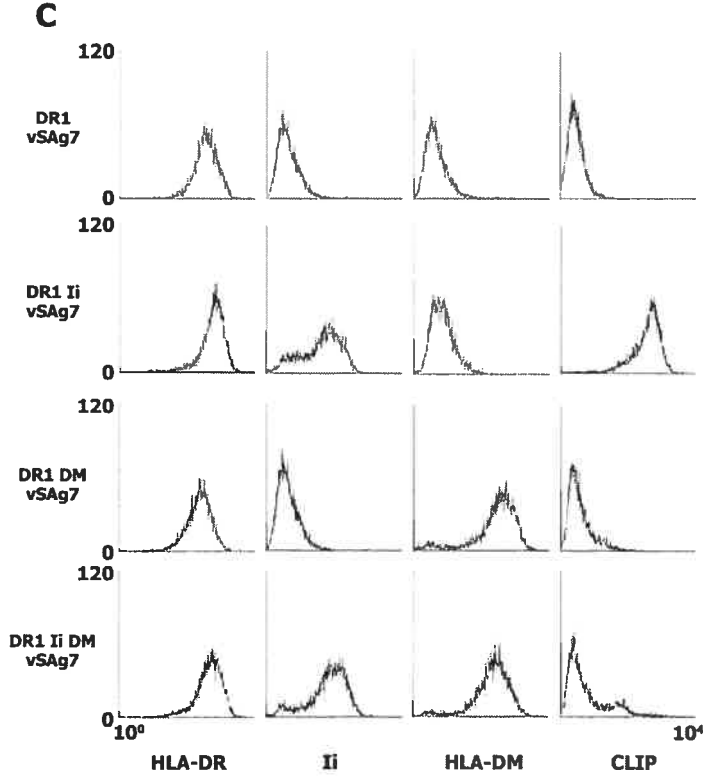
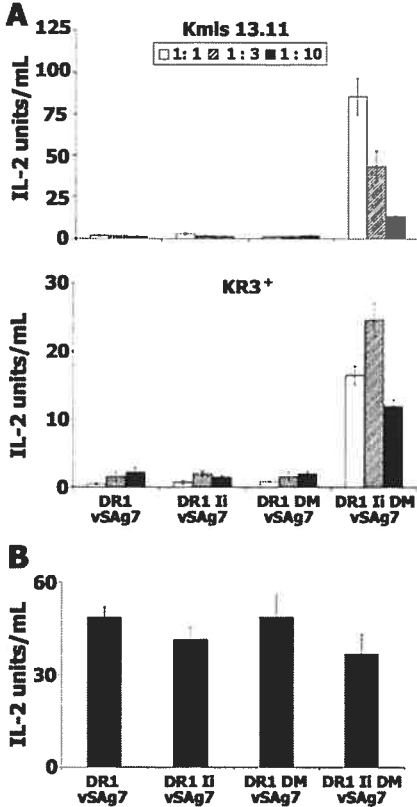
**Figure 4. Raji cells present vSAGs**

(A) Relative vSAG7-specific mRNA expression was measured on Northern blots. Raji SR $\alpha$  represent mock-transfected cells. The constitutive *gapdh* transcription is shown as control of mRNA loading. (B). Endogenous presentation of transfected vSAG7 to T cell hybridomas Kmls13.11 and KR3<sup>+</sup> to different APC : Responder T cell hybridoma ratios as indicated. (C) Flow cytometry analysis of vSAG7 cell surface expression on Raji and HeLa cells using the VS7 mAb. Background fluorescence (filled curve) is obtained by staining Raji SR $\alpha$  and HeLa cells with VS7 mAb. The staining of vSAG7<sup>+</sup> cells is shown in black solid line. (D) IL-2 production by Kmls13.11 T cell hybridoma in response to HeLa CIITA cells transfected (CIITA vSAG7) or not (CIITA) with vSAG7 for various APC : T cell hybridoma ratios. Stimulation with the negative control DR1 vSAG7 is also shown. (E) Dose-dependent inhibition by L-243 of the T cell stimulation by vSAG7-transfected HeLa CIITA.



**Figure 5. Co-expression of DM and Ii rescues vSAg7 presentation by HeLa DR1 cells.**

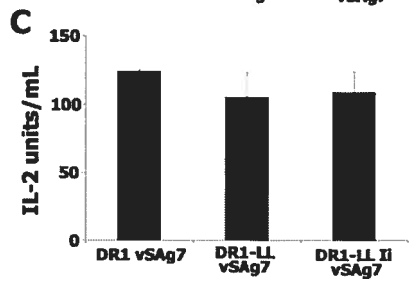
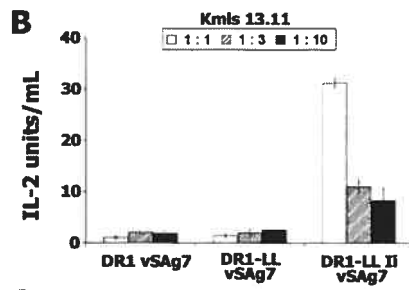
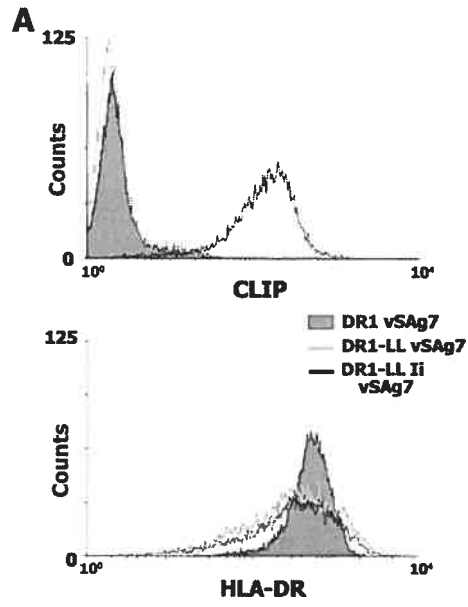
(A) Endogenous presentation of vSAg7 by DR1<sup>+</sup> HeLa and DAP cells to responsive mouse T cell hybridomas Kmls13.11 or KR3<sup>+</sup> for various APC : T cell hybridoma ratios. (B) Assessment of vSAg7 expression by transfer of the activity to BJAB cells were co-cultured for 16-20h with the different vSAg-expressing cell lines in the presence of KR3<sup>+</sup>. (C) The expression of HLA-DR (L-243) and CLIP (CerCLIP.1) at the cell surface was analyzed by flow cytometry. For HLA-DM (Map.DM1) and Ii (BU45) stainings, cells were first fixed and permeabilized.



**Figure 6. An ectopic endosomal sorting motif in the DR $\beta$  tail allows vSAg presentation.**

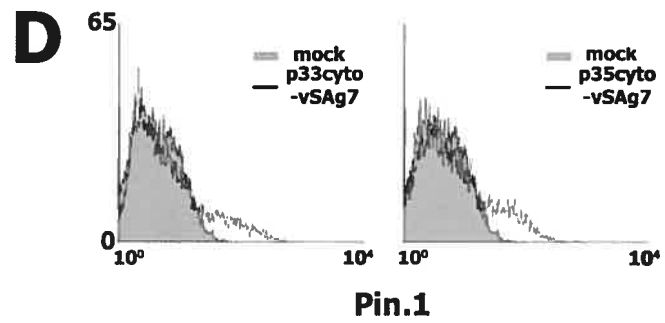
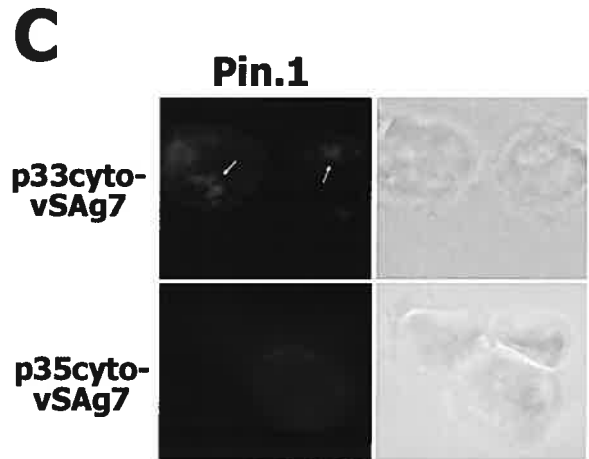
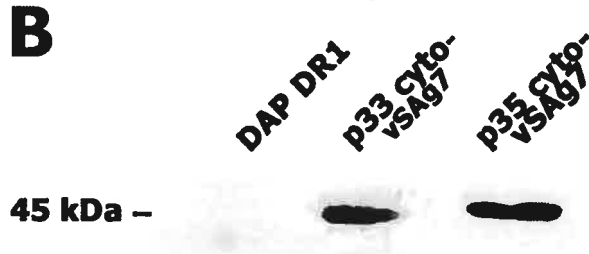
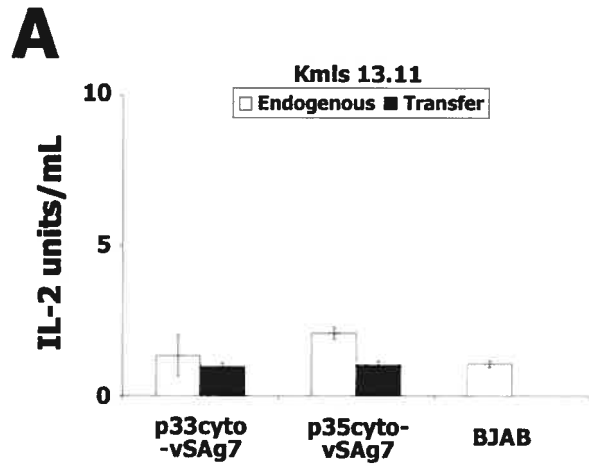
(A) Flow cytometry analysis of CLIP (CerCLIP.1) and HLA-DR (L-243) expression at the surface of HeLa transfectants. (B) Endogenous presentation of vSAg7 by various ratios of HeLa cells to responsive mouse T cell hybridomas Kmls13.11. (C) Assessment of vSAg7 expression by transfer of the activity to BJAB B cells co-cultured for 16-20h with the different vSAg-expressing cell lines in the presence of KR3<sup>+</sup>.





**Figure 7. Sorting vSAg7 to endosomes destroys its activity.**

(A) Direct (endogenous) and indirect (transfer) presentation of chimeric p33cyto-vSAg7 and p35cyto-vSAg7 molecules by transfected DAP DR1 cells. (B) Immunoblot analysis using Pin.1 mAb of cells shown in panel A. vSAg-negative DAP DR1 cells were used as control. (C) HEK 293T cells were transiently transfected with p33cyto-vSAg7 or p35cyto-vSAg7 chimeric molecules. Cells were permeabilized, stained with Pin.1 and analyzed by fluorescence microscopy. White arrows indicate the presence of large vesicles in the cytoplasm. (D) Mock or transfected HEK 293T cells were permeabilized and stained using the Pin.1 Ab specific for the cytoplasmic tail of all Ii isoforms.



**CHAPITRE 4 – ARTICLE**

**HLA-DO MODULATION OF THE PEPTIDE REPERTOIRE DOES NOT INHIBIT  
SUPERANTIGEN PRESENTATION.<sup>1</sup>**

---

Georges A. Azar\*, Walid Mourad<sup>§</sup>, and Jacques Thibodeau\*

\*Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie,  
Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada, H3C 3J7

<sup>§</sup> CHUM Hôpital St-Luc, Montréal Canada.

**Running title:** HLA-DO effect on superantigens presentation

**Keywords:** Superantigen, HLA-DO, MHC, HLA-DM, Antigen processing

#### 4.1 RÉSUMÉ

Les superantigènes (SAGs) forment un groupe de petites protéines à propriétés mitogènes pour les lymphocytes T en présence de cellules présentatrices d'antigènes. Ils interagissent avec les molécules de CMH de classe II à l'extérieur de leur niche peptidique et forment un complexe tri-moléculaire en se liant à la partie V $\beta$  du TcR opposé. Les rôles de la chaîne invariante et de HLA-DM dans la présentation des SAGs par les molécules de CMH II ont déjà été décrits. L'effet de ces chaperonnes incombe, au moins partiellement, de leur impact sur la sélection du répertoire peptidique dans la niche des CMH II. La fonction de DM est régulée par une autre molécule, HLA-DO. Il a été démontré que la transfection de H2-O, l'homologue murin de HLA-DO, affecte dramatiquement la liaison et la présentation des SAGs bactériens par les molécules de CMH II murines. Cependant, HLA-DO et H2-O semblent avoir des effets différents sur la voie de présentation par les CMH II, comme l'incapacité d'augmenter les niveaux de CLIP par H2-O. Pour investiguer l'effet de HLA-DO sur la présentation des SAGs, nous avons comparés les lignées B 721.45 et sa dérivée DO $\beta$  - déficiente 721.61. Nos résultats montrent que la liaison de SEA, SEB et TSST-1 n'est pas affectée par HLA-DO. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant les HeLa CIITA<sup>+</sup> surexprimant ou non HLA-DO. De plus, en présence de bSAGs, les splénocytes de souris H2-O<sup>-/-</sup> prolifèrent à des niveaux semblables à ceux des souris contrôles. Finalement, la surexpression de HLA-DO par les cellules HeLa CIITA<sup>+</sup> n'affecte pas la présentation du SAG mtv7 stablement transfecté. Ainsi, le rôle bien établi de DM dans la liaison et la présentation des SAG par les molécules de CMH II, n'est pas affecté par la présence de DO. Ces résultats suggèrent que l'effet de DM joue un rôle plus élaboré qu'une simple modification du répertoire peptidique présenté par les molécules de classe II.

## 4.2 ABSTRACT

Superantigens (SAGs) are a group of small proteins displaying T-cell stimulatory properties in the presence of antigen-presenting cells. They bind MHC class II molecules outside the peptide binding groove and form a tri-molecular complex through their interaction with the V $\beta$  part of the responsive TcR. The role of invariant chain and HLA-DM on the capacity of classical class II molecules to bind superantigens has been well documented. The effect of these chaperones would result, at least partly, from their impact on the selection of the peptide repertoire in the groove. The function of DM is regulated by another chaperone called HLA-DO. The mouse homologue, H2-O, was shown upon transfection to dramatically affect the binding and presentation of bacterial SAGs by mouse class II molecules. However, DO and H2-O seem to have very different effects on the class II presentation pathway as, for example, the latter does not increase CLIP levels. To investigate the effect of HLA-DO on the presentation of SAGs, we used the B cell line 721.45 and its DO $\beta$ -deficient derivative, 721.61. Our results showed that the binding of SEA, SEB and TSST-1 was not affected by HLA-DO. Similar results were obtained using HeLa CIITA<sup>+</sup> cells overexpressing or not HLA-DO. Interestingly, we found that H2-O-proficient and -deficient splenocytes proliferate to the same extent in the presence of bSAGs. Finally, overexpression of HLA-DO in HeLa CIITA<sup>+</sup> cells did not affect the presentation of the stably transfected mtv7 SAg. Thus, the established role of DM on the capacity of class II molecules to bind superantigens is unimpaired by the presence of DO. These results suggest that the effect of DM may be more profound than a trivial modification of the class II-bound peptide repertoire.

### 4.3 INTRODUCTION

Superantigens (SAGs) are small bacterial (bSAGs) or viral (vSAGs) proteins that bind MHC class II molecules outside the peptide-binding groove and activate up to 20% of the T cell repertoire in a V $\beta$ -specific manner (1,2). This results in secretion of high levels of cytokines and leads to either anergy or deletion of those activated T cells (3-8). The best-characterized SAGs are those secreted by *Staphylococcus aureus* as well as the product of the 3' ORF of the mouse mammary tumor viruses (MMTV).

Bacterial SAGs are soluble toxins secreted from a number of organisms such as *Staphylococcus aureus* and *Mycoplasma arthritidis* (2,9). A dozen bSAGs have been crystallized so far and all show very similar tertiary structures. However, various mode of interaction with MHC class II molecules have been reported (see (10-12)). Through their N-terminal domain, some bSAGs such as SEB and TSST-1 bind the  $\alpha$  chain of the MHC II (13-15). Others (SEH, SPE-C, SPE-G - J and SMEZ) engage with high affinity the histidine 81 of the  $\beta$  chain with the help of a Zinc ion while some (SEA, SED, SEE and MAM) engage both class II chains and possibly crosslink the receptor (11,16-18).

MMTV encodes a superantigen in its 3' long terminal repeat (LTR) by which it exploits the immune system for its successful transmission (for a review see (19,20)). It is required for viral infectivity and virus spread (21-23). Also, integrated proviruses in the mouse genome express vSAGs, leading to the deletion of reactive T cells in the thymus (24). The biochemical characterization of the MMTV vSAGs has been cumbersome and their crystal structure has yet to be determined. They are type II membrane glycoproteins which most likely associate in a furin-processed form with mature, peptide-loaded MHC class II molecules at the plasma membrane of APCs (25,26).

SAGs have long been implicated in various diseases such as toxic shock, as well as in autoimmune conditions (27). They also proved to be useful tools for the appreciation of



the peptide-driven structural heterogeneity of HLA-DR molecules (13,28). It has been demonstrated that the class II-bound peptide modulates the affinity of SEA and TSST-1, but not SEB, for MHC class II molecules (12,29-31). As for bSAGs, it has been suggested that vSAGs presentation is sensitive to the MHC class II peptide repertoire (25,32). Accordingly, molecules implicated in the class II antigen processing pathway have been shown to modulate the binding of some SAGs. Invariant chain increases the binding of SEA by competing with large polypeptides located in the ER while efficient binding of TSST-1 and MAM requires HLA-DM to remove the non-permissive CLIP peptide from the groove. (28,33,34). Interestingly, it was proposed that DM affects SAG binding not only through its catalytic activity on CLIP release but also because of a possible direct ability to affect the fine conformation of class II molecules (25,35).

In most APCs, most notably in B cells, a third accessory molecule to the MHC class II loading machinery can be found (36,37). HLA-DO is a non-classical class II molecule showing very few polymorphisms (38). Although its physiological role remains to be firmly established, HLA-DO clearly regulates the activity of HLA-DM (39-42). The DO-DM complex forms in the ER and the complex traffics to the endocytic pathway through a route that remains to be characterized (43). Transfection of HLA-DO in CIITA<sup>+</sup> cells resulted in the accumulation of class II-CLIP complexes at the cell surface, showing that DM was inhibited in these conditions (39,41). Subsequent *in vitro* studies showed that the activity of DO is pH-dependent, suggesting that it inhibits DM in early endocytic compartments but not in lysosomes (40,43,44). The mouse H2-O molecule has not been extensively characterized and inactivation or overexpression of H2-O in various genetic backgrounds did not impact the display of cell surface CLIP (42,45). Interestingly, the group of Ostrand-Rosenberg has showed that transfection of H2-O in class II<sup>+</sup> mouse SaI sarcoma cells inhibited the binding and presentation of SEA and SEB (46).

To further investigate the role of HLA-DM in SAG presentation and to get insights into the function of HLA-DO, we tested the binding and presentation of a panel of SAGs by

human and mouse cells expressing various levels of HLA-DO or H2-O. Our results demonstrate that although DO modifies the peptide repertoire displayed by the MHC class II molecules at the cell surface, the MHC class II/SAg interactions are not affected.

## 4.4 MATERIAL AND METHODS

### Antibodies and reagents

L243 (ATCC HB-55) mAb (IgG<sub>2a</sub>) binds a specific DR $\alpha$  conformational determinant (47). BU-45 (IgG<sub>1</sub>) is a mAb specific to the C-terminal portion of the human Ii (48). Pin.1 (IgG<sub>1</sub>), a kind gift from Dr P. Cresswell (Yale University), recognizes both Ii p33 and 35 cytoplasmic tails (49). CerCLIP.1 (IgG<sub>1</sub>) is directed against the N-terminal segment of CLIP bound to class II molecules (PharMingen, San Diego, CA). MaP.DM1 (IgG<sub>1</sub>) is directed against the luminal portion of HLA-DM (PharMingen International, Oakville, Canada) (50). Mags.DO5 (IgG<sub>1</sub>) recognizes a conformational determinant on HLA-DO (51).

SEA, SEB, TSST-1 SAGs were from Toxin Technology (FL, USA). Biotinylated SAGs (SEA-bio, SEB-bio and TSST-1-bio) were prepared using NHS-biotine according to the manufacturer's protocol (Pierce; Rockford, IL). The final concentration was adjusted to 450 ng/uL in PBS. Recombinant MAM was produced as GST fusion proteins as described previously (17), SEE and SED (52).

### Cells and mice

The human B-cell line 721.61 (.61) is derived from the Epstein-Barr virus-transformed HLA-hemizygous B-cell line 721.45 (.45), (described (53)). .61, .45 and the EBV-negative BJAB (54) were cultured in RPMI 1640 medium with 10% FBS (Gibco BRL, USA) and 4 $\mu$ M 2-ME. The human epithelial HeLa cells (ATCC CCL-2) were cultured in DMEM completed with 10% FBS and 4 $\mu$ M 2-ME. I1B3 and 3DT 34.5.8 (mV $\beta$ 1 and mV $\beta$ 8) (55), KSEA 1.8/4.9.3 (mV $\beta$ 1) (56) and K25-49.16 (mV $\beta$ 3) (56,57) murine T cell hybridomas were grown DMEM containing 10% FBS and 4 $\mu$ M 2-ME. KR3<sup>+</sup> (mV $\beta$ 8.1) (58), 11.40 (mV $\beta$ 11) (59) and KOX 15-8.3 (mV $\beta$ 15) (56) were grown in

complete RPMI 1640. Selection was applied 48h post transfection (puromycin 0,2 µg/mL; Zeocin 160 µg/mL; hygromycin 55µg/mL).

Mice with both H2-OA genes inactivated (H2-Oα<sup>-/-</sup>) were a kind gift from Dr L. Karlsson (42). Splenocytes from these mice and from age-matched C57Bl/6 mice were cultured in complete RPMI 1640 10% FBS

### **Plasmids and transfections**

vSAg7 was expressed following transfection of SRα MTV7 encoding the resistance gene to puromycin (a gift from Dr François Denis, Institut Armand Frappier, Laval, Québec). pBudDO encoding both the α and β chains of HLA-DO has been described previously (60). HeLa CIITA and HeLa CIITA DO cells (60) were stably transfected using Fugene6 (Roche Diagnostics, Canada) with SRα MTV7 to obtain the HeLa CIITA vSAg7 and HeLa CIITA DO vSAg7 cells.

### **Flow cytometry analysis**

Cells were washed in PBS and incubated with biotinylated bSAg (SAg-bio) in PBS for 4 hours at 4°C. Stainings using antibodies were carried out for 30 minutes. Then cells were washed in PBS and incubated in PBS for another 30 min. at 4°C, with Streptavidin-PE for the SAg-bio or Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Cedarlane, Canada) for the mAbs. Cells were washed twice and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur® (Becton Dickinson, CA). Intracellular staining for HLA-DO, HLA-DM and Ii were carried out on cells fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with saponin (61,62) using respectively, Mag.DO, MaP.DM1 or BU45 mAbs and the Alexa-488 coupled goat anti-mouse IgG.

### Functional assays

For bSAg presentation assays,  $6 \times 10^4$  APCs were co-cultured with  $6 \times 10^4$  cells of the appropriate T cell hybridoma in the presence of different concentrations of soluble bSAgs. The vSAg7-expressing APCs were co-cultured at different ratios with  $6 \times 10^4$  T cell hybridomas (KR3+). 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 (ATCC TIB-214) as measured by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation (63). Splenocytes were cultured for 5 days at  $10^5$  cells per well in presence of the different bSAgs at the appropriate concentrations before adding the  $^3\text{H}$ -thymidine to measure the SAg induced T cell proliferation. For paracrine transfer of soluble vSAg, expressing cells (donors) were co-cultured with BJAB or splenocytes (acceptors) together with responder T-cell hybridomas at the indicated ratios.

## 4.5 RESULTS

### Effect of HLA-DO on bSAg binding

Two different cellular systems were used to analyze the effect of DO on the binding of bSAgs to human classical class II molecules. First, we relied on the 721.45 B cell line and its DO-negative counterpart, 721.61, which has lost all two genes coding for the DO $\beta$  chain (64). In accordance with the relatively low expression of HLA-DO in .45 cells, only a modest increase in cell surface CLIP levels was observed by flow cytometry as compared to .61 cells (Fig.1 and Table 1). To fully appreciate the impact of DO on the classical class II molecules, we used CIITA<sup>+</sup> HeLa cells super-transfected or not with HLA-DO. The class II transactivator CIITA is the master regulator of MHC class II genes and under its control, cells up-regulate not only the expression of HLA-DR (Figure 1), DP, DQ but also that of Ii and the non classical class II HLA-DM and DO (60,65-67). However, overexpression of DO in HeLa CIITA cells (HeLa CIITA DO) leads to a 15 fold increase in the MFV for cell surface CLIP-class II complexes, showing the efficient inhibition of HLA-DM's peptide exchange activity (Fig.1 and Table 1) (39).

Bacterial SAgS are soluble proteins and their binding to MHC class II molecules can be directly measured by flow cytometry using biotinylated ligands (SAgs-bio). Saturating concentrations of SAgS-bio were used and transfected cells expressing different levels of HLA-DR showed proportional variations in the MFVs obtained with bSAgs (data not shown). Figure 2A shows two independent experiments assessing the binding of SAgS onto transfected HeLa cells. The results demonstrate that overexpression of DO in HeLa CIITA does not affect the apparent interaction between SAgS and class II molecules. The HeLa CIITA DO<sup>+</sup> over HeLa CIITA ratios of the MFVs obtained in a representative experiment using either L243, CLIP, SEA, SEB or TSST-1 is shown in figure 2B. Interestingly, while

over-expression of DO translates into a dramatic increase in binding of the CerCLIP mAb, the effect on the binding of bSAGs was marginal at best and comparable to the experimental variations observed with the L243 mAb.

A similar experiment was conducted using .45 and .61 cells. The CLIP increase was about 2 fold in DO-proficient cells but the variations in the binding of SAGs were again much less important (Fig.2C). Taken together, these results suggest that DO expression does not alter the overall binding of bSAGs.

### **Effect of HLA-DO on bSag presentation to T-cell hybridomas**

In order to confirm the DO-insensitive binding of SEA, SEB and TSST-1 to MHC class II molecules, we turned to T cell functional assays. Mouse T cell hybridomas bearing appropriate V $\beta$ s are responsive to low amounts of SAGs and have been extensively used to characterize their properties (56,68). Figure 3A shows dose-response curves for T cell hybridomas responsive to each of the bSAGs. SEA was efficiently presented to the V $\beta$ 1<sup>+</sup> KSEA1.8/4.9.3 hybridoma, independent of the DO expression levels. Also, SEB and TSST-1 presentation to 3DT 34.5.8 (V $\beta$ 1<sup>+</sup>) and KOX 15-8.3 (V $\beta$ 15<sup>+</sup>) was independent of the levels of DO expressed by transfected HeLa cells or the B lymphocytes. Similar results were obtained with at least another hybridoma for each bSAG (data not shown). These results are in accordance with the direct binding experiments presented above.

In order to generalize our findings, three other combinations of bSAGs and hybridomas were tested. SED and SEE are produced by *Staphylococcus aureus* while MAM is the product of *mycoplasma arthritidis*. HeLa CIITA and HeLa CIITA DO cells were equally effective in presenting SEE, SED and MAM to 11.40, I1B3 and K25-49.16, respectively. For .45 and .61 cells, in this particular experiment, a slight enhancement of the presentation correlated with the presence of DO. However, this result most likely reflects variations in the cell count as it was not reproduced in another experiment and was not

observed when analyzing the presentation by HeLa cells overexpressing DO (data not shown and fig. 3B, left panels). These results further support the contention that HLA-DO expression does not affect bSAGs binding.

### **Effect of H2-O on bSAGs binding and presentation**

Given the negative results obtained with our panels of bSAGs and hybridomas regarding the impact of HLA-DO, we turned to a more physiological system. Splenocytes from DO-proficient and -deficient C57Bl/6 mice were purified and tested directly as above for the binding of biotinylated SAGs. These mice are I-E<sup>-</sup> but express the I-A<sup>b</sup> class II allotype. About half of the cells in the spleen are class II<sup>+</sup> B cells or DCs expressing various levels of H2-O (69,70). Figure 4A shows that the binding of SEA and TSST-1 is not affected by the expression of H2-O. No specific binding was observed for SEB (data not shown) as this SAg binds mainly to I-E (71,72). SEA, SEE and TSST-1 were added to splenocytes and T cell proliferation was measured after five days by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation (Figure 4 B-D). No difference was observed in the response of DO-deficient and -proficient mice. Altogether, these results suggest that H2-O does not modulate the magnitude of the T cell response to our panel of bSAGs.

### **Effect of HLA-DO expression on endogenous vSAG presentation**

Recent experiments established the importance of class II-bound peptides and of HLA-DM in the presentation of MMTV-encoded SAGs (25,73). In our earlier work, a DR<sup>+</sup> HeLa cell line proved to be defective in presenting a transfected endogenous vSAG. However, presentation was restored upon co-expression of DM and Ii (25). Although the exact mechanism has yet to be uncovered, such DM-dependent SAg presentation phenotype is possibly sensitive to the inhibitory activity of DO. To verify this hypothesis, we used the easily transfectable HeLa CIITA cells, which efficiently present vSAG7 from MMTV7. The vSAG7 ORF DNA was stably transfected into the HeLa CIITA or HeLa CIITA DO cells to



obtain HeLa CIITA vSag7 and HeLa CIITA DO vSag7 cell lines, respectively. These bulk populations express very similar levels of class II molecules as judged by the L243 staining profiles (data not shown).

Functional assays were conducted using the V $\beta$ 6<sup>+</sup> KR3<sup>+</sup> murine T cell hybridoma. Two different ratios of APCs:T cells (1:1 and 1:3) were tested and IL-2 production was measured after 24h of co-culture. Figure 5A shows no significant effect of the DO overexpression. A control experiment was done by including the BJAB cells in the co-culture. Such paracrine transfer on the presentation-competent B cells is used to determine the extent of vSag expression in various transfectants. Although the assay does not discriminate between endogenous presentation by HeLa cells versus presentation of transferred fragments by BJAB, the results clearly show that both HeLa CIITA vSag7 and HeLa CIITA DO vSag7 cell lines express comparable levels of the vSag. These results suggest that overexpression of DO does not affect the ability of DR molecules to present vSag7.

#### 4.6 DISCUSSION

Although SAgS show a general preference for binding to HLA-DR and I-E molecules, their presentation was said to be MHC-unrestricted. Indeed, SAgS do not require processing and a given family member can be efficiently presented by a large number of allotypes and even by different isotypes (1,56,74). Also, the fact that they stimulate T cells on the basis of their V $\beta$  usage reinforced this notion. Despite these particularities, the presentation of SAgS and cognate peptides share many similarities (75,76). For example, mutation of upward-pointing residues into the MHC molecules modulates T cell recognition without altering the interaction with SAgS or peptides (77,78). On the other hand, by analogy with the TcR, SAgS binding was shown in some cases to be sensitive to the class II conformation and the peptide load clearly contributed to this effect (79). Co-crystals between bSAgS and HLA-DR showed that MAM, TSST-1, SEH and SPE-

C directly contact the class II-bound peptide (15,18,80,81). For TSST-1, the influence of the peptide, most specifically its C-terminal region, was confirmed biochemically by several groups (29,31,82,83).

The importance of the peptide on the presentation of bSAGs was also inferred, indirectly, from the effect of DM expression. Both the presentation and binding of MAM and TSST-1 are inhibited by CLIP but restored upon DM expression in different cell lines (28,33). Also, spleen cells from mice deficient in H2-DM require 500 times more TSST-1 to achieve the levels of stimulation observed with H2-DM-sufficient mice (34). From these studies, it was suggested that CLIP is the prototypic non-permissive peptide for TSST-1 and MAM binding.

In DO<sup>+</sup> HeLa CIITA cells, the load of CLIP at the cell surface is increased dramatically as a result of the inhibitory effect of DO on DM function. Knowing the inhibitory effect of CLIP on TSST-1 and MAM binding, it was surprising that the presentation of these bSAGs was unaffected by the presence of DO. We expected that the 15 fold increase in the CLIP loaded class II population at the cell surface of HLA-DO expressing HeLa cells (Fig 1 and Table 1) would somewhat translate into a loss of binding of TSST-1. Consistent with our finding that SEB and TSST-1 only bind subsets of HLA-DR on the surface of APCs (13), these results suggest that the pool of class II-CLIP that is long-lived in the presence of DO might never have served as receptors for TSST-1, even in the situation where CLIP had been removed. What structural feature distinguishes these class II molecules from those that are SAg-receptive is unknown. The fact that these class II molecules suffer from the expression of DO suggests that they were at some point in rather early endocytic compartments. Indeed, DO inhibits DM in early endosomes while those class II in acidic vesicles are substrates for the catalysis by DM. The non-permissive class II molecules may never reached highly acidic compartments. Knowing that DR undergoes a conformational change at low pH values (84), we can speculate that TSST-1 binding requires a permanent conformation change occurring only during lysosomal transit. Those

class II molecules that encounter DO would not have had access to lysosomal compartments in any case and thus would never have served as receptors. An alternative explanation would be that despite the existence of class II subsets, DM may play a critical chaperone role independent of its peptide-editing function. This is reminiscent of the results obtained by the group of Hammerling on the DR3-specific mAb epitope 16.23 (85). Although CLIP was thought to inhibit DR recognition by 16.23 mAb, the results suggested that DM restoration of the epitope was independent of CLIP removal. By analogy, the extra class II / CLIP complexes in DO-overexpressing cells may still have interacted with DM in such a way not to allow peptide exchange but to allow a lasting, TSST-sensitive, conformation change to occur. The existence of three-molecular complexes between DO, DR and DM is compatible with this scenario (40,50,86).

In the case of SEA, we have shown using a DR1<sup>+</sup> B cell line that SEA does not bind the totality of the class II molecules. We estimated that only about 60% of DR molecules serve as SEA receptors (87). Unfortunately, no crystal structure with HLA-DR is available to dissect the interactions between the two molecules. As for SEH and SPE-C, which also bind the  $\beta$ H81 residue, SEA most likely contacts the N-terminal region of the peptide (11,12). In various Ii-negative cell lines, binding of this bSAg is clearly inhibited by large polypeptides lodged in the groove (28). However, it binds to DR-CLIP complexes and would therefore not be sensitive to the effect of DO. The same applies to SEB which binding seems to be independent from the peptide (28,29,88,89). Interestingly, vSAg7 presentation was not affected by the presence of DO, although we and others have recently demonstrated the importance of HLA-DM and of the peptide repertoire (25,32).

Our results on bSAgs are difficult to reconcile with those of Qi *et al.* (46) showing that H2-O expression inhibits the binding and/or presentation of SEB and SEA. In these experiments, the mouse SaI tumor cell line was transfected either with CIITA (with or without H2-O) or with I-Ak, H2-DM and H2-O. These two independent systems allowed the study of H2-O function in the presence or absence of Ii. Curiously, the presentation of

SEB and SEA was very efficient in the absence of Ii but was dependent on DM expression. We can speculate that H2-O and HLA-DO have a very different impact on the peptide repertoire. Although the study of H2-O- proficient and -deficient mice suggested that the effect of this chaperone was subtle, it may be more pronounced upon overexpression. Also, the impact of H2-O was found to be dependent on the genetic background of the mice and thus will vary according to the type of APCs (90). The study of Qi *et al.* looked at the presentation of SEA by I-A<sup>k</sup>, which spontaneously releases CLIP. Others had already suggested that SEA presentation by this allele was DM-dependent but peptide-independent, suggesting a role for DM beyond its effect on the peptide repertoire (35). As opposed to DR molecules, this murine class II may be particularly sensitive to the conformation editing properties of DM and SAgS may sense the subtle changes. H2-O expression could prohibit H2-DM from altering the class II conformation. Interestingly, the I-A<sup>k</sup>/HEL complex was shown by the group of Unanue to exist in two isomeric forms called “type A” and “type B” and where the type A is not recognized by T cells specific for the type B. However, in the presence of DM, the type B conformer is converted to the type A through a conformation change involving the N-terminus of the peptide (91). By analogy, SEA may bind only to the type A conformer. Future experiments will determine if a correlation exists between H2-O expression and the type of conformers expressed on APCs.

In conclusion, HLA-DO and H2-O seem to affect differentially the capacity of class II molecules to present bSAgs. Future studies should investigate the role of the APC nature as well as the impact of the class II allele or isotype. These experiments will help understanding the function of DO as well as the mechanism by which it inhibits DM and modifies the peptide repertoire.

#### **4.7 ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Drs I.C. MacLennan, D.L. Hardie, P. Cresswell, E.O. Long, R.P. Sékaly for hybridomas, cDNAs and cell lines. JT was supported by a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé de Québec (FRSQ). W.M. was supported by grants from the Arthritis Society of Canada, the Canadian Arthritis Network and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). This work was supported by grants from the CIHR to JT.

#### 4.8 REFERENCES

1. Dellabona, P., Peccoud, J., Kappler, J., Marrack, P., Benoist, C., and Mathis, D. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 62, 1115-1121. 1990.
2. Proft, T. and Fraser, J. D. Bacterial superantigens. *Clinical & Experimental Immunology* 133(3), 299-306. 2003.
3. Kawabe, Y. and Ochi, A. Selective anergy of V $\beta$ 8<sup>+</sup>,CD4<sup>+</sup> T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *Journal of Experimental Medicine* 172, 1065-1070. 1990.
4. Marrack, P., Blackman, M., Kushnir, E., and Kappler, J. The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *Journal of Experimental Medicine* 171, 455-464. 1990.
5. Miethke, T., Wahl, C., Heeg, K., Echtenacher, B., Krammer, P. H., and Wagner, H. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine* 175, 91-98. 1992.
6. Rammensee, H.-G., Kroschewiski, R., and Frangoulis, B. Clonal anergy induced in mature V $\beta$ 6<sup>+</sup> T lymphocytes on immunizing Mls-1b mice with Mls-1a expressing cells. *Nature* 339, 541-544. 1989.
7. Rellahan, B. L., Jones, L. A., Kruisbeek, A. M., Fry, A. M., and Matis, L. A. In vivo induction of anergy in peripheral V $\beta$ 8<sup>+</sup> T cells by staphylococcal enterotoxin B. *Journal of Experimental Medicine* 172, 1091-1100. 1990.
8. White, J., Herman, A., Pullen, A. M., Kubo, R. T., Kappler, J. W., and Marrack, P. The V $\beta$ -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56(1), 27-35. 1989.
9. McCormick, J. K., Yarwood, J. M., and Schlievert, P. M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Reviews of Microbiology* 55, 77-104. 2001.
10. Baker, M. D. and Acharya, K. R. Superantigens: structure-function relationships. *Int.J.Med.Microbiol.* 293(7-8), 529-537. 2004.

11. Petersson, K., Forsberg, G., and Walse, B. Interplay between superantigens and immunoreceptors. *Scand.J.Immunol.* 59(4), 345-355. 2004.
12. Sundberg, E. J., Li, Y., and Mariuzza, R. A. So many ways of getting in the way: diversity in the molecular architecture of superantigen-dependent T-cell signaling complexes. *Current Opinion in Immunology* 14(1), 36-44. 2002.
13. Thibodeau, J., Cloutier, I., Lavoie, P. M., Labrecque, N., Mourad, W., Jardetzky, T., and Sekaly, R.-P. Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding. *Science* 266, 1874-1878. 1994.
14. Seth, A., Stern, L. J., Ottenhoff, T. H. M., Engel, I., Owen, M. J., Lamb, J. R., Klausner, R. D., and Wiley, D. C. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen *in vitro*. *Nature* 369, 324-327. 1994.
15. Kim, J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science* 266(5192), 1870-1874. 16-12-1994.
16. Hudson, K. R., Tiedemann, R. E., Urban, R. G., Lowe, S. C., Strominger, J. L., and Fraser, J. D. Staphylococcal enterotoxin A has two cooperative binding sites on major histocompatibility complex class II. *Journal of Experimental Medicine* 182, 711-720. 1995.
17. Langlois, M. A., El Fakhry, Y., and Mourad, W. Zinc-binding sites in the N terminus of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen permit the dimer formation required for high affinity binding to HLA-DR and for T cell activation. *J.Biol.Chem.* 278(25), 22309-22315. 20-6-2003.
18. Zhao, Y., Li, Z., Drozd, S. J., Guo, Y., Mourad, W., and Li, H. Crystal structure of *Mycoplasma arthritidis* mitogen complexed with HLA-DR1 reveals a novel superantigen fold and a dimerized superantigen-MHC complex. *Structure.* 12(2), 277-288. 2004.
19. Acha-Orbea, H., Finke, D., Attinger, A., Schmid, S., Wehrli, N., Vacheron, S., Xenarios, I., Scarpellino, L., Toellner, K. M., MacLennan, I. C., and Luther, S. A. Interplays between mouse mammary tumor virus and the cellular and humoral immune response. *Immunological Reviews* 168, 287-303. 1999.
20. Luther, S. A. and Acha-Orbea, H. Mouse mammary tumor virus: immunological interplays between virus and host. *Advances in Immunology* 65, 139-243. 1997.

21. Golovkina, T. V., Chervovsky, A., Dudley, J. P., and Ross, S. R. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 69, 637-645. 1992.
22. Held, W., Waanders, G. A., Shakhov, A. N., Scarpellino, L., Acha-Orbea, H., and MacDonald, H. R. Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumour virus infection and allows virus transmission. *Cell* 74, 529-540. 1993.
23. Tsubura, A., Inaba, M., Imai, S., Murakami, A., Oyaizu, N., Yasumizu, R., Ohmishi, Y., Tanaka, H., Morii, S., and Ikehara, S. Intervention of T-cells in transportation of mouse mammary tumor virus (milk factor) to mammary gland cells in vivo. *Cancer Research* 48, 6555-6559. 1988.
24. Schneider, R., Lees, R. K., Pedrazzini, T., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H., and MacDonald, H. R. Postnatal disappearance of self-reactive (V $\beta$ 6+) cells from the thymus of Mls<sup>a</sup> mice. Implications for T cell development and autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 169, 2149-2158. 1989.
25. Azar, G. A., Sekaly, R. P., and Thibodeau, J. A defective viral superantigen-presenting phenotype in HLA-DR transfectants is corrected by CIITA. *Journal of Immunology* 174(12), 7548-7557. 15-6-2005.
26. Grigg, M. E., McMahon, C. W., Morkowski, S., Rudensky, A. Y., and Pullen, A. M. Mtv-1 superantigen trafficks independently of major histocompatibility complex class II directly to the B-cell surface by the exocytic pathway. *J. Virol.* 72(4), 2577-2588. 1998.
27. Kotzin, B. L., Leung, D. Y. M., Kappler, J., and Marrack, P. Superantigens and their potential role in human disease. *Advances in Immunology* 54, 99-166. 1993.
28. Lavoie, P. M., Thibodeau, J., Cloutier, I., Busch, R., and Sekaly, R. P. 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. 1997.
29. Wen, R., Cole, G. A., Surman, S., Blackman, M. A., and Woodland, D. L. Major histocompatibility complex class II-associated peptides control the presentation of bacterial superantigens to T cells. *Journal of Experimental Medicine* 183, 1083-1092. 1996.



30. Kozono, H., Parker, D., White, J., Marrack, P., and Kappler, J. Multiple binding sites for bacterial superantigens on soluble class II MHC molecules. *Immunity* 3(2), 187-196. 1995.
31. Hogan, R. J., VanBeek, J., Broussard, D. R., Surman, S. L., and Woodland, D. L. Identification of MHC class II-associated peptides that promote the presentation of toxic shock syndrome toxin-1 to T cells. *Journal of Immunology* 166(11), 6514-6522. 1-6-2001.
32. Golovkina, T. V., Agafonova, Y., Kazansky, D., and Chervonsky, A. Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens. *Journal of Immunology* 166(4), 2244-2250. 15-2-2001.
33. Langlois, M. A., Etongue-Mayer, P., Ouellette, M., and Mourad, W. Binding of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen to human MHC class II molecules via its N terminus is modulated by invariant chain expression and its C terminus is required for T cell activation. *European Journal of Immunology* 30(6), 1748-1756. 2000.
34. Tourne, S., Miyazaki, T., Oxenius, A., Klein, L., Fehr, T., Kyewski, B., Benoist, C., and Mathis, D. Selection of a broad repertoire of CD4<sup>+</sup> T cells in H-2Ma<sup>0/0</sup> mice. *Immunity*. 7(2), 187-195. 1997.
35. Albert, L. J., Denzin, L. K., Ghumman, B., Bangia, N., Cresswell, P., and Watts, T. H. Quantitative defect in staphylococcal enterotoxin A binding and presentation by HLA-DM-deficient T2.Ak cells corrected by transfection of HLA-DM genes. *Cell Immunol.* 183(1), 42-51. 10-1-1998.
36. Denzin, L. K., Fallas, J. L., Prendes, M., and Yi, W. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunological Reviews* 207, 279-292. 2005.
37. Hornell, T. M., Burster, T., Jahnsen, F. L., Pashine, A., Ochoa, M. T., Harding, J. J., Macaubas, C., Lee, A. W., Modlin, R. L., and Mellins, E. D. Human dendritic cell expression of HLA-DO is subset specific and regulated by maturation. *Journal of Immunology* 176(6), 3536-3547. 15-3-2006.
38. Tonnelle, C., DeMars, R., and Long, E. O. DO $\beta$ : a new  $\beta$  chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO Journal* 4, 2839-2847. 1985.
39. Denzin, L. K., Sant'Angelo, D. B., Hammond, C., Surman, M. J., and Cresswell, P. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278, 106-109. 1997.
40. Kropshofer, H., Vogt, A. B., Thery, C., Armandola, E. A., Li, B. C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., and Hammerling, G. J. A role for HLA-DO as a co-chaperone of

- HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO Journal* 17, 2971-2981. 1998.
41. Van Ham, S. M., Tjin, E. P. M., Lillemeier, B. F., Gruneberg, U., Van Meijgaarden, K. E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T. H., Pappin, D. J., Trowsdale, J., and Neefjes, J. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7(12), 950-957. 1997.
  42. Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C. D., Wong, P., Ngo, K., Teyton, L., Peterson, P. A., Brunmark, A., Rudensky, A. Y., Fung-Leung, W. P., and Karlsson, L. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8, 233-243. 1998.
  43. Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W. P., Jackson, M., Peterson, P. A., and Karlsson, L. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO Journal* 15(18), 4817-4824. 1996.
  44. van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T., Pappin, D., and Neefjes, J. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *Journal of Experimental Medicine* 191, 1127-1136. 2000.
  45. Brocke, P., Armandola, E., Garbi, N., and Hammerling, G. J. Downmodulation of antigen presentation by H2-O in B cell lines and primary B lymphocytes. *European Journal of Immunology* 33(2), 411-421. 2003.
  46. Qi, L. and Ostrand-Rosenberg, S. H2-O inhibits presentation of bacterial superantigens, but not endogenous self antigens. *Journal of Immunology* 167(3), 1371-1378. 1-8-2001.
  47. Fu, X. T. and Karr, R. W. HLA-DR alpha chain residues located on the outer loops are involved in nonpolymorphic and polymorphic antibody-binding epitopes. *Human Immunology* 39(4), 253-260. 1994.
  48. Wraight, C. J., Van Endert, P., Moller, P., Lipp, J., Ling, N. R., MacLennan, I. C., Koch, N., and Moldenhauer, G. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J.Biol.Chem.* 265(10), 5787-5792. 5-4-1990.
  49. Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354, 392-394. 1991.

50. Hammond, C., Denzin, L. K., Pan, M., Griffith, J. M., Geuze, H. J., and Cresswell, P. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *Journal of Immunology* 161(7), 3282-3291. 1998.
51. Glazier, K. S., Hake, S. B., Tobin, H. M., Chadburn, A., Schattner, E. J., and Denzin, L. K. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *Journal of Experimental Medicine* 195(8), 1063-1069. 15-4-2002.
52. Al-Daccak, R., Mehindate, K., Hebert, J., Rink, L., Mecheri, S., and Mourad, W. Mycoplasma arthritis-derived superantigen induces proinflammatory monokine gene expression in the THP-1 human monocytic cell line. *Infection & Immunity* 62(6), 2409-2416. 1994.
53. DeMars, R., Chang, C. C., Shaw, S., Reitnauer, P. J., and Sondel, P. M. Homozygous deletions that simultaneously eliminate expression of class I and class II antigens of EBV-transformed B-lymphoblastoid cells. I. Reduced proliferative responses of autologous and allogeneic T cells to mutant cells that have decreased expression of class II antigens. *Human Immunology* 11(2), 77-97. 1984.
54. Menezes, J., Leibold, W., Klein, G., and Clements, G. Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV- genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine*. 22(4), 276-284. 1975.
55. Lamarre, D., Capon, D. J., Karp, D. R., Gregory, T., Long, E., and Sekaly, R. P. Class II MHC molecules and the HIV gp120 envelope protein interact with functionally distinct regions of the CD4 molecule. *EMBO Journal* 8, 3271-3277. 1989.
56. Herman, A., Croteau, G., Sekaly, R.-P., Kappler, J., and Marrack, P. HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells. *Journal of Experimental Medicine* 172, 709-717. 1990.
57. Callahan, J. E., Herman, A., Kappler, J. W., and Marrack, P. Stimulation of B10.BR T cells with superantigenic staphylococcal toxins. *Journal of Immunology* 144, 2473-2479. 1990.
58. Kanagawa, O. and Maki, R. Inhibition of MHC class II-restricted T cell response by Lyt-2 alloantigen. *Journal of Experimental Medicine* 170, 901-912. 1989.

59. Woodland, D. L., Pat Happ, M., Gollob, K. J., and Palmer, E. An endogenous retrovirus mediating deletion of  $\alpha\beta$  T cells? *Nature* 349, 529-530. 1991.
60. Khalil, H., Deshaies, F., Bellemare-Pelletier, A., Brunet, A., Faubert, A., Azar, G. A., and Thibodeau, J. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO $\beta$  in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60(5), 372-382. 2002.
61. Brunet, A., Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. J., and Thibodeau, J. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$ . *J.Biol.Chem.* 275(47), 37062-37071. 24-11-2000.
62. Khalil, H., Brunet, A., Saba, I., Terra, R., Sekaly, R. P., and Thibodeau, J. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *International Immunology* 15(10), 1249-1263. 2003.
63. Thibodeau, J., Labrecque, N., Denis, F., Huber, B. T., and Sekaly, R.-P. 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. 1994.
64. Ceman, S., Petersen, J. W., Pinet, V., and DeMars, R. Gene required for normal MHC class II expression and function is localized to approximately 45 kb of DNA in the class II region of the MHC. *Journal of Immunology* 152, 2865-2873. 1994.
65. Hake, S. B., Tobin, H. M., Steimle, V., and Denzin, L. K. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *European Journal of Immunology* 33(9), 2361-2371. 2003.
66. LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J. M., Krawczyk, M., Otten, L. A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *European Journal of Immunology* 34(6), 1513-1525. 2004.
67. Nagarajan, U. M., Lochamy, J., Chen, X., Beresford, G. W., Nilsen, R., Jensen, P. E., and Boss, J. M. Class II Transactivator Is Required for Maximal Expression of HLA-DOB in B Cells. *Journal of Immunology* 168(4), 1780-1786. 15-2-2002.
68. Pullen, A. M., Choi, Y., Kushnir, E., Kappler, J., and Marrack, P. The open reading frames in the 3' Long terminal repeats of several mouse mammary tumor virus integrants encode V $\beta$ 3-specific superantigens. *Journal of Experimental Medicine* 175, 41-47. 1992.

69. Chen, X., Reed-Loisel, L. M., Karlsson, L., and Jensen, P. E. H2-O expression in primary dendritic cells. *Journal of Immunology* 176(6), 3548-3556. 15-3-2006.
70. Karlsson, L., Surh, C. D., Sprent, J., and Peterson, P. A. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351, 485-488. 1991.
71. Lin, Y. S., Huang, Y. T., Chen, P. S., Lin, C. F., Jan, M. S., and Lei, H. Y. Requirement of I-E molecule for thymocyte apoptosis induced by staphylococcal enterotoxin B in vivo. *Cell Immunol.* 193(1), 71-79. 10-4-1999.
72. Robinson, J. H., Pyle, G., and Kehoe, M. A. Influence of major histocompatibility complex haplotype on the mitogenic response of T cells to staphylococcal enterotoxin B. *Infection & Immunity* 59(10), 3667-3672. 1991.
73. Golovkina, T., Agafonova, Y., Kazansky, D., and Chervonsky, A. Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens. *Journal of Immunology* 166(4), 2244-2250. 15-2-2001.
74. Subramanyam, M., Mclellan, B., Labrecque, N., Sekaly, R.-P., and Huber, B. T. Presentation of the Mls-1 superantigen by human HLA class II molecules to murine T cells. *Journal of Immunology* 151, 2538-2545. 1993.
75. Leder, L., Llera, A., Lavoie, P. M., Lebedeva, M. I., Li, H., Sékaly, R.-P., Bohach, G. A., Gahr, P. J., Schlievert, P. M., Karjalainen, K., and Mariuzza, R. A. A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxin B and C<sub>3</sub> to the T-cell receptor  $\beta$  chain and major histocompatibility complex class II. *Journal of Experimental Medicine* 187(6), 823-833. 1998.
76. Proft, T. and Fraser, J. Superantigens: Just like peptides only different. *Journal of Experimental Medicine* 187(6), 819-821. 1998.
77. Deckhut, A. M., Chien, Y.-H., Blackman, M. A., and Woodland, D. L. Evidence for a functional interaction between the  $\beta$  chain of major histocompatibility complex class II and the T cell receptor  $\alpha$  chain during recognition of a bacterial superantigen. *Journal of Experimental Medicine* 180(5), 1931-1935. 1994.
78. Labrecque, N., Thibodeau, J., Mourad, W., and Sekaly, R.-P. T cell receptor-major histocompatibility complex class II interaction is required for the T cell response to bacterial superantigens. *Journal of Experimental Medicine* 180, 1921-1929. 1994.
79. Woodland, D. L., Wen, R., and Blackman, M. A. Why do superantigens care about peptides? *Immunology Today* 18(1), 18-22. 1997.

80. Li, Y., Li, H., Dimasi, N., McCormick, J. K., Martin, R., Schuck, P., Schlievert, P. M., and Mariuzza, R. A. Crystal structure of a superantigen bound to the high-affinity, zinc-dependent site on MHC class II. *Immunity* 14(1), 93-104. 2001.
81. Petersson, K., Hakansson, M., Nilsson, H., Forsberg, G., Svensson, L. A., Liljas, A., and Walse, B. Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence. *EMBO Journal* 20(13), 3306-3312. 2-7-2001.
82. Von Bonin, A., Ehrlich, S., Malcherek, G., and Fleischer, B. Major histocompatibility complex class II-associated peptides determine the binding of the superantigen toxic shock syndrome toxin-1. *European Journal of Immunology* 25, 2894-2898. 1995.
83. Wen, R., Broussard, D. R., Surman, S., Hogg, T. L., Blackman, M. A., and Woodland, D. L. 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. 1997.
84. Ullrich, H. J., Doring, K., Grueneberg, U., Jaehnig, F., Trowsdale, J., and Van Ham, M. S. Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24), 13163-13168. 1997.
85. Verreck, F. A., Fargeas, C. A., and Hammerling, G. J. Conformational alterations during biosynthesis of HLA-DR3 molecules controlled by invariant chain and HLA-DM. *European Journal of Immunology* 31(4), 1029-1036. 2001.
86. Deshaies, F., Brunet, A., Diallo, D. A., Denzin, L. K., Samaan, A., and Thibodeau, J. A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102(18), 6443-6448. 3-5-2005.
87. Lavoie, P. M., McGrath, H., Shoukry, N. H., Cazenave, P. A., Sekaly, R. P., and Thibodeau, J. Quantitative relationship between MHC class II-superantigen complexes and the balance of T cell activation versus death. *Journal of Immunology* 166(12), 7229-7237. 15-6-2001.
88. Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Chi, Y.-I., Stauffacher, C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Three-dimensional structure of human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368, 711-718. 1994.

89. Kozono, H., Parker, D., White, J., Marrack, P., and Kappler, J. Multiple binding sites for bacterial superantigens on soluble class II major histocompatibility complex molecules. *Immunity* 3(2), 187-196. 1995.
90. Perraudeau, M., Taylor, P. R., Stauss, H. J., Lindstedt, R., Bygrave, A. E., Pappin, D. J., Ellmerich, S., Whitten, A., Rahman, D., Canas, B., Walport, M. J., Botto, M., and Altmann, D. M. Altered major histocompatibility complex class II peptide loading in H2- O-deficient mice. *European Journal of Immunology* 30(10), 2871-2880. 2000.
91. Lovitch, S. B., Pu, Z., and Unanue, E. R. Amino-Terminal Flanking Residues Determine the Conformation of a Peptide-Class II MHC Complex. *Journal of Immunology* 176(5), 2958-2968. 1-3-2006.

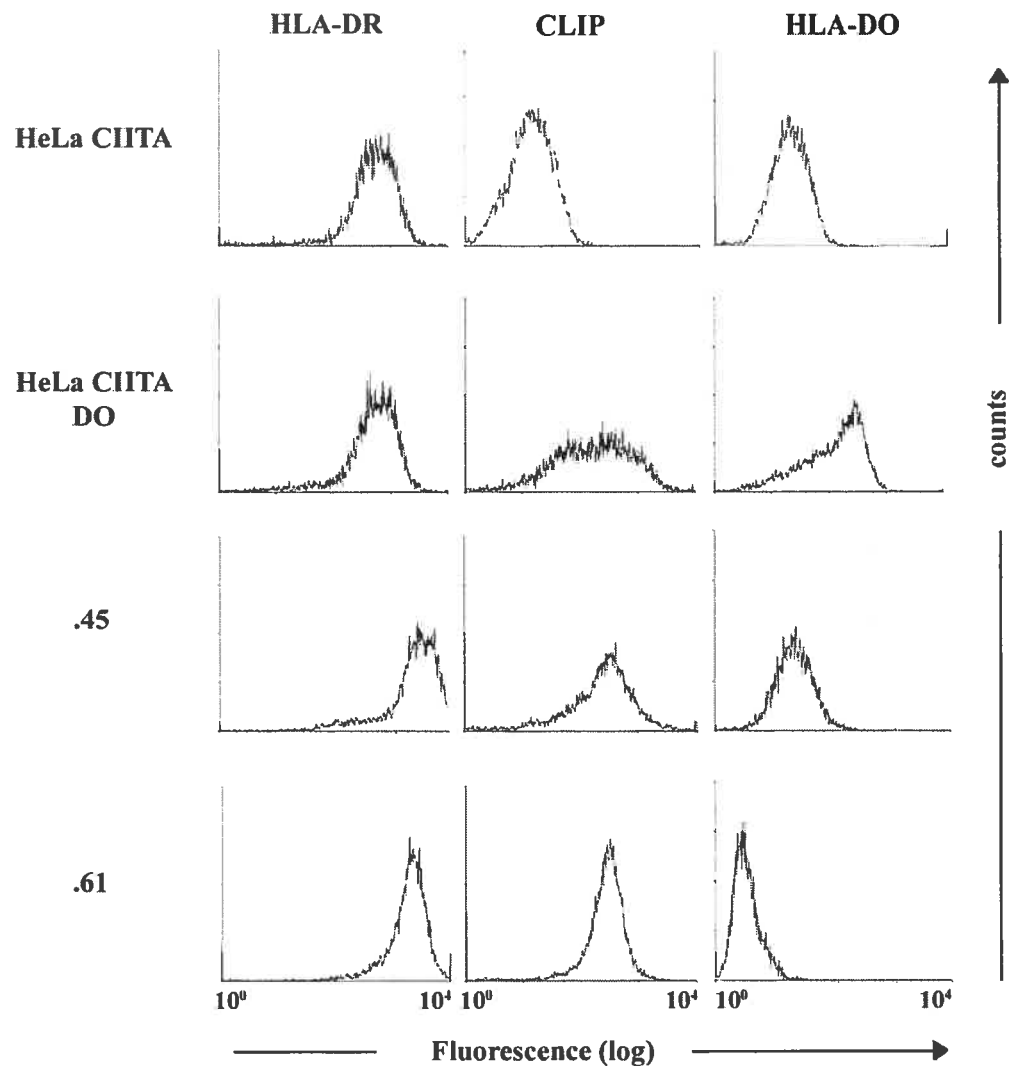
## 4.8 FIGURES

---

### **Figure 1. DO induced surface CLIP upregulation.**

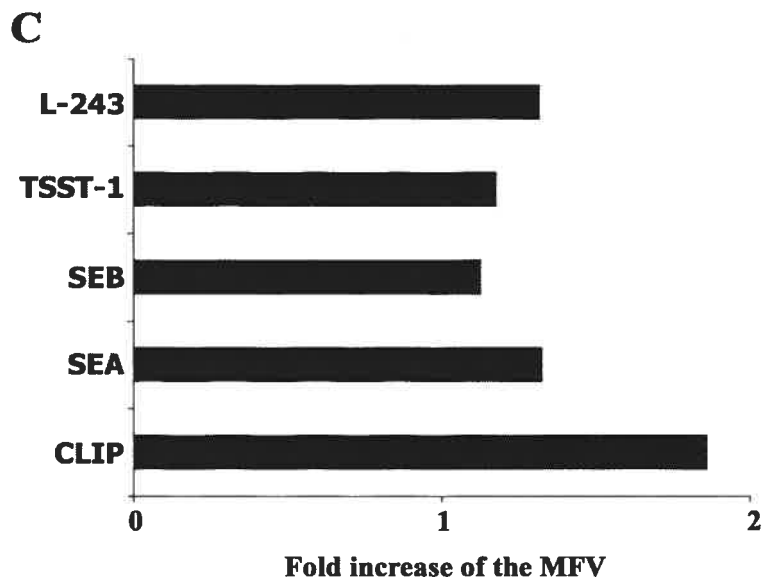
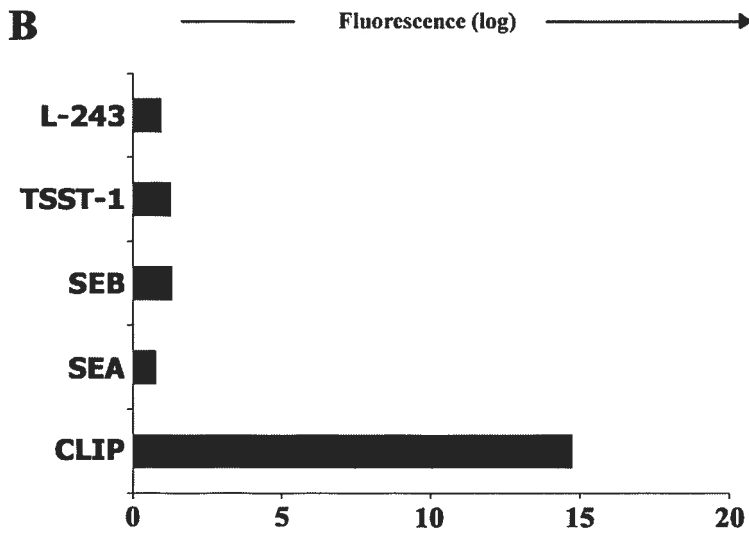
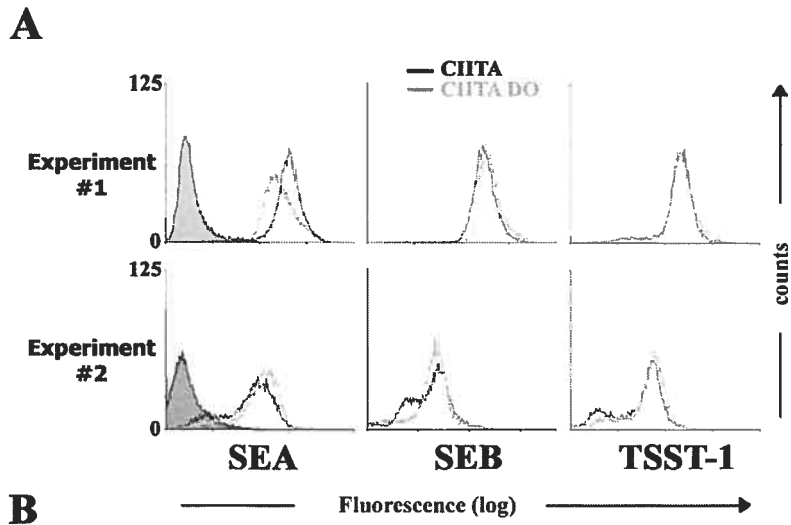
Flow cytometry analysis of HLA-DR and CLIP cell surface and HLA-DO intracellular expression on HeLa CIITA, HeLa CIITA DO, .45 and .61 cells as measured by staining with respectively L-243, CerCLIP and Mags DO5 mAbs.





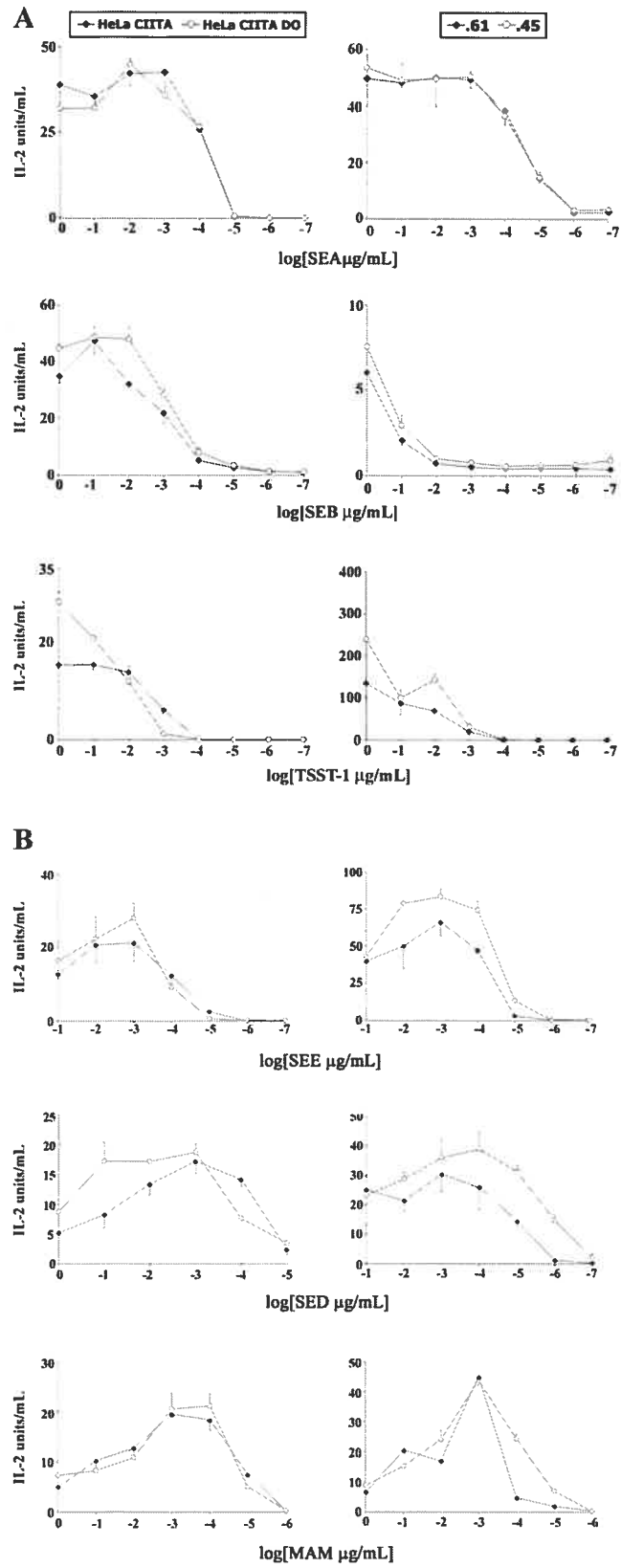
**Figure 2. DO effect on cell surface SAg binding**

*A.* Flow cytometry analysis of two independent biotinylated bSAg binding experiments. Histograms showing the levels of bSAg binding onto HeLa CIITA+ DO+ (grey line) and HeLa CIITA+ (black line) cells are overlaid. Binding tests were carried out using 2  $\mu\text{g}$  of biotinylated bSAg for  $1.10^6$  APCs. Panels *B.* and *C.* show the effect of DO expression (measured as folds of binding increase) on the binding of biotinylated bSAGs (SEA, SEB and TSST-1) and binding of CerCLIP and L-243 mAbs on HeLa CIITA+ DO+ cells and .61 B cells respectively. Folds of binding increase were calculated by dividing the mean fluorescence values (MFV) of DO<sup>+</sup>/DO<sup>-</sup> cells.



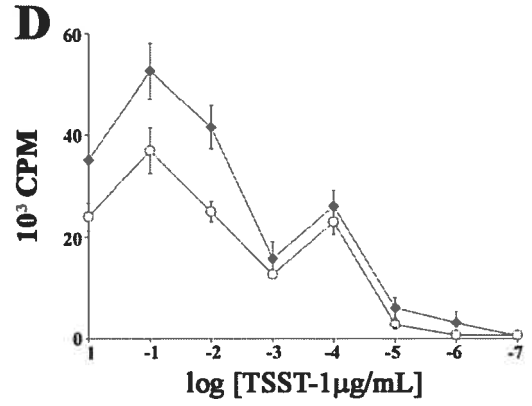
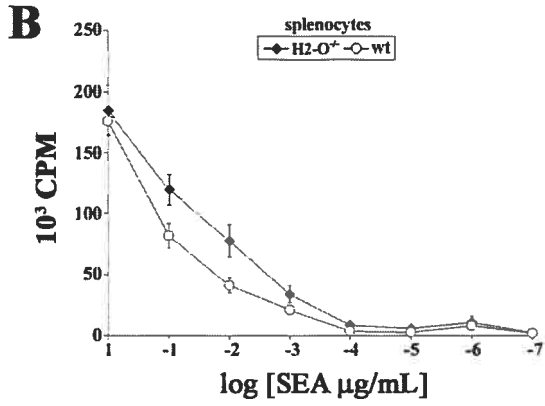
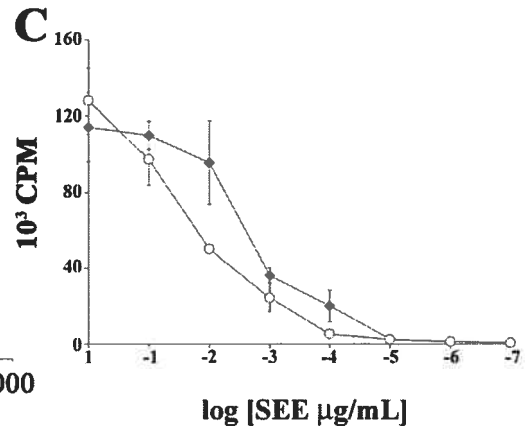
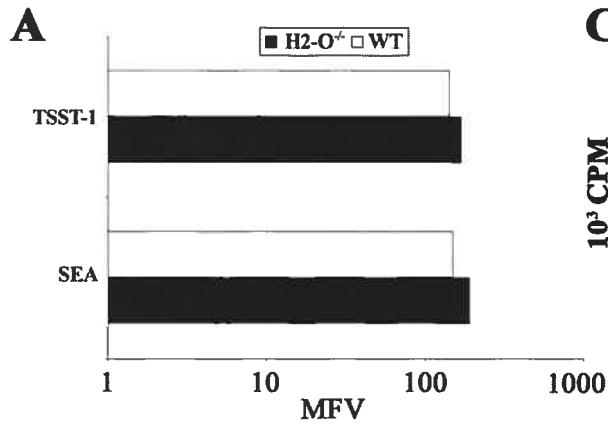
**Figure 3. DOexpression doesn't significantly affect bSAg presentation to a panel of T-cell hybridomas.**

Presentation of SEA, SEB and TSST-1 bSAGs to KSEA 1.8/4.9.3, 3DT and KOX 15-8.3 murine T-cell hybridomas (*A.*) and SEE, SED and MAM bSAGs to 11.40, I1B3 and K25-49.16 T-cell hybridomas (*B.*) by the indicated  $DO^+$  (○) or  $DO^-$  (●) APCs. IL-2 production was measured in the supernatant after 16-20 h co-culture of the APCs the bSAGs with the responder hybridoma. The error bars indicate the standard deviation obtained for all IL-2 assays performed in triplicate.



**Figure 4. Soluble SAg binding and presentation by splenocytes is independent of DO expression**

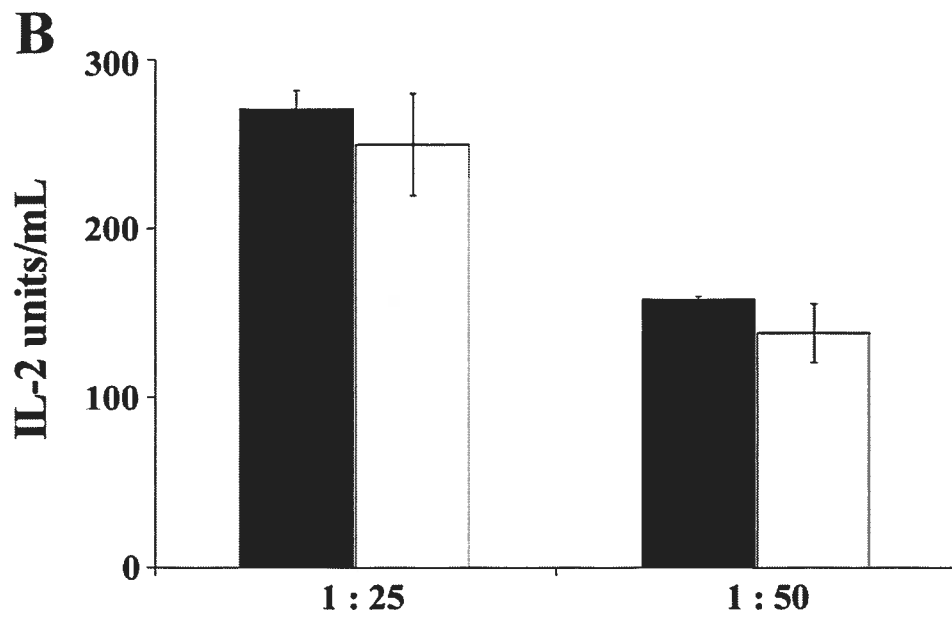
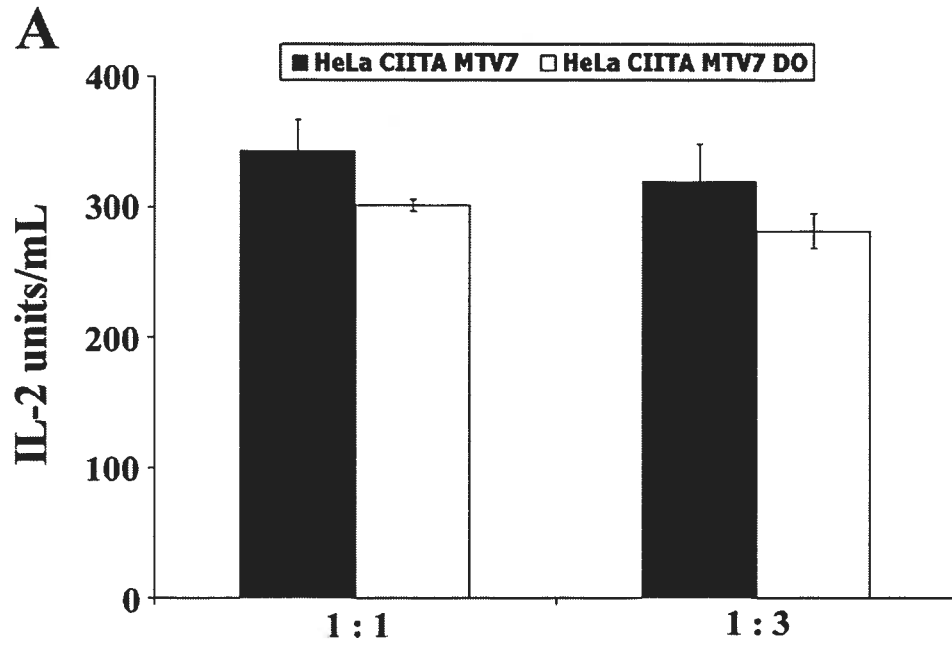
*A.* Comparison of binding levels of biotinylated TSST-1 and SEA bSAGs onto splenocytes from H2-O<sup>-/-</sup> (Black filled columns) and wild type C57Bl/6 mice (white columns). bSAG binding levels are presented as mean fluorescence values of the positively stained populations. *B.*, *C.* and *D.* bSAG presentation was measured by splenocytes proliferation as counts per minute (CPM) of incorporated <sup>3</sup>H-Thymidine, after 5 days incubation with varying concentrations of bSAGs: SEA, SEE and TSST-1 in panels *B.*, *C.* and *D.* respectively. We compare splenocytes obtained from H2-O<sup>-/-</sup> on C57Bl6 background (**Error! Objects cannot be created from editing field codes.**) to wt C57Bl6 splenocytes (○).



**Figure 5. Endogenous vSAGs presentation is independent from DO expression**

*A.* Endogenous presentation of vSAG7 by HLA-DR+, vSAG7 stably transfected HeLa CIITA and HeLa CIITA DO cells to responder T-cell hybridoma KR3+ (mV $\beta$ 8) for different APC : Responder ratios for a fixed  $60 \cdot 10^3$  Responders/well. IL-2 production was measured in the supernatant after 16-20h co-culture of the vSAG7+ APCs with the responder hybridoma. *B.* Assessment of vSAG7 expression by transfer presentation over class II<sup>+</sup> vSAG<sup>-</sup> Bjab human B-cell line. KR3+ is the responder T-cell hybridoma. Bjab cells were co-cultured for 16-20h with the different vSAG expressing cell lines in addition to KR3+. IL-2 production was measured by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation by the IL-2 dependent CTLL-2 cell line, as an indicator of T-cell responsiveness. The error bars indicate the standard deviation obtained for all IL-2 assays performed in triplicate.





**Table 1. Relative effect of DO expression on CLIP upregulation**

This table represents a summary of the mean fluorescence values of the cell surface stainings using L243 mAb (anti-HLA-DR) and CerCLIP mAb (anti-HLA-DR/CLIP complexes) of the stated APCs. The CLIP/DR ratios allow us to calculate the CLIP increase factors independently of the HLA-DR levels of expression.

	<i>HLA-DR</i> <i>(L-243)</i>	<i>CLIP</i>	<i>Ratio</i> <i>CLIP:DR</i>
HeLa CIITA	940	22	0.02
HeLa CIITA DO	870	324	0.37
.61	1718	278	0.17
.45	2263	517	0.23

## **CHAPITRE 5 – CONCLUSION**

Durant les années 90 et à cause de leurs caractéristiques fascinantes, les SAg avaient capturé l'imagination des chercheurs qui les considéraient comme outils à potentiel thérapeutique, pouvant aider à éliminer les cancers aussi bien que les maladies autoimmunes. Sur le chemin de l'application thérapeutique, comme déjà abordé dans la revue de littérature, les SAg ont servi comme modèles pour étudier plusieurs mécanismes impliqués dans la réponse immune. Citons entre autres les interactions CMH-peptide – TcR (339,340) et la détermination des résidus clés de la région CDR3 du TcR pour la reconnaissance du peptide (341), les délétions thymique et extrathymique, l'anergie, la tolérance, la prolifération et l'apoptose des L.T (342-344), la signalisation via le TcR (345), le seuil minimal pour l'activation des L.T (259,346-348), aussi la nature de la présentation peptidique par les CMH II (148,349-351). Il reste encore beaucoup à apprendre sur les SAg mais avec l'information qui nous est disponible à cause de la résolution des structures tridimensionnelles de quelques complexes CMH II – SAg et TcR $\beta$  – SAg, les SAg gagnent en importance comme outils d'exploration du système immunitaire.

### **5.1 Superantigènes endogènes et autoimmunité**

L'implication des SAg dans l'établissement des maladies autoimmunes reste encore à prouver. Mais, vu la nature des maladies autoimmunes et les caractéristiques mitogènes des SAg, il est possible de prévoir un rôle des SAg dans ces maladies. Dès 1994, Conrad *et al.* ont rapporté la possibilité de l'implication d'un SAg dans l'établissement du diabète de type I (337). Dans ce rapport, on observait une expansion polyclonale V $\beta$ 7-spécifique dans les pancréas d'individus atteints du diabète auto-immun. De plus, l'exposition à des préparations de membranes de cellules pancréatiques des individus malades, induisait un enrichissement V $\beta$ 7<sup>+</sup> des lymphocytes périphériques provenant d'individus sains. Ces signes semblaient suffisants pour suggérer la présence d'un SAg (337). Quelques années plus tard, un deuxième rapport suivit, annonçant la découverte d'un cadre de lecture ouvert dans le gène de l'enveloppe d'un HERV apparenté à MMTV (336). Le produit de 153 a.a. (IDDMK<sub>1,22</sub>) de ce cadre de lecture fut présumé SAg et responsable de l'activation des

L.T autoréactifs causant la destruction des îlots  $\beta$  du pancréas. Ce produit lorsque exprimé par la lignée B humaine Raji sous contrôle d'un promoteur constitutif, induisait *in vitro*, une expansion spécifique des L.T humains  $V\beta 7^+$  (336). Le HERV-K18 encodant IDDMK<sub>1,22</sub> SAg dans son gène *env*, n'est pas mobile, et est uniquement transmis selon les lois mendelliennes. Vu que chez les jumeaux identiques, les mêmes facteurs de susceptibilité génétique sont retrouvés, et que le même HERV codant pour le même IDDMK<sub>1,22</sub> s'y retrouve aussi, il fallait trouver le facteur environnemental déclencheur de l'expression différentielle du SAg. L'IFN- $\alpha$  relâché lors d'infections virales fut, par la suite, identifié comme élément déclencheur de l'expression du IDDMK<sub>1,22</sub> SAg (334). De plus, Sutkowski *et al.* publient simultanément leurs observations sur la trans-activation du gène *env* de HERV-K18 par la protéine LMP2-A (*late membrane protein 2-A*) de EBV (220,352).

Jusque là, l'hypothèse de l'expression différentielle d'un SAg causant l'établissement du diabète autoimmunitaire répond bien à l'étiologie différentielle de la maladie chez les jumeaux identiques, mais elle reste controversée dans la littérature. En effet, l'association entre HERV-K18 (IDDMK<sub>1,22</sub>), son expression ou celle de certains de ses gènes (en particulier le SAg) et le diabète autoimmunitaire fut disputée et réfutée par plusieurs études (353-358). Il reste que la possibilité que l'expression d'un SAg endogène puisse induire une maladie autoimmunitaire devait être explorée.

En se basant sur les connaissances acquises de l'étude de l'interaction du vSAg de MMTV avec le système immunitaire de souris *in vivo*, on sait que l'expression du SAg (suite à l'infection des souris) induit un fort enrichissement des L.T durant les premiers jours d'infection atteignant un maximum au jour 9 post-infection (197). Cet enrichissement est suivi d'une diminution graduelle du nombre des L.T répondants dans tous les tissus lymphoïdes, jusqu'à déletion presque complète des TcR portant les  $V\beta$  impliqués, au bout de 2-4 mois (197). La déletion des L.T réactifs est indépendante du thymus puisqu'elle a lieu avec la même cinétique et aussi bien chez les souris adultes nouvellement infectées que

chez les souriceaux nouveau-nés (309). Pour que cette série d'événements ait lieu, il faut que les L.T soient en contact avec le SAg pour au moins la période des 4 mois. Dans des conditions pareilles, les souris ne développent pas d'autoimmunité détectable. D'autre part, lorsque le SAg est le produit du virus endogène et est exprimé dans le thymus, la délétion devient thymique. Très vite, on ne retrouve presque plus de L.T exprimant les V $\beta$  spécifiques au vSAg. Donc une expression du vSAg continue dans le temps mène à la délétion des L.T répondants. Si parmi ces derniers se glissent quelques L.T autoréactifs, ils seront éliminés par délétion. Ceci explique pourquoi dans le seul autre modèle de vSAg rétroviral on ne décrit pas d'autoimmunité.

Par contre, les travaux du début des années 90 avaient montré qu'un contact ponctuel avec un SAg (SEB, TSST-1 ou MAM) causait une rechute chez les animaux en rémission de conditions autoimmunes (EAE, BCWIA et arthrite rhumatoïde respectivement) (223,272-274). Dans ces études les SAg ne sont pas suffisants pour induire la maladie, mais, ils causent son exacerbation et la détérioration de la condition des animaux atteints. Ce raisonnement nous mène à constater qu'uniquement un contact ponctuel avec un SAg pourrait être impliqué dans l'autoimmunité. Tout contact prolongé résultera en une délétion des L.T répondants.

En revenant au diabète autoimmun, il faudrait donc que l'expression de IDDMK<sub>1,2</sub>22 SAg soit limitée dans le temps pour que l'hypothèse du groupe de Conrad tienne. Selon leur modèle, il suffirait d'une production d'IFN- $\alpha$  (334) ou de LMP2-A (352) pour induire l'expression du SAg. Sans débattre si LMP2-A et l'IFN- $\alpha$  remplissent les conditions d'induction ponctuelle dans le temps de l'expression du vSAg afin d'éviter la délétion des L.T activés et de permettre à l'autoimmunité de s'établir, il faudrait que la nature même du SAg soit confirmée. C'est pour cette raison que nous avons essayé de mieux caractériser les propriétés superantigéniques du produit du gène *env* de HERV-K18. Malgré de forts niveaux d'expression et l'utilisation de 16 hybridomes T couvrant un large éventail de V $\beta$  murins, nos travaux nous ont mené à la conclusion que le produit

IDDMK<sub>1,222</sub> SAg est incapable d'activer les L.T, même ceux à TcRV $\beta$  étroitement apparentés au V $\beta$ 7 humain (Chapitre 2) (219). Il demeure possible que les TcR des hybridomes T de souris ne puissent répondre à ce SAg en particulier. Par contre, Lapatchek *et al.* avaient essayé d'activer avec le même SAg des L.T primaires humains et murins, sans succès (359).

## 5.2 Cancer du sein et MMTV

L'incidence du cancer du sein varie géographiquement avec une haute prévalence en Amérique du Nord et en Europe du Nord, une prévalence intermédiaire en Amérique Latine et en Europe du Sud. Une faible incidence du cancer du sein est observée en Asie et en Afrique (360). Une étude publiée en 2000 fait un parallèle entre l'incidence géographique du cancer du sein et la distribution géographique de l'espèce murine possédant le plus de copies de MMTV (*Mus domesticus*) (361). Dans le contexte du récent rapport décrivant une infection efficace de cellules humaines et félines *in vitro* par MMTV (315), l'idée d'avoir une zoonose responsable du cancer du sein devient possible. Les recherches moléculaires pour un équivalent de MMTV chez l'homme n'ont pas arrêté, mais elles demeurent controversées malgré la publication de plusieurs études rapportant l'isolation de séquences similaires à 95% à celle de MMTV (360,362). Dans le cas échéant, MMTV est équipé d'un SAg essentiel à une infection réussie et productive. Ce vSAg est capable d'être présenté par des molécules de classe II humaines et d'activer des L.T humains (298,299) et serait donc capable d'assurer la propagation du virus par l'intermédiaire du système immunitaire humain et d'atteindre les glandes mammaires. Dans l'éventualité de l'existence d'un SAg endogène humain, le vSAg de MMTV devient un modèle d'étude intéressant, en plus de devenir une cible potentielle de thérapies contre le cancer du sein si le lien avec cette affliction et MMTV se fortifie.

En effet, quelques études attribuent des propriétés superantigéniques à des séquences rétrovirales encodées par des ERV humains apparentés aux HERV-K et à



MMTV (363) ou encore au gène *env* de HERV-W (364) associant leur expression au cancer du sein et à la sclérose en plaque, respectivement. En revanche, ces rapports attendent toujours confirmation, quoique, un lien de plus en plus clair se dresse entre les HERV-K et MMTV. En effet, les HERV-K sont étroitement apparentés à MMTV (331), au moins en ce qui concerne leurs protéines *env* mutuelles. Ils forment la famille de ERV la plus active biologiquement chez l'humain et permettent l'expression de plusieurs protéines virales, allant même à produire des particules rétrovirales dans plusieurs tissus (333). D'ailleurs, le rajout d'oestradiol et de progestérone induit l'expression d'ARNm des HERV-K dans les cellules provenant de cancers du sein chez l'humain (329) rappelant les éléments de réponse hormonaux contrôlant l'expression des gènes de MMTV (365). Ces parallèles entre la famille des HERV-K et MMTV, ainsi que la large distribution des SAg à travers les espèces, renforce l'idée de l'existence de vSAg endogènes humains.

### **5.3 Comment MMTV évite de causer l'autoimmunité et le choc toxique?**

L'infection de souriceaux par MMTV dépend de la survie de ces derniers jusqu'à maturité, reproduction et transmission à la descendance. Utiliser un SAg comme étape essentielle à la réussite de l'infection semble dangereux en connaissant les potentiels pathogéniques des SAg (chocs toxiques et autoimmunité). Donc MMTV semble avoir trouvé l'équilibre entre l'activation du système immunitaire pour subvenir à ses besoins de propagation tout en évitant le déclenchement de conditions pathologiques pouvant mettre la survie de son hôte en danger.

Comme mentionné un peu plus haut, l'exposition au SAg de façon continue dans le temps est une partie de la solution. Mais selon les travaux de Lavoie *et al.* (347), un nombre critique de complexes CMH II – SAg à la surface de la CPA détermine le résultat de l'activation des L.T. Dans ce rapport, il a été déterminé que la concentration optimale de SAg à la surface d'une CPA ne dépassant pas les  $2 \times 10^4$  complexes. Ce chiffre est très proche de celui essentiel pour l'induction d'une activation efficace des L.T par des

complexes CMH – peptide estimé à  $10^4$  molécules (366). À plus haute concentration, et de manière proportionnelle à la croissance du nombre de complexes CMH II – SAg disponibles, il s'est avéré que les réponses T induites deviennent progressivement déficientes avec une diminution de la quantité d'IL-2 produite et diminution de la prolifération des L.T activés. Suite aux 3 à 4 premières divisions cellulaires, les L.T activés dans ces conditions rentrent en apoptose. Ceci semble correspondre à ce qui est observé avec le vSAg de MMTV durant les premiers jour d'infection. MMTV a donc tout intérêt de faire présenter son SAg par un nombre supérieur de complexes à la surface des CPA, et éviter d'induire une activation optimale causant un choc toxique, ou encore la prolifération et la survie à long terme des quelques L.T autoréactifs parmi les L.T activés. En poursuivant cette logique, MMTV voudrait éviter aussi de faire présenter son SAg par des cellules exprimant de faibles niveaux de CMH II (cellules épithéliales comme HeLa) à leur surface de peur que l'activation ne mène pas à la délétion des L.T activés et établisse une autoimmunité. Donc MMTV par sélection naturelle, aurait trouvé un moyen de rendre le vSAg sensible à des différences subtiles retrouvées entre les molécules de classe II à la surface d'une CPA professionnelle (L.B et CD) et les CMH II induits à la surface d'autres cellules, pour éviter de se faire présenter par un nombre de molécules insuffisant pour induire l'apoptose des L.T activés. Ainsi, une fois les caractéristiques et les conditions de présentation bien élucidées, le vSAg de MMTV pourrait être le modèle à suivre dans l'utilisation des SAg à des fins thérapeutiques pour traiter l'autoimmunité.

#### **5.4 Conditions pour une présentation efficace d'un SAg endogène**

La déficience d'une cellule épithéliale humaine dans la présentation du vSAg de MMTV malgré un bon niveau d'expression de CMH II à sa surface et d'ARNm du vSAg, nous fournit un excellent modèle de départ (Chapitre 3 figures 1 et 2). A première vue, il semblait que le problème pourrait venir de la nature épithéliale des cellules HeLa que nous utilisons pour la présentation. D'ailleurs, MMTV est reconnu pour infecter de préférence

les L.B et les CD immatures. De plus, *in vivo*, les L.B sont les cellules qui présentent le vSAg aux L.T. Cette étape étant essentielle à l'accomplissement du cycle viral (197).

Une simple transfection de CMH II n'est pas suffisante pour transformer une cellule épithéliale ou fibroblastique en l'équivalent d'une CPA (L.B ou CD). En effet, nous avons seulement réussi à surmonter cette déficience de présentation du vSAg en co-transfectant, dans les mêmes cellules HeLa, la chaîne invariante et DM (Chapitre 3, figure 5). De même, un traitement à l'IFN- $\gamma$  ou encore une transfection de CIITA suffisaient à rétablir une présentation efficace (Chapitre 3, figures 3 et 4). De cette manière nous avons rapproché nos HeLa au statut de CPA en reconstruisant un minimum de machinerie de CMH II. Décrire de façon moléculaire ce qui rendait nos HeLa plus aptes à présenter le vSAg fut compliqué par le fait que nous avons une exception sérieuse à notre modèle selon lequel, seules les CPA ayant une machinerie de classe II sont capables de présentation efficace du vSAg. En effet, nous avons en notre possession une cellule fibroblastique murine (DAP) chez laquelle l'expression unique des mêmes molécules HLA-DR1, en absence de Ii et de DM, est suffisante pour permettre une présentation efficace du vSAg (Chapitre 3, figure 1) et (298). Ayant les mêmes molécules, à la même quantité, à la surface cellulaire (Chapitre 3, figure 2), qu'elle est donc la différence entre les DR1 de DAP et celles de HeLa? Nos travaux dans ce sens ont identifié une différence dans le cheminement que les molécules de classe II prennent, dans la cellule, afin d'acquérir leur cargaison peptidique et se retrouver en surface. Comme mentionné un peu plus haut, nous avons réussi à compenser pour cette différence en co-exprimant la chaîne Ii et DM.

#### 5.4.1 Effets de Ii

Dans notre modèle de présentation directe du vSAg de MMTV par les cellules HeLa DR1<sup>+</sup>, la chaîne invariante joue un rôle essentiel. En effet en absence de Ii, il était impossible d'obtenir une activation des hybridomes T de souris (Chapitre 3, (148)). Ce constat est vrai aussi dans le cas de plusieurs autres SAg comme SEA, TSST-1 (349).

Même *in vivo*, Ii joue un rôle appréciable puisqu'on perçoit une diminution des niveaux de délétion thymique des thymocytes aux V $\beta$  spécifiques au(x) vSAg exprimé(s), chez les souris Ii<sup>-/-</sup> (43). Dans les HeLa, Ii influence la présentation du vSAg par au moins deux mécanismes associés directement à ses fonctions (voir chapitre 1.2.5). En premier lieu Ii protège la niche peptidique des CMH II nouvellement synthétisés, de l'association de polypeptides du R.E. qui peuvent nuire à l'association des SAg à la surface cellulaire (148,349). Ensuite, grâce au signal de ciblage de sa queue cytoplasmique, Ii conduit les CMH II *de novo* vers les endosomes pour permettre à DM d'exercer ses fonctions. Dans le cas des cellules DAP, la présence ou l'absence de la chaîne invariante n'affecte aucunement la présentation du vSAg. Et ce, probablement à cause du fait que les cellules murines arrivent à accumuler les molécules de classe II dans les endosomes sans l'intervention de Ii (367), permettant donc aux protéases et peptidases de digérer les polypeptides chargés dans leurs niches peptidiques en des peptides plus courts, ce qui n'est pas le cas des cellules HeLa (367).

#### 5.4.2 Effets de DM

En absence de la chaîne invariante, DM est insuffisante pour rétablir la présentation du vSAg par les cellules HeLa. Ces dernières ont besoin d'exprimer simultanément DM et Ii afin de réussir la présentation du vSAg endogène (148). A première vue, il semblait que DM soit essentiel pour débarrasser les niches des CMH II du CLIP non-permissif. Mais le fait que les molécules de classe II liant CLIP à la surface des DAP DR1 Ii $\Delta$ 20 soient permissives (Thibodeau J. résultats non publiés) pour la présentation du vSAg, suggérait un rôle alternatif à DM. Nous avons démontré par la suite, qu'un motif di-leucine dans la queue cytoplasmique de DR $\beta$  pouvait compenser pour DM et permettre la présentation du vSAg par les complexes DR1<sub>LL</sub> – CLIP. Malheureusement, la différence entre le CLIP trouvé dans les niches des molécules DR1<sub>LL</sub> et DR1 à la surface des HeLa n'a pas été investiguée. Nous avons utilisé différents AcM dirigés contre HLA-DR pour essayer de distinguer conformationnellement DR1 – CLIP de DR1<sub>LL</sub> – CLIP mais sans succès.

Par contre, l'accumulation des complexes DR1<sub>LL</sub> – CLIP dans les endosomes tardifs (147), mime l'accumulation des molécules DR1 dans des endosomes observée chez les cellules DAP. Il est donc possible que la réussite de la présentation du vSAg par ces molécules soit due à une digestion progressive de CLIP par les exoprotéases et les aminopeptidases des endosomes tardifs, favorisée par une résidence prolongée des complexes DR1<sub>LL</sub> – CLIP dans ces compartiments. Ainsi la taille du peptide devient-elle un facteur déterminant pour la présentation réussie du vSAg? Dans le contexte des molécules DR – CLIP, DM peut participer à ce scénario en délogeant le CLIP non permissif et le remplaçant par des peptides parfois plus courts. La taille du peptide dans la niche des CMH II de surface interfère avec la présentation de certains SAg, notamment TSST-1 (240) et SEA (368). En effet, SEA a été trouvé sensible aux prolongations du côté N-terminal du peptide quant à TSST-1, l'équipe de Woodland a prouvé l'inhibition de la présentation du SAg par les peptides ayant une extension C-terminale.

#### 5.4.3 Est-ce une question de peptide?

En suivant notre raisonnement au point 5.3 selon lequel le vSAg veut assurer sa présentation par un nombre élevé de complexes CMH II-pep, il est difficile de concevoir une présentation du vSAg conditionnelle à une série limitée de peptides répondant à des caractéristiques précises tout en étant communs à plusieurs allotypes de classe II chez différents individus. Par contre, trouver un moyen intrinsèque à tous les peptides pour différencier les complexes formés par les CPA professionnelles et d'autres cellules CMH II<sup>+</sup> semble plus logique. D'ailleurs, nos expériences ont montré que le peptide CLIP, commun à presque tous les allotypes de DR, est permissif à la présentation du vSAg, mais seulement lorsque le complexe HLA-DR – CLIP réside dans les endosomes tardifs (i.e. conduits par le motif di-leucine de la molécule DR1<sub>LL</sub>). Normalement, la présence de ce genre de compartiments cellulaires et le passage des molécules de classe II à travers ces derniers, leur mérite le nom de MIIC, et les MIIC sont spécifiques aux CPA. Nous avons supposé que le point déterminant pour le vSAg soit donc la taille du peptide comme

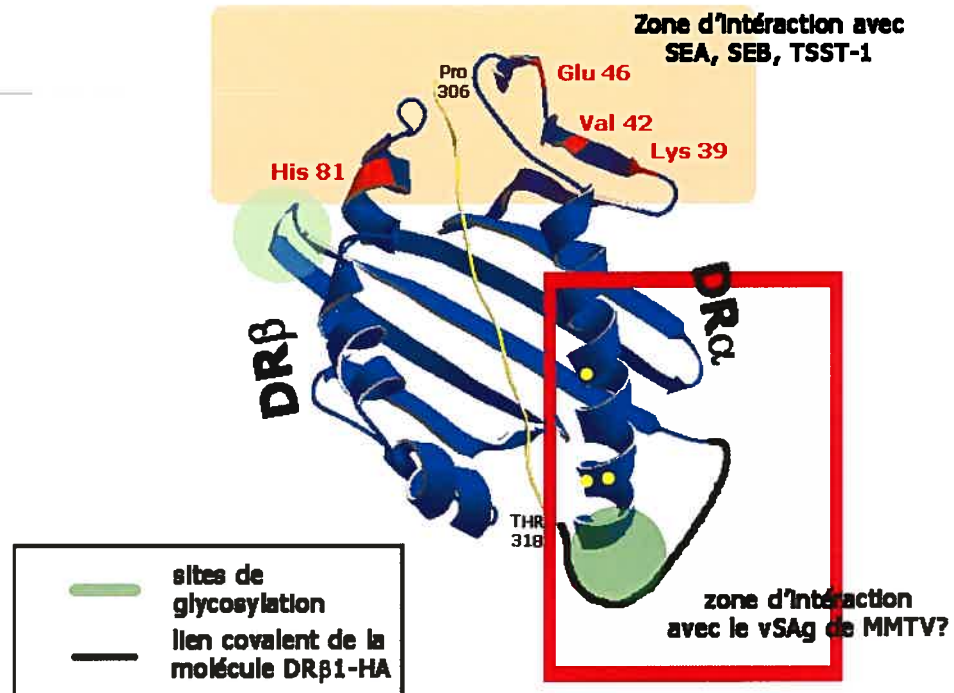
expliqué au point 5.4.1 et discuté au point 3.6. Ce genre de sensibilité à la taille du peptide semble être partagé par d'autres SAg (À part SEA (368) et TSST-1(240), l'interaction de SEB avec les CMH II est inhibée par les prolongement N et C terminaux de CLIP (369)). De plus, les peptides liés covalamment à la chaîne  $\beta$  des CMH II ne sont pas permissifs à la présentation du vSAg (148,370) probablement à cause du lien covalent qui se prolonge de l'extrémité COOH du peptide vers la chaîne  $\beta$  des CMH II (voir figure 5.1). Ceci dit, rien n'empêche qu'il y ait des peptides courts non permissifs à l'interaction du vSAg avec certaines molécules de classe II.

#### **5.4 Le phénomène de transfert du vSAg de MMTV**

A travers toute l'étude présentée au chapitre 3 de cette thèse, nous avons utilisé la présentation du vSAg en transfert pour évaluer les niveaux d'expression des différentes CPA, surtout celles qui étaient incapables de présentation directe (voir chapitre 1.4.2.2). Rares sont les cellules qui, à notre connaissance, sont capables d'accepter le transfert du vSAg soluble et de le présenter avec succès aux L.T. Ce constat est assez étonnant puisque notre modèle de présentation directe du vSAg favorise une rencontre avec les CMH II en surface (Chapitre 3), ce qui, a fortiori, semble être le cas de la présentation du vSAg soluble en transfert. Or à l'exception des CH12 (lignée B murine), toutes nos cellules capables de présentation directe du vSAg sont incapables d'accepter le transfert. On peut ainsi affirmer l'existence de deux formes distinctes de présentation des vSAg. Une cellule capable de recevoir le transfert, si elle exprime le vSAg, pourrait au moins se l'auto-transférer et donc mimer une présentation directe, mais pas le contraire. Parmi toutes les CPA en notre disposition, seules les BJAB étaient capables de présenter le vSAg en transfert. La comparaison entre nos différentes lignées cellulaires nous a permis d'écarter la quantité de classe II à la surface, la présence ou absence de DO, ou encore, la présence ou absence du virus EBV dans nos cellules comme facteur dans le phénomène du transfert. De même, la nature de la CPA utilisée ne semblait pas être suffisante pour assurer le transfert, vu que les Raji, Ramos, LG2 et SA (toutes des lignées B) étaient toutes incapables de présenter le

vSAg soluble. Nous avons effectué quelques expériences pour essayer de déterminer les exigences pour une présentation efficace du vSAg en transfert, mais sans succès. Nous avons en revanche, appris que des Raji en co-incubation avec les BJAB n'influencent pas le transfert ni en augmentant son efficacité ni en l'inhibant, indiquant que la réussite de ce dernier dépend d'un facteur interne ou d'une qualité que seules les BJAB possèdent. Ce raisonnement nous a mené à investiguer le rôle de la sialylation des protéines de la surface des CPA puisque nous avons trouvé un rapport décrivant les BJAB comme étant des cellules à faible contenu en acide neuraminique et en sialyl transférase comparé, entre autres, aux Raji (371). Cette piste nous semblait particulièrement intéressante puisqu'elle permet d'expliquer la possibilité de présenter le vSAg produit de façon endogène et non celui acquit à l'extérieur. En effet, on suppose que sur les Raji, les glycoprotéines sialylées de surface, surtout les CMH II, dressent une barrière face au vSAg soluble mais pas au vSAg endogène. Cette restriction ne se présente pas à la surface des BJAB puisque ces dernières sont dépourvues de protéines sialylée. Nous avons donc essayé de traiter les HeLa CIITA et les Raji avec de la neuraminidase avant de les mettre en co-culture avec des cellules productrices de vSAg et d'hybridomes T, afin de tester le transfert. Malheureusement nos résultats préliminaires n'ont montré aucun effet du traitement sur l'efficacité du transfert. Par contre, ces résultats restent préliminaires et cette piste mérite d'être investiguée plus profondément, surtout que les L.B activés (LPS ou même les L.B des centres germinatifs (CG)) perdent la sialylation de leurs glycoprotéines (incluant celle des classe II) de surface et acquièrent ainsi la capacité d'activer les L.T naïfs (372-374). De plus, un rapport assez intéressant démontre qu'un traitement à la neuraminidase est suffisant pour rétablir la capacité des L.B au repos, d'interagir avec l'agglutinine d'arachide (PNA) (373). Il est à noter que nous avons essayé aussi le transfert sur des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains traités à la GM-CSF et l'IL-4 sans succès malgré de bons niveaux d'expression de classe II à la surface. L'induction de l'expression de DO dans ces cellules ne changea rien au résultat du transfert (Azar et Thibodeau, résultats non publiés).

### 5.5 Modèle d'interaction des vSAg de MMTV avec les CMH II.



**Figure 5.1** Schématisation de la zone d'interaction potentielle du vSAg avec HLA-DR. Est représentée une vue du haut de la niche peptidique de HLA-DR1 occupée par le peptide HA<sub>306-318</sub> (306PKYVKQNTLKLAT<sub>318</sub>) en jaune. Cette schématisation est basée sur le cristal publié par Stern *et al.* (91). En rouge sont marqués les résidus impliqués dans l'interaction des bSAg (SEA, SEB et TSST-1) (300). Les cercles verts représentent les motifs de glycosylation (N-X-T/S) dans la région représentée (chaîne α: N<sub>78</sub>-Y<sub>79</sub>-T<sub>80</sub>; et chaîne β: N<sub>19</sub>-G<sub>20</sub>-T<sub>21</sub>). La ligne noire représente le lien covalent reliant le peptide à la chaîne β. Le cadre rouge représente la zone potentielle d'interaction avec le vSAg basée sur les éléments interférant avec sa présentation, les mutations α<sub>66</sub>, α<sub>72</sub> et α<sub>73</sub> (points jaunes), le lien covalent et la sialylation potentielle sur le site de glycosylation de la chaîne α (voir texte).

La question du mode de liaison du vSAg aux molécules de classe II demeure sans réponse. Evidemment la réponse ultime à ce problème est la résolution du cristal CMH II – vSAg. A court de cristal, on peut deviner une zone d'interaction approximative à partir de quelques évidences récoltées à travers nos travaux. En effet, à l'aide de mutants CMH II,



Thibodeau *et al.* avaient réussi à empêcher la présentation des bSAg (SEA, SEB et TSST-1) par HLA-DR1, sans toutefois affecter celle des vSAg de MMTV (vSAg7 et vSAg9) (300). D'autre part, on a observé une interférence dans la présentation du vSAg par des molécules HLA-DR1 portant des mutations dans la portion C terminale de l'hélice de la chaîne  $\alpha$  (DR $\alpha$ 66 et DR $\alpha$ 72,73) (Shoukry, Thibodeau et Sékaly résultats non publiés). De notre côté, les cellules HeLa exprimant des molécules HLA-DR1 exclusivement occupées par le peptide HA<sub>306-318</sub> (lien covalent entre le peptide et DR $\beta$ ) étaient incapables de présenter le vSAg endogène. Nous étions surpris par ce résultat puisque HA<sub>306-318</sub> est un des peptides stables dans la niche de DR1. De même, l'équipe de Golovkina *et al.* a échoué la présentation du vSAg avec des molécules CMH II covalamment liées à leur cargaison peptidique (370). Nous avons conclu que le lien covalent pouvait interférer avec la présentation efficace du vSAg puisque ce peptide est constaté permissif pour la présentation directe du vSAg à la surface des DAP (Shoukry *et al.* non publié). Finalement, s'il s'avère vrai que les vSAg solubles de MMTV soient sensibles à la sialylation des CMH II et que les bSAg (SEA, SEB et TSST-1) lui soient résistants (il n'y a ni différence de présentation ni de liaison des bSAg entre BJAB et Raji (Azar et Thibodeau résultats non publiés)). Et que la sialylation des CMH II humains se fasse sur la chaîne  $\alpha$  tout comme chez les CMH II de souris (375,376), il y aurait de fortes chances que le vSAg de MMTV interagisse avec l'extrémité C terminale de l'hélice  $\alpha$ 1. Ces résultats pris ensemble suggèrent fortement un impact assez important de la région C terminale de l'hélice  $\alpha$ 1 des CMH II sur l'interaction avec les vSAg de MMTV, qu'ils soient solubles ou endogènes voir figure 5.1 (N.B : cette figure ne représente pas le mode de liaison des SAg aux CMH II mais représente plutôt des zones d'interactions. Il est fort possible que le vSAg de MMTV interagisse ailleurs aussi.)

## Bibliographie

1. Charron, D. 2005. Immunogenetics today: HLA, MHC and much more. *Curr.Opin.Immunol.* 17:493-497.
2. Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R. C., Bruford, E. A., Khodiyar, V. K., Lush, M. J., Povey, S., Talbot, C. C., Jr., Wright, M. W., Wain, H. M., Trowsdale, J., Ziegler, A., and Beck, S. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nat.Rev.Genet.* 5:889-899.
3. Trowsdale, J. 1995. "Both man & bird & beast": Comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* 41:1-17.
4. Bouvier, M. 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol.Immunol.* 39:697-706.
5. Tector, M., Zhang, Q., and Salter, R. D. 1997. Beta 2-microglobulin and calnexin can independently promote folding and disulfide bond formation in class I histocompatibility proteins. *Mol.Immunol.* 34:401-408.
6. Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5:103-114.
7. Trombetta, E. S. and Mellman, I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 23:975-1028.
8. Shastri, N., Cardinaud, S., Schwab, S. R., Serwold, T., and Kunisawa, J. 2005. All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol.Rev.* 207:31-41.
9. Paulsson, K. and Wang, P. 2003. Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochim.Biophys.Acta* 1641:1-12.
10. York, I. A. and Rock, K. L. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu.Rev.Immunol.* 14:369-396.
11. Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
12. Madden, D. R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:587-622.

13. Engelhard, V. H. 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12:181-207.
14. LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J. M., Krawczyk, M., Otten, L. A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. 2004. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur.J.Immunol.* 34:1513-1525.
15. Ting, J. P. and Trowsdale, J. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-S33.
16. Muhlethaler-Mottet, A., Otten, L. A., Steimle, V., and Mach, B. 1997. 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.
17. Landmann, S., Muhlethaler-Mottet, A., Bernasconi, L., Suter, T., Waldburger, J. M., Masternak, K., Arrighi, J. F., Hauser, C., Fontana, A., and Reith, W. 2001. Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J.Exp.Med.* 194:379-391.
18. Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., and Trinchieri, G. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat.Immunol.* 2:1144-1150.
19. Khalil, H., Deshaies, F., Bellemare-Pelletier, A., Brunet, A., Faubert, A., Azar, G. A., and Thibodeau, J. 2002. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO $\beta$  in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-382.
20. Waldburger, J. M., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. 2001. 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.
21. Pai, R. K., Askew, D., Boom, W. H., and Harding, C. V. 2002. Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J.Immunol.* 169:1326-1333.
22. Kara, C. J. and Glimcher, L. H. 1993. Promoter accessibility within the environment of the MHC is affected in class II-deficient combined immunodeficiency. *EMBO J.* 12:187-193.
23. Silacci, P., Mottet, A., Steimle, V., Reith, W., and Mach, B. 1994. Developmental extinction of major histocompatibility complex class II gene expression in

- plasmacytes is mediated by silencing of the transactivator gene CIITA. *J.Exp.Med.* 180:1329-1336.
24. Piskurich, J. F., Lin, K. I., Lin, Y., Wang, Y., Ting, J. P., and Calame, K. 2000. BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat.Immunol.* 1:526-532.
  25. Yu, J., Angelin-Duclos, C., Greenwood, J., Liao, J., and Calame, K. 2000. Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol.Cell Biol.* 20:2592-2603.
  26. Gyory, I., Wu, J., Fejer, G., Seto, E., and Wright, K. L. 2004. PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat.Immunol.* 5:299-308.
  27. Felsenfeld, G. and Groudine, M. 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421:448-453.
  28. Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiyama, S., and Yoshimura, A. 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921-924.
  29. Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N., and Yoshimura, A. 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* 18:1309-1320.
  30. Morris, A. C., Beresford, G. W., Mooney, M. R., and Boss, J. M. 2002. Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol.Cell Biol.* 22:4781-4791.
  31. Van den Elsen, P. J., van der, Stoep N., Vietor, H. E., Wilson, L., van Zutphen, M., and Gobin, S. J. 2000. Lack of CIITA expression is central to the absence of antigen presentation functions of trophoblast cells and is caused by methylation of the IFN-gamma inducible promoter (PIV) of CIITA. *Hum.Immunol.* 61:850-862.
  32. Geirsson, A., Lynch, R. J., Paliwal, I., Bothwell, A. L., and Hammond, G. L. 2003. Human trophoblast noncoding RNA suppresses CIITA promoter III activity in murine B-lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 301:718-724.
  33. Geirsson, A., Paliwal, I., Lynch, R. J., Bothwell, A. L., and Hammond, G. L. 2003. Class II transactivator promoter activity is suppressed through regulation by a trophoblast noncoding RNA. *Transplantation* 76:387-394.

34. Murphy, S. P., Choi, J. C., and Holtz, R. 2004. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression in trophoblast cells. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 2:52-
35. Holtz, R., Choi, J. C., Petroff, M. G., Piskurich, J. F., and Murphy, S. P. 2003. Class II transactivator (CIITA) promoter methylation does not correlate with silencing of CIITA transcription in trophoblasts. *Biol.Reprod.* 69:915-924.
36. 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.* 5:3485-3488.
37. O'Sullivan, D. M., Noonan, D., and Quaranta, V. 1987. 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.
38. Arunachalam, B., Lamb, C. A., and Cresswell, P. 1994. Transport properties of free and MHC class II associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int.Immunol.* 6:439-451.
39. Anderson, M. S. and Miller, J. 1992. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:2282-2286.
40. 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.* 177:1699-1712.
41. Bonnerot, C., Marks, M. S., Cosson, P., Robertson, E. J., Bikoff, E. K., Germain, R. N., and Bonifacino, J. S. 1994. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* 13:934-944.
42. Elliott, E. A., Drake, J. R., Amigorena, S., Elsemore, J., Webster, P., Mellman, I., and Flavell, R. A. 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J.Exp.Med.* 179:681-694.
43. 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* 72:635-648.
44. Bikoff, E. K., Germain, R. N., and Robertson, E. J. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* 2:301-310.

45. Busch, R., Cloutier, I., Sekaly, R.-P., and Hammerling, G. J. 1996. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15:418-428.
46. Castellino, F., Han, R., and Germain, R. N. 2001. The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur.J Immunol* 31:841-850.
47. Neumann, J., Schach, N., and Koch, N. 2001. 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.
48. Bakke, O. and Dobberstein, B. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
49. Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V., and Peterson, P. A. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600-605.
50. Wolf, P. R. and Ploegh, H. L. 1995. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 11:267-306.
51. 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):2021-2032.
52. Roche, P. A., Teletski, C. L., Stang, E., Bakke, O., and Long, E. O. 1993. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:8581-8585.
53. 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.* 111:839-855.
54. Michelsen, K., Yuan, H., and Schwappach, B. 2005. Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep.* 6:717-722.
55. 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.* 15:1249-1263.
56. Khalil, H., Brunet, A., and Thibodeau, J. 2005. A three-amino-acid-long HLA-DR{beta} cytoplasmic tail is sufficient to overcome ER retention of invariant-chain p35. *J.Cell Sci.* 118:4679-4687.

57. Bakke, O. and Nordeng, T. W. 1999. Intracellular traffic to compartments for MHC class II peptide loading: signals for endosomal and polarized sorting. *Immunol.Rev.* 172:171-187.
58. Nordeng, T. W., Gregers, T. F., Kongsvik, T. L., Meresse, S., Gorvel, J. P., Jourdan, F., Motta, A., and Bakke, O. 2002. The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology. *Mol.Biol.Cell* 13:1846-1856.
59. Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354:392-394.
60. Hiltbold, E. M. and Roche, P. A. 2002. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr.Opin.Immunol.* 14:30-35.
61. Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* 14:37-49.
62. Wang, K., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1997. Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J.Biol.Chem.* 272:17055-17060.
63. McCormick, P. J., Martina, J. A., and Bonifacino, J. S. 2005. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:7910-7915.
64. Dugast, M., Toussaint, H., Dousset, C., and Benaroch, P. 2005. 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.
65. Geuze, H. J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol.Today* 19:282-287.
66. Kleijmeer, M. J., Morkowski, S., Griffith, J. M., Rudensky, A. Y., and Geuze, H. J. 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J.Cell Biol.* 139:639-649.
67. Peters, P. J., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Ploegh, H. L., and Geuze, H. J. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349:669-676.
68. Manoury, B., Mazzeo, D., Li, D. N., Billson, J., Loak, K., Benaroch, P., and Watts, C. 2003. Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone. *Immunity* 18:489-498.

69. Watts, C. 2004. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat.Immunol.* 5:685-692.
70. Bohley, P. and Seglen, P. O. 1992. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48:151-157.
71. Villadangos, J. A. 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol.Immunol.* 38:329-346.
72. Nakagawa, T. Y., Brissette, W. H., Lira, P. D., Griffiths, R. J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J. D., Eastman, S. E., Howard, E. D., Clarke, S. R., Rosloniec, E. F., Elliott, E. A., and Rudensky, A. Y. 1999. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 10:207-217.
73. Driessen, C., Bryant, R. A., Lennon-Dumenil, A. M., Villadangos, J. A., Bryant, P. W., Shi, G. P., Chapman, H. A., and Ploegh, H. L. 1999. Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J.Cell Biol.* 147:775-790.
74. Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J. A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A. Y. 1998. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280:450-453.
75. Shi, G. P., Bryant, R. A., Riese, R., Verhelst, S., Driessen, C., Li, Z., Bromme, D., Ploegh, H. L., and Chapman, H. A. 2000. Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J.Exp.Med.* 191:1177-1186.
76. Pisoni, R. L., Acker, T. L., Lisowski, K. M., Lemons, R. M., and Thoene, J. G. 1990. A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J.Cell Biol.* 110:327-335.
77. Collins, D. S., Unanue, E. R., and Harding, C. V. 1991. Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing. *J.Immunol.* 147:4054-4059.
78. Arunachalam, B., Phan, U. T., Geuze, H. J., and Cresswell, P. 2000. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:745-750.
79. Watts, C., Antoniou, A., Manoury, B., Hewitt, E. W., McKay, L. M., Grayson, L., Fairweather, N. F., Emsley, P., Isaacs, N., and Simitsek, P. D. 1998. Modulation by epitope-specific antibodies of class II MHC-restricted presentation of the tetanus toxin antigen. *Immunol.Rev.* 164:11-16.



80. Amigorena, S., Lankar, D., Briken, V., Gapin, L., Viguiier, M., and Bonnerot, C. 1998. Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. *J.Exp.Med.* 187:505-515.
81. Bonnerot, C., Briken, V., Brachet, V., Lankar, D., Cassard, S., Jabri, B., and Amigorena, S. 1998. syk protein tyrosine kinase regulates Fc receptor gamma-chain-mediated transport to lysosomes. *EMBO J.* 17:4606-4616.
82. Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., They, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. 1999. Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J.Exp.Med.* 189:371-380.
83. Sedlik, C., Orbach, D., Veron, P., Schweighoffer, E., Colucci, F., Gamberale, R., Ioan-Facsinay, A., Verbeek, S., Ricciardi-Castagnoli, P., Bonnerot, C., Tybulewicz, V. L., Di Santo, J., and Amigorena, S. 2003. A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J.Immunol.* 170:846-852.
84. Ravetch, J. V. and Bolland, S. 2001. IgG Fc receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 19:275-290.
85. Bergtold, A., Desai, D. D., Gavhane, A., and Clynes, R. 2005. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23:503-514.
86. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
87. Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T., and Aderem, A. 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat.Immunol.* 4:1247-1253.
88. Blander, J. M. and Medzhitov, R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 304:1014-1018.
89. Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S. L., Nussenzweig, M., and Steinman, R. M. 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J.Cell Biol.* 151:673-684.

90. Lanzavecchia, A. 1990. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 8:773-793.
91. Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
92. McFarland, B. J. and Beeson, C. 2002. Binding interactions between peptides and proteins of the class II major histocompatibility complex. *Med.Res.Rev.* 22:168-203.
93. Natarajan, S. K., Stern, L. J., and Sadegh-Nasseri, S. 1999. Sodium dodecyl sulfate stability of HLA-DR1 complexes correlates with burial of hydrophobic residues in pocket 1. *J.Immunol.* 162:3463-3470.
94. Verreck, F. A. W., Vermeulen, C., Van der Poel, A., Jorritsma, P., Amons, R., Coligan, J. E., Drijfhout, J. W., and Koning, F. 1996. The generation of SDS-stable HLA DR dimers is independent of efficient peptide binding. *Int.Immunol.* 8:397-404.
95. Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Jenis, D. M., and Grey, H. M. 1986. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 47:1071-1077.
96. Buus, S., Colon, S., Smith, C., Freed, J. H., Miles, C., and Grey, H. M. 1986. Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:3968-3971.
97. Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Miles, C., and Grey, H. M. 1987. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 235:1353-1358.
98. Boniface, J. J., Lyons, D. S., Wettstein, D. A., Allbritton, N. L., and Davis, M. M. 1996. Evidence for a conformational change in a class II major histocompatibility complex molecule occurring in the same pH range where antigen binding is enhanced. *J.Exp.Med.* 183:119-126.
99. Lee, J. M., Kay, C. M., and Watts, T. H. 1992. Conformational changes in mouse MHC class II proteins at acidic pH. *Int.Immunol.* 4:889-897.
100. Runnels, H. A., Moore, J. C., and Jensen, P. E. 1996. A structural transition in class II major histocompatibility complex proteins at mildly acidic pH. *J.Exp.Med.* 183:127-136.

101. Accapezzato, D., Nisini, R., Paroli, M., Bruno, G., Bonino, F., Houghton, M., and Barnaba, V. 1998. Generation of an MHC class II-restricted T cell epitope by extracellular processing of hepatitis delta antigen. *J.Immunol.* 160:5262-5266.
102. Hulsmeyer, M., Fiorillo, M. T., Bettosini, F., Sorrentino, R., Saenger, W., Ziegler, A., and Uchanska-Ziegler, B. 2004. Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide. *J.Exp.Med.* 199:271-281.
103. Santambrogio, L., Sato, A. K., Carven, G. J., Belyanskaya, S. L., Strominger, J. L., and Stern, L. J. 1999. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:15056-15061.
104. Santambrogio, L., Sato, A. K., Fischer, F. R., Dorf, M. E., and Stern, L. J. 1999. Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:15050-15055.
105. Arndt, S. O., Vogt, A. B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wolpl, A., Sun, Y., Schadendorf, D., Hammerling, G. J., and Kropshofer, H. 2000. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J.* 19:1241-1251.
106. Pu, Z., Carrero, J. A., and Unanue, E. R. 2002. Distinct recognition by two subsets of T cells of an MHC class II-peptide complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99:8844-8849.
107. Pu, Z., Lovitch, S. B., Bikoff, E. K., and Unanue, E. R. 2004. T cells distinguish MHC-peptide complexes formed in separate vesicles and edited by H2-DM. *Immunity.* 20:467-476.
108. Lovitch, S. B. and Unanue, E. R. 2005. Conformational isomers of a peptide-class II major histocompatibility complex. *Immunol.Rev.* 207:293-313.
109. Fremont, D. H., Crawford, F., Marrack, P., Hendrickson, W. A., and Kappler, J. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385-393.
110. Mosyak, L., Zaller, D. M., and Wiley, D. C. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377-383.
111. Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S., and Trowsdale, J. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353:571-573.
112. Sanderson, F., Powis, S. H., Kelly, A. P., and Trowsdale, J. 1994. Limited polymorphism in HLA-DM does not involve the peptide binding groove. *Immunogenetics* 39:56-58.

113. Kropshofer, H., Hammerling, G. J., and Vogt, A. B. 1999. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol.Rev.* 172:267-278.
114. Sanderson, F., Kleijmeer, M. J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neeffjes, J. J., Geuze, H. J., and Trowsdale, J. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266:1566-1569.
115. Schafer, P. H., Green, J. M., Malapati, S., Gu, L., and Pierce, S. K. 1996. HLA-DM is present in one-fifth the amount of HLA-DR in the class II peptide-loading compartment where it associates with leupeptin- induced peptide (LIP)-HLA-DR complexes. *J.Immunol.* 157:5487-5495.
116. Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1995. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* 3:561-572.
117. Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J., and Bonifacino, J. S. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the  $\beta$  chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J.Cell Biol.* 131:351-369.
118. Pierre, P., Denzin, L. K., Hammond, C., Drake, J. R., Amigorena, S., Cresswell, P., and Mellman, I. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 4:229-239.
119. Pierre, P., Denzin, L. K., Hammond, C., Drake, J. R., Amigorena, S., Cresswell, P., and Mellman, I. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity.* 4:229-239.
120. Andersson, T., Patwardhan, A., Emilson, A., Carlsson, K., and Scheynius, A. 1998. HLA-DM is expressed on the cell surface and colocalizes with HLA-DR and invariant chain in human Langerhans cells. *Arch.Dermatol.Res.* 290:674-680.
121. Denzin, L. K. and Cresswell, P. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-165.
122. Sanderson, F., Thomas, C., Neeffjes, J., and Trowsdale, J. 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity* 4:87-96.
123. Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D. M. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375:802-806.
124. Sherman, M. A., Weber, D. A., and Jensen, P. E. 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3:197-205.

125. Vogt, A. B., Kropshofer, H., Moldenhauer, G., and Hammerling, G. J. 1996. Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:9724-9729.
126. Kropshofer, H., Arndt, S. O., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J., and Vogt, A. B. 1997. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6:293-302.
127. Kropshofer, H., Vogt, A. B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J. S., and Hammerling, G. J. 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* 15:6144-6154.
128. Riberdy, J. M., Newcomb, J. R., Surman, M. J., Barbosa, J. A., and Cresswell, P. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360:474-477.
129. Lightstone, L., Hargreaves, R., Bobek, G., Peterson, M., Aichinger, G., Lombardi, G., and Lechler, R. 1997. In the absence of the invariant chain, HLA-DR molecules display a distinct array of peptides which is influenced by the presence or absence of HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:5772-5777.
130. Drover, S., Kovats, S., Masewicz, S., Blum, J. S., and Nepom, G. T. 1998. Modulation of peptide-dependent allospecific epitopes on HLA-DR4 molecules by HLA-DM. *Hum.Immunol.* 59:77-86.
131. Germain, R. N. and Rinker Jr, A. G. 1993. Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature* 363:725-728.
132. Busch, R., Rinderknecht, C. H., Roh, S., Lee, A. W., Harding, J. J., Burster, T., Hornell, T. M., and Mellins, E. D. 2005. Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol.Rev.* 207:242-260.
133. Martin, W. D., Hicks, G. G., Mendiratta, S. K., Leva, H. I., Ruley, H. E., and Van Kaer, L. 1996. *H2-M* mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* 84:543-550.
134. Mellins, E., Smith, L., Arp, B., Cotner, T., Celis, E., and Pious, D. 1990. Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* 343:71-74.
135. Verreck, F. A., Fargeas, C. A., and Hammerling, G. J. 2001. Conformational alterations during biosynthesis of HLA-DR3 molecules controlled by invariant chain and HLA-DM. *Eur.J.Immunol.* 31:1029-1036.

136. Karlsson, L., Surh, C. D., Sprent, J., and Peterson, P. A. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351:485-488.
137. Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W. P., Jackson, M., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-4824.
138. Tonnelles, C., DeMars, R., and Long, E. O. 1985. DO $\beta$ : a new  $\beta$  chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-2847.
139. Taxman, D. J., Cressman, D. E., and Ting, J. P. 2000. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J.Immunol.* 165:1410-1416.
140. Hake, S. B., Tobin, H. M., Steimle, V., and Denzin, L. K. 2003. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *Eur.J.Immunol.* 33:2361-2371.
141. Denzin, L. K., Fallas, J. L., Prendes, M., and Yi, W. 2005. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol.Rev.* 207:279-292.
142. Douek, D. C. and Altmann, D. M. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int.Immunol.* 9:355-364.
143. Chalouni, C., Banchereau, J., Vogt, A. B., Pascual, V., and Davoust, J. 2003. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. *Int.Immunol.* 15:457-466.
144. Chen, X., Laur, O., Kambayashi, T., Li, S., Bray, R. A., Weber, D. A., Karlsson, L., and Jensen, P. E. 2002. Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J.Exp.Med.* 195:1053-1062.
145. Glazier, K. S., Hake, S. B., Tobin, H. M., Chadburn, A., Schattner, E. J., and Denzin, L. K. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J.Exp.Med.* 195:1063-1069.
146. Denzin, L. K., Sant'Angelo, D. B., Hammond, C., Surman, M. J., and Cresswell, P. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.
147. Brunet, A., Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. J., and Thibodeau, J. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.

148. Azar, G. A., Sekaly, R. P., and Thibodeau, J. 2005. A defective viral superantigen-presenting phenotype in HLA-DR transfectants is corrected by CIITA. *J.Immunol.* 174:7548-7557.
149. Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C. D., Wong, P., Ngo, K., Teyton, L., Peterson, P. A., Brunmark, A., Rudensky, A. Y., Fung-Leung, W. P., and Karlsson, L. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-243.
150. Van Ham, S. M., Tjin, E. P. M., Lillemeier, B. F., Gruneberg, U., Van Meijgaarden, K. E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T. H., Pappin, D. J., Trowsdale, J., and Neefjes, J. 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7:950-957.
151. Kropshofer, H., Vogt, A. B., Thery, C., Armandola, E. A., Li, B. C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., and Hammerling, G. J. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-2981.
152. van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T., Pappin, D., and Neefjes, J. 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J.Exp.Med.* 191:1127-1136.
153. van Lith, M., van Ham, M., Griekspoor, A., Tjin, E., Verwoerd, D., Calafat, J., Janssen, H., Reits, E., Pastoors, L., and Neefjes, J. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J.Immunol.* 167:884-892.
154. Garcia, K. C. and Adams, E. J. 2005. How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell* 122:333-336.
155. Nicholson, M. J., Hahn, M., and Wucherpfennig, K. W. 2005. Unusual Features of Self-Peptide/MHC Binding by Autoimmune T Cell Receptors. *Immunity* 23:351-360.
156. Jerne, N. K. 1971. The somatic generation of immune recognition. *Eur.J.Immunol.* 1:1-9.
157. Zerrahn, J., Held, W., and Raulet, D. H. 1997. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 88:627-636.
158. Wu, L. C., Tuot, D. S., Lyons, D. S., Garcia, K. C., and Davis, M. M. 2002. Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature* 418:552-556.

159. Krogsgaard, M. and Davis, M. M. 2005. How T cells 'see' antigen. *Nat.Immunol.* 6:239-245.
160. Krogsgaard, M., Prado, N., Adams, E. J., He, X. L., Chow, D. C., Wilson, D. B., Garcia, K. C., and Davis, M. M. 2003. Evidence that structural rearrangements and/or flexibility during TCR binding can contribute to T cell activation. *Mol.Cell* 12:1367-1378.
161. Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., and Sakaguchi, S. 2003. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 426:454-460.
162. Sundberg, E. J., Li, Y., and Mariuzza, R. A. 2002. So many ways of getting in the way: diversity in the molecular architecture of superantigen-dependent T-cell signaling complexes. *Curr.Opin.Immunol.* 14:36-44.
163. Fehling, H. J., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., and von Boehmer, H. 1995. Crucial role of the pre-T-cell receptor  $\alpha$  gene in development of  $\alpha\beta$  but not  $\gamma\delta$  T cells. *Nature* 375:795-798.
164. Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 21:139-176.
165. Hernandez-Munain, C., Sleckman, B. P., and Krangel, M. S. 1999. A developmental switch from TCR delta enhancer to TCR alpha enhancer function during thymocyte maturation. *Immunity* 10:723-733.
166. Borgulya, P., Kishi, H., Uematsu, Y., and Boehmer, H. V. 1992. Exclusion and inclusion of  $\alpha$  and  $\beta$  T cell receptor alleles. *Cell* 69:529-537.
167. Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J. T., and Jenkinson, E. J. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu.Rev.Immunol.* 14:73-99.
168. Kasai, M., Kropshofer, H., Vogt, A. B., Kominami, E., and Mizuochi, T. 2000. CLIP-derived self peptides bound to MHC class II molecules of medullary thymic epithelial cells differ from those of cortical thymic epithelial cells in their diversity, length, and C-terminal processing. *Eur.J.Immunol.* 30:3542-3551.
169. Kyewski, B. and Derbinski, J. 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat.Rev.Immunol.* 4:688-698.
170. Derbinski, J., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenahn, M., Peltonen, L., Walter, J., and Kyewski, B. 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J.Exp.Med.* 202:33-45.



171. Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298:1395-1401.
172. Oehen, S., Feng, L., Xia, Y., Surh, C. D., and Hedrick, S. M. 1996. Antigen compartmentation and T helper cell tolerance induction. *J.Exp.Med.* 183:2617-2626.
173. Sant'Angelo, D. B. and Janeway, C. A., Jr. 2002. Negative selection of thymocytes expressing the D10 TCR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:6931-6936.
174. Palmer, E. 2003. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat.Rev.Immunol.* 3:383-391.
175. Samelson, L. E., Patel, M. D., Weissman, A. M., Harford, J. B., and Klausner, R. D. 1986. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 46:1083-1090.
176. Timmerman, L. A., Clipstone, N. A., Ho, S. N., Northrop, J. P., and Crabtree, G. R. 1996. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression. *Nature* 383:837-840.
177. Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221-227.
178. Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89-95.
179. Huppa, J. B. and Davis, M. M. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat.Rev.Immunol.* 3:973-983.
180. Kupfer, A., Dennert, G., and Singer, S. J. 1983. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80:7224-7228.
181. Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G. M. 2002. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol.Rev.* 189:152-160.
182. Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr.Opin.Immunol.* 12:242-249.
183. Jordan, M. S., Singer, A. L., and Koretzky, G. A. 2003. Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat.Immunol.* 4:110-116.

184. Cantrell, D. A. 2003. GTPases and T cell activation. *Immunol.Rev.* 192:122-130.
185. Bayliss, M. 1940. Studies on the mechanisms of vomiting produced by staphylococcus enterotoxin. *J.Exp.Med* 72:669-684.
186. Dack, G. M., Cary, W. E., Woolpert, O., and Wiggers, H. 1930. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic staphylococcus. *J.Prev.Med.* 4:167-175.
187. Jordan, E. O. 1930. The production by the staphylococci of a substance producing food poisoning. *J.Am.Med.Assoc.* 94:1648-1650.
188. Marrack, P. and Kappler, J. 1990. The Staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248:705-711.
189. White, J., Herman, A., Pullen, A. M., Kubo, R. T., Kappler, J. W., and Marrack, P. 1989. The V $\beta$ -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56:27-35.
190. Festenstein, H. 1973. Immunogenetic and biological aspects of in vitro lymphocyte allotransformation (MLR) in the mouse. *Transplant.Rev.* 15:62-88.
191. MacDonald, H. R., Schneider, R., Lees, R. K., Howe, R. C., Acha-Orbea, H., Festenstein, H., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. 1988. T-cell receptor V $\beta$  use predicts reactivity and tolerance to Mls- encoded antigens. *Nature* 332:40-45.
192. Kappler, J. W., Staerz, U., White, J., and Marrack, P. C. 1988. Self-tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* 332:35-40.
193. Woodland, D. L., Pat Happ, M., Gollob, K. J., and Palmer, E. 1991. An endogenous retrovirus mediating deletion of  $\alpha\beta$  T cells? *Nature* 349:529-530.
194. Frankel, W. N., Rudy, C., Coffin, J. M., and Huber, B. T. 1991. Linkage of *Mls* genes to endogenous mammary tumour viruses of inbred mice. *Nature* 349:526-528.
195. Dyson, P. J., Knight, A. M., Fairchild, S., Simpson, E., and Tomonari, K. 1991. Genes encoding ligands for deletion of V $\beta$ 11 T cells cosegregate with mammary tumour virus genomes. *Nature* 349:531-532.
196. Lavoie, P. M., Thibodeau, J., Erard, F., and Sekaly, R. P. 1999. Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunol.Rev.* 168:257-269.

197. Luther, S. A. and Acha-Orbea, H. 1997. Mouse mammary tumor virus: immunological interplays between virus and host. *Adv.Immunol.* 65:139-243.
198. Janeway, C. A., Jr., Yagi, J., Conrad, P. J., Katz, M. E., Jones, B., Vroegop, S., and Buxser, S. 1989. T-cell responses to MIs and bacterial proteins that mimic its behavior. *Immunol.Rev.* 107:61-88.
199. Imanishi, K., Igarashi, H., and Uchiyama, T. 1990. Activation of murine T cells by streptococcal pyrogenic exotoxin type A. Requirement for MHC class II molecules on accessory cells and identification of V $\beta$  elements in T cell receptor of toxin-reactive T cells. *J.Immunol.* 145:3170-3176.
200. Tomai, M., Kotb, M., Majumdar, G., and Beachey, E. H. 1990. Superantigenicity of Streptococcal M protein. *J.Exp.Med.* 172:359-362.
201. Ohmen, J. D., Barnes, P. F., Grisso, C. L., Bloom, B. R., and Modlin, R. L. 1994. Evidence for a superantigen in human tuberculosis. *Immunity* 1:35-43.
202. Cole, B. C., Kartchner, D. R., and Wells, D. J. 1989. Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis* . VII. Responsiveness is associated with expression of a product(s) of the V $\beta$ 8 gene family present on the T cell receptor  $\alpha/\beta$  for antigen. *J.Immunol.* 142:4131-4137.
203. Tumang, J. R., Posnett, D. N., Cole, B. C., Crow, M. K., and Friedman, S. M. 1990. Helper T cell-dependent human B cell differentiation mediated by a mycoplasmal superantigen bridge. *J.Exp.Med.* 171:2153-2158.
204. Stuart, P. M. and Woodward, J. G. 1992. *Yersinia enterocolitica* produces superantigenic activity. *J.Immunol.* 148:225-233.
205. Lafon, M., Lafage, M., Martinez-Arends, A., Ramirez, R., Vuillier, F., Charron, D., Lotteau, V., and Scott-Algara, D. 1992. Evidence for a viral superantigen in human. *Nature* 358:507-510.
206. Lafon, M. 1993. Rabies virus superantigen. *Res.Immunol.* 144:209-213.
207. Acha-Orbea, H., Shakhov, A. N., Scarpellino, L., Kolb, E., Muller, V., Vessaz-Shaw, A., Fuchs, R., Blochlinger, K., Rollini, P., Billotte, J., Sarafidou, M., MacDonald, H. R., and Diggelmann, H. 1991. Clonal deletion of V $\beta$ 14-bearing T cells in mice transgenic for mammary tumour virus. *Nature* 350:207-211.
208. Sutkowski, N., Palkama, T., Ciurli, C., Sekaly, R. P., Thorley-Lawson, D. A., and Huber, B. T. 1996. An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J.Exp.Med.* 184:971-980.

209. Denkers, E. Y., Caspar, P., and Sher, A. 1994. *Toxoplasma gondii* possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor V $\beta$ 5-bearing CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *J.Exp.Med.* 180:985-994.
210. Delcourt, M., Peumans, W. J., Wagner, M. C., and Truffa-Bachi, P. 1996. V $\beta$ -specific deletion of mature thymocytes induced by the plant superantigen *Urtica dioica* agglutinin. *Cell.Immunol.* 168:158-164.
211. Galelli, A. and Truffa-Bachi, P. 1993. *Urtica dioica* agglutinin. A superantigenic lectin from stinging rhizome. *J.Immunol.* 151:1821-1831.
212. Galelli, A., Delcourt, M., Wagner, M.-C., Peumans, W., and Truffa-Bachi, P. 1995. Selective expansion followed by profound deletion of mature V $\beta$ 8.3<sup>+</sup> T cells in vivo after exposure to the superantigenic lectin *Urtica dioica* agglutinin. *J.Immunol.* 154:2600-2611.
213. Astoul, E., Lafage, M., and Lafon, M. 1996. Rabies superantigen as a Vbeta T-dependent adjuvant. *J.Exp.Med.* 183:1623-1631.
214. Petersson, K., Forsberg, G., and Walse, B. 2004. Interplay between superantigens and immunoreceptors. *Scand.J.Immunol.* 59:345-355.
215. Zhao, Y., Li, Z., Drozd, S., Guo, Y., Stack, R., Hauer, C., and Li, H. 2004. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen complexed with peptide/MHC class II antigen. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 60:353-356.
216. Zhao, Y., Li, Z., Drozd, S. J., Guo, Y., Mourad, W., and Li, H. 2004. Crystal structure of *Mycoplasma arthritidis* mitogen complexed with HLA-DR1 reveals a novel superantigen fold and a dimerized superantigen-MHC complex. *Structure.* 12:277-288.
217. Donadini, R., Liew, C. W., Kwan, A. H., Mackay, J. P., and Fields, B. A. 2004. Crystal and solution structures of a superantigen from *Yersinia pseudotuberculosis* reveal a jelly-roll fold. *Structure.* 12:145-156.
218. Saul, F. A., Rovira, P., Boulot, G., Damme, E. J., Peumans, W. J., Truffa-Bachi, P., and Bentley, G. A. 2000. Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II. *Structure.* 8:593-603.
219. Azar, G. A. and Thibodeau, J. 2002. 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.

220. Sutkowski, N., Conrad, B., Thorley-Lawson, D. A., and Huber, B. T. 2001. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 15:579-589.
221. Hamad, A. R. A., Marrack, P., and Kappler, J. W. 1997. Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins. *J.Exp.Med.* 185:1447-1454.
222. Schlievert, P. M., Jablonski, L. M., Roggiani, M., Sadler, I., Callantine, S., Mitchell, D. T., Ohlendorf, D. H., and Bohach, G. A. 2000. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infect.Immun.* 68:3630-3634.
223. Schwab, J. H., Brown, R. R., Anderle, S. K., and Schlievert, P. M. 1993. Superantigen can reactivate bacterial cell wall-induced arthritis. *J.Immunol.* 150:4151-4159.
224. Schwab, J. H., WATSON, D. W., and CROMARTIE, W. J. 1955. Further studies of group A streptococcal factors with lethal and cardiotoxic properties. *J.Infect.Dis.* 96:14-18.
225. Li, H., Llera, A., Malchiodi, E. L., and Mariuzza, R. A. 1999. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu.Rev.Immunol.* 17:435-466.
226. Faulkner, L., Cooper, A., Fantino, C., Altmann, D. M., and Sriskandan, S. 2005. The mechanism of superantigen-mediated toxic shock: not a simple Th1 cytokine storm. *J.Immunol.* 175:6870-6877.
227. O'Hehir, R. E. and Lamb, J. R. 1990. Induction of specific clonal anergy in human T lymphocytes by *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:8884-8888.
228. Miethke, T., Wahl, C., Heeg, K., and Wagner, H. 1993. Acquired resistance to superantigen-induced T cell shock. V $\beta$  selective T cell unresponsiveness unfolds directly from a transient state of hyperreactivity. *J.Immunol.* 150:3776-3784.
229. Ulrich, R. G. 2000. Evolving superantigens of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 27:1-7.
230. Novick, R. P., Schlievert, P., and Ruzin, A. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes.Infect.* 3:585-594.
231. Papageorgiou, A. C. and Acharya, K. R. 2000. Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol.* 8:369-375.
232. Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., and Cook, W. J. 1987. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 194:531-544.

233. Derrick, J. P. and Wigley, D. B. 1994. The third IgG-binding domain from streptococcal protein G. An analysis by X-ray crystallography of the structure alone and in a complex with Fab. *J.Mol.Biol.* 243:906-918.
234. Wikstrom, M., Drakenberg, T., Forsen, S., Sjobring, U., and Bjorck, L. 1994. Three-dimensional solution structure of an immunoglobulin light chain-binding domain of protein L. Comparison with the IgG-binding domains of protein G. *Biochemistry* 33:14011-14017.
235. Mitchell, D. T., Levitt, D. G., Schlievert, P. M., and Ohlendorf, D. H. 2000. Structural evidence for the evolution of pyrogenic toxin superantigens. *J.Mol.Evol.* 51:520-531.
236. Kozono, H., Parker, D., White, J., Marrack, P., and Kappler, J. 1995. Multiple binding sites for bacterial superantigens on soluble class II major histocompatibility complex molecules. *Immunity* 3:187-196.
237. Kim, J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1994. Toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science* 266:1870-1874.
238. Sundberg, E. J., Sawicki, M. W., Southwood, S., Andersen, P. S., Sette, A., and Mariuzza, R. A. 2002. Minor structural changes in a mutated human melanoma antigen correspond to dramatically enhanced stimulation of a CD4+ tumor-infiltrating lymphocyte line. *J.Mol.Biol.* 319:449-461.
239. Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Chi, Y.-I., Stauffacher, C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1994. Three-dimensional structure of human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368:711-718.
240. Hogan, R. J., VanBeek, J., Broussard, D. R., Surman, S. L., and Woodland, D. L. 2001. Identification of MHC class II-associated peptides that promote the presentation of toxic shock syndrome toxin-1 to T cells. *J.Immunol.* 166:6514-6522.
241. Wen, R., Broussard, D. R., Surman, S., Hogg, T. L., Blackman, M. A., and Woodland, D. L. 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. *Eur.J.Immunol.* 27:772-781.
242. Sundberg, E. J., Andersen, P. S., Schlievert, P. M., Karjalainen, K., and Mariuzza, R. A. 2003. Structural, energetic, and functional analysis of a protein-protein interface at distinct stages of affinity maturation. *Structure.* 11:1151-1161.
243. Chi, Y. I., Sadler, I., Jablonski, L. M., Callantine, S. D., Deobald, C. F., Stauffacher, C. V., and Bohach, G. A. 2002. Zinc-mediated dimerization and its effect on

activity and conformation of staphylococcal enterotoxin type C. *J.Biol.Chem.* 277:22839-22846.

244. Petersson, K., Hakansson, M., Nilsson, H., Forsberg, G., Svensson, L. A., Liljas, A., and Walse, B. 2001. Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence. *EMBO J.* 20:3306-3312.
245. Li, Y., Li, H., Dimasi, N., McCormick, J. K., Martin, R., Schuck, P., Schlievert, P. M., and Mariuzza, R. A. 2001. Crystal structure of a superantigen bound to the high-affinity, zinc-dependent site on MHC class II. *Immunity.* 14:93-104.
246. Hudson, K. R., Tiedemann, R. E., Urban, R. G., Lowe, S. C., Strominger, J. L., and Fraser, J. D. 1995. Staphylococcal enterotoxin A has two cooperative binding sites on major histocompatibility complex class II. *J.Exp.Med.* 182:711-720.
247. Mehindate, K., Thibodeau, J., Dohlsten, M., Kalland, T., Sekaly, R.-P., and Mourad, W. 1995. Cross-linking of major histocompatibility complex class II molecules by staphylococcal enterotoxin A superantigen is a requirement for inflammatory cytokine gene expression. *J.Exp.Med.* 182:1573-1577.
248. Tiedemann, R. E. and Fraser, J. D. 1996. Cross-linking of MHC class II molecules by Staphylococcal enterotoxin A is essential for antigen-presenting cell and T cell activation. *J.Immunol.* 157:3958-3966.
249. Petersson, K., Thunnissen, M., Forsberg, G., and 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.(Camb.)* 10:1619-1626.
250. Al Daccak, R., Mehindate, K., Damdoumi, F., Etongue-Mayer, P., Nilsson, H., Antonsson, P., Sundstrom, M., Dohlsten, M., Sekaly, R. P., and Mourad, W. 1998. Staphylococcal enterotoxin D is a promiscuous superantigen offering multiple modes of interactions with the MHC class II receptors. *J.Immunol.* 160:225-232.
251. Andersen, P. S., Geisler, C., Buus, S., Mariuzza, R. A., and Karjalainen, K. 2001. Role of the T cell receptor ligand affinity in T cell activation by bacterial superantigens. *J.Biol.Chem.* 276:33452-33457.
252. Malchiodi, E. L., Eisenstein, E., Fields, B. A., Ohlendorf, D. H., Schlievert, P. M., Karjalainen, K., and Mariuzza, R. A. 1995. Superantigen binding to a T cell receptor  $\beta$  chain of known three-dimensional structure. *J.Exp.Med.* 182:1833-1845.
253. Petersson, K., Pettersson, H., Skartved, N. J., Walse, B., and Forsberg, G. 2003. Staphylococcal enterotoxin H induces V alpha-specific expansion of T cells. *J.Immunol.* 170:4148-4154.

254. Andersen, P. S., Lavoie, P. M., Sekaly, R. P., Churchill, H., Kranz, D. M., Schlievert, P. M., Karjalainen, K., and Mariuzza, R. A. 1999. Role of the T cell receptor (TCR)  $\alpha$  chain in stabilizing TCR-superantigen-MHC class II complexes. *Immunity* 10:473-483.
255. Bravo, de Alba, Marche, P. N., Cazenave, P. A., Cloutier, I., Sekaly, R. P., and Thibodeau, J. 1997. V alpha domain modulates the multiple topologies of mouse T cell receptor V beta20/staphylococcal enterotoxins A and E complexes. *Eur.J.Immunol.* 27:92-99.
256. Llewelyn, M. and Cohen, J. 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect.Dis.* 2:156-162.
257. Chatila, T. and Geha, R. S. 1993. Signal transduction by microbial superantigens via MHC class II molecules. *Immunol.Rev.* 131:43-59.
258. Miethke, T., Wahl, C., Heeg, K., Echtenacher, B., Krammer, P. H., and Wagner, H. 1992. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 175:91-98.
259. Kawabe, Y. and Ochi, A. 1991. Programmed cell death and extrathymic reduction of V $\beta$ 8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 349:245-248.
260. Bohach, G. A., Fast, D. J., Nelson, R. D., and Schlievert, P. M. 1990. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit.Rev.Microbiol.* 17:251-272.
261. McCormick, J. K., Yarwood, J. M., and Schlievert, P. M. 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu.Rev.Microbiol.* 55:77-104.
262. Hajjeh, R. A., Reingold, A., Weil, A., Shutt, K., Schuchat, A., and Perkins, B. A. 1999. Toxic shock syndrome in the United States: surveillance update, 1979 1996. *Emerg.Infect.Dis.* 5:807-810.
263. Evenson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S., and Bergdoll, M. S. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int.J.Food Microbiol.* 7:311-316.
264. Kotzin, B. L., Leung, D. Y. M., Kappler, J., and Marrack, P. 1993. Superantigens and their potential role in human disease. *Adv.Immunol.* 54:99-166.
265. Sears, C. L. and Kaper, J. B. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol.Rev.* 60:167-215.



266. Kawabe, Y. and Ochi, A. 1990. Selective anergy of V $\beta$ 8+,CD4+ T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *J.Exp.Med.* 172:1065-1070.
267. Christen, U. and Von Herrath, M. G. 2005. Infections and autoimmunity--good or bad? *J.Immunol.* 174:7481-7486.
268. Dyment, D. A., Ebers, G. C., and Sadovnick, A. D. 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 3:104-110.
269. Todd, J. A., Acha-Orbea, H., Bell, J. I., Chao, N., Fronck, Z., Jacob, C. O., McDermott, M., Sinha, A. A., Timmerman, L., Steinman, L., and . 1988. A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science* 240:1003-1009.
270. Ueda, H., Howson, J. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D. B., Hunter, K. M., Smith, A. N., Di Genova, G., Herr, M. H., Dahlman, I., Payne, F., Smyth, D., Lowe, C., Twells, R. C., Howlett, S., Healy, B., Nutland, S., Rance, H. E., Everett, V., Smink, L. J., Lam, A. C., Cordell, H. J., Walker, N. M., Bordin, C., Hulme, J., Motzo, C., Cucca, F., Hess, J. F., Metzker, M. L., Rogers, J., Gregory, S., Allahabadia, A., Nithiyanthan, R., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Bingley, P., Gillespie, K. M., Undlien, D. E., Ronningen, K. S., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Savage, D. A., Maxwell, A. P., Carson, D. J., Patterson, C. C., Franklyn, J. A., Clayton, D. G., Peterson, L. B., Wicker, L. S., Todd, J. A., and Gough, S. C. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-511.
271. Christen, U. and Von Herrath, M. G. 2004. Initiation of autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.* 16:759-767.
272. Brocke, S., Gaur, A., Piercy, C., Gautam, A., Gijbels, K., Fathman, C. G., and Steinman, L. 1993. Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 365:642-644.
273. Racke, M. K., Quigley, L., Cannella, B., Raine, C. S., McFarlin, D. E., and Scott, D. E. 1994. Superantigen modulation of experimental allergic encephalomyelitis: activation of anergy determines outcome. *J.Immunol.* 152:2051-2059.
274. Cole, B. C. and Griffiths, M. M. 1993. Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the Mycoplasma arthritidis superantigen MAM. *Arthritis Rheum.* 36:994-1002.
275. Prevost, G., Rifai, S., Chaix, M. L., and Piemont, Y. 1991. Functional evidence that the Ser-195 residue of staphylococcal exfoliative toxin A is essential for biological activity. *Infect.Immun.* 59:3337-3339.

276. Rago, J. V., Vath, G. M., Bohach, G. A., Ohlendorf, D. H., and Schlievert, P. M. 2000. Mutational analysis of the superantigen staphylococcal exfoliative toxin A (ETA). *J.Immunol.* 164:2207-2213.
277. Acha-Orbea, H. and Palmer, E. 1991. Mls-a retrovirus exploits the immune system. *Immunol.Today* 12:356-361.
278. Choi, Y., Kappler, J. W., and Marrack, P. 1991. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumour virus. *Nature* 350:203-207.
279. Woodland, D. L., Lund, F. E., Happ, M. P., Blackman, M. A., Palmer, E., and Corley, R. B. 1991. Endogeneous superantigen expression is controlled by mouse mammary tumor proviral loci. *J.Exp.Med.* 174:1255-1258.
280. Choi, Y., Marrack, P., and Kappler, J. W. 1992. Structural analysis of a mouse mammary tumor virus superantigen. *J.Exp.Med.* 175:847-852.
281. Knight, A. M., Harrison, G. B., Paese, R. J., Robinson, P. J., and Dyson, P. J. 1992. Biochemical analysis of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat product. Evidence for the molecular structure of an endogenous superantigen. *Eur.J.Immunol.* 22:879-882.
282. Korman, A. J., Bourgarel, P., Meo, T., and Rieckhof, G. E. 1992. The mouse mammary tumour virus long terminal repeat encodes a type II transmembrane glycoprotein. *EMBO J.* 11:1901-1905.
283. Held, W., Waanders, G. A., Acha-Orbea, H., and MacDonald, H. R. 1994. Reverse transcriptase-dependent and -independent phases of infection with mouse mammary tumor virus: Implications for superantigen function. *J.Exp.Med.* 180:2347-2351.
- 
284. Acha-Orbea, H., Scarpellino, L., Shakhov, A. N., Held, W., and MacDonald, H. R. 1992. Inhibition of mouse mammary tumor virus-induced T cell responses in vivo by antibodies to an open reading frame protein. *J.Exp.Med.* 176:1769-1772.
285. Winslow, G. M., Scherer, M. T., Kappler, J. W., and Marrack, P. 1992. Detection and biochemical characterization of the mouse mammary tumor virus 7 superantigen (Mls-1a). *Cell* 71:719-719.
286. Winslow, G. M., Marrack, P., and Kappler, J. W. 1994. Processing and major histocompatibility complex binding of the MTV7 superantigen. *Immunity* 1:23-33.
287. Brandt-Carlson, C. and Butel, J. S. 1991. Detection and characterization of a glycoprotein encoded by the mouse mammary tumor virus long terminal repeat gene. *J.Virol.* 65:6051-6060.

288. McMahon, C. W., Bogatzki, L. Y., and Pullen, A. M. 1997. Mouse mammary tumor virus superantigens require N-linked glycosylation for effective presentation to T cells. *Virology* 228:161-170.
289. Haga, S., Shigesada, K., Namba, Y., Tanaka, H., Imai, S., Morimoto, J., Hiroishi, S., Yamamoto, H., Sarkar, N. H., and Hilgers, J. 1992. Polyclonal and monoclonal antibodies monospecific to MMTV LTR orf protein produced in *E. coli*. *Cancer Lett.* 65:201-207.
290. Mohan, N., Mottershead, D., Subramanyam, M., Beutner, U., and Huber, B. T. 1993. Production and characterization of an Mls-1-specific monoclonal antibody. *J.Exp.Med.* 177:351-358.
291. Delcourt, M., Thibodeau, J., Denis, F., and Sekaly, R. P. 1997. Paracrine transfer of mouse mammary tumor virus superantigen. *J.Exp.Med.* 185:471-480.
292. Modlin, C. S., Todd, G. T., Cohen, T. D., and Fairchild, R. L. 1995. Transfer of endogenous retroviral superantigen from donor to recipient B cells following priming to induce peripheral T cell tolerance. *Cell.Immunol.* 164:217-226.
293. Reilly, M., Mix, D., Reilly, A. A., Yang, Ye, X, and Winslow, G. M. 2000. Intercellular transfer of a soluble viral superantigen. *J.Virol.* 74:8262-8267.
294. Molloy, S. S., Bresnahan, P. A., Leppla, S. H., Klimpel, K. R., and Thomas, G. 1992. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J.Biol.Chem.* 267:16396-16402.
295. Mix, D. and Winslow, G. M. 1996. Proteolytic processing activates a viral superantigen. *J.Exp.Med.* 184:1549-1554.
296. Denis, F., Shoukry, N. H., Delcourt, M., Thibodeau, J., Labrecque, N., McGrath, H., Munzer, J. S., Seidah, N. G., and Sekaly, R. P. 2000. Alternative proteolytic processing of mouse mammary tumor virus superantigens. *J.Virol.* 74:3067-3073.
297. Lambert, J. F., Acha-Orbea, H., Kolb, E., and Diggelmann, H. 1993. The 3' half of the mouse mammary tumor virus orf gene is not sufficient for its superantigen function in transgenic mice. *Mol.Immunol.* 30:1399-1404.
298. Labrecque, N., McGrath, H., Subramanyam, M., Huber, B. T., and Sekaly, R.-P. 1993. Human T cells respond to mouse mammary tumour virus encoded superantigen: V $\beta$  restriction and conserved evolutionary features. *J.Exp.Med.* 177:1735-1743.

299. Subramanyam, M., Mclellan, B., Labrecque, N., Sekaly, R.-P., and Huber, B. T. 1993. Presentation of the Mls-1 superantigen by human HLA class II molecules to murine T cells. *J.Immunol.* 151:2538-2545.
300. Thibodeau, J., Labrecque, N., Denis, F., Huber, B. T., and Sekaly, R.-P. 1994. Binding sites for bacterial and endogenous retroviral superantigens can be dissociated on major histocompatibility complex class II molecules. *J.Exp.Med.* 179:1029-1034.
301. Hsu, P. N., Wolf, Bryant P., Sutkowski, N., Mclellan, B., Ploegh, H. L., and Huber, B. T. 2001. Association of mouse mammary tumor virus superantigen with MHC class II during biosynthesis. *J.Immunol.* 166:3309-3314.
302. Grigg, M. E., McMahon, C. W., Morkowski, S., Rudensky, A. Y., and Pullen, A. M. 1998. Mtv-1 superantigen trafficks independently of major histocompatibility complex class II directly to the B-cell surface by the exocytic pathway. *J.Virol.* 72:2577-2588.
303. Webb, S. R. and Sprent, J. 1990. Response of mature unprimed CD8<sup>+</sup> T cells to Mls<sup>a</sup> determinants. *J.Exp.Med.* 171:953-958.
304. Baribaud, F., Wirth, S., Maillard, I., Valsesia, S., Acha-Orbea, H., and Diggelmann, H. 2001. Identification of key amino acids of the mouse mammary tumor virus superantigen involved in the specific interaction with T-cell receptor V(beta) domains. *J.Virol.* 75:7453-7461.
305. Cazenave, P. A., Marche, P. N., Jouvin-Marche, E., Voegtle, D., Bonhomme, F., Bandeira, A., and Coutinho, A. 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.
306. Pullen, A. M., Wade, T., Marrack, P., and Kappler, J. W. 1990. Identification of the region of T cell receptor  $\beta$  chain that interacts with the self-superantigen Mls-1<sup>a</sup>. *Cell* 61:1365-1374.
307. Pullen, A. M., Bill, J., Kubo, R. T., Marrack, P., and Kappler, J. W. 1991. Analysis of the interaction site for the self-superantigen Mls- 1a on T cell receptor V $\beta$ . *J.Exp.Med.* 173:1183-1192.
308. Herrmann, T., Hochgrebe, T., Torres-Nagel, N. E., Huber, B. T., and Hunig, T. 1994. Control of the rat T cell response to retroviral and bacterial superantigens by class II MHC products and Tcrb-V8.2 alleles. *J.Immunol.* 152:4300-4309.
309. Acha-Orbea, H., Finke, D., Attinger, A., Schmid, S., Wehrli, N., Vacheron, S., Xenarios, I., Scarpellino, L., Toellner, K. M., MacLennan, I. C., and Luther, S. A.

1999. Interplays between mouse mammary tumor virus and the cellular and humoral immune response. *Immunol.Rev.* 168:287-303.
310. Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudravalli, R., and Ross, S. R. 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:2281-2286.
311. Finke, D., Mortezaei, L., and Acha-Orbea, H. 1998. Preactivation of B lymphocytes does not enhance mouse mammary tumor virus infection. *J.Virol.* 72:7688-7691.
312. Vacheron, S., Luther, S. A., and Acha-Orbea, H. 2002. Preferential infection of immature dendritic cells and B cells by mouse mammary tumor virus. *J.Immunol.* 168:3470-3476.
313. Ross, S. R., Schofield, J. J., Farr, C. J., and Bucan, M. 2002. Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:12386-12390.
314. Neckers, L. M., Yenokida, G., and James, S. P. 1984. The role of the transferrin receptor in human B lymphocyte activation. *J.Immunol.* 133:2437-2441.
315. Indik, S., Gunzburg, W. H., Salmons, B., and Rouault, F. 2005. Mouse mammary tumor virus infects human cells. *Cancer Res.* 65:6651-6659.
316. Beutner, U., Kraus, E., Kitamura, D., Rajewsky, K., and Huber, B. T. 1994. B cells are essential for murine mammary tumor virus transmission, but not for presentation of endogenous superantigens. *J.Exp.Med.* 179:1457-1466.
317. Ardavin, C., Luthi, F., Andersson, M., Scarpellino, L., Martin, P., Diggelmann, H., and Acha-Orbea, H. 1997. Retrovirus-induced target cell activation in the early phases of infection: the mouse mammary tumor virus model. *J.Virol.* 71:7295-7299.
318. Burzyn, D., Rassa, J. C., Kim, D., Nepomnaschy, I., Ross, S. R., and Piazzon, I. 2004. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J.Virol.* 78:576-584.
319. Held, W., Acha-Orbea, H., MacDonald, H. R., and Waanders, G. A. 1994. Superantigens and retroviral infection: insights from mouse mammary tumor virus. *Immunol.Today* 15:184-190.
320. Golovkina, T. V., Chervonsky, A., Dudley, J. P., and Ross, S. R. 1992. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 69:637-645.
321. Held, W., Waanders, G. A., Shakhov, A. N., Scarpellino, L., Acha-Orbea, H., and MacDonald, H. R. 1993. Superantigen-induced immune stimulation amplifies

- mouse mammary tumour virus infection and allows virus transmission. *Cell* 74:529-540.
322. Tsubura, A., Inaba, M., Imai, S., Murakami, A., Oyaizu, N., Yasumizu, R., Ohmishi, Y., Tanaka, H., Morii, S., and Ikehara, S. 1988. Intervention of T-cells in transportation of mouse mammary tumor virus (milk factor) to mammary gland cells in vivo. *Cancer Res.* 48:6555-6559.
  323. Golovkina, T. V., Dudley, J. P., and Ross, S. R. 1998. B and T cells are required for mouse mammary tumor virus spread within the mammary gland. *J.Immunol.* 161:2375-2382.
  324. Marrack, P., Kushnir, E., and Kappler, J. 1991. A maternally inherited superantigen encoded by a mammary tumour virus. *Nature* 349:524-526.
  325. Papiernik, M., Pontoux, M., and Gisselbrecht, S. 1992. Acquired Mls-1a-like clonal deletion in Mls-1b mice. *J.Exp.Med.* 175:453-460.
  326. Ignatowicz, L., Kappler, J. W., and Marrack, P. 1992. The effects of chronic infection with a superantigen-producing virus. *J.Exp.Med.* 175:917-923.
  327. Schneider, R., Lees, R. K., Pedrazzini, T., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H., and MacDonald, H. R. 1989. Postnatal disappearance of self-reactive (V $\beta$ 6+) cells from the thymus of Mlsa mice. Implications for T cell development and autoimmunity. *J.Exp.Med.* 169:2149-2158.
  328. Nelson, P. N., Carnegie, P. R., Martin, J., Davari, Ejtehad H., Hooley, P., Roden, D., Rowland-Jones, S., Warren, P., Astley, J., and Murray, P. G. 2003. Demystified. Human endogenous retroviruses. *Mol.Pathol.* 56:11-18.
  329. Nelson, P. N., Hooley, P., Roden, D., Davari, Ejtehad H., Rylance, P., Warren, P., Martin, J., and Murray, P. G. 2004. Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin.Exp.Immunol.* 138:1-9.
  330. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczkzy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W.,

- McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., and Chen, Y. J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
331. de Parseval, N. and Heidmann, T. 2005. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet. Genome Res.* 110:318-332.
332. Sverdlov, E. D. 2000. Retroviruses and primate evolution. *Bioessays* 22:161-171.
333. Prudhomme, S., Bonnaud, B., and Mallet, F. 2005. Endogenous retroviruses and animal reproduction. *Cytogenet. Genome Res.* 110:353-364.
334. Stauffer, Y., Marguerat, S., Meylan, F., Ucla, C., Sutkowski, N., Huber, B., Pelet, T., and Conrad, B. 2001. Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity. *Immunity* 15:591-601.

335. Marguerat, S., Wang, W. Y., Todd, J. A., and Conrad, B. 2004. Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes. *Diabetes* 53:852-854.
336. Conrad, B., Weissmahr, R. N., Boni, J., Arcari, R., Schupbach, J., and Mach, B. 1997. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 90:303-313.
337. Conrad, B., Weidmann, E., Trucco, G., Rudert, W. A., Behboo, R., Ricordi, C., Rodriquez-Rilo, H., Finegold, D., and Trucco, M. 1994. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* 371:351-355.
338. Qi, L. and Ostrand-Rosenberg, S. 2001. H2-O inhibits presentation of bacterial superantigens, but not endogenous self antigens. *J.Immunol.* 167:1371-1378.
339. Ehrich, E. W., Devaux, B., Rock, E. P., Jorgensen, J. L., Davis, M. M., Chien, Y.-H., and Chien, Y. H. 1993. T cell receptor interaction with peptide/major histocompatibility complex (MHC) and superantigen/MHC ligands is dominated by antigen. *J.Exp.Med.* 178:713-722.
340. Seth, A., Stern, L. J., Ottenhoff, T. H. M., Engel, I., Owen, M. J., Lamb, J. R., Klausner, R. D., and Wiley, D. C. 1994. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen *in vitro*. *Nature* 369:324-327.
341. Hodtsev, A. S., Choi, Y., Spanopoulou, E., and Posnett, D. N. 1998. Mycoplasma superantigen is a CDR3-dependent ligand for the T cell antigen receptor. *J.Exp.Med.* 187:319-327.
342. Desbarats, J., Duke, R. C., and Newell, M. K. 1998. Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4+ T cells. *Nat.Med.* 4:1377-1382.
343. Lee, W. T. and Vitetta, E. S. 1992. Memory T cells are anergic to the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *J.Exp.Med.* 176:575-579.
344. Weber, G. F., Abromson-Leeman, S., and Cantor, H. 1995. A signaling pathway coupled to T cell receptor ligation by MMTV superantigen leading to transient activation and programmed cell death. *Immunity* 2:363-372.
345. Wegener, A.-M. K., Letourneur, F., Hoeveler, A., Brocker, T., Luton, F., and Malissen, B. 1992. The T cell receptor/CD3 Complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 68:83-95.
346. Kawai, K. and Ohashi, P. S. 1995. Immunological function of a defined T-cell population tolerized to low- affinity self antigens. *Nature* 374:68-69.



347. Lavoie, P. M., McGrath, H., Shoukry, N. H., Cazenave, P. A., Sekaly, R. P., and Thibodeau, J. 2001. Quantitative relationship between MHC class II-superantigen complexes and the balance of T cell activation versus death. *J.Immunol.* 166:7229-7237.
348. Schodin, B. A., Tsomides, T. J., and Kranz, D. M. 1996. Correlation between the number of T cell receptors required for T cell activation and TCR-ligand affinity. *Immunity* 5:137-146.
349. Lavoie, P. M., Thibodeau, J., Cloutier, I., Busch, R., and Sekaly, R. P. 1997. 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.
350. Tourne, S., Miyazaki, T., Oxenius, A., Klein, L., Fehr, T., Kyewski, B., Benoist, C., and Mathis, D. 1997. Selection of a broad repertoire of CD4<sup>+</sup> T cells in H-2Ma<sup>0/0</sup> mice. *Immunity.* 7:187-195.
351. Albert, L. J., Denzin, L. K., Ghumman, B., Bangia, N., Cresswell, P., and Watts, T. H. 1998. Quantitative defect in staphylococcal enterotoxin A binding and presentation by HLA-DM-deficient T2.Ak cells corrected by transfection of HLA-DM genes. *Cell Immunol.* 183:42-51.
352. Sutkowski, N., Chen, G., Calderon, G., and Huber, B. T. 2004. Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen. *J.Virol.* 78:7852-7860.
353. Jaeckel, E., Heringlake, S., Berger, D., Brabant, G., Hunsmann, G., and Manns, M. P. 1999. No evidence for association between IDDMK(1,2)22, a novel isolated retrovirus, and IDDM. *Diabetes* 48:209-214.
354. Kim, A., Jun, H. S., Wong, L., Stephure, D., Pacaud, D., Trussell, R. A., and Yoon, J. W. 1999. Human endogenous retrovirus with a high genomic sequence homology with IDDMK(1,2)22 is not specific for Type I (insulin-dependent) diabetic patients but ubiquitous. *Diabetologia* 42:413-418.
355. Lan, M. S., Mason, A., Coutant, R., Chen, Q. Y., Vargas, A., Rao, J., Gomez, R., Chalew, S., Garry, R., and Maclaren, N. K. 1998. HERV-K10s and immune-mediated (type 1) diabetes. *Cell* 95:14-16.
356. Lower, R., Tonjes, R. R., Boller, K., Denner, J., Kaiser, B., Phelps, R. C., Lower, J., Kurth, R., Badenhop, K., Donner, H., Usadel, K. H., Miethke, T., Lapatschek, M., and Wagner, H. 1998. Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K. *Cell* 95:11-14.

357. Muir, A., Ruan, Q. G., Marron, M. P., and She, J. X. 1999. The IDDMK(1,2)22 retrovirus is not detectable in either mRNA or genomic DNA from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 48:219-222.
358. Murphy, V. J., Harrison, L. C., Rudert, W. A., Luppi, P., Trucco, M., Fierabracci, A., Biro, P. A., and Bottazzo, G. F. 1998. Retroviral superantigens and type 1 diabetes mellitus. *Cell* 95:9-11.
359. Lapatschek, M., Durr, S., Lower, R., Magin, C., Wagner, H., and Miethke, T. 2000. Functional analysis of the env open reading frame in human endogenous retrovirus IDDMK(1,2)22 encoding superantigen activity. *J.Virol.* 74:6386-6393.
360. Szabo, S., Haislip, A. M., and Garry, R. F. 2005. Of mice, cats, and men: is human breast cancer a zoonosis? *Microsc.Res.Tech.* 68:197-208.
361. Stewart, T. H., Sage, R. D., Stewart, A. F., and Cameron, D. W. 2000. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*. *Br.J.Cancer* 82:446-451.
362. Wang, Y., Pelisson, I., Melana, S. M., Go, V., Holland, J. F., and Pogo, B. G. 2001. MMTV-like env gene sequences in human breast cancer. *Arch.Virol.* 146:171-180.
363. Wang, Y., Jiang, J. D., Xu, D., Li, Y., Qu, C., Holland, J. F., and Pogo, B. G. 2004. A mouse mammary tumor virus-like long terminal repeat superantigen in human breast cancer. *Cancer Res.* 64:4105-4111.
364. Firouzi, R., Rolland, A., Michel, M., Jouvin-Marche, E., Hauw, J. J., Malcus-Vocanson, C., Lazarini, F., Gebuhrer, L., Seigneurin, J. M., Touraine, J. L., Sanhadji, K., Marche, P. N., and Perron, H. 2003. Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J.Neurovirol.* 9:79-93.
365. Truss, M., Chalepakis, G., and Beato, M. 1992. Interplay of steroid hormone receptors and transcription factors on the mouse mammary tumor virus promoter. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 43:365-378.
366. Germain, R. N. and Stefanova, I. 1999. The dynamic of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu.Rev.Immunol.* 17:467-522.
367. Simonsen, A., Momburg, F., Drexler, J., Hammerling, G. J., and Bakke, O. 1993. Intracellular distribution of the MHC class II molecules and the associated invariant chain (Ii) in different cell lines. *Int.Immunol.* 5:903-917.

368. Kozono, H., Parker, D., White, J., Marrack, P., and Kappler, J. 1995. Multiple binding sites for bacterial superantigens on soluble class II MHC molecules. *Immunity* 3:187-196.
369. Vogt, A. B., Stern, L. J., Amshoff, C., Dobberstein, B., Hammerling, G. J., and Kropshofer, H. 1995. Interference of distinct invariant chain regions with superantigen contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR. *J.Immunol.* 155:4757-4765.
370. Golovkina, T. V., Agafonova, Y., Kazansky, D., and Chervonsky, A. 2001. Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens. *J.Immunol.* 166:2244-2250.
371. Lui, S. W. and Ng, M. H. 1980. Glycoproteins and sialyl transferase of human B lymphoblastoid cell lines. *Arch.Virol.* 63:31-41.
372. Guthridge, J. M., Kaplan, A. M., and Cohen, D. A. 1994. Regulation of B cell:T cell interactions: potential involvement of an endogenous B cell sialidase. *Immunol.Invest* 23:393-411.
373. Monfalcone, A. P., Kosco, M. H., Szakal, A. K., and Tew, J. G. 1989. Germinal center B cells and mixed leukocyte reactions. *J.Leukoc.Biol.* 46:181-188.
374. Bagriacik, E. U. and Miller, K. S. 1999. Cell surface sialic acid and the regulation of immune cell interactions: the neuraminidase effect reconsidered. *Glycobiology* 9:267-275.
375. Frohman, M. and Cowing, C. 1985. Presentation of antigen by B cells: functional dependence on radiation dose, interleukins, cellular activation, and differential glycosylation. *J.Immunol.* 134:2269-2275.
376. Frelinger, J. G., Frelinger, J. A., and Hood, L. 1981. Peptide map comparisons of epidermal and spleen H-2 molecules. *Immunogenetics* 12:569-577.