

2M11.3458.8

Université de Montréal

**CARACTÉRISATION DES MOLÉCULES NON-
CLASSIQUES DU COMPLEXE MAJEUR
D'HISTOCOMPATIBILITÉ HUMAIN
HLA-DM ET HLA-DO**

par

Djibril Amadou Diallo

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître Es Sciences (M.Sc)
en Microbiologie et Immunologie

Juillet, 2006

© Djibril Amadou Diallo, 2006



W

H

U58

2006

V.159

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

Ce mémoire intitulé :

CARACTÉRISATION DES MOLÉCULES NON-CLASSIQUES DU COMPLEXE
MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ HUMAIN
HLA-DM ET HLA-DO

présenté par :

Djibril Amadou Diallo

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Louis de Repentigny, président-rapporteur

Dr Jacques Thibodeau, directeur de recherche

Dr Naglaa Shoukry, membre du jury

RÉSUMÉ

HLA-DO et HLA-DM sont deux molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité humain qui régulent la présentation antigénique par le CMH II aux lymphocytes TCD4⁺. Alors que DM contrôle la dissociation de CLIP (Class II associated invariant chain peptide) et le chargement des peptides antigéniques sur les molécules classiques comme DR, DO module l'activité catalytique de DM au niveau des compartiments endo-lysosomiaux. Ensemble, DO et DM ont une activité éditrice sur le répertoire antigénique de classe II. En effet, chez des souris Knock Out (souris *HLA-DM*^{-/-} tout comme celles *HLA-DO*^{-/-}), il a été montré que DO et DM influençaient directement le choix de l'épitope présenté. Par ailleurs chez les lymphocytes B ainsi que des cellules fibroblastes transfectées, il a été montré que la majorité de DO est associée physiquement à DM et que cette association est requise pour la sortie de DO du réticulum endoplasmique. Pour apporter une meilleure compréhension au fonctionnement de DM et de DO, notamment cette réquisition de DM pour la maturation de DO, nous nous sommes proposés de caractériser les interactions DO/DM en cartographiant par mutagenèse dirigée les résidus médians le contact entre les deux molécules et aussi en analysant l'impact de DM sur l'assemblage de DO et de sa sortie du réticulum endoplasmique. Ainsi, en criblant par mutagenèse des résidus exposés des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ de DM ainsi que des résidus conservés du domaine $\alpha 2$ de DO, seul le domaine $\beta 1$ de DM montrait des résultats suggérant une implication dans l'interaction. Par ailleurs, en nous servant d'un anticorps conformationnel anti DO, nous avons montré que HLA-DM agit comme un chaperon lors du repliement de HLA-DO, permettant ainsi à celui-ci d'avoir la conformation requise pour la sortie du RE. L'identification de résidus médiant l'interaction entre DO et DM et une meilleure compréhension de l'impact de DM sur la maturation de DO sont deux éléments qui pourraient servir à une meilleure analyse de l'édition du répertoire de peptides antigéniques de classe II par ces molécules.

MOTS-CLÉS

CMH II

Régulation de la presentation antigénique

HLA-DM

HLA-DO

Caractérisation moléculaire

Chaperon

Sortie du RE

ABSTRACT

HLA-DO and HLA-DM are two non-classical MHC II molecules that regulate antigen presentation to CD4⁺ T lymphocyte. While DM controls CLIP (Class II associated invariant chain peptide) dissociation and peptide loading on classical molecules such as DR, DO modulates the catalytic activity of DM in the endo-lysosomal compartments. Together, DO and DM have an editing activity on class II antigen peptide repertoire. Indeed, it has been shown in *HLA-DM*^{-/-} and *HLA-DO*^{-/-} Knock Out mice, that DO and DM can directly influence the choice of an epitope during the peptide loading process. In B lymphocytes and transfected fibroblast cells, the majority of DO is physically associated to DM and this association is required for DO egress out of ER. For a better understanding of the mechanisms underlying the molecular action of DO and DM; particularly the requirement of DM for DO maturation, we decided to characterize DO/DM interactions by mapping the contacting residues between the two molecules and by analyzing DM impact on DO assembly and egress out of ER using conformational anti-DO antibody. To localize residues mediating contact between DO and DM we point-mutated exposed residues on DM α 1 and DM β 1 chain loops and laterals faces and also conserved residues in α 2 domain of DO. Only mutations in β 1 domain did affect DO surface level of expression, suggesting that DM β 1 region may be implicated in DO/DM interaction. Using conformational antibody Mag.DO, we show that DM acts as a chaperon for DO, allowing it to gain the optimal conformation required for the release from ER retention. The Identification of residues mediating contact between DO and DM and the characterization of DM impact on DO maturation are two elements that could serve for a better analysis of class II antigenic peptide editing by those two molecules.

KEYWORDS

MHC II

Regulation of antigen presentation

HLA-DM

HLA-DO

Molecular characterization

Chaperon

ER egress

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
MOTS-CLÉS.....	ii
ABSTRACT	iii
KEYWORDS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xii
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	16
1.1 Introduction.....	17
1.1.1 À la découverte du Complexe majeur d'histocompatibilité	17
1.1.2 Le locus du complexe majeur d'histocompatibilité	18
1.1.3 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.....	20
1.2 Les molécules classiques du CMH II.....	22
1.2.1 Structure et Organisation	22
1.2.2 Plancher α/β et liaison des peptides.....	24
1.2.3 Distribution et régulation de l'expression.....	26
1.2.3.1 Distribution tissulaire.....	26
1.2.3.2 Régulation de l'expression.....	27
1.2.3.3 CIITA et la distribution tissulaire des molécules classiques.....	29
1.2.4 Présentation antigénique par les molécules classiques du CMH II.....	30
1.2.4.1 Biosynthèse et assemblage des complexes classe II-Ii.....	31
1.2.4.2 Importance de la chaîne invariante dans la maturation des molécules de classe II classiques	32

1.2.4.3	Ciblage des molécules classiques du CMH II aux compartiments endolysosomiaux par la chaîne invariante.....	33
1.2.4.4	Dégradation de la chaîne invariante	34
1.2.4.5	Compartiments de chargement des peptides	35
1.2.4.6	Transport des complexes CMH II – peptide à la surface des cellules présentatrices d’antigènes.....	39
1.3	Les molécules non classiques du CMH II	41
1.4	HLA-DM	43
1.4.1	Régulation de l’expression et distribution tissulaire	43
1.4.2	Ciblage et distribution cellulaire	43
1.4.3	HLA-DM et la présentation antigénique par les molécules de classe II classiques.....	45
1.4.3.1	Structure.....	45
1.4.3.2	Rôle dans l’échange de CLIP et le chargement des peptides.....	47
1.4.3.3	Rôle de chaperon dans la stabilisation des classes II vides.....	48
1.4.3.4	Rôle dans la sélection/édition des peptides antigéniques et épitopes.....	48
1.4.4	Association entre HLA-DM et HLA-DR.....	50
1.4.4.1	Résidus de HLA-DR impliqués dans l’interaction de DM – DR.....	50
1.4.4.2	Résidus de HLA-DM impliqués dans l’interaction DM – DR.....	51
1.4.5	Modèle de relâche peptidique sous l’action de DM.....	54
1.5	HLA-DO.....	56
1.5.1	Distribution tissulaire	57
1.5.2	Régulation de l’expression.....	58
1.5.3	Transport et ciblage intracellulaire.....	59
1.5.4	Fonction de HLA-DO	60
1.5.4.1	Fonction in vivo.....	61
1.5.4.2	HLA-DO dans la genèse de la réponse humorale par les lymphocytes B	64

1.6	Édition du répertoire antigénique de classe II et Immunodominance dans la réponse T CD4 ⁺	65
1.7	Hypothèse et Objectifs de travail	68
1.7.1	Hypothèse	68
1.7.2	Objectifs	69
1.7.2.1	Objectif 1 : Cartographie des résidus impliqués dans l'interaction DO/DM 69	
1.7.2.2	Objectif 2 : Impact de DM sur les premières étapes de maturation de DO 70	
CHAPITRE 2 ARTICLE 1		72
2.1	EVIDENCE FOR A DM-INDUCED CONFORMATION CHANGE IN HLA-DOβ ¹ 73	
2.2	ABSTRACT.....	74
2.3	RÉSUMÉ ET CONTRIBUTION.....	75
2.3.1	Résumé.....	75
2.3.2	Contribution	76
2.4	INTRODUCTION.....	77
2.5	MATERIALS AND METHODS.....	80
2.5.1	Plasmids and cDNA.....	80
2.5.2	Antibodies	80
2.5.3	Cell lines, transfections and BFA treatment	81
2.5.4	Flow cytometry	81
2.5.5	Fluorescent microscopy	81
2.5.6	Immunoprecipitation, Western blotting and endoglycosidase H treatment..	82
2.6	RESULTS.....	83
2.6.1	Mag.DO5 mAb binds the HLA-DOβ chain.....	83
2.6.2	Mags.DO recognizes a conformational epitope	84
2.6.3	Mags.DO staining increases in presence of HLA-DM.....	84

2.6.4	Conformation change occurs in the ER.....	85
2.6.5	The Mags.DO reactivity increases on cells expressing correctly folded HLA-DO molecules	85
2.7	DISCUSSION.....	87
2.8	REFERENCES	89
2.9	FIGURES.....	95
2.10	FIGURE LEGENDS	100
2.11	SUPPLEMENTAL DATA.....	102
2.11.1	Mapping of DO/DM contacting residues by site directed mutagenesis	103
2.11.1.1	Mutagenesis.....	103
2.11.1.2	Cell transfection and flow cytometry.....	106
2.11.1.3	Supplemental data References.....	106
2.11.1.4	Supplemental Figures.....	107
CHAPITRE 3 DISCUSSION		114
3.1	Localisation des sites d'interaction DO/DM	115
3.2	Effet chaperon de DM sur l'assemblage de DO et de sa sortie du RE.....	118
3.2.1	DO comme co-chaperon?	120
3.2.2	Importance d'un effet chaperon de DM sur la sortie de DO du RE.....	121
3.2.3	DO dans la modulation de la présentation antigénique chez les cellules dendritiques.	122
CHAPITRE 4 CONCLUSION		124
CHAPITRE 5 RÉFÉRENCES.....		131
CHAPITRE 6 ANNEXES		CXLVI
6.1	ANNEXE I ARTICLE 2.....	cxlvii
6.2	ANNEXE II ACCORD DES CO-AUTEURS.....	clv
6.2.1	CO-AUTEURS ARTICLE 1	clvi

6.2.2 CO-AUTEURS ARTICLE 2clvii

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1.1 Locus du complexe majeur d'histocompatibilité	19
Figure 1.1.2 Voie de présentation antigénique par le CMH I et II	20
Figure 1.1.3 Structure des molécules classiques du complexe majeur d'histocompatibilité	21
Figure 1.2.1 Site d'interaction du complexe CMH II – peptide avec le TCR et le CD4	23
Figure 1.2.2 Orientation des peptides dans la niche des molécules classiques du CMH II	25
Figure 1.2.3 Ponts hydrogènes reliant le peptide HA à la niche de DR1	26
Figure 1.2.4 Complexe transcriptionnel du CMH II.....	28
Figure 1.2.5 Promoteur MHC2TA	29
Figure 1.2.6 Voie de présentation antigénique par les molécules du CMH II.....	31
Figure 1.2.7 Complexe nonamérique classe II-Ii	32
Figure 1.2.8 Vue d'ensemble de la dégradation de la chaîne invariante	35
Figure 1.2.9 Voie endosomale et ciblage molécules du CMH II.....	37
Figure 1.2.10 Voies d'apprêtement des antigènes présentés par les classes II.....	38
Figure 1.2.11 Modèle de formation des exosomes et transport en surface des complexes CMH II – peptide.	40
Figure 1.3.1 Inhabilité des molécules non classiques à présenter des peptides	42
Figure 1.4.1 La structure tridimensionnelle de HLA-DM est similaire à celle de DR .	46
Figure 1.4.2 Le plancher de HLA-DM possède une seule pochette fossile.....	46
Figure 1.4.3 Les fonctions de HLA-DM dans la présentation antigénique par les classes II	49
Figure 1.4.4 Mutations ponctuelles sur HLA-DR affectant l'interaction avec HLA-DM	51

Figure 1.4.5 Modèle d'interaction entre HLA-DM et HLA-DR	53
Figure 1.4.6 Modèle de relâche peptidique catalysé par HLA-DM	55
Figure 1.5.1 Modulation de la présentation antigénique par HLA-DO chez les lymphocytes B	63
Figure 1.6.1 Modulation du ciblage de la réponse T CD4 ⁺ <i>in vivo</i> vers l'épitope immunodominant 158-173 de LACK par DM	66

Chapitre 2

Figure 2.9.1 Mag.DO mAb is conformational.....	95
Figure 2.9.2 Monoclonal antibody Mags.DO1 maps to the β chain of DO	96
Figure 2.9.3 DM increases Mag.DO reactivity	97
Figure 2.9.4 DM-induced conformation change occurs in ER.....	98
Figure 2.9.5 DO chimera with DR $\alpha\beta$ N-terminal domain is DM independent.....	99
Figure 2.11.1 Mapping of HLA-DO and HLA-DM interacting residues on exposed loops of DM α 1 and B1 domain.....	108
Figure 2.11.2 Mapping of DM-DO interaction site at HLA-DM α glycosylation asparagine residue	109
Figure 2.11.3 Mapping of HLA-DO interacting residues on HLA-DMB exposed lateral face.....	111
Figure 2.11.4 Looking for interacting sites at conserved residues in classe II α 2 domain	113

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANS: "*8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid*"

APC: Antigen presenting cell

BFA: Brefeldine A

BCR: "*B cell receptor*"

CPA: Cellule présentatrice d'antigènes

CLIP: "*Class II invariant Chain associated peptide*"

CIITA: "*Class II transactivator*"

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CMH-I: CMH de classe I

CMH-II : CMH de classe II

HLA : "*Human leukocyte antigen*"

DQ : HLA-DQ

DR : HLA-DR

DP : HLA-DP

DO: HLA-DO

DM : HLA-DM

DO PV: mutant DO α P11V/ β wt

DMY: mutant DM 226-YTPL; DM α wt/ β Y226A

Ii : Chaîne invariante

Ig : Immunoglobuline

GILT : "*Gamma-interferon-Inducible Lysosomal Thiol reductase*"

HA: Hémagglutinine

IFN- γ : Interferon gamma

KDa: Kilodaltons

MIIC: "*Major histocompatibility-complex class II compartments*"

MHC: "*Major histocompatibility complex*"

MLR: Mixed Lymphocyte Reaction

pbs: paire de bases

RE : Réticulum endoplasmique

RER : Réticulum endoplasmique rugueux

TCR : "*T cell receptor*"

LACK: *Leishmania* homologue of activated receptor for c-kinase

Wt: Wild type

K.O: Knock Out

Km: Constante de Michaelis Menten

*À la mémoire de mon père feu Amadou
Moctar Diallo, paix à ton âme.*

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Jacques Thibodeau pour m'avoir initié à la recherche scientifique.

Je remercie également tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenu durant mon parcours, notamment, l'équipe du laboratoire d'immunologie moléculaire de l'université de Montréal, parents et amis et plus particulièrement Chrystèle Betty.

CHAPITRE 1 Revue de la littérature

1.1 Introduction

1.1.1 À la découverte du Complexe majeur d'histocompatibilité

Le CMH a été initialement découvert chez des souris suite à des études de transplantation qui avaient pour but la compréhension des tumeurs spontanées que développaient ces animaux (1,2). C'est Gore (3,4) qui fut le premier à identifier cet ensemble de facteurs génétiques contrôlant la compatibilité entre tissus (complexe majeur d'histocompatibilité) dont il désigna les gènes sous le nom d'antigènes II. Plus tard, grâce à des croisements entre souris congéniques, Snell arriva à caractériser les gènes du locus et les nomma alors les gènes H (5). Ainsi naquit le complexe majeur d'histocompatibilité H-2 de la souris.

La découverte du CMH chez l'homme s'est faite plus tard, dans les années 50-60, dans un contexte relativement différent. Jean Dausset, en 1952, identifia des anticorps agglutinant des leucocytes à cause d'un déterminant polymorphique nommé Mac-1 (6,7). Par la suite, van Rood, Bodmer et Payne identifiaient indépendamment des anticorps dirigés contre des déterminants paternels exprimés sur des cellules fœtales (6,7). Ces déterminants furent alors regroupés sous le nom de HLA (human leukocyte antigen; antigène leucocytaire humain). Grâce à l'utilisation de différents alloantisérums, le polymorphisme du HLA commença progressivement à être mis au jour. HLA-A, B et C, regroupés aujourd'hui sous le nom de CMH I, furent les premiers à être découverts (7). Par la suite, HLA-DR, DC (actuel DQ) et SB (actuel DP), regroupés sous le nom de CMH II, furent découverts grâce au test cellulaire MLR (Mixed lymphocyte reaction); un test anciennement utilisé pour mesurer l'histocompatibilité au niveau du HLA. Des lymphocytes de deux donneurs sont mis en co-culture et si le locus du CMH des donneurs est différent; il s'en suivra une prolifération cellulaire. Par la suite, les différents haplotypes du HLA furent confirmés par

des allosérums (6,7). Aujourd'hui le CMH a été caractérisé chez la presque totalité des vertébrés.

1.1.2 Le locus du complexe majeur d'histocompatibilité

Depuis sa découverte dans les années 30, plusieurs études ont été effectuées pour mieux caractériser le locus du CMH. Cependant c'est seulement en 1999 que la première séquence fut établie. Le locus du CMH humain défini à l'époque, occupait jusqu'à 3,6 méga bases sur le bras court du chromosome 6 et contenait plus de 224 loci de gènes dont 128 potentiellement exprimés (8). Cependant, le déséquilibre de liaison et la découverte d'autres gènes (*HFE*, *TRIM38* et BTNs entre autres) ont permis d'allonger le locus du CMH jusqu'à 7,6 méga bases (9).

De façon classique, le locus du CMH est divisé en 3 régions génomiques du télomère au centromère, classées respectivement, en gènes de classe I, gènes de classe III et gènes de classe II (figure 1.1.1) (10). Les gènes de classe II codent pour des molécules de présentation antigénique aux lymphocytes T CD4⁺. On distingue notamment les molécules classiques (HLA-DR, DP et DQ) exprimées principalement à la surface des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes B pour la présentation des peptides et les molécules non classiques (HLA-DM et HLA-DO) qui régulent le chargement des peptides (11,12). La région II contient également des gènes codant pour des molécules appartenant à la voie de présentation antigénique de classe I, notamment LMP2 et 7 et TAP 1 dont les produits protéiques sont impliqués dans l'apprêtement antigénique (13, 14).

La région III ne contient pas de gènes codant pour des protéines présentatrices d'antigènes comme les molécules des classes I et II exprimées à la surface des CPA, cependant certains de ses gènes ont un rôle important dans la réponse immunitaire; par exemple les gènes *C* qui codent pour le complément (facteurs protéiques impliqués dans la réponse innée) et le gène *NOTCH* dont le produit est impliqué dans la différenciation des lymphocytes T (15).

Les gènes de la région I codent pour les molécules de la voie de présentation antigénique aux lymphocytes T CD8⁺ (13). Comme pour ceux de la région II, les produits des gènes de classe I ont été divisés en molécules classiques (HLA-A, B et C) et molécules non classiques (MICA, et HLA-G entre autres). Les premières sont très polymorphiques et exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées alors que la définition des secondes reste quelque peu ambiguë (15).

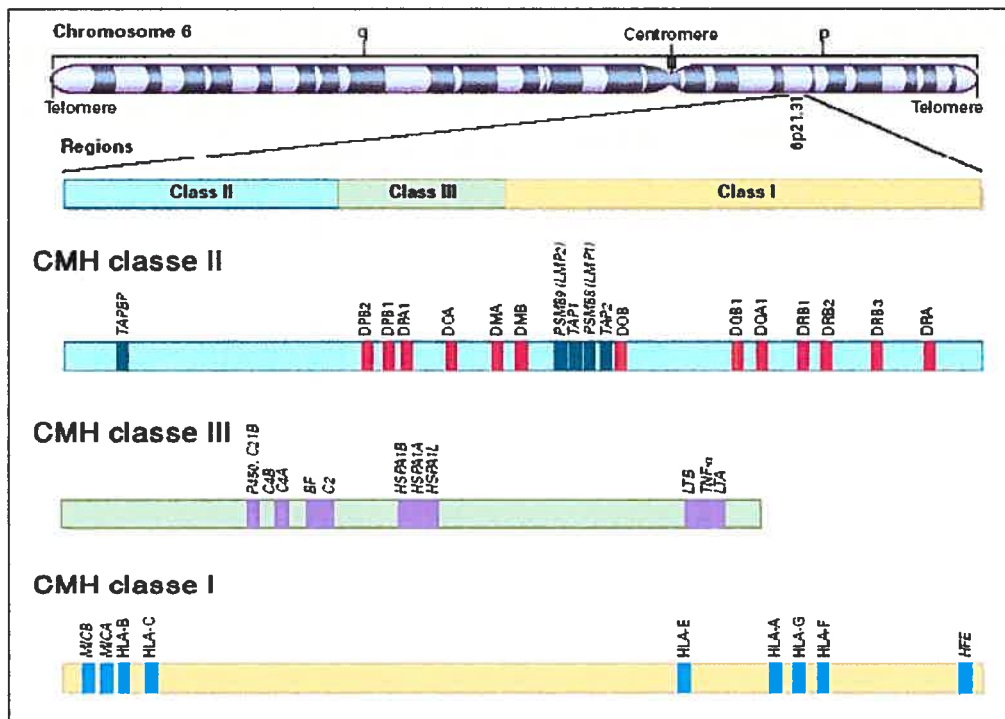


Figure 1.1.1 Locus du complexe majeur d'histocompatibilité

Représentation de la position et de l'organisation des trois classes du locus du CMH dans le bras court du chromosome 6. Les classes I et II occupent respectivement la position télomérique et la position centromérique avec la classe III séparant les deux (Inspiré de Klein *et al.*, 2000) (10). Le locus du CMH compte plus de 200 gènes, cependant, seuls quelques uns sont présentés sur ce schéma.

1.1.3 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

Même si à l'origine le CMH a été découvert dans un contexte de compatibilité histologique lors de transplantation, lequel contexte est d'ailleurs à l'origine de son nom, aujourd'hui il est connu qu'un de ses rôles primordiaux est de permettre l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. L'expression des molécules de classe I de façon ubiquitaire sur toutes les cellules nucléées permet en effet la présentation de peptides dérivant des pathogènes intracellulaires aux lymphocytes T $CD8^+$ (figure 1.2 A). Ces lymphocytes T ainsi activés, détruisent les cellules infectées par le pathogène grâce à leur activité cytolytique. Par ailleurs, les molécules de classe II exprimées principalement par les cellules présentatrices d'antigènes exposent des peptides exogènes aux lymphocytes T $CD4^+$ qui vont ainsi initier la réponse humorale contre les pathogènes extracellulaires (figure 1.1.2 B).

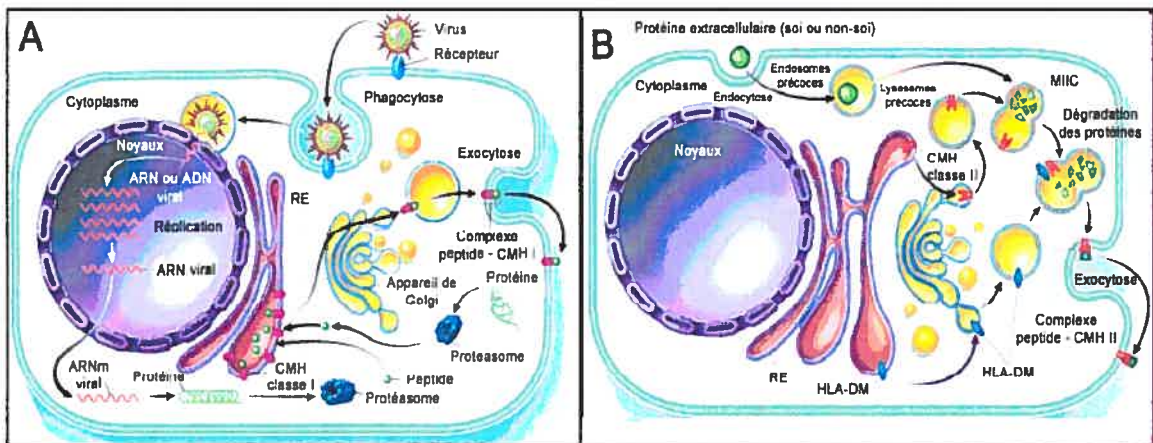


Figure 1.1.2 Voie de présentation antigénique par le CMH I et II

A) Voie de présentation antigénique par les molécules de classe I. Les protéines endogènes sont dégradées par le protéasome en peptides qui sont dirigés vers le RE pour être chargés sur la niche des molécules de classe I. Les complexes CMH-I / peptide sont envoyés à la surface cellulaire pour activer les lymphocytes T $CD8^+$. **B)** Voie de présentation antigénique par les molécules de classe II. Des protéines extracellulaires sont internalisées et dégradées dans les endosomes en peptides. Grâce à HLA-DM, le fragment CLIP sur les classes II sera échangé pour un de ces peptides antigéniques. Les complexes CMH-II / peptide seront alors présentés à la surface aux lymphocytes T $CD4^+$ (Inspiré de Klein et al., 2000) (10).

Les deux classes de molécules sont des glycoprotéines possédant une structure tridimensionnelle très similaire constituée d'un domaine apparenté à la famille des immunoglobulines, d'une niche peptidique, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique dont la fonction de signalisation cellulaire n'est pas encore clairement définie (figure 1.1.3).

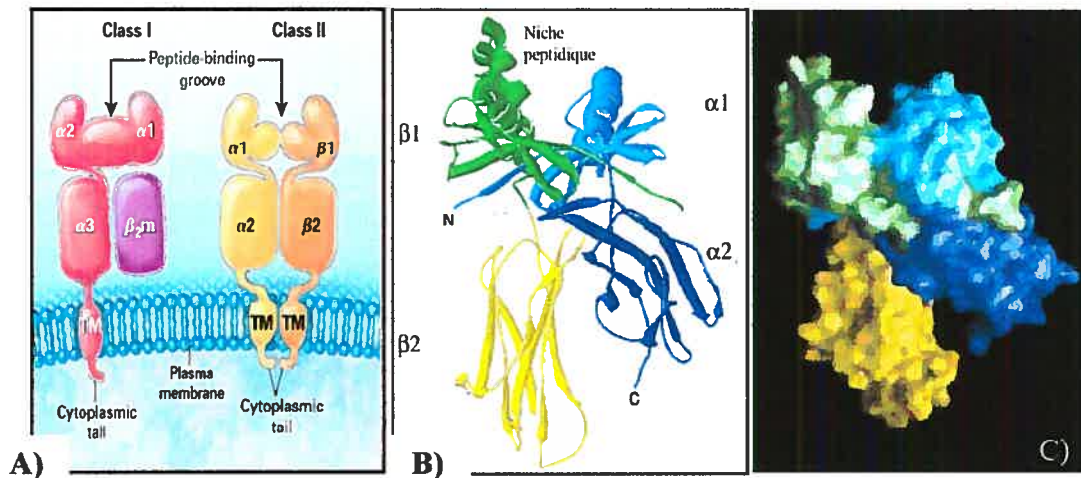


Figure 1.1.3 Structure des molécules classiques du complexe majeur d'histocompatibilité

A) Représentation schématique de la structure générale des molécules de classes I et II. La niche peptidique des classes I est formée par la chaîne α uniquement (domaine $\alpha 1$ et 2) alors que celle des classes II est formée par les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ (tiré de Klein et al., 2000) (10). B) et C) montrent respectivement le diagramme et la surface moléculaire de HLA-DR1 (code d'accès PDB 1AQD) obtenues par modélisation de la structure cristallographique (adapté de Murthy, VL et Stern, LJ., 1997) (16).

1.2 Les molécules classiques du CMH II

1.2.1 Structure et Organisation

On compte jusqu'à trois isotypes de molécules classiques du CMH II; HLA-DR, DQ et DP. Chacune de ces molécules est formée par l'association non covalente d'une chaîne α de 31 à 34 kDa et d'une chaîne β de 26 à 29 kDa codées par des gènes distincts. Pour chacune des chaînes α et β il existe de multiples allèles, donnant ainsi l'impressionnant polymorphisme du CMH II (Tableau 1). Par ailleurs, les deux chaînes sont glycosylées sur leur résidu asparagine au sein du motif Asn-X-Ser/Thr. Lorsque repliées, les chaînes α et β forment deux domaines extracellulaires $\alpha 1/\alpha 2$ et $\beta 1/\beta 2$, une région transmembranaire hydrophobe et un court domaine C-terminal cytoplasmique (figure 1.1.3 A et B).

Tableau I : Polymorphisme des molécules classiques du CMH II

Gene	nombre		
	Allèles	Protéines	Allèles nulles
<i>HLA-DRA</i>	3	2	0
<i>HLA-DRB</i>	511	419	7
<i>HLA-DQA1</i>	32	24	1
<i>HLA-DQB1</i>	62	54	1
<i>HLA-DPA1</i>	23	14	0
<i>HLA-DPB1</i>	121	108	2

Source IMGT/HLA database (http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/help/align_help.html)

Les premières structures cristallographiques des molécules de classe II classiques ont été obtenues par Joan Gorga du groupe Strominger en collaboration avec Don Wiley (17). Jusqu'à 7 haplotypes de HLA-DR dont DR1 (2.7 Å) furent cristallisés (7). Aujourd'hui, la plupart des molécules classiques du CMH II ont été cristallisées avec leurs différents ligands que sont les peptides liés, le TCR et le CD4 (16,18-22).

L'obtention de la structure cristallographique a grandement contribué à la compréhension de la présentation antigénique par les molécules du CMH I et II. Elle a permis, entre autres, une meilleure définition de l'organisation de la niche peptidique mais aussi une meilleure compréhension de l'interaction CMH-TCR. En effet, en plus de la nécessité de la reconnaissance du peptide, le récepteur de cellule T doit également être spécifique à la molécule du CMH II présentant le peptide (23).

Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ se replient pour former une niche dans laquelle viendra se loger les peptides alors que le domaine $\beta 2$ sert à arrimer le co-récepteur CD4 des lymphocytes T (figure 1.2.1). Le TCR quant à lui, interagit via ses domaines variables $V\alpha$ et $V\beta$ avec une région plus étendue du CMH II constituée du peptide antigénique lié et les hélices alpha des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ (figure 1.2.1) (18).

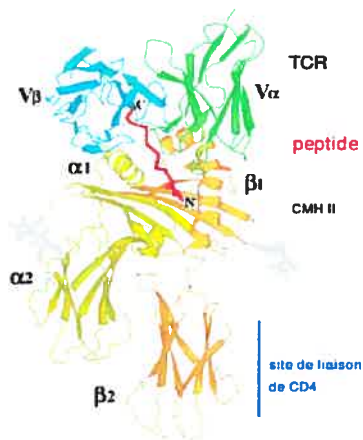


Figure 1.2.1 Site d'interaction du complexe CMH II – peptide avec le TCR et le CD4

Adapté de Reinherz *et al.*, 1999 (18).

1.2.2 Plancher α/β et liaison des peptides

À la différence des molécules de classe I qui lient des peptides relativement courts (8 à 10 résidus d'acides aminés), les molécules de classe II lient des peptides ayant une taille moyenne de 17 résidus et parfois même des protéines pleines longueurs (24-26) à cause de la structure ouverte de leur niche (23,27). Cette capacité à lier des protéines entières remet en question le modèle de genèse des épitopes de classe II qui veut que la dégradation de l'antigène précède le chargement des peptides sur la niche peptidique.

Grâce à la cristallographie, le contact entre le peptide et sa niche a été mieux défini. C'est l'équipe de Don Wiley qui fut la première à apporter une clarification en utilisant le peptide HA (résidu 306 au résidu 318) associé à HLA-DR1 (28). Leur étude montrait que le peptide HA adoptait une conformation polyproline hélicoïdale de type II (figure 1.2.2 A et B) et est retenu dans la niche par 13 ponts hydrogènes (figure 1.2.3) ainsi que l'ancrage de ses chaînes latérales dans 5 des pochettes de la niche (figure 1.2.2 B et C) (28). Les ponts hydrogènes, 15 au total, sont conservés chez la plupart des molécules de classe II, aussi bien chez l'homme que chez la souris (29). Par ailleurs, les pochettes (P1 à P10) (figure 1.2.2 C) sont fortement polymorphiques et sont responsables de la spécificité différentielle entre peptides et molécules de classe II (29).

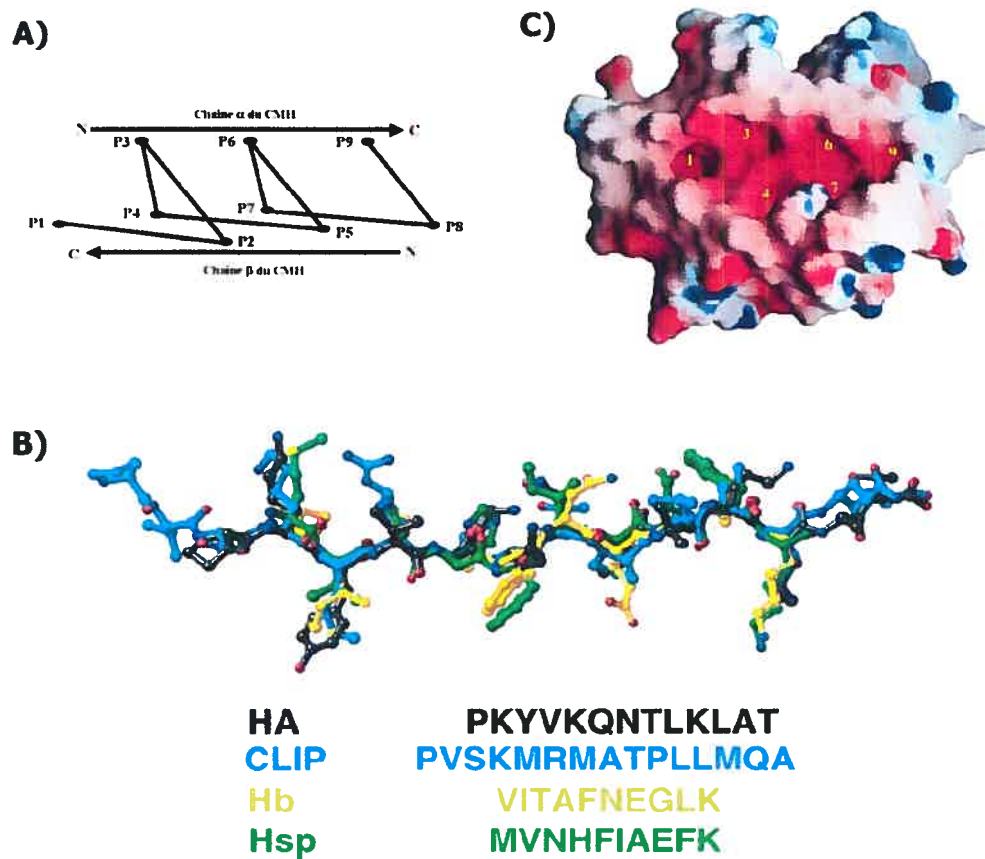


Figure 1.2.2 Orientation des peptides dans la niche des molécules classiques du CMH II

A) Schéma de la conformation en hélice polyproline de type II (ppII) des peptides occupant la niche peptidique des molécules de classe II. Les acides aminés P3, P6 et P9 occupent le même côté de l'hélice alors que les faces P3-P4 et P6-P7 du peptide pointent dans la niche. Les résidus du peptide sont identifiés dans l'ordre, de P1 à P9. **B)** Alignement de quatre peptides liés aux molécules de classe II. Les peptides, tous superposables, adoptent une structure hélicoïdale ppII. **C)** Représentation de la niche peptidique d'une molécule HLA-DR1. Les pochettes pouvant accueillir les chaînes latérales des peptides sont indiquées par des numéros (Inspiré de Batalia et Collins, 1997) (30)

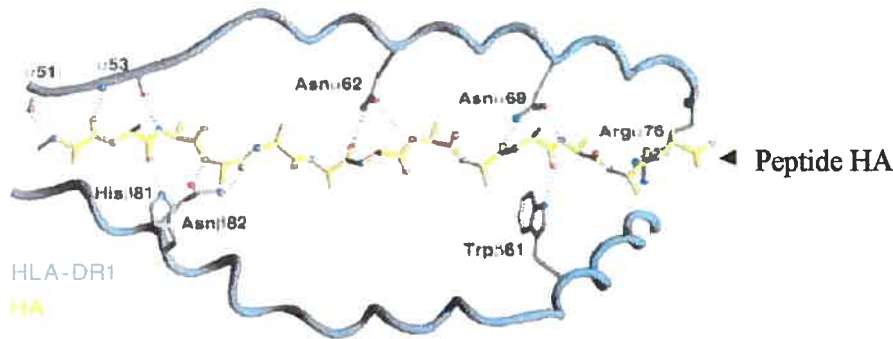


Figure 1.2.3 Ponts hydrogènes reliant le peptide HA à la niche de DR1

Représentation de la niche peptidique d'une molécule HLA-DR1 associée à un peptide HA. Une série de ponts hydrogènes conservés (lignes pointillées) permettent le contact entre la niche de la molécule de classe II et le peptide (Inspiré Stern *et al.*, 1994) (28)

1.2.3 Distribution et régulation de l'expression

1.2.3.1 Distribution tissulaire

Contrairement aux molécules du CMH I exprimées sur toutes les cellules nucléées, les molécules classiques du CMH II sont principalement exprimées sur un nombre limité de cellules, et cela de façon constitutive ou inducible. Ainsi chez les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), à savoir les cellules épithéliales thymiques, les lymphocytes B, les monocytes et macrophages ainsi que les cellules dendritiques, les molécules classiques du CMH II sont exprimées constitutivement. Chez d'autres cellules comme les cellules endothéliales, les cellules tumorales, les fibroblastes, les cellules musculaires, entre autres, l'expression peut être induite par plusieurs stimuli dont l'interféron γ (31).

Même si les CPA expriment constitutivement les molécules classiques du CMH II, cette expression peut être modulée par plusieurs facteurs dont le type cellulaire, l'état de maturation et la nature du stimulus immun. Ainsi chez les lymphocytes B, l'expression

atteint son maximum au stade mature des cellules, mais elle est régulée à la baisse lorsque les cellules passent au stade plasmocyte (27,31). Chez les cellules dendritiques immatures, les molécules de classe II nouvellement synthétisées sont majoritairement ciblées aux compartiments endolysosomiaux (32,33). Ces cellules en patrouille dans les tissus périphériques ont plutôt une grande capacité d'endocytose et le contenu internalisé est ciblé aux compartiments contenant les molécules de classe II. Une fois activées par des cytokines inflammatoires ou par des LPS (lipopolysaccharide bactérien), elles deviennent matures, réorientent les classes II vers la surface cellulaire et migrent aux organes lymphoïdes secondaires où elles vont activer les lymphocytes T (32,33).

1.2.3.2 Régulation de l'expression

La régulation primaire de l'expression des molécules classiques du CMH II se fait au niveau transcriptionnel par les facteurs spécifiques de transcription du CMH II; le facteur régulateur X (RFX) et le transactivateur de classe II (CIITA) (31,34). En effet, ces facteurs sont si indispensables que leur déficience chez certaines personnes a conduit au développement d'une immunodéficiences primaire nommée "Bare lymphocyte syndrome" (BLS) (35-37). L'importance du CIITA peut facilement être mise à l'épreuve. En effet sa simple transfection dans des cellules fibroblastiques comme les HeLa suffit à induire l'expression des molécules du CMH II.

La transcription est par ailleurs contrôlée via un promoteur proximal conservé d'environ 150 paires de bases situé immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription (31,34). Ce promoteur contient 4 éléments régulateurs en cis, respectivement les boîtes S, X, X2 et Y (figure 1.2.4), fortement conservés (31,34).

Jusqu'à plus de 20 facteurs nucléaires capables de lier chacun des 4 éléments régulateurs en cis ont été identifiés. Cependant c'est grâce aux études sur le BLS que l'importance et le niveau d'implication de chacun ont pu être éclairés (31,34). La boîte X est reconnue par un complexe trimérique de RFX (RFX5, RFXANK ou RFX-B et RFXAP), la boîte X2 par

X2BP (un complexe protéique CREB) et la boîte Y par un complexe trimérique de NF-YA, NF-YB et NF-YC (figure 1.2.4). Plusieurs facteurs peuvent lier la boîte S, cependant un seul a été identifié comme ayant une fonction *in-vivo* (34). La liaison de l'ensemble de ces facteurs sur leur site respectif conduit à la formation d'un grand complexe nucléoprotéique stable appelé enhancesome de CMH II qui va permettre le recrutement de CIITA (34). Une fois recruté, CIITA interagit avec les facteurs de transcription (TBP, TAF II 32, TAF II 70, TF II H, P-TEFb CBP) pour activer la transcription (figure 1.2.4) (31,34,38). Jusqu'à trois mécanismes d'action non exclusifs ont été proposés pour CIITA selon sa liaison avec chacun des facteurs d'activation de transcription. D'abord l'interaction avec les facteurs généraux de transcription comme TBP, TAFII 32 et 70 permet le recrutement de la machinerie de transcription et donc l'initiation de celle-ci. Ensuite, l'interaction avec TFII H ou P-TEFb peut permettre l'élongation de la transcription. Et finalement, l'interaction avec CBP qui a une activité acétylase permet le relâchement de la chromatine et permet donc un accès plus facile de l'ensemble de la machinerie de transcription au promoteur (31,34,38).

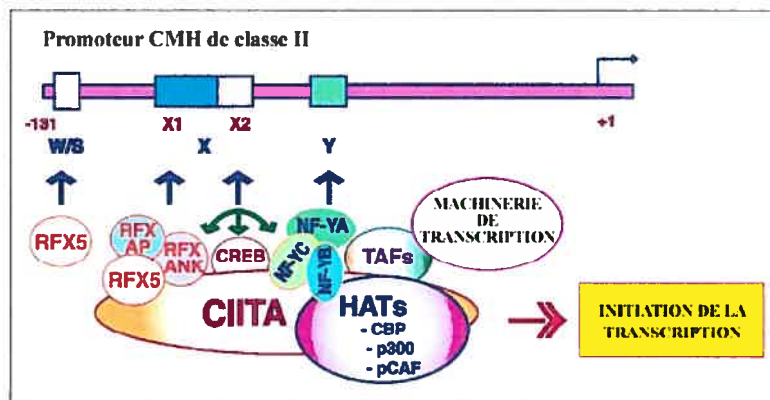


Figure 1.2.4 Complexe transcriptionnel du CMH II

Représentation du promoteur typique des gènes du CMH de classe II ainsi que les facteurs régulant leur expression (Inspiré de Ting *et al.*, 2002) (38)

1.2.3.3 CIITA et la distribution tissulaire des molécules classiques

Du moment que les facteurs de transcription des gènes de classes II sont aussi ubiquitaires, le contrôle de l'expression de ces gènes et par conséquent la distribution tissulaire spécifique des molécules de classe II peut être vu comme étant sous contrôle exclusif de CIITA. Ainsi la compréhension de la régulation de l'expression des gènes du CMH II passe nécessairement par celle du gène codant pour CIITA, le gène *MHC2TA*. La transcription de ce gène est contrôlée en fonction du type cellulaire par 4 promoteurs (PI à IV) situés en amont du site d'initiation de la transcription (figure 1.2.5). PI, PIII et PIV se retrouvent aussi bien chez l'homme que chez la souris alors que PII ne se retrouve que chez l'homme et son rôle est encore incompris. Alors que PI contrôle la transcription de *MHC2TA* chez les cellules dendritiques, PIII contrôle la transcription chez les lymphocytes B. Le promoteur PIV, quant à lui, contrôle la transcription inducible par l' $\text{INF}\gamma$ (figure 1.2.5) (34).

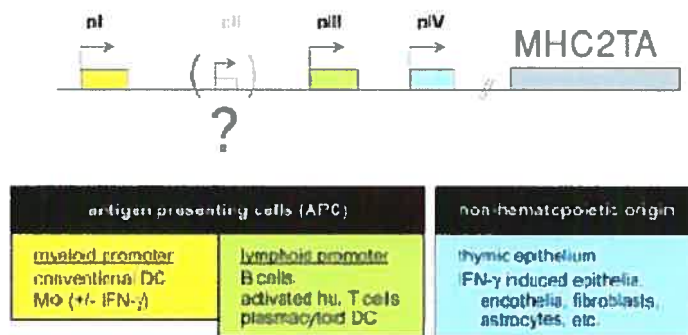


Figure 1.2.5 Promoteur MHC2TA

Promoteur contrôlant la transcription de CIITA en fonction du type cellulaire. Adapté de LeibundGut-Landmann et al., 2004 (34)

En plus de contrôler l'expression des molécules classiques du CMH II, CIITA avec RFX contrôlent également la transcription des gènes codant pour la chaîne invariante, HLA-DM et HLA-DO β (voir plus loin) qui sont des molécules indispensables au bon fonctionnement de la présentation antigénique par les classes II. Par ailleurs, CIITA peut également transactiver les promoteurs des gènes codant pour les molécules du CMH I et la β 2 microglobuline (chaperon des molécules de classe I). Cependant, cette fonction n'est pas indispensable pour l'expression de ces gènes (34). En effet, même en son absence, les molécules de classes I sont exprimées.

1.2.4 Présentation antigénique par les molécules classiques du CMH II

La présentation antigénique par les classes II classiques requiert que certaines conditions soient remplies (figure 1.2.6). Brièvement, on peut citer parmi ces conditions le bon assemblage des molécules classiques suite à leur synthèse au RE, leur ciblage vers les compartiments endolysosomiaux dans lesquels se fait le chargement proprement dit des antigènes, l'internalisation de l'antigène, sa dégradation en peptides suivi du chargement de ceux mieux adaptés à la niche et finalement le transport des complexes CMHII-peptide à la surface cellulaire. Cependant l'ordre de ces différents événements ainsi que les compartiments dans lesquels ils se déroulent ne sont pas encore totalement élucidés.

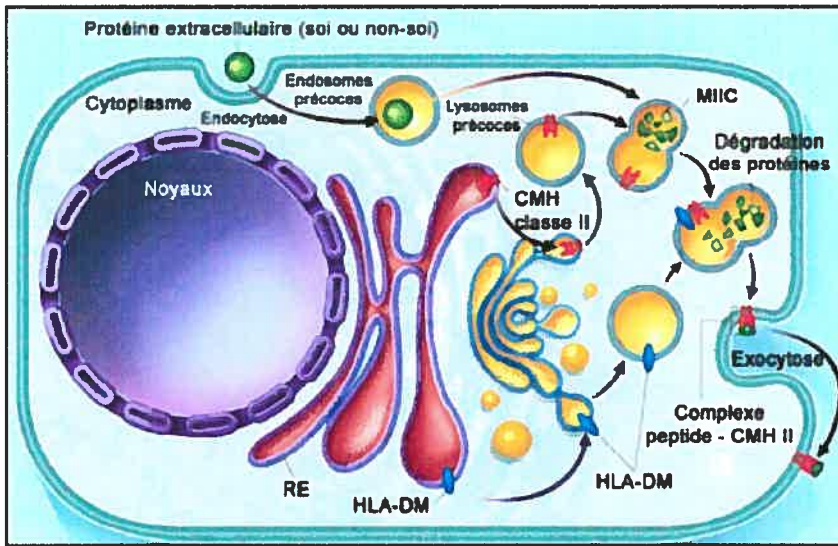


Figure 1.2.6 Voie de présentation antigénique par les molécules du CMH II

Des protéines extracellulaires du soi ou étrangères sont internalisées par endocytose (ou phagocytose) et dégradées dans les endosomes. Au niveau des MIIC, le fragment CLIP sur les classes II sera échangé pour un peptide issu de la dégradation de l'antigène internalisé. Cet échange est catalysé par la molécule HLA-DM. Les complexes CMH II / peptide seront alors présentés à la surface aux lymphocytes T $CD4^+$. (Adapté de Klein, J. et Saton., 2000) (10).

1.2.4.1 Biosynthèse et assemblage des complexes classe II-Ii

Les sous-unités α et β des molécules du CMH II sont des glycoprotéines de type I. Suite à leur traduction, elles sont transloquées à l'intérieur du RER grâce à leur signal N-terminal. Ces signaux sont par la suite clivés et les chaînes α et β sont intégrées au sein de la membrane du réticulum endoplasmique par leur domaine transmembranaire hydrophobe (39). Les chaînes α et β doivent par la suite s'associer à la chaîne invariante (Ii) pour compléter leur assemblage. Ii est une protéine de type II et contrairement aux chaînes α et β des molécules de classe II, aucun signal ne sera enlevé. En effet, suite à sa traduction, le domaine transmembranaire joue le rôle de séquence signal et cible le domaine C-terminal dans le RE (39). Trois unités de Ii s'associent pour former un complexe trimérique sur

lequel s'ajoute d'abord, un hétérodimère classe II $\alpha\beta$, et ensuite deux autres (39,40). L'ensemble forme ainsi un complexe nonamérique $(\text{classe II}\alpha\beta)^3\text{-(Ii)}^3$ (figure 1.2.7) qui va être dirigé vers la voie sécrétoire.

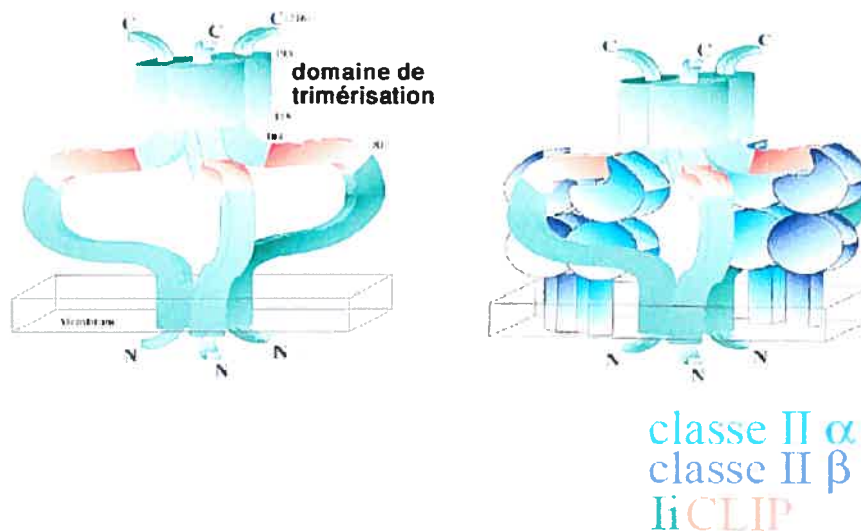


Figure 1.2.7 Complexe nonamérique classe II-Ii

Le panneau de gauche montre un trimère de chaînes invariantes, tandis que celui de droite représente un modèle du complexe classe II / Ii (Une des molécules de classe II est absente du modèle afin d'alléger la figure). La région responsable de la trimérisation de la chaîne invariante est indiquée ainsi que le CLIP (class II invariant chain associated peptide) (Adapté de Cresswell, P. Cell ; 1996) (41).

1.2.4.2 Importance de la chaîne invariante dans la maturation des molécules de classe II classiques

La chaîne invariante joue un rôle fondamental dans la maturation des molécules classiques du CMH II. En effet les dimères α/β de classe II formés en absence de la chaîne invariante sont très faiblement exprimés à la surface cellulaire, comme ça a été montré chez des cellules transfectées avec les chaînes α et β seules et chez des souris dont le gène Ii a

été inactivé. L'examen microscopique de telles cellules révèle une accumulation des molécules de classe II classiques dans le RE et les protéines semblent être retenues par des chaperons résidents du RE (BiP, GRP94 et ERp72) du fait de leur mauvais repliement (42). Par ailleurs, chez ces cellules n'exprimant pas Ii, une petite portion de classes II α/β atteint tout de même la surface cellulaire. Cependant ces molécules ne parviennent pas à réagir avec certains anticorps anti-classe II conformationnels et ne parviennent pas non plus à présenter certains peptides, confirmant ainsi l'idée d'un mauvais repliement malgré qu'elles aient atteint la surface cellulaire (39).

Une fois assemblées dans le RE avec Ii, les molécules de classe II classiques transitent au Golgi puis aux compartiments endolysosomiaux pour rencontrer les peptides antigéniques. La sortie du RE des classes II classiques est une étape médiée par Ii. En s'associant avec la chaîne invariante, les molécules de classe II atteignent leur bon repliement et du coup échappent à la rétention par les chaperons du RE (40). Par ailleurs, il a été également démontré que les complexes classe II α/β -Ii partiellement assemblés sont associés à la calnexine, un autre chaperon du RE, et ne montrent pas de résistance à l'Endo-H; un caractère qui ne s'acquiert qu'au niveau du Golgi suite à la glucosylation. Par contre, les complexes nonamériques classe II α/β / Ii proprement assemblés ne sont pas associés à la calnexine et possèdent des sucres acquis dans le Golgi (43). Le rôle chaperon de la chaîne invariante a également une autre importance notamment dans la stabilisation de la niche des classes II et l'inhibition de la liaison de peptides endogènes grâce à sa portion CLIP.

1.2.4.3 Ciblage des molécules classiques du CMH II aux compartiments endolysosomiaux par la chaîne invariante

Contrairement à la voie sécrétoire classique qui conduit les glycoprotéines membranaires, incluant celles du CMH I, directement à la surface cellulaire à partir du réseau trans-Golgien, les complexes classe II α/β -Ii sont dirigés vers la voie endocytaire (39,40,44). Toutefois il s'avère difficile à infirmer la possibilité d'un ciblage en surface

suivi d'une rapide internalisation (40). En effet, il a été montré pour certaines protéines qu'il existait une ré-internalisation via le récepteur de mannose 6-phosphate qui agit comme voie de secours (39). Dans le réseau trans-Golgien, ce récepteur lie des glycoprotéines via le mannose 6-P et les dirige directement au lysosome. Cependant un certain nombre de récepteurs de mannose 6-P exprimés à la surface cellulaire peut aussi lier les glycoprotéines ayant "accidentellement" atteint la surface et les renvoyer au lysosome par endocytose (39).

En plus du signal mannose 6-P, la ré-internalisation rapide des protéines peut se faire via des motifs de Leucine ou Tyrosine de types LZ et YXXZ/NXXY où Z est un acide aminé hydrophobe (Leu, Ile, Val, Met, Ala, Cys). Ces motifs sont localisés dans la queue cytoplasmique des protéines et il en existe deux (motif LZ) chez la chaîne invariante qui permettraient le ciblage des complexes $\alpha\beta$ -Ii aux compartiments endolysosomiaux ainsi que la ré-internalisation depuis la surface cellulaire (40).

1.2.4.4 Dégradation de la chaîne invariante

Une fois engagés dans le réseau de compartiment endolysosomiaux, les molécules de classe II sont progressivement débarrassées de leur chaperon Ii par des protéases pour faire place aux peptides antigéniques. La dégradation de la chaîne invariante est initiée par les endopeptidases reconnaissant un motif d'asparagine (27). Les protéases lysosomiales telles que les cathepsines B, D E, L et S sont responsables des étapes ultérieures de la dégradation, cependant, leur participation individuelle reste encore difficile à évaluer (27).

La chaîne invariante n'est pas dégradée dans son intégralité. Un fragment nommé CLIP (class II associated invariant chain) est laissé sur la niche peptidique (figure 1.2.8). Pour qu'un peptide soit chargé sur le dimère $\alpha\beta$, CLIP doit être dissocié. Chez certains allèles du CMH II classique et dans l'environnement relativement acide des compartiments cellulaires, CLIP peut s'extirper spontanément. Cependant, la plupart du temps la dissociation requiert l'aide de la molécule non classique HLA-DM (45).

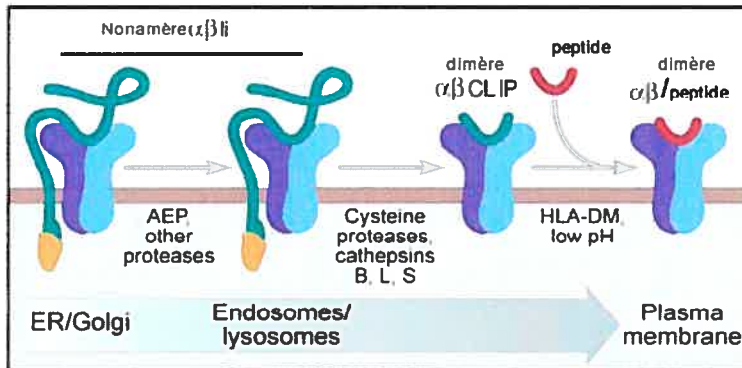


Figure 1.2.8 Vue d'ensemble de la dégradation de la chaîne invariante

La chaîne invariante est dégradée par différente protéase à l'exception de CLIP dont HLA-DM catalyse le remplacement par un autre peptide. Adaptée de Trombotta *et al.*, 2005. (27)

1.2.4.5 Compartiments de chargement des peptides

Suite à leur endocytose, les protéines exogènes antigéniques voyagent à travers le réseau de compartiments endosomiaux pour atteindre les lysosomes qui sont le principal site de protéolyse intracellulaire. L'acidification progressive du réseau de compartiments et la réduction des ponts disulfures par GILT (γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase) dans les lysosomes dénaturent progressivement les structures complexes des protéines internalisées, permettant ainsi l'accès des protéases comme la cathepsine S à leurs sites de clivage (40,46).

Les lysosomes et/ou les endosomes tardifs ont longtemps été considérés comme le site dans lequel se fait le chargement de peptides du fait qu'ils sont les principaux compartiments de protéolyse (27). Cependant, dans la plupart des cellules, la protéolyse lysosomale est excessive et le transport membranaire entre le lysosome et la membrane plasmique est relativement inefficace. Par ailleurs, malgré que les endosomes soient très efficaces pour le recyclage, ces compartiments n'accablent pas de classe II et les protéines internalisées

n'y résident que brièvement (27). De cette analyse sommaire, on se rend à l'évidence de la difficulté à statuer sur la nature des compartiments de chargement.

Plusieurs autres études réalisées avec des lymphocytes B, macrophages et cellules dendritiques ont permis la caractérisation de compartiments dans lesquels s'accumulent des molécules de classe II classiques ainsi que HLA-DM (figure 1.2.9). Toutefois, ces compartiments nommés MIIC ont été par la suite caractérisés comme étant des endolysosomes conventionnels (27,47,48). Par ailleurs, HLA-DM est distribué sur tout le réseau endosomal (48), suggérant qu'il continue à exercer sa fonction de catalyseur de dissociation de CLIP et/ou d'éditeur de peptides (figure 1.2.9). La difficulté apparente à identifier le site de chargement de peptides peut être très révélateur quant à l'importance de cette étape. En effet, la large distribution des classes II à travers le réseau de compartiment (figure 1.2.9) pourrait accroître le répertoire de peptides présentés par les molécules de classe II.

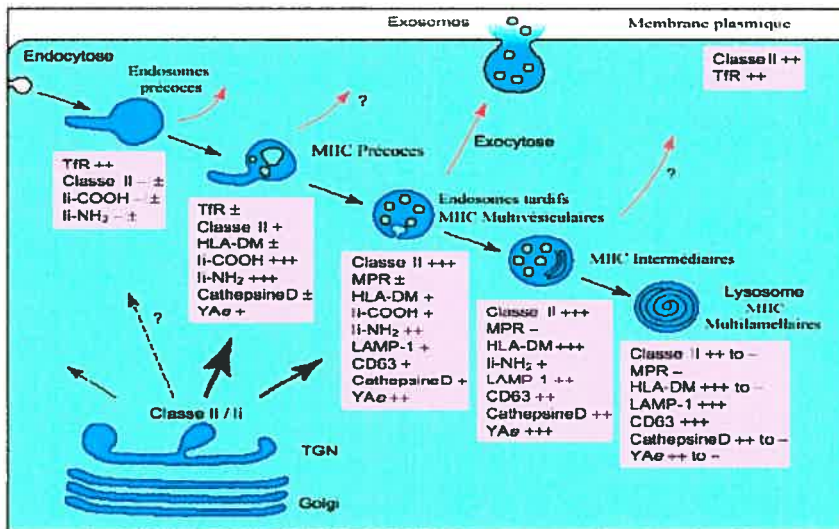


Figure 1.2.9 Voie endosomale et ciblage molécules du CMH II

Après leur passage dans le réseau trans-golgien (TGN), les molécules de classe II passent par la voie endosomale pour atteindre les lysosomes. Une petite partie se rend en surface pour être ensuite ré-intériorisée, alors qu'une grande portion est dirigée directement aux MIIC précoces ou aux endosomes tardifs (flèches noires). Les complexes CMHII-peptides quitteraient la voie endosomale de plusieurs façons (flèches rouges). La liste des marqueurs est indiquée pour chaque compartiment. Abréviations : Ii = chaîne invariante, LAMP-1 = lysosome-associated membrane protein, MIIC = MHC class II compartment, MPR = mannose 6-phosphate receptor, TfR = transferrin receptor. (Figure adapté de Geuze, 1998) (49)

Le problème de l'identification du site de chargement soulève une autre question fondamentale, à savoir si la génération des peptides précède leur chargement ou l'inverse (figure 1.2.10). Même si le premier modèle est celui le mieux accepté, certaines données soulèvent des points qui vont à son encontre. En effet, des peptides de 10 à 15 résidus présentés par les classes II ne s'accumuleraient que très rarement dans les compartiments endocytaires, ce qui réduit la possibilité de chargement (27). Un modèle alternatif suggère que les protéines internalisées soient chargées sur la niche avant leur dégradation protéolytique (50). L'ouverture de la niche peptidique des classes II permet en effet la réception de long peptides ou même de protéines pleine longueur (24,26). Les protéines

chargées sur la niche seraient ensuite dégradées à partir des extrémités débordantes alors que la région en contact direct avec la niche est protégée et par la même occasion, les épitopes sont préservés de la destruction (51,52).

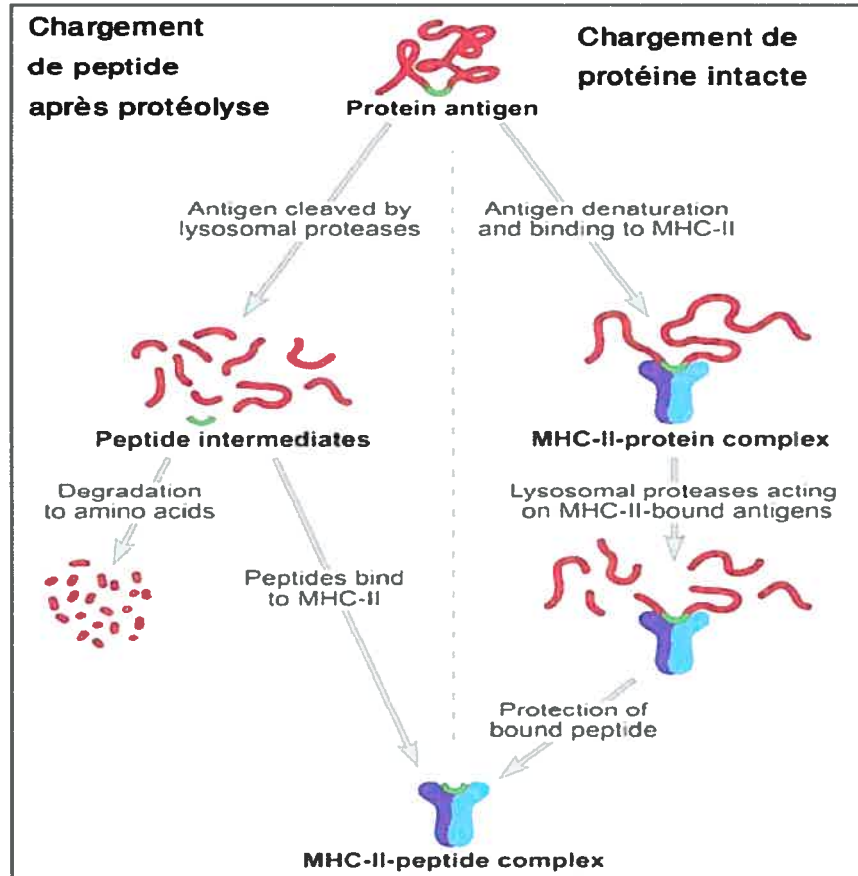


Figure 1.2.10 Voies d'apprêtement des antigènes présentés par les classes II

Dans le modèle chargement de peptides (partie gauche), les protéines internalisées par les CPA sont dégradées par les protéases du lysosome. Sous l'action de la protéolyse, la majeure partie des protéines internalisées est dégradée en acides aminés, et les quelques peptides ayant survécu sont chargés sur la niche peptidique. Dans le modèle de capture/protection d'épitopes, la protéine intacte est chargée sur la niche et les bouts débordants sont dégradés alors que la portion dans la niche est protégée. Adapté de Trombotta *et al.*, 2005 (27)

1.2.4.6 Transport des complexes CMH II – peptide à la surface des cellules présentatrices d'antigènes

Les complexes CMH II-peptide antigéniques formés dans les compartiments de chargement doivent être transportés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes afin qu'ils interagissent avec les TCR des lymphocytes T CD4⁺. Le mécanisme par lequel s'effectue ce transport n'est pas encore clairement défini, cependant, il existe plusieurs possibilités. Le premier mécanisme envisageable est celui du transport direct des compartiments de chargement MIIC à la surface cellulaire grâce à des transporteurs de vésicules, ou par fusion directe des MIIC avec la membrane plasmique. Ainsi en utilisant des molécules de CMH II dont la chaîne β est couplée à la GFP, Wubbolts *et al* (53) ont montré chez la lignée Meljuso (des cellules de mélanome) que des vésicules contenant des complexes CMH II-peptide se déplaçaient vers la surface cellulaire et fusionnaient avec la membrane plasmique. Par ailleurs, en utilisant de la "vidéo microscopique", Chow *et al.*, (2002) ont montré chez des cellules dendritiques matures que le transport des molécules de classe II se faisait via des structures tubulaires se formant au lysosome et qui se déplaçaient pour fusionner avec la membrane plasmique (54). Le transport des complexes classe II-peptide via des vésicules depuis le lysosome avait été précédemment décrit par Turley *et al.*, (2000) et dans leur étude, les auteurs montraient que ce transport dépend des filaments d'actine (55).

Le transport des complexes classe II-peptide peut également se faire via les corps multivésiculaires qui par exocytose libèrent leurs exosomes dans le milieu extra cellulaire (56) (figure 1.2.11). Des études ont en effet montré que des exosomes sécrétés par les cellules présentatrices d'antigènes contenaient des complexes CMH II-peptide qui peuvent stimuler la prolifération de lymphocytes T (45,56).

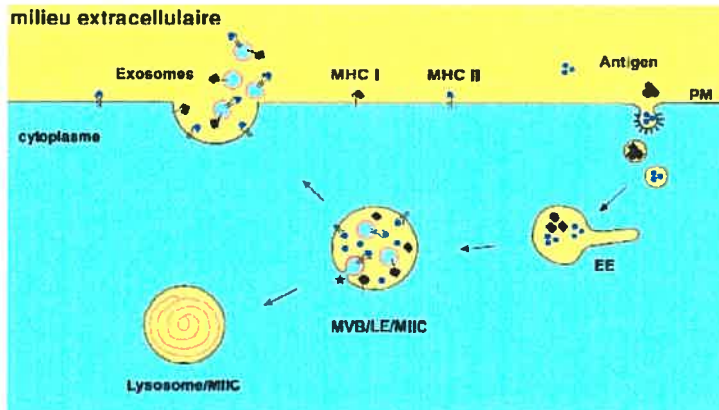


Figure 1.2.11 Modèle de formation des exosomes et transport en surface des complexes CMH II – peptide.

Suite à leur internalisation, les antigènes voyagent des endosomes précoces aux compartiments tardifs (MVB, LE, MIIC). Tout au long du trajet, ils sont progressivement dégradés et les peptides sont chargés sur les classes II. Les complexes classe II/peptide sont ensuite transportés à la surface cellulaire soit par fusion membranaire ou par exocytose. Adapté de Denzer K *et al.*; 2000 (56). MVB = multivesicular bodies (corps multivésiculaires), LE = late endosome (endosome Tardif), EE = early endosome (endosome précoce), PM = plasma membrane (membrane cytoplasmique).

Suite à la fusion des MIIC avec la membrane plasmique, les complexes classe II-peptide seraient retenues en surface et les molécules assistant le chargement de peptides telles que HLA-DM et les autres chaperons pourraient être ré-internalisées très rapidement grâce à leurs motifs de ciblage/internalisation (45). Alternativement, les chaperons pourraient également être triés avant l'arrivée des vésicules de transport à la surface cellulaire comme décrit par Turley *et al.*, (2000). En effet, les auteurs observent une exclusion des protéines résidentes du lysosome tels que LAMP1 et H2-M des vésicules nommées CIIV (class II containing vesicle) contenant les complexes classe II/peptide alors que des molécules co-stimulatrices comme B7 étaient retenues (55). Les compartiments CIIV avaient déjà été décrits comme moyen de transport des complexes classe II-peptide chez la lignée A20 de lymphocytes B (57) et chez des cellules dendritiques en stade de maturation intermédiaire (32). Cependant, malgré la ressemblance morphologique aux compartiments MIIC, la

relation entre les deux n'a pas encore été clairement établie. Toutefois, la présence des marqueurs lysosomiaux et des molécules chaperon dont DM dans les compartiments MIIC et leur exclusion des compartiments CIIV suggèreraient que ces derniers sont un compartiment intermédiaire dans le transport des complexes classe II/peptide vers la surface depuis les MIIC.

Pour ce qui est des exosomes, un tri moléculaire pourrait également se faire avant l'exocytose. En effet, des travaux ont montré que les exosomes, en plus de contenir des molécules de classe II, sont enrichis en plusieurs tétraspanes dont CD37, 53, 63, 81 et 82, alors que DM, Lamp-1 et 2 étaient principalement absents (58).

1.3 Les molécules non classiques du CMH II

En plus de la chaîne invariante qui joue un rôle fondamental dans la maturation et le ciblage des molécules de classe II classiques, d'autres molécules accessoires nommées HLA-DM et HLA-DO interviennent également dans la présentation antigénique par le CMH II. DM joue un rôle fondamental dans le chargement des peptides en catalysant la dissociation de CLIP, et DO intervient en agissant comme modulateur de l'activité de DM. Les gènes codant pour ces deux molécules appartiennent à la région II du locus du CMH. Cependant pour certaines caractéristiques comme l'absence de polymorphisme (tableau II), l'incapacité à lier des peptides (figure 1.3.1) et la localisation lysosomale (59-61), on les appelle des molécules non classiques du CMH II par opposition à DR, DP et DQ qui sont les molécules classiques (62).

Tableau II Polymorphisme très limité de HLA-DM et HLA-DO

Gene	nombre		
	Allèles	Protéines	Allèles nulles
<i>HLA-DRA</i>	3	2	0
<i>HLA-DRB</i>	511	419	7
<i>HLA-DQA1</i>	32	24	1
<i>HLA-DQB1</i>	62	54	1
<i>HLA-DPA1</i>	23	14	0
<i>HLA-DPB1</i>	121	108	2
<i>HLA-DMA</i>	4	4	0
<i>HLA-DMB</i>	7	7	0
<i>HLA-DOA</i>	12	3	1
<i>HLA-DOB</i>	9	4	0

Adapté de European Bioinformatic Institute / Immunogenetic database

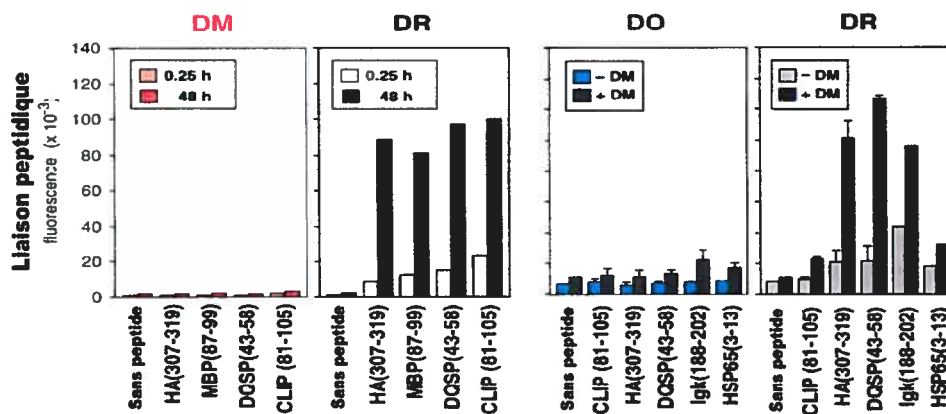


Figure 1.3.1 Inhabilité des molécules non classiques à présenter des peptides

Les molécules HLA-DM et HLA-DO purifiées ne lient aucun des peptides (CLIP, HA et MBP) connus pour leur haute affinité pour HLA-DR (Inspiré de Kropshofer *et al.*, 1999), (63).

1.4 HLA-DM

1.4.1 Régulation de l'expression et distribution tissulaire

HLA-DM comme les molécules de classe II classiques est un hétérodimère formé d'une chaîne α et d'une chaîne β codées respectivement par les gènes *DMA* et *DMB* (identifiés en 1991 dans la région II du CMH humain) fortement conservés chez plusieurs espèces (15). Les deux gènes sont situés côte à côte entre *LMP2/TAP* et *DOA* (figure 1.1.1) et leur transcription est régulée par CIITA et RFX (revue dans (63)) mais impliquerait également d'autres facteurs. En effet, un niveau basal d'expression de H2-M persiste chez des souris déficientes en CIITA et RFX5 (62). De même, Fling *et al.*, (1997) ont identifié une CPA déficiente en DM mais sans pour autant que le locus de celui-ci soit altéré et cette déficience pouvait être complétée par le mutant T2 dont toute la région II a été enlevée (64).

La distribution tissulaire de HLA-DM suit celle des molécules de classe II classiques. En effet, toutes les CPA expriment HLA-DM et cette expression est également inductible par l'INF γ comme c'est le cas pour les molécules de classe II classiques chez les CPA non professionnelles (62).

1.4.2 Ciblage et distribution cellulaire

Suite à leur transcription, *DMA* et *DMB* sont traduits respectivement en des protéines matures de 26-35 et 27-31KDa glycosylées (62,65). Les chaînes α et β nouvellement synthétisées s'assemblent dans le RE pour former un dimère. Cependant, contrairement aux classes II classiques nouvellement synthétisées, une association physique avec la chaîne invariante n'est pas requise pour le bon assemblage ni pour la sortie du RE (62,66,67).

Suite à sa maturation dans le Golgi, HLA-DM est exportée vers les compartiments endolysosomiaux. Contrairement aux molécules de classe II classiques qui ne font que transiter par ces compartiments pour le chargement des peptides, DM est un résident permanent (62). Toutefois, une certaine portion peut se retrouver en surface, notamment chez les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Cette expression de DM en surface a, par ailleurs, été associée au chargement de peptide sur les classes II en surface et/ou celui dans les compartiments de recyclage des endosomes précoces (68,69). Le ciblage et possiblement le maintien de DM dans les compartiments endolysosomiaux sont contrôlés par le motif conservé YTPL (résidus 226-229) dans la queue cytoplasmique de la chaîne DM β (67,70). En effet, l'inactivation de ce motif par une mutation du résidu β Y226 en A conduit au ciblage de la molécule DM à la surface cellulaire. Par ailleurs, DM, tout comme les complexes classe II-Ii transiterait du réseau trans Golgien vers les endosomes, bien que les deux seraient transportés dans des vésicules distinctes (71). Ferrari *et al.*, (1997) rapportent que les complexes classe II-Ii seraient d'abord transportés dans des compartiments libres de DM dans lesquels la chaîne invariante serait dégradée. Par la suite, les complexes classe II-CLIP générés seraient transportés dans les compartiments de chargement contenant DM (72). Toutefois plusieurs groupes ont montré que DM est présent dans tous les compartiments (49,73,74), même si la majorité se trouve dans les MIIC. En effet, en utilisant un immunoblot quantitatif, Schafer *et al* (1996) ont montré qu'il y avait 23 fois plus de classes II que de DM au total. Cependant dans les compartiments MIIC, ce rapport était ramené à 5 DR pour 1 DM (75).

1.4.3 HLA-DM et la présentation antigénique par les molécules de classe II classiques

1.4.3.1 Structure

Malgré la très faible homologie de séquence avec les molécules de classe II classiques, environ 25% seulement, la structure globale de l'hétérodimère DM $\alpha\beta$ est très similaire à celle des molécules classiques (figure 1.4.1) (76,77). Le repliement des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ forme une structure ressemblant à la niche des molécules de classe II classiques (figure 1.4.1). Cependant le domaine $\beta 1$ de DM forme jusqu'à trois protubérances qui font disparaître toutes les pochettes de la niche à l'exception de celle centrale (Figure 1.4.2) dont la fonction n'est toujours pas connue (63,76,77). Par ailleurs, certains auteurs suggèrent que DM serait devenu trop rigide à cause de la présence de ponts disulfures supplémentaires qui empêchent la flexibilité entre les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ (77). Cette modification majeure empêcherait ainsi HLA-DM de lier des peptides.

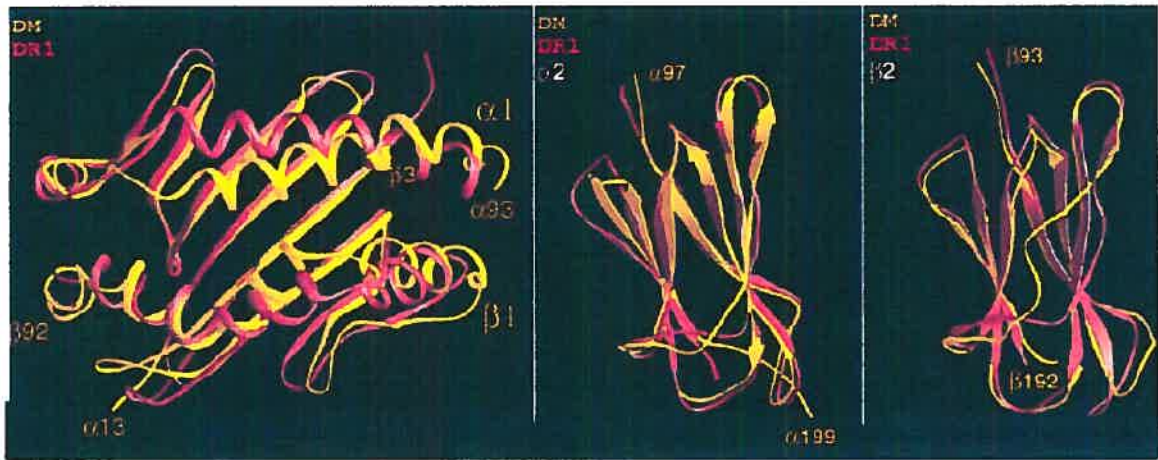


Figure 1.4.1 La structure tridimensionnelle de HLA-DM est similaire à celle de DR

La superposition des différents domaines de HLA-DM et DR montre la ressemblance dans la structure globale des deux molécules. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ de HLA-DM sont plus rapprochés, obstruant presque totalement la niche peptidique (Adapté de Mosyak et al., 1998) (76).

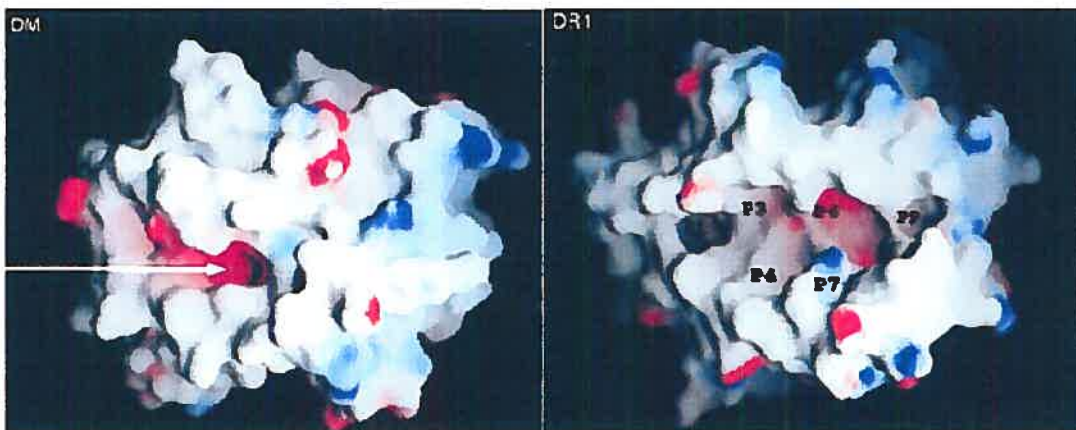


Figure 1.4.2 Le plancher de HLA-DM possède une seule pochette fossile

La niche peptidique de HLA-DM est refermée sur elle-même à l'exception de la pochette centrale et ne lie pas de peptides comparativement à celles des classes II classiques, ici DR1 (Adapté de Mosyak et al., 1998) (76).

1.4.3.2 Rôle dans l'échange de CLIP et le chargement des peptides

En utilisant un système de transfection de cellules n'exprimant pas HLA-DM de façon naturelle contrairement aux APC, et des lignées de lymphocytes B dont le gène *HLA-DM* a été inactivé, Fling *et al* (1994, 1997) (64,78) ainsi que plusieurs autres groupes (79-81) ont montré que HLA-DM avait un rôle fondamental dans l'assemblage intracellulaire des complexes classe II-peptide. En effet en absence de DM, les molécules classiques étaient principalement associées à CLIP alors que suite à sa ré-introduction, CLIP était remplacé par d'autres peptides. Cette fonction de DM a été confirmée par la suite dans un système acellulaire où il a été montré que la catalyse de la dissociation de CLIP et le chargement d'autres peptides sur les molécules de classe II classiques suivaient le niveau de DM (80,82,83).

Du fait de sa localisation dans les endolysosomes, la fonction physiologique de DM devrait vraisemblablement être affectée par le pH. En effet, les tests *in vitro* ont confirmé l'activité maximale de DM dans un intervalle de pH de 4.5 à 5.5 (80,82), le pH typique des endolysosomes. HLA-DM est également capable de moduler le chargement de peptides à un pH neutre; cependant, la dissociation de CLIP n'est pas accéléré à ce pH (80,82). Cette activité au pH neutre suggèrerait que dans les compartiments ayant ce pH, par exemple les endosomes précoces et ceux de recyclage, DM pourrait catalyser le remplacement de certains peptides par d'autres, augmentant ainsi le répertoire de peptides antigéniques.

Bien qu'il ne soit pas clairement démontré que HLA-DM est une enzyme (62), la dissociation de CLIP et le chargement des peptides en présence de DM ressemblent à un phénomène dépendant d'une activité enzymatique. En effet, il existe beaucoup moins de molécules HLA-DM qu'il en existe de molécules classiques (75,80) et lors des tests de dissociation de CLIP associé à DR1 et DR2, l'activité de DM affichait un K_m (constante de Michaelis-Menten) de 500 à 1000 nM (84).

1.4.3.3 Rôle de chaperon dans la stabilisation des classes II vides

Les molécules de classe II non chargées de peptides sont instables. Elles s'agrègent et se dénaturent au pH endolysosomal (85-87). HLA-DM en plus de catalyser la libération de CLIP, agirait comme stabilisateur des classes II libres de peptides. En effet, il a été montré *in vitro* qu'en absence de peptides et au pH endo-lysosomal, les complexes DR s'agrègent et deviennent inactifs; cependant, la co-incubation avec DM les stabilise (88,89). Ainsi, en agissant comme chaperon, HLA-DM favorise d'une certaine façon la maturation des classes II et les maintient aptes à lier des peptides. Cette fonction est d'une importance capitale dans les conditions protéolytiques des lysosomes. En effet, à cause de cette protéolyse, la demi-vie des peptides est réduite alors que les épitopes doivent être préservés.

1.4.3.4 Rôle dans la sélection/édition des peptides antigéniques et épitopes

En plus de catalyser la libération de CLIP, HLA-DM peut également agir positivement ou négativement sur le chargement d'un peptide en fonction de l'affinité de celui-ci pour la niche peptidique. HLA-DM catalyserait préférentiellement la dissociation des peptides dont l'ancrage des chaînes latérales n'est pas optimale (90). Cette fonction de DM comme éditeur de peptides a été démontrée par plusieurs études biochimiques. En séquençant le pool de peptides élués des molécules classiques de classe II isolées à partir de lysats de cellules présentatrices d'antigènes, ces études ont mis en évidence l'augmentation du répertoire de peptides présentés par les classes II en présence de HLA-DM (90,91). Le changement du répertoire de peptides par DM a également été montré par plusieurs autres types d'études dont la chromatographie en phase liquide, la spectrométrie de masse, et les tests fonctionnels utilisant des cellules T allo-réactive et leurs peptides spécifiques (11). Par ailleurs, HLA-DM a été impliqué dans la modulation de la présentation de l'épitope du

MBP (myelin basic protein) associé à la sclérose en plaques (68) ainsi que l'épitope 273–285 de GAD associé au diabète de type I (92).

Toutefois, il est important de noter que la fonction éditrice de DM ne se limite pas qu'aux compartiments endolysosomiaux (92) où sont destinés les molécules de classe II nouvellement synthétisées et les antigènes internalisés. L'édition des peptides peut également s'effectuer dans les vésicules de recyclage ou endosomes précoces (68).

Ainsi, HLA-DM aurait jusqu'à trois fonctions principales dans la présentation antigénique par les molécules de classe II classiques; d'abord la catalyse de la dissociation de CLIP, ensuite la stabilisation des molécules de classe II vides et finalement la catalyse de l'échange de peptides ayant une faible affinité (figure 1.4.3).

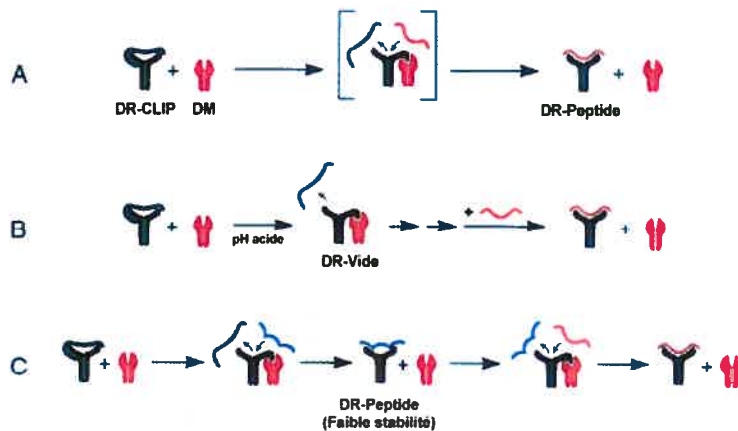


Figure 1.4.3 Les fonctions de HLA-DM dans la présentation antigénique par les classes II

A) Catalyse de l'échange peptidique par DM. En se liant à DR, DM permet la relâche du peptide CLIP et permet la liaison d'un peptide de plus forte affinité (rouge). **B)** Stabilisation de la classe II par DM. Dans l'éventualité où la molécule de classe II ne trouverait pas de peptides à lier dans sa niche (DR-vidé), DM agit comme chaperon pour empêcher qu'elle s'agrège et devient incapable à lier les futurs peptides. **C)** Édition de peptides par DM. Dans l'éventualité où CLIP serait échangé pour un peptide instable (bleu), DM peut réengager la molécule de classe II afin d'échanger ce peptide pour un peptide de plus haute stabilité (Adapté de Kropshofer *et al.*, 1999) (63).

1.4.4 Association entre HLA-DM et HLA-DR

Une interaction physique entre HLA-DM et HLA-DR avait déjà été suggérée afin d'expliquer la relâche de CLIP. Cependant, ce n'est que plus tard que Sanderson *et al.*, (1996) (93) en ont apporté la preuve en co-précipitant les deux molécules avec des anticorps conformationnels dans des conditions de faible pH et dans le détergeant non ionique de digitonine. Parallèlement Denzin *et al* (1996) (94) montraient des résultats similaires en utilisant un marquage métabolique avec la ³⁵S en plus de la coprécipitation. Par ailleurs, la nature des détergents dans lesquels sont co-précipités DM et DR confirment la faiblesse de l'interaction entre les deux molécules (93).

1.4.4.1 Résidus de HLA-DR impliqués dans l'interaction de DM – DR

C'est grâce à la mutagenèse aléatoire et dirigée que les résidus impliqués dans l'interaction entre DR et DM ont été caractérisés. Doebele *et al* (2000) (95) identifiaient pour la première fois des résidus de HLA-DR médiant l'interaction avec HLA-DM. Six résidus dont la mutation cause une accumulation de CLIP en surface furent identifiés sur HLA-DR (figure 1.4.4). L'ensemble des six résidus était situé sur la même face latérale de DR et cette découverte se trouvait à être en accord avec celle de Denzin et Cresswell (1995) (80) qui impliquait cette même région latérale dans l'interaction avec DM. En effet, en utilisant l'anticorps conformationnel CerCLIP.1, les auteurs ont pu bloquer la dissociation de CLIP par DM (80). Or cet anticorps lie la portion N-terminale de CLIP qui se situe très proche de la face latérale de DR identifiée par Doebele *et al* (2000) (95), ces résultats confirment ainsi, que DM interagit avec la face latérale de DR. Par ailleurs, parmi les résidus identifiés, certains sont acides et pourraient donc participer au changement conformationnel et à l'activité catalytique dépendant du pH (11).

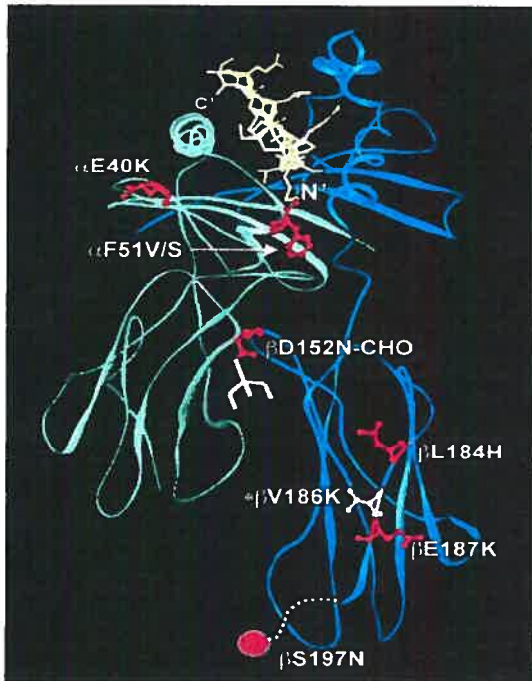


Figure 1.4.4 Mutations ponctuelles sur HLA-DR affectant l'interaction avec HLA-DM

Représentation du cristal de DR3-CLIP. La chaîne α est représentée en vert, la chaîne β en bleu et le peptide CLIP en jaune. Les mutations qui affectent l'interaction avec DM sont indiquées en rouge avec les substitutions correspondantes. La position D152N correspond à un nouveau site de glycosylation représenté par une fourche (Tiré de Doebele et al., 2000) (95).

1.4.4.2 Résidus de HLA-DM impliqués dans l'interaction DM – DR

Comme pour HLA-DR, en utilisant la mutagenèse aléatoire et dirigée, le même groupe (96) a localisé jusqu'à sept résidus critiques sur la face latérale de HLA-DM (figure 1.4.5 A). Ces variants ont été testés pour leur capacité à promouvoir la liaison de peptides bio-éthynylés sur la niche de la molécule DR4. Toutes les mutations causant une accumulation de CLIP affectaient également le chargement des peptides (96). L'implication des faces latérales dans l'interaction entre DM et DR a été confirmée par la dimérisation

des deux molécules. En fusionnant DM et DR via leur chaîne β grâce à un leucine zipper (figure 1.4.5), l'activité catalytique de DM se trouve fortement augmentée (96,97).

Les résultats de Pashine *et al.*, (2003) (96) sont par ailleurs en accord avec ceux de Stratikos *et al.*, (2002) (98). Dans cette étude, les auteurs démontraient que la cystéine en position 46 sur la chaîne β de DM interagissait avec une région de DR à proximité de la région N-terminale du peptide lié sur la niche (98). En effet, en liant de façon covalente un peptide à ce résidu de DM β , l'association du peptide à la niche de DR était toujours efficace. Cependant, en présence d'autres peptides, les auteurs observaient une autodissociation du peptide relié à DM par le pont cystéine (98), suggérant ainsi que la Cys46 de la chaîne β de DM est en étroite proximité avec le N terminal du peptide durant l'échange peptidique (Figure 1.4.5 C).

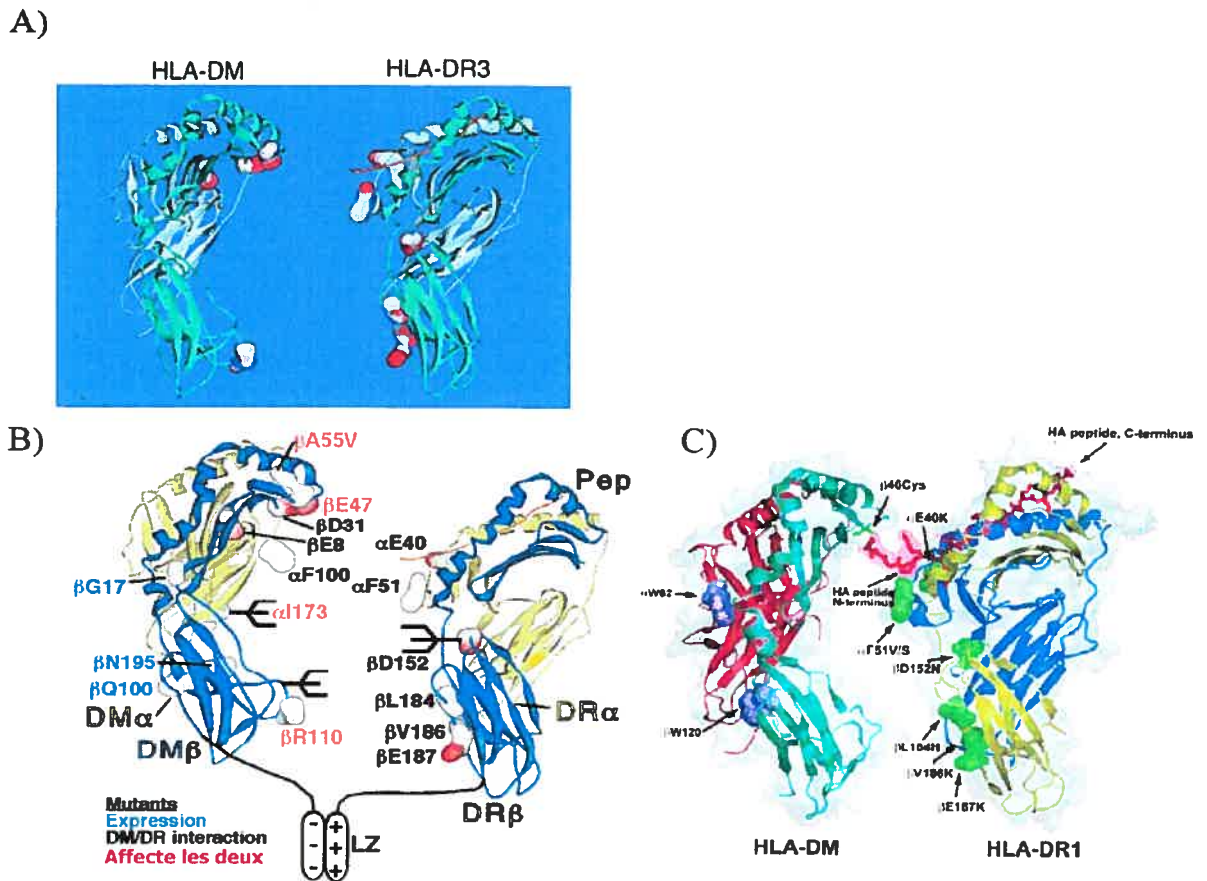


Figure 1.4.5 Modèle d'interaction entre HLA-DM et HLA-DR

A) Position des résidus impliqués dans l'interaction entre HLA-DM (gauche) et HLA-DR3 (droite) ((adapté de Busch et al, 2005) (11)). B) Résidus impliqués dans l'interaction entre DM et DR. Les résidus sont colorés selon l'effet de leur mutation sur l'expression (bleu), l'interaction avec DR (noir) ou bien les deux (rouge). DM (gauche) et DR-CLIP (à droite) sont fusionnés par un Leucine Zipper (LZ) par leur région C-terminale ((adapté de Pashine et al., 2003)96). C) Représentation de la molécule DM (gauche) reliée par sa cystéine $\beta 46$ à la région NH2 du peptide HA (rouge) associé la niche de DR1 (droite). Les mutations de DR affectant l'interaction avec DM sont indiquées ainsi que les résidus tryptophanes $\alpha 62/\beta 120$ sur DM (mauve) auparavant suggérés comme faisant partie de l'interaction (adapté de Stratikos et al., 2002) (98).

1.4.5 Modèle de relâche peptidique sous l'action de DM

En plus de catalyser la libération de CLIP, HLA-DM est également responsable de la relâche de certains peptides déjà sur la niche. Malgré que les déterminants de cette susceptibilité différentielle des complexes classe II-peptide à DM ne soient pas encore clairement définis, il est envisageable que le mécanisme implique des caractères communs comme les ponts hydrogènes retenant le peptide et l'état d'ancrage dans les pochettes (83,99). Les 12 à 15 ponts hydrogènes retenant les peptides impliquent les résidus α 51-53 des molécules de classe II situés à l'entrée de la niche et les résidus conservés α 62, 69, 71 et β 61, 81, 82 (figure 1.4.6 A). Ainsi, HLA-DM, suite à son interaction physique avec les molécules classiques, conduirait à la déstabilisation du lien hydrogène pour libérer le peptide. En évaluant par mutagenèse dirigée l'effet de DM sur chacun de ces ponts hydrogènes, Stratikos *et al.*, (2004) (98) ont montré que le pont le plus critique est celui formé entre les résidus α 51-53 et la région N terminale du peptide (figure 1.4.6 A). Puisque le résidu α 51 est un de ceux interagissant avec DM (95), cette interaction déstabiliserait alors le pont hydrogène retenant le peptide, conduisant ainsi à sa libération (83,95,98). L'importance de la dislocation des ponts hydrogènes pour la libération de CLIP ou des peptides antigéniques a par ailleurs été confirmée par l'utilisation d'un composé phénolique ayant un groupement donneur d'hydrogènes (100).

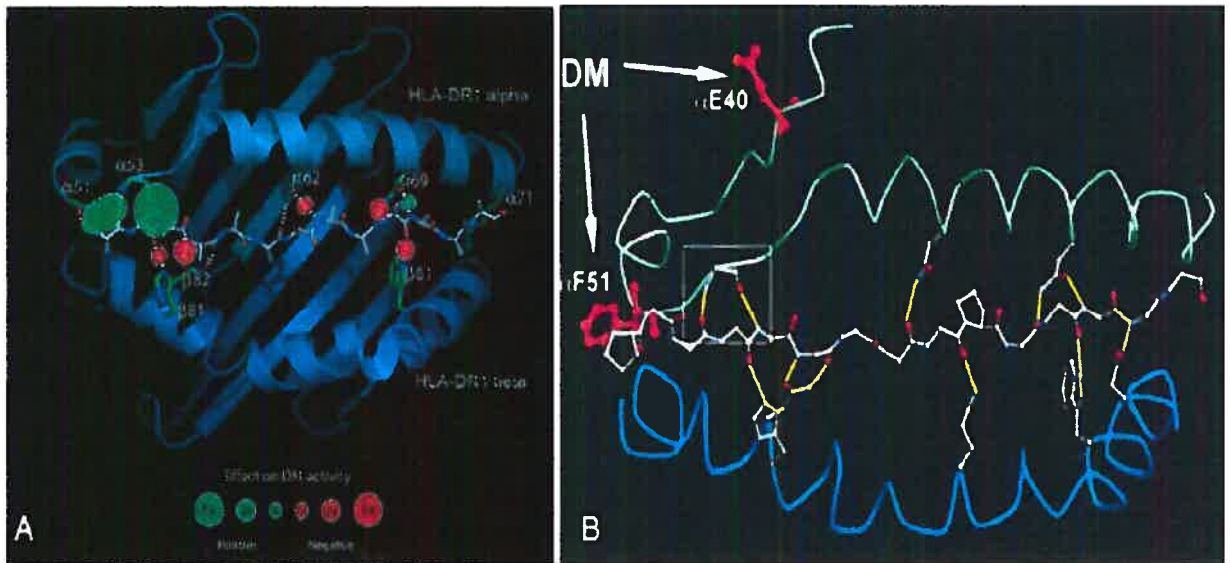


Figure 1.4.6 Modèle de relâche peptidique catalysé par HLA-DM

A) Effet de l'activité catalytique de DM sur les différents ponts hydrogènes. Le vert indique un effet accentué et le rouge, un effet moindre. La taille des cercles indique le degré de l'effet. Le plus grand effet de DM (plus grands cercles verts) est associé aux ponts hydrogènes formés entre la chaîne α de DR1 et la région N terminale du peptide (Adapté de Stratikos *et al.*, 2004) (101) **B)** Model de relâche peptidique par DM. La liaison de DM aux résidus DR α F51 et α E40 déstabiliserait les ponts hydrogènes impliqués entre le résidu critique α S53 et le peptide (Adapté de Doebele *et al.*, 2000) (95).

Il existe d'autres modèles de relâche peptidique basés sur des changements de conformation. Ces modèles suggèrent que la niche de la molécule de classe II classique reste dans un état «ouvert» suite à la liaison d'un peptide dont le N terminal est mal ancré dans la pochette P1. DM, en interagissant avec les résidus α F51 et α E40 situés proches de cette pochette déstabiliserait les ponts hydrogènes, mais aussi induirait un changement de conformation sur DR aboutissant ainsi à la libération du peptide. La molécule de classe II, maintenant vide, serait par la suite stabilisée par l'activité chaperon de HLA-DM. Ce modèle est supporté par un certain nombre de preuves. Les ponts hydrogènes formés avec les résidus α 51-53 sont les plus critiques pour l'activité de DM (101). Par ailleurs, ces

résidus sont dans la zone de la P1 qui est la pochette la plus déterminante dans la liaison des peptides (102-104) et ont été identifiés (α F51 et E40) comme site d'interaction de DR avec DM (95).

1.5 HLA-DO

Contrairement à HLA-DM dont les gènes ont été découverts lors d'un criblage systématique du locus du CMH, les gènes codant pour HLA-DO ont été découverts par hybridation croisée (62). Initialement nommés *DZA* et *DOB*, le gène *DZA* a par la suite été renommé *DNA* puis *DOA* (nom actuel). Même si les produits des deux gènes ont été proposés comme étant partenaires, un certain nombre de preuves suggéraient initialement que non. En effet aucun produit protéique n'avait été identifié au moment de la découverte de *DOA* et *DOB*, et contrairement aux gènes des autres molécules de classe II qui sont côte à côte, les gènes *DOA* et *DOB* sont séparés sur le locus du CMH II (Figure 1.1.1) (62,63). Par ailleurs, alors que la transcription de *DOA* est régulée de la même façon que celle des autres gènes de classe II, la transcription de *DOB* semblait, à l'époque, être contrôlée différemment (105). Les études montraient qu'elle est indépendante de CIITA et est non inductible par l'INF γ . La preuve que les produits de *DOA* et *DOB* existent et forment une protéine DO $\alpha\beta$ fonctionnelle a été obtenue pour la première fois chez la souris par Karlsson *et al* (1991) (106). Les auteurs ont découvert que H2-O, équivalent de HLA-DO humain, est exprimée chez les cellules épithéliales thymiques et chez les lymphocytes B. Ce n'est qu'en 1996 que la protéine DO $\alpha\beta$ a été découverte chez l'homme. Les études montraient que HLA-DO était fortement associée à HLA-DM tout le long des compartiments endolysosomiaux (60) suggérant ainsi un rôle de modulation de l'activité de DM.

1.5.1 Distribution tissulaire

Une des caractéristiques qui distingue d'avantage DO des autres molécules de classe II est sa distribution tissulaire. Jusqu'à récemment, les études avaient montré que H2-O et HLA-DO étaient presque exclusivement exprimées chez les lymphocytes B et les cellules épithéliales médullaires et corticales du thymus (62,63). Dans le thymus DO est exprimée à la fois dans des cellules DR⁺ et DR⁻ du cortex et de la médula, mais aussi autour du site apoptotique des thymocytes (corpuscule de Hassall) chez des cellules DR⁻/DQ⁺ (107). L'expression de HLA-DO par les lymphocytes B a été grandement étudiée en rapport avec le développement dynamique de ces cellules (108-112). Au cours de leur différenciation séquentielle, les lymphocytes B passent d'un stade pro-B, à pré-B et à B immature au sein de la moelle osseuse, puis à B mature une fois dans les organes lymphoïdes secondaires (113). Alors que DM et DR sont exprimées dès le stade pro-B, avant même le récepteur BCR, DO ne débute son expression que dans les lymphocytes B matures (revue dans (12)). Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes B, considérés jusque là comme naïfs, sont exposés aux antigènes étrangers, puis activés pour se différencier en plasmocytes et B mémoires dans les centres germinaux (113,114). Les lymphocytes B des centres germinaux ainsi que les plasmocytes cessent d'exprimer DO. Cependant, les B mémoire reprennent l'expression au même niveau que les lymphocytes B matures (12).

L'expression de DO avait été rapportée chez les cellules dendritiques mais de façon controversée et ne semblait pas être un phénomène généralisé. Les études montraient que les cellules dendritiques immatures et matures dérivés de monocytes ne l'expriment pas (107,109,115). Récemment, Hornell *et al.*, (2006) ont montraient que HLA-DO est exprimé chez plusieurs types de cellules dendritiques notamment les cellules de Langerhans, les "tonsillar interdigitating DC" (cellules dendritiques amygdaliennes) et un groupe de cellules dendritiques en circulation (116). De même cette expression de DO est régulée par la différenciation et l'activation de ces cellules dendritiques. Bien que l'expression soit

faible, cette découverte de DO chez les cellules dendritiques relance donc le débat sur sa fonction dans la modulation de la présentation antigénique.

1.5.2 Régulation de l'expression

Bien que leur produit protéique forme un unique hétérodimère HLA-DO $\alpha\beta$, la régulation de l'expression des gènes *DOA* et *DOB* codant pour les chaînes α et β se fait différemment. Alors que les deux gènes possèdent les éléments de promoteur W, X et Y, seule l'expression de *DOA* est pleinement contrôlée par CIITA alors que *DOB* peut être exprimé même en absence de ce facteur (117). De même, contrairement à *DOA*, l'expression de *DOB* est non inductible par l'INF γ (105). La non implication de CIITA dans la régulation de l'expression de *DOB* a toute fois été remise en cause par Nagarajan *et al* (2002) (118). En effet, par une série d'expériences incluant des RT-PCR quantitatives, des essais de promoteur- rapporteur et d'immunoprécipitation de chromatine, ils ont montré que le niveau d'expression de *DOB* pouvait être augmenté par CIITA (118). Cette découverte a été confirmée par une étude dans notre laboratoire qui montrait que l'expression de HLA-DOB pouvait être induite par une transduction de CIITA chez les cellules HeLa (119). Toutefois le niveau d'expression de CIITA pré-requis était relativement élevé. Ensemble, ces données suggèrent l'implication d'autres facteurs dans la transcription de *DOB*. Hake *et al* (2003) (120) ont montré qu'en plus des boîtes W, X et Y très conservées à travers les promoteurs des molécules de classe II, *DOB* possède également une boîte OCT. Les facteurs CREB-1, RFXANK et Oct-2 sont pleinement recrutés au promoteur de *DOB* alors que CIITA et Bob-1 ne le sont que faiblement (120). Ainsi la régulation différentielle de l'expression de *DOB* comparativement à celle de *DOA* dicterait la restriction tissulaire de HLA-DO (12). Par ailleurs, comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, l'expression de HLA-DO est régulée à la baisse au niveau des centres germinaux suivie d'une réexpression au stade B mémoire. *DR*, *DM* et *DOA* étant sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CIITA, la régulation à la baisse de DO dans

les centres germinaux se ferait en toute vraisemblance au niveau protéique (112). Cependant, le mécanisme reste encore à clarifier.

1.5.3 Transport et ciblage intracellulaire

HLA-DO α et HLA-DO β sont des glycoprotéines de 25 à 34kDa et 28 à 32kDa respectivement (62). Suite à leur synthèse, les deux protéines sont transloquées dans le RE où elles s'assemblent pour former un dimère $\alpha\beta$. Comme c'est le cas pour les molécules de classe II classiques, le dimère HLA-DO $\alpha\beta$ nouvellement assemblé dans le RE est instable et incapable de sortir du RE. Cependant, contrairement aux classes II classiques, la présence de Ii ne lui permet pas de sortir de cette organelle, même si les deux protéines (DO et Ii) parviennent à s'associer (60). Par contre, lorsque HLA-DM est co-transfecté dans les cellules, HLA-DO s'assemble efficacement et est transportée par DM vers les compartiments endolysosomiaux (60). Une étude réalisée dans notre laboratoire apporte une confirmation solide quant à l'instabilité de l'hétérodimère HLA-DO (Article annexe à ce mémoire, Deshaies *et al.*, (2005); (121)). Dans cette étude nous montrons que la mutation d'une proline (α P11) située sur le plancher potentiel de DO en une valine donne une molécule HLA-DO fonctionnelle et complètement indépendante de DM pour sa sortie du réticulum endoplasmique (121). Par ailleurs, dans cette même étude, nous avons également découvert que le résidu α E41 est un de ceux qui médient l'interaction avec HLA-DM. Ces données suggèrent ainsi que DM en se liant à DO α stabiliserait HLA-DO. Une autre étude en cours nous suggère que DM induit un changement de conformation sur DO, comme nous le démontrons par immunomarquage avec un anticorps conformationnel (Article inclut dans ce mémoire).

L'association entre HLA-DO et HLA-DM a été confirmée chez des lymphocytes B et les complexes se retrouvent dans les compartiments endolysosomiaux (60,62). Dans les lysosomes, la presque totalité de HLA-DO est associée à HLA-DM et il n'existerait pas de DO libres en dehors du réticulum endoplasmique contrairement à DM. Cependant, le sort

des complexes DO/DM dans ces compartiment n'est pas encore clairement défini (60,122). La sortie des complexes DO/DM du RE ainsi que le ciblage de HLA-DM vers les lysosomes sont deux événements médiés par le motif YTPL situé sur la queue cytoplasmique de DM β (67,70). Cependant le mécanisme de transport des complexes au réseau endolysosomal n'est pas encore clair et il n'est pas encore établi si les complexes DM/DO et DM sont ciblés dans des compartiments de natures différentes (62). DO β possède deux motifs potentiels de ciblage endosomal dans sa queue cytoplasmique (123). Cependant ces motifs ne seraient pas requis pour le ciblage des complexes DM/DO vers les compartiments lysosomiaux (124,125). Toutefois, ces motifs dans DO β seraient impliqués dans la distribution des complexes DM/DO ainsi que les molécules de classe II dans les MIIC multivésiculaires, notamment la co-localisation à la membrane limitante (125). Cette redistribution permettrait ainsi une meilleure interaction latérale entre les complexes DO/DM et les molécules de classe II classiques et possiblement un meilleur chargement des peptides (125).

1.5.4 Fonction de HLA-DO

Partant du fait que la presque totalité de DO soit liée à DM dans les lymphocytes B et que DM peut, à lui tout seul, médier le chargement des peptides, il a été suggéré que DO modulerait l'activité de DM (62). Par ailleurs, cette activité modulatrice de DO sur la présentation antigénique avait été considérée comme restreinte aux lymphocytes B (62). En effet, jusqu'à récemment, seule ces cellules semblaient exprimer HLA-DO de façon naturelle, contrairement aux cellules dendritiques dérivées des monocytes. Cependant, vu la découverte récente de l'expression chez plusieurs lignées primaires de cellules dendritiques comme les cellules de Langherhans, les cellules dendritiques amygdaliennes et une population de cellules dendritiques en circulation (116), l'impact de DO sur la modulation de la présentation pourrait être plus généralisé que supposé.

Différents groupes ont étudié l'effet positif ou négatif de DO sur l'activité de DM. La modulation négative de l'activité de DM a été suggérée suite à l'accumulation de complexes DR-CLIP à la surface de cellules DO⁺ (126,127). Cette inhibition de l'activité de DM a également été observée par Hornell *et al.*, (2006) chez les populations de cellules dendritiques exprimant DO (116).

La modulation de l'activité de DM par DO a également été montrée de façon plus fonctionnelle, notamment sur l'efficacité de l'échange de peptides antigéniques associés à DR. Il ressort de ces études que les complexes DO/DM sont moins efficaces comparativement à DM seul (122,128). Par ailleurs, l'effet de DO montre une dépendance au pH. Alors que l'inhibition est observée à un pH de 5,5, l'efficacité de chargement des peptides aux pH inférieur à 5 est similaire à celle en présence de DM libre (122,128). Cet effet pH-dépendant pourrait s'expliquer par un changement conformationnel que pourraient subir DO/DM et/ou DO suite à l'acidification (128).

Il a été montré chez des lymphocytes B que les complexes DO/DM s'associaient à DR dans les lysosomes (122,129). Cependant, même s'il est envisageable que le changement conformationnel des molécules puisse conduire à la dissociation du complexe, il n'a pas été établi si l'efficacité de chargement de peptides au pH acide est due ou non, à la libération de DM du complexe DM/DO (62). Paradoxalement, il a également été suggéré que DM/DO interagit plus fermement avec DR comparé à DM seul, donnant ainsi un effet de chaperon plus soutenu, et permettant donc le recrutement de peptides ayant une plus haute affinité pour DR (122).

1.5.4.1 Fonction in vivo

L'activité inhibitrice de DO sur DM a principalement été montrée dans des systèmes de transfection où l'on observe un niveau élevé de complexes CLIP-Classe II à la surface cellulaire. Cependant, des souris K.O H2-O affichent un niveau normal de CLIP

en surface (128), suggérant ainsi que cette mesure ne serait pas un paramètre significatif pour l'analyse de l'activité de DO. Ceci est d'autant plus vrai, vu que différents haplotypes de classes II peuvent avoir différentes affinités pour CLIP (62).

Un paramètre révélateur quand à la fonction modulatrice de DO sur DM serait l'analyse du répertoire général de peptides associés aux molécules classe II classiques. Plusieurs études ont en effet montré que certains peptides sont présentés exclusivement par des cellules DO⁻ et d'autres par des cellules DO⁺ (127-129). La compréhension du mécanisme par lequel HLA-DO influence le répertoire de peptides est venue avec les études de présentation antigénique par les lymphocytes B des souris K.O H2-O (128,130,131). Ces études montraient que la présentation d'antigènes internalisés par phase fluide était meilleure chez les lymphocytes B de souris H2-O^{-/-} comparativement aux lymphocytes B de souris sauvages. Par ailleurs, lorsque l'antigène était internalisé via les immunoglobulines de surface, la présentation était meilleure chez les cellules B exprimant H2-O (128). Toutefois, l'impact de cette voie d'internalisation sur la présentation pouvait varier d'un épitope à un autre dans le sens que la présentation se trouvait à être augmentée, ou diminuée, ou non affectée selon l'épitope analysé (130,131).

La différence fondamentale entre les voies d'internalisation via la phase fluide et celle via les Ig de surface (figure 1.5.1) vient du fait que dans la seconde, la dégradation de l'antigène est relativement retardée, du fait de sa liaison à l'immunoglobuline, jusqu'à ce qu'il atteigne les lysosomes (132). Cette liaison à l'immunoglobuline protégerait ainsi l'épitope de sa destruction prématurée. Dans la première voie, la dégradation commence aussitôt après l'internalisation. Cependant, DO pouvant inhiber DM dans ces compartiments précoces à pH relativement élevé, le chargement des peptides générés à partir de l'antigène internalisé par phase fluide serait donc peu efficace. Dans les lysosomes, l'antigène internalisé via le BCR se dissocie de celui-ci et est dégradé en peptides. HLA-DM n'étant pas inhibé par HLA-DO au faible pH de ces compartiments, le chargement de peptide va donc être plus efficace (62). Ainsi, les épitopes des antigènes

spécifiquement internalisés via le BCR seraient efficacement présentés pour permettre la génération d'anticorps de haute affinité par les lymphocytes B.

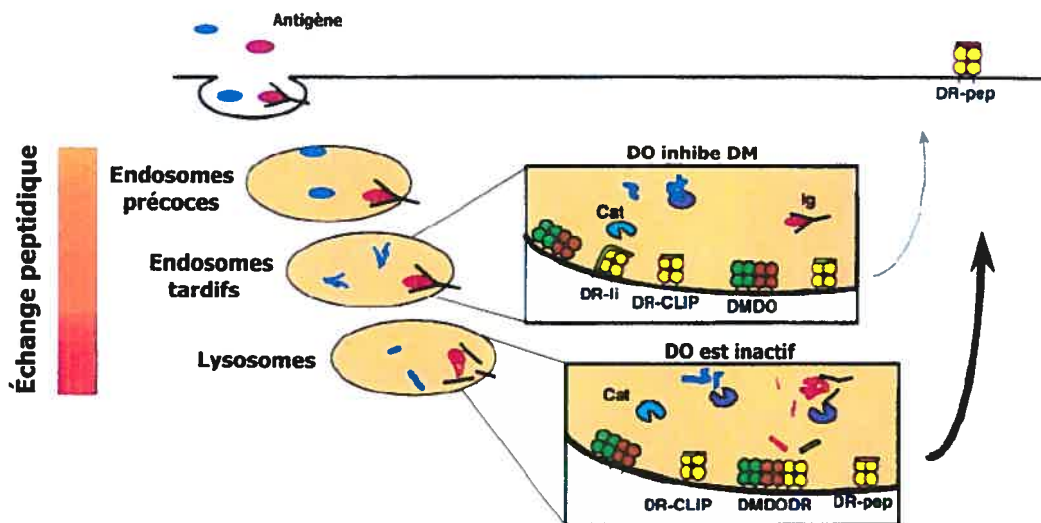


Figure 1.5.1 Modulation de la présentation antigénique par HLA-DO chez les lymphocytes B

Des antigènes sont internalisés par endocytose (bleu) ou via les Igs de surface (bourgogne) et entrent dans la voie endosomale. Dans les compartiments précoces, DO inhibe DM et empêche donc la présentation des peptides générés à ce niveau. Les antigènes liés aux immunoglobulines de surface sont protégés de la dégradation jusqu'aux lysosomes. A cet endroit, le potentiel inhibiteur de DO étant diminué à cause du pH, DM catalyserait de façon efficace le chargement des peptides générés sur DR (Inspiré de Alfonso et Karlsson, 2000) (62)

Ainsi, l'activité de DO permettrait aux lymphocytes B de limiter la présentation des antigènes non ou peu spécifiques (ceux internalisés par phase fluide), et une meilleure présentation de ceux spécifiques (antigènes internalisés via le BCR) notamment en jouant sur la sélection des épitopes de ces derniers. Cependant, plusieurs autres études devront être effectuées pour une meilleure compréhension du contexte de sélection du répertoire de peptides. En effet, comme nous l'avons décrit plus haut, HLA-DM agit sur le répertoire de

peptides présentés par les classes II, influençant directement les épitopes immunodominants présentés (91). Le lien entre DO, DM et les compartiments de chargement dans la sélection du répertoire de peptide devra donc être mieux caractérisé.

1.5.4.2 HLA-DO dans la genèse de la réponse humorale par les lymphocytes B

Comme nous l'avons décrit plus haut, l'expression de HLA-DO chez les lymphocytes B est un processus aussi dynamique que le développement même de ces cellules. DO débute son expression au stade mature des cellules, ensuite s'éteint aux centres germinaux puis se ré-exprime chez les lymphocytes B mémoires mais pas chez les plasmocytes (108-112). La modulation de DO dans les centres germinaux est vraisemblablement d'une grande importance dans la genèse de la réponse humorale. En effet, elle fait suite à l'activation des lymphocytes B (108,111) et c'est dans les centres germinaux qu'a lieu l'hypermutation somatique et la sélection positive des cellules B (113,114) pour la production d'anticorps de haute affinité. Certains suggèrent, justement, que la modulation de DO dans le centre germinal permet le maintien de la présentation d'antigènes internalisé via des BCR de faible affinité; ce qui aurait pour résultat un élargissement du pool d'anticorps disponibles pour l'hypermutation (12). Il est également envisageable que DO soit modulée en coordination avec la baisse d'expression des BCR chez les cellules B du centre germinal. La baisse de DO compenserait ainsi la diminution de la capacité de présentation résultant de la baisse d'expression du BCR.

La caractérisation de la réponse humorale des souris H2-O^{-/-} a montré qu'avec l'âge, ces souris montraient une augmentation d'IgG1 dans leur sérum (128). Une autre découverte suggérait une plus grande présentation d'antigènes internalisés par phase fluide et/ou les BCR de faibles affinités suite à l'absence de DO (62).

1.6 Édition du répertoire antigénique de classe II et Immunodominance dans la réponse T CD4⁺

Comme nous l'avons introduit dans les sections 1.4.3.4 et 1.5.4.1, DM est directement impliqué dans la sélection de peptides ayant une meilleure affinité pour la niche peptidique (figure 1.4.3), et DO a une influence différentielle sur la présentation d'épitopes issus d'antigènes internalisés via les immunoglobulines de surface. Bien que cette fonction d'édition du répertoire antigénique de classe II ne soit pas encore clairement définie, d'importants progrès ont été réalisés avec les études de Nanda *et al* (2005) (91). En effet, jusqu'ici l'importance de cette fonction d'édition du répertoire antigénique sur la réponse lymphocytaire T CD4⁺ spécifique à un pathogène ou un antigène n'avait pas été caractérisée. Des souris BALB/c (H-2^d) et B10.R (H-2^k) infectées par *Leishmania major* ou immunisées avec la protéine LACK “*Leishmania* homologue of activated receptor for c-kinase” développent des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à un épitope immunodominant unique (épitopes 158-173 et 81-96 de LACK, respectivement pour BALB/c (H-2^d) et B10.R (H-2^k)). En utilisant des souris BALB/c (H-2^d) DM^{-/-} et B10.R (H-2^k) DM^{-/-}, Nanda *et al* (2005) (91) montraient qu'en absence de DM, la réponse T CD4⁺ à *L. major* étaient déroutées des épitopes uniques 158-173 et 81-96 de LACK. Et mieux encore, la réponse devenait diversifiée avec l'apparition de nouveau épitopes (figure 1.6.1).

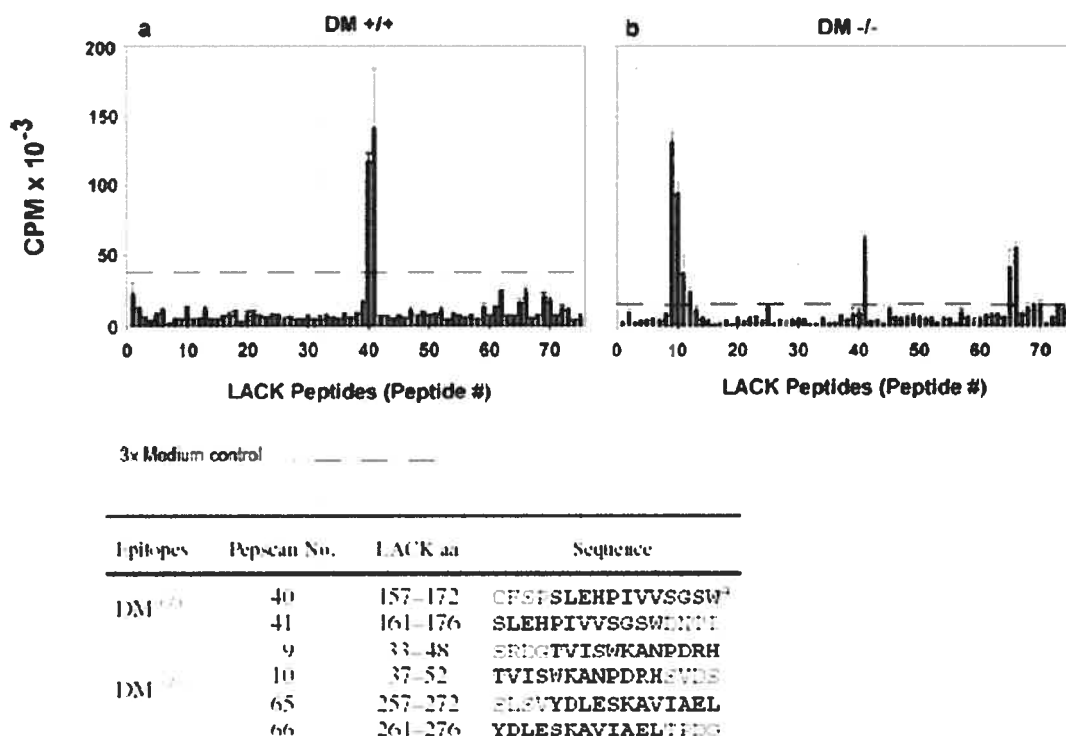


Figure 1.6.1 Modulation du ciblage de la réponse T CD4⁺ *in vivo* vers l'épitope immunodominant 158-173 de LACK par DM

Des souris BALB/c DM^{+/+} (a) et DM^{-/-} (b) ont été immunisées avec une protéine recombinante LACK (*Leishmania* homologue of activated receptor for c-kinase) et les lymphocytes T des ganglions lymphatiques ont été récupérés 9 à 10 jours après l'immunisation et mis en culture avec ou sans le pool de peptide "16-mer" de LACK (La protéine LACK a été coupé en 75 peptide de sorte à générer des peptides superposés). Dans les souris DM^{+/+} la réponse est principalement ciblée sur les peptides 40 et 41 (epitopes LACK 157-172 et LACK 161-176) comme le montre la prolifération des cellules T correspondantes (prolifération évalué par l'incorporation de thymidine estimée en CPM 10³). Alors qu'en absence de DM la réponse est diversifiée. Tiré de Nanda *et al* (2005) (91).

Ainsi, cette étude apporte une preuve concrète quant à l'implication de l'activité éditrice de DM sur le développement d'une réponse T CD4⁺ hautement spécifique. Toutefois, il reste encore à établir le mécanisme. En effet, il serait difficile d'exclure la possibilité que le phénomène implique également la perte de l'activité chaperon de DM. Par ailleurs, l'effet

DO devra également être clarifié et voire même être évaluée dans le même modèle, étant donné que des résultats *in vitro* ont montré son influence différentielle sur la présentation (130, 131).

La compréhension de la régulation de la présentation antigénique de classe II par HLA-DM et HLA-DO pourrait être d'une grande importance, notamment dans le cadre du développement d'approches immunothérapeutiques ou vaccinales. Cependant, à la lumière de cette revue de littérature, leur fonctionnement est encore en quête de clarification, par exemple, la nécessité apparente de DM pour la sortie de DO du RE, et la régulation de l'expression de DO aux centres germinaux entre autres.

1.7 Hypothèse et Objectifs de travail

Tout au long des paragraphes ci-hauts, nous avons décrit la présentation antigénique par les molécules de classe II classiques. Par ailleurs, nous avons également décrit comment cette présentation était régulée par la molécule non classique HLA-DM, notamment la catalyse de la dissociation de CLIP, l'effet chaperon sur les classes II vides ainsi que l'édition du répertoire de peptides. Nous avons aussi décrit la régulation de la présentation par DO qui agit comme modulateur de DM. Comme il se dégage de cette revue de la littérature, il subsiste encore beaucoup d'interrogations dans la caractérisation de ces deux molécules non classiques. Par exemple, pourquoi DM qui semble pourtant posséder tous les prérequis pour la régulation de la présentation antigénique (dissociation de CLIP, stabilisation des molécules de classe II, édition des peptides antigéniques) aurait besoin d'un modulateur? Et pourquoi ce modulateur qu'est DO aurait besoin de sa cible, DM, pour être fonctionnelle, notamment sortir du RE et être ciblée aux compartiments de chargement?

1.7.1 Hypothèse

En absence de HLA-DM, HLA-DO est retenue dans le réticulum endoplasmique et contrairement aux molécules classiques, la chaîne invariante ne permet pas sa sortie. Suite à son introduction, DM s'associe à DO au sein du RE et permet sa sortie du RE et son ciblage aux compartiments de chargement des peptides antigéniques (12). Toutefois DO ne possède pas de motif de rétention au RE qui pourrait être masqué suite à l'association avec DM. Par ailleurs, une étude de notre laboratoire a montré que la mutation de la proline 11 de la chaîne α de DO donne une molécule DO complètement indépendante de DM pour son assemblage et sa sortie du RE (Deshaie *et al.*, 2005 article en annexe (121)).

Ainsi, nous postulons donc que le repliement de DO serait sous-optimal et DM en agissant comme chaperon, corrigerait cette “aberration”. Autrement dit, les chaînes α et β de DO, seules dans le RE, s’assembleraient mal et l’hétérodimère $DO\alpha\beta$ mal replié serait ainsi retenu dans le RE comme toute protéine mal assemblée (133). DM en s’associant à DO via le résidu $\alpha E41$ de celui-ci (Deshaie *et al.*, 2005 article en annexe (121)) induirait un changement de conformation permettant à DO de se replier proprement et se libérer de la rétention au RE.

Ainsi, dans ce présent travail, nous nous proposons donc de mieux caractériser le couple DO/DM afin de mieux comprendre la maturation de DO.

1.7.2 Objectifs

Il a été clairement montré que DM et DR interagissent par leur face latérale et les résidus médiant le contact entre les deux molécules ont été identifiés (revue par Busch *et al.*, 2005 (11)). Cependant, à part le résidu $DO\alpha E41$, aucun autre résidu, du côté de DO comme celui de DM, n’a encore été identifié dans le contact entre DO et DM. Nous nous sommes donc fixés comme premier objectif, d’identifier d’autres résidus impliqués dans l’interaction DO/DM sur les deux molécules. Par ailleurs, l’hypothèse que nous postulons suggère que DM agirait comme une molécule chaperon lors de l’assemblage de DO. Notre deuxième objectif est donc d’analyser l’impact de DM sur les premières étapes de maturation de DO.

1.7.2.1 Objectif 1 : Cartographie des résidus impliqués dans l’interaction DO/DM

DM et DR interagissant par leur face latérale et les résidus impliqués dans cette interaction ne l’étant pas dans celle DO/DM, nous proposons que DM interagirait avec DO via des résidus exposés; ceci d’autant plus le résidu $\alpha E41$ de DO qui interagit avec DM serait lui-même exposé. Ainsi, en procédant par mutagenèse dirigée, nous avons criblé les

zones exposées de DM, notamment les boucles des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ ainsi que la protubérance en prolongement de la deuxième boucle de DM $\beta 1$. Ces régions ont été identifiées sur la structure cristallographique de DM avec le programme SPDBV (code d'accès PDB du cristal de DM : 1HDM; Mosyak *et al* (1998) (76)).

HLA-DO et son homologue H2-O de la souris possèdent dans leur domaine $\alpha 2$ des résidus conservés mais qui sont curieusement changés de façon conservée chez les molécules classiques DR, DP et DQ. Nous avons donc ciblé ces résidus dans notre approche de mutagenèse. Nous avons remplacé les résidus conservés de DO par ceux conservés des classes II et vérifié leur implication dans l'interaction DO/DM.

Les cDNA mutés par la méthode de PCR-overlap ont été co-transfectés dans des cellules HEK-293T avec DO sauvage (dans le cas des mutants DM) ou DM sauvage (dans le cas des mutants DO) et la perte de l'interaction a été évaluée en cytométrie en flux avec des anticorps anti-DO et anti-DM. Nous nous sommes servis notamment d'un variant de DM dont le motif de ciblage-rétention endolysosomal YTPL a été muté (DM α wt/BY226A; DMY) et qui s'exprime donc à la surface cellulaire. Ceci nous a permis, en effet, de visualiser directement à la surface cellulaire, la perte ou non de l'interaction DO/DM.

1.7.2.2 Objectif 2 : Impact de DM sur les premières étapes de maturation de DO

Nous disposons dans notre laboratoire d'un anticorps qui a été obtenu suite à l'immunisation de souris avec le complexe DO/DM. Cet anticorps nommé Mag.DO reconnaît DO mais pas DM et mieux encore, la reconnaissance de DO est augmentée lorsque DM est présent (augmentation de la moyenne de fluorescence au cytométrie en flux). Nous avons donc utilisé cet anticorps pour analyser l'effet de DM sur l'assemblage de DO.

Ainsi, deux groupes de cellules ont été transfectés ; soit avec les cDNAs codant pour DO et DM soit avec le cDNA codant pour DO, et analysées en cytométrie en flux avec l'anticorps Mag.DO et un anticorps contrôle HKC5 (anti-DO β). Par ailleurs, les protéines

DO ont également été immunoprécipitées des deux groupes de cellules et la quantité fut comparée dans les deux cas. En effet, l'augmentation du signal de l'anti-DO que nous observons en présence de DM au cytométrie en flux pourrait être due à l'assemblage d'un plus grand nombre de molécules de DO en présence de DM. Il est donc important de comparer la quantité de protéines chez les deux groupes de cellules. Finalement l'effet de DM sur le repliement de DO a été vérifié au sein même du RE grâce à un traitement à la BFA (Brefeldine A) ; un agent qui bloque le transport entre compartiments, suivit d'un marquage avec l'anticorps Mag.DO.

L'étude de ces deux objectifs permettra de mieux comprendre comment DM et DO interagissent et aussi comment DM permet la maturation de DO. Par ailleurs, les résultats pourraient également ouvrir d'autres avenues, notamment des études en vue de comprendre l'édition du répertoire antigénique. En utilisant des molécules DM ayant perdu la capacité d'interagir avec DO et vice-versa, on pourrait ainsi mieux mesurer l'impact de chacune des molécules sur l'édition du répertoire de peptides antigéniques. Et du moment que cette édition de peptides a un impact directe sur la présentation des épitopes immunodominants, la caractérisation de l'interaction DO/DM pourrait donc aider à développer de meilleures approches immunothérapeutiques et/ou vaccinales.

CHAPITRE 2 ARTICLE 1

2.1 EVIDENCE FOR A DM-INDUCED CONFORMATION CHANGE IN HLA-DO β ¹

Francis Deshaies², **Djibril A. Diallo**², Mammad Pezeshki², Helen Tobin³,
Angélique Bellemare-Pelletier², Nathalie Bédard², Alexandre Brunet²,
Lisa K. Denzin³, and Jacques Thibodeau^{2†}

² Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal. Montréal, Qc, Canada.

³ Immunology Program, Weill Graduate School of Medical Sciences, Cornell University, and Sloan-Kettering Institute, Immunology Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021, USA

Running title: Different conformations of HLA-DO

[†] Corresponding author: Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Tel : (514) 343-6279; Fax: (514) 343-5701

e-mail: [REDACTED]

2.2 ABSTRACT

HLA-DO (DO) is a non-classical class II molecule which modulates the function of HLA-DM (DM) and the loading of antigenic peptides on molecules such as HLA-DR (DR). In B lymphocytes, the majority of DO is found associated with DM and this interaction is critical to allow DO egress from the endoplasmic reticulum. However, DO does not bear any classical ER retention motifs that could be masked upon DM binding. To evaluate the role of DM in the early steps of DO maturation, we made use of the Mags.DO5 monoclonal antibody raised against DO/DM complexes. Using mixed heterodimers between DR and DO chains, we found that the epitope for Mags.DO5 is located on the DO β chain. DO showed increased reactivity with Mags.DO5 in the presence of DM, suggesting that DM influences the folding of DO. The increased reactivity of Mags.DO5 in the presence of DM was also observed in brefeldin A-treated cells, suggesting that a conformation change in DO occurs in the ER. By exchanging the N-terminal $\alpha\beta$ regions of DO for those of DR, we created a DM-independent chimeric DO molecule capable of ER egress. Interestingly, this molecule is efficiently recognized by Mags.DO5, even in the absence of DM. Taken together, our results demonstrate that DM acts as a chaperone, assisting the folding of DO to allow ER egress.

2.3 RÉSUMÉ ET CONTRIBUTION

2.3.1 Résumé

HLA-DO (DO) est une molécule non classique du CMH II qui module la fonction de HLA-DM (DM) et le chargement de peptides sur les molécules classiques du CMH II comme HLA-DR (DR). Chez les lymphocytes B, la majorité de DO se retrouve en complexe avec DM; une interaction qui est critique pour la sortie de DO du réticulum endoplasmique. Cependant, DO ne possédant pas les motifs classiques de rétention dans le RE qui pourraient être masqués suite à la liaison de DM. Ainsi, le rôle de DM dans l'egress de DO impliquerait vraisemblablement d'autres mécanismes. Pour évaluer le rôle de DM dans les premières étapes de maturation de DO, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal Mag.DO dirigé contre le complexe DO/DM. DO montre une réactivité croissante vis-à-vis de l'anticorps Mag lorsque DM est présent, suggérant ainsi que DM influencerait le repliement de DO. En utilisant des hétérodimères mixtes entre DR et DO, nous avons trouvé que l'épitope de Mag.DO est situé sur la chaîne DO β . L'augmentation de réactivité de Mag.DO en présence de DM a également été observée dans des cellules traitées avec la bréféldine A, suggérant ainsi que le changement conformationnel de DO débute dans le RE. En échangeant les régions N terminales $\alpha\beta$ de DO par celles de DR, nous avons obtenu une molécule DO chimérique capable de sortir du RE et cela indépendamment de DM. Par ailleurs, cette molécule est efficacement reconnue par Mag.DO5 même en absence de DM. Ensembles ces résultats nous suggèrent que DM agit comme un chaperon dans l'assemblage et le repliement de DO, pour permettre notamment la sortie de celui-ci du RE.

2.3.2 Contribution

Dans la première partie des travaux présentés ci-dessous, j'ai réalisé les expériences d'immunomarquages et biochimiques (Immunoprécipitation, SDS-PAGE, Western blot) montrant dans un système de transfection de cellules 293T qu'il y avait autant de DO en présence comme en absence de DM. Ces expériences ont ainsi permis de confirmer que l'augmentation de la réactivité de DO face à l'anticorps Mag.DO est liée à un changement de conformation induit par l'association à DM et non pas à une présence plus importante de molécules de DO. J'ai par ailleurs réalisé les expériences de titration des anticorps pour confirmer l'augmentation de l'affinité de Mag-DO face à HLA-DO en présence de HLA-DM. Ensemble, ces expériences confirment de façon concise l'effet chaperon de DM lors de la maturation de DO.

Dans la deuxième partie, j'ai réalisé l'ensemble des travaux pour l'identification de résidus médiant l'interaction entre DO et DM. Ces travaux consistaient d'abord à introduire des mutations ponctuelles sur les cDNA des molécules de DM (chaîne α et β) et DO α par la méthode de PCR overlap et par la suite vérifier la perte de l'interaction (si perte a lieu) dans un système de transfection cellulaire de 293T en utilisant la cytométrie en flux.

Finalement, j'ai participé avec le Dr Thibodeau, à l'analyse et l'interprétation des résultats ainsi qu'à la rédaction de cet article.

2.4 INTRODUCTION

MHC class II molecules present antigenic peptides to specific CD4⁺ T lymphocytes (1). Once synthesized in the endoplasmic reticulum, classical MHC class II $\alpha\beta$ heterodimers associate with the invariant chain (Ii). This chaperone stabilizes the class II molecules, prevents the binding of endogenous peptides and targets the complex to the proper endosomal/lysosomal compartments (2-5). In the endocytic pathway, Ii is cleaved by proteases to generate a last defined piece (CLIP), which occupies the peptide-binding groove of the MHC molecule (6). Exchange of CLIP for antigenic peptides or polypeptides is catalyzed by HLA-DM, a class II molecule found within specialized lysosomal structures called MIICs (7-10).

By opposition to the classical MHC II molecules (HLA-DR, -DP and -DQ), HLA-DM is known as a non-classical class II molecule mainly because of its lack of polymorphism (11). Its incapacity to present peptide and its weak cell surface expression were also reported (8,10,12). In addition to the removal of CLIP, other studies suggested that HLA-DM acts as a chaperone to stabilize empty class II molecule (13-15) and to edit peptides presented by HLA-DR (9,16-18). Although the precise molecular mechanism of action of HLA-DM remains to be established, many experiments suggest that protonation in the endocytic pathway results in minor, reversible structural changes exposing hydrophobic regions of the DM heterodimer (19,20). Accordingly, Ullrich *et al.* (20) used 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS), a fluorescent dye binding to hydrophobic protein patches, to demonstrate subtle pH-induced change in DM. Since the interaction of DM with DR reduces ANS binding to both molecules, it was postulated that the surface of contact comprises these pH-sensitive regions (19,20). More recently, the group of Mellins provided a model for the DR-DM interaction based on functional mutagenesis data obtained on both molecules (21,22).

Another non-classical MHC related molecule, HLA-DO, was shown to accumulate in MIIC like compartments in a DM-dependent fashion (23). HLA-DO was first described as an HLA-DM inhibitor since overexpression in CIITA-transfected cells increased the amount of classical class II molecules bound to the CLIP fragment (24,25). However, mouse B cells proficient or deficient in H2-O (equivalent of human HLA-DO) do not show dramatic variations in the levels of CLIP bound to I-A^b (26-28). It was proposed that H2-O promotes presentation of antigens internalized by membrane immunoglobulins by selectively inhibiting the activity of H2-M (murine equivalent of human HLA-DM) in early endocytic compartments rich in proteins internalized by fluid-phase endocytosis (27). This hypothesis is consistent with an active inhibitory role of HLA-DO in vitro at mildly acidic pH (early endosomes) and to a poor inhibitory potential at low pH (MIIC and lysosomal compartments) (27). Also, this model of pH-dependent activity of DO on DM is consistent with results obtained using splenocytes from mice with a targeted mutation in the H2-OA genes and which showed slightly increased efficiency in the presentation of soluble antigens (27). Accordingly, APCs from H2-O or HLA-DO transgenic animals showed reduced presentation of exogenous antigens (26,29). Others suggested that HLA-DO stabilizes HLA-DM and promote stable MHC-peptide complexes when physiological conditions are met (30). Thus, it is now accepted that H2-O and DO “modulate” MHC class II antigen processing and that their expression even favors the presentation of various peptides (26,28,30,31).

Interestingly, it was recently demonstrated that DO expression is negatively regulated in germinal centers and following B cell activation. (32-35). The proposed relationship between the DO down-regulation in GCs and the affinity maturation of antibodies is an interesting hypothesis that remains to be evaluated (36).

In B lymphocytes, the majority of DO molecules was found associated with DM (24,30,37) and this association allows DO to egress the ER (23). Lack of a recognizable di-basic ER retention motif (RXR or KKXX) suggests that the assembled DO $\alpha\beta$ heterodimer is

improperly folded in the absence of DM and most probably unstable. Misfolding of newly synthesized proteins is known to induce retention and aggregation in the ER (38). So far, the molecular interactions between DO and DM have not been characterized. In the present study, using a conformation-dependent antibody and transfected cells expressing chimeric DO molecules, we demonstrate that HLA-DM binding impacts on the conformation of DO.

2.5 MATERIALS AND METHODS

2.5.1 Plasmids and cDNA

RSV.3DR₁₈/DO β , pBSDO α .9, pBud CE4-A, pBud CE4-A DO $\alpha\beta$, pBud DM and RSV.5gptDN1 were previously described (39,40). pBud DR β was generated by inserting the *Bam*HI fragment of RSV.3 DR β 008 in pBudCE4-A. The DO β cDNA from the 721.45 cell line (41) was excised with *Bam*HI and the 1.3 kb fragment was cloned into RSV.5 neo plasmid to generate RSV.5 Neo DO β . RSV.5 Neo DR₁₈/DO β (cDO β) was generated by inserting the *Mlu*I-*Eco*RV fragment of RSV.3 DR₁₈/DO β into RSV.5neo DO β . The DR₁₈/DO α chimeric cDNA (cDO α) was made by overlap extension PCR as described (39) using the DR α cDNA cloned in the *Bam*HI site of pBlueScript (Stratagene, CA), and RSV.5gptDN1 as templates. The sequence of the oligonucleotides is available upon request. The *Sal*I-*Pvu*II fragment encompassing the junction between DR and DO was subcloned into RSV.5gptDN1. The nucleotide sequence was confirmed by DNA sequencing. A 2 Kbp *Bam*HI fragment was either cloned into the *Bg*III site of pBudCE4-A DR β to generate pBudDR₁₈/DO α + DR β or cloned into SR α puro (kindly provided by Dr. François Denis) to generate SR α puroDR₁₈/DO α .

2.5.2 Antibodies

Monoclonal antibodies L243 (DR α -specific), XD5.117 (DR β -specific), MAP.DM1 (DM-specific; Pharmingen; (42)) as well as the mouse serum against DO β and the rabbit sera against DO α and DM β have been described previously (39,40). HKC5 is an IgG₁ mouse monoclonal antibody specific for the cytoplasmic tail of DO β (43). MagsDO.1, MagsDO.4 and MagsDO.5 monoclonal antibodies were generated from mice immunized against purified DO-DM complexes and were described previously (44) Secondary antibodies were the Alexa Fluor 488-conjugated® goat anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes,

Eugene, Oregon), biotinylated goat anti-rabbit antibody (Bio/Can Scientific, Ont., Canada) and Texas red-coupled streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech).

2.5.3 Cell lines, transfections and BFA treatment

HeLa DR α +DR₁₈/DO β (DR α /cDO β) was previously described (39). HeLa DO and HeLa DM.5 were described (40). Raji and HeLa cells were kindly provided by Dr. R.P. Sékaly. HEK 293T cells were obtained from Dr. Eric Cohen. Cells were cultured in DMEM, 10% FBS (Invitrogen) and selective agents. HeLa cells were co-transfected by the calcium phosphate precipitation method (45) using 2-20 μ g of each DNA or transfected with Fugene6 (Roche Diagnostics, Canada) using 1 μ g of each DNA (39). HeLa DM.5 were transfected with Fugene6 reagent. For transient expression, HEK293T cells were transfected by the calcium phosphate precipitation method using 2 μ g of each DNA. Cells were analyzed 2 days post-transfection. For Brefeldine A (BFA) treatment, a final concentration of 10 μ g/ml of BFA was added 6 hours post-transfection. After 16 hours of treatment, cells were harvested and analyzed by flow cytometry.

2.5.4 Flow cytometry

Cells were harvested using trypsin, washed and stained for surface expression. For intracellular staining, cells were treated with formaldehyde for 20 minutes, then with 50mM NH₄Cl for 15 minutes and permeabilized with PBS-BSA containing 0,05% saponin (39). Cells were analyzed on a FACS[®]calibur (Becton Dickinson, USA).

2.5.5 Fluorescent microscopy

HeLa cells were plated on cover slips in 24 well plates and cultured for 2 days before intracellular staining as described for flow cytometry analysis. Cells were washed twice and the cover slips were mounted using Gelto1 Mounting Medium (Immunon Shandon). Cells

were analyzed by fluorescence microscopy on a Zeiss axioplan 2 imaging microscope. Photographs were taken with a Sony DXC-390P digital camera.

2.5.6 Immunoprecipitation, Western blotting and endoglycosidase H treatment

Cells (10^7) were trypsinized, washed in PBS and lysed into 1% CHAPS or Triton-X100 (39). Immunoprecipitations were done overnight at 4°C using primary antibodies bound to protein-G coupled to sepharose 4B (Amersham Biosciences). Samples were analyzed by western blots 39. For EndoH treatment, lysates containing 2×10^5 cells were directly digested with Endoglycosidase H for 30 minutes at 37°C (NEB, Canada) and resuspended in reducing Laemli 5X buffer. Samples were boiled and analyzed on western blots.

2.6 RESULTS

2.6.1 Mag.DO5 mAb binds the HLA-DO β chain

In DM-negative cells, transfected DO was shown to be retained in the ER (23). Lack of maturation was also observed in mice with a targeted deletion of HLA-DM (23). However, when the two molecules are co-expressed, a complex forms and is sorted to the endocytic pathway. Interestingly, we did not find in the primary sequence of either DO α or DO β a classical di-basic ER retention motifs that could be responsible for ER retention and that could be overcome by DM upon binding. Moreover, we have recently showed that a mutation in the putative groove of DO (α P11 to V) could restore ER egress independently of HLA-DM expression (46). Thus, by analogy with the critical role of Ii in the cell surface expression of classical class II molecules (1), we postulated that DM may assist folding of the DO $\alpha\beta$ heterodimer, allowing its release from ER. To gain insights into a possible impact of DM expression on the structure of DO, we made use of Mags.DO monoclonal antibodies obtained following immunization of mice with DO/DM complexes purified from a human B cell line (44). Competition experiments showed that the epitopes recognized by Mags.DO1, Mags.DO4 and Mags.DO5 overlapped and were most likely similar (data not shown). These will be collectively referred to as Mags.DO. Given our recent demonstration that DM bind to the α chain of DO (46) and that Mag.DO recognizes the DO/DM complex 44, we hypothesized that Mag.DO binds to the DO β chain. This was verified using mixed DR-DO pairs expressed in class II negative HeLa cells (47). These mixed heterodimers (DR α /cDO β and cDO α /DR β) overcome ER retention and were made possible by exchanging the first 18 amino acids of a non-classical chain for the corresponding sequence of HLA-DR (**Figure 2.9.2A**). The cell surface expression of DR α /cDO β and cDO α /DR β was controlled using DR-specific antibodies against the α and β chains, respectively (**Figure 2.9.2C**). Mags.DO recognized the DR α /cDO β mixed pair expressed on HeLa cells but not its cDO α /DR β counterpart. These results suggested that Mags.DO is specific for an

epitope located on the DO β chain. In support of this, we found that although Mags.DO does not bind DR, it competed significantly with the binding of an anti-serum made against the DR α /cDO β mixed pair (data not shown).

2.6.2 Mags.DO recognizes a conformational epitope

The fact that Mags.DO does not recognize DO β on immunoblots suggested that the Ab recognizes a conformational epitope (data not shown). This was confirmed by flow cytometry on permeabilized cells. Indeed, Mag.DO recognizes the DO $\alpha\beta$ complex expressed following transfection of both α and β chain in 293T cells but recognized neither DO α nor DO β when expressed separately (**Figure 2.9.1**). This demonstrates that the Mags.DO recognize a conformational epitope located on DO.

2.6.3 Mags.DO staining increases in presence of HLA-DM

Although Mags.DO was made against DM/DO complexes, it does not recognize DM (data not shown). However, in transiently transfected HEK 293T cells, Mags.DO recognized more strongly DO when part of a complex with DM as compared to DO expressed in the absence of DM (**Figure 2.9.3A**). To rule out that these differences were due to variations in the level of DO expression, cells were permeabilized and stained with the HKC5 mAb specific for the cytoplasmic tail of DO β (43). **Figure 2.9.3A** shows that transfected cells express comparable level of DO β . Moreover, since DO β and DO α are encoded on the same vector, we can rule out a lack of DO α chain in the DM⁻ cells. The mean fluorescence values obtained for the various stainings were plotted as the Mags.DO over HKC5 ratio and the results clearly show an impact of DM expression (**Figure 2.9.3B**). However, although the HKC5 staining suggests that there is equivalent amount of DO β in the presence or absence of DM, the possibility remains that DM could increase the association between DO α and DO β complexes, thereby increasing the Mags.DO staining. To rule out this possibility we immunoprecipitated DO α in presence or absence of DM and compared by western blotting

the amount of co-immunoprecipitated DO β . As shown in **figure 2.9.3C**, same amount of DO complexes is being immunoprecipitated either in presence or absence of DM.

2.6.4 Conformation change occurs in the ER

The possibility remained that the effect of DM was indirect and the consequence of DO targeting to acidic compartments. Indeed, the group of Karlsson demonstrated in vitro using ANS that DO undergoes a conformation change at low pH (27). To evaluate if a conformation change could also occur in the ER, we transiently expressed DO or DO/DM in HEK 293 and treated the cells with brefeldin A to prevent ER egress. Under these conditions, a control DM molecule devoid of its sorting tyrosine-based signal (DM 226YTPL) could not be detected at the cell surface by flow cytometry (not shown). **Figure 2.9.4** shows that the increased reactivity of Mags.DO toward DO expressed in the presence of DM was also observed in BFA-treated cells. Expression is low in these conditions, most probably because of the short period time point tested (24h). This result suggested that the DM-induced conformation change detected in DO was the result of interactions taking place in the ER. The same conclusion was reached from the study of a mutant DO molecule that is strongly impaired in its capacity to leave the ER (data not shown). Finally, the effect of DM was also seen when using a mutant devoid of its lysosomal sorting signal (data not shown).

2.6.5 The Mags.DO reactivity increases on cells expressing correctly folded HLA-DO molecules

The fact that Mags.DO does not bind DM suggests that the strong recognition of DO by the mAb could be observed in the absence of DM given that DO is properly folded. To verify this hypothesis, we expressed a chimeric DO molecule that allows the substantial accumulation, proper maturation and ER egress of DO independently of the presence of HLA-DM. This construct was made based from our previous results showing that the

substitution of the first 18 amino acids of DO β for those of DR β (cDO β) allowed the pairing with DR α and vice versa (**Figure 2.9.2**). Pairing of the cDO α and cDO β chains produced the cDO molecule. As opposed to wild-type DO which co-localizes with the ER marker calnexin, the cDO molecule was able to egress the ER in DM- HeLa cells and to accumulate in Lamp-1⁺ scattered punctate cytoplasmic vesicles (**Figure 2.9.5B and data not shown**).

The pattern of Mags.DO and HKC5 staining was evaluated on cDO expressing HeLa. As seen in **figure 2.9.5A**, the conformational antibody recognized cDO as efficiently as HKC5. This is reminiscent of the pattern observed for the staining of DO in the presence of DM (**Figure 2.9.3A**). Moreover, the presence of DM did not increase the reactivity against cDO. We confirmed that cDO, despite the presence of 18 DR amino acids on each chain, was still able to bind to DM in a DO-like fashion. It has been shown previously that the strong DM/DO interaction was resistant to both Chaps and Triton X-100 while weaker ligands of DM, such as HLA-DR, readily dissociate in Triton (23,48). The cells lysates were immunoprecipitated with the DO β -specific serum and blotted for the presence of DM. As a control, we used Raji B cells which express both DO and DM. **Figure 2.9.5C** confirms that DM/DO complexes, as opposed to DM/DR, can be immunoprecipitated from lysates of Raji cells prepared in Triton. Interestingly, the cDO molecule behaved just like wild-type DO and co-immunoprecipitated DM. Taken together, these results demonstrate that cDO interacts with DM in a manner indistinguishable from DO.

Taken together, these results on cDO demonstrate that the Mags.DO epitope is located on DO and does not include DM residues. This suggests that the DM-induced increase in Mags.DO recognition of wild-type DO is the consequence of a conformation change of the latter. The proper pairing of the DO α 1 and DO β 1 membrane distal domains, through the use of chimeric molecules or co-expression of DM, probably affects the conformation of DO and increases the binding of Mags.DO1. In addition, the properly folded cDO or

DO/DM complex can escape ER retention, a most likely consequence of the optimized pairing between the $\alpha\beta$ N-terminal regions.

2.7 DISCUSSION

In transfected HeLa cells and in murine B lymphocytes, under the experimental conditions tested so far, DO or H2-O molecules did not egress the ER on their own (23). In the present study, we sought to understand the mechanism by which DO escapes retention when expressed in DM⁺ cells. Interestingly, Liejdahl et al. showed that even in the absence of DM, the DO α and β chains can be co-immunoprecipitated (23). Together with the absence of known ER retention signals in the primary sequence of the α or β chain, this observation suggested to us that the quaternary structure of the DO heterodimer was not optimal and was somehow recognized by an ER chaperone. Consequently, DO does not acquire post-translational modifications in the form of complex Endo H-resistant sugars (23).

Studies on mixed pairs suggested a cis-co-evolution of α and β chain polymorphism favouring pairing of molecules from a given haplotype (49). A role for Ii has been described to facilitate ER egress of mismatched heterodimers (50). Although DO behaves very much like a mismatched pair, Ii does not seem to affect its sorting (23). Our results show that DM acts as a chaperone and may give some clues as to the mechanism by which it allows DO to egress the ER. We have recently discovered a point mutation that allowed DO egress independent of DM (46). We proposed that the DO α P11V mutation allowed proper folding of DO and reduced the need for DM. Here, using the Mags.DO conformational mAb, we demonstrate that HLA-DM affects the conformations of HLA-DO. Our preliminary results suggest that the DM-induced conformation change must be pretty drastic. Increasing the Mags.DO concentrations did not restore full staining by flow cytometry on permeabilized cells, suggesting that the epitope is simply not present on most

free DO molecules (data not shown). Some molecules would acquire spontaneously the proper conformation, explaining the weak but positive Mags.DO staining and the presence of few DO molecules at the cell surface in the absence of DM (data not shown).

The fact that changes in the N-terminal DO α and β regions restored Mags.DO reactivity suggests that the epitope is located in the membrane-distal β 1 domains. However, we cannot rule out that efficient pairing in the N-terminal region affects the structure of the membrane proximal domains. Mapping of the binding sites on HLA-DO and -DM will help to understand the interactions. Our results showed that the DO α chain, especially the α 1 domain, encompasses residues interacting with DM (46). However, none of the mutations we have made on the exposed regions of the DM α 1 and DM β 1 domains were sufficient to abrogate DO binding (**see supplemental data, figures 2.11.1 to 2.11.3**). Also, site-directed mutagenesis in the DO α 2 domain did not identify additional residues involved in the interaction (**see supplemental data, figure 2.11.4**).

Early after their synthesis in the ER, α and β chain of MHC molecules must associate to avoid premature degradation. Quality control chaperones include BiP, GRP94 et ERp72 which have been implicated in the ER retention of class II molecules in the absence of Ii (1). Although HLA-DO has not been investigated for the binding of these chaperones, we can assume that it will follow similar rules. It is likely that a transient association with ER chaperones such as BIP, calnexin or calreticulin will cause retention. This association probably persists until DM interacts with DO to form a transport competent multi-unit complex. Indeed, we suspect that DM allows DO to egress the ER by inducing the removal of an ER resident chaperone. In that model, it is not known whether HLA-DM would directly compete with this chaperone or if it would rescue HLA-DO by modifying its conformation in a way the chaperone will no longer recognize it. Our results strongly suggest the later option for several reasons. First, we clearly show that DM modifies the conformation of HLA-DO. Second, analysis of our chimerical cDO molecule suggests that a correction of the conformation is sufficient to avoid retention. Third, cDO molecule can

egress from ER, which suggests that it is not constrained by any chaperone activity. Furthermore, HLA-DM continues to bind cDO even if the presumed chaperones are not further involved. It is thus unlikely that DM and the chaperone will compete for the same HLA-DO residues. Future experiments will define the chaperones involved and the mechanisms responsible for the degradation of DO.

2.8 REFERENCES

1. Cresswell, P. 1994. Assembly, Transport, and Function of Mhc Class-II Molecules. *Annual Review of Immunology* 12:259-293.
2. Bakke, O. and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
3. 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.
4. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-618.
5. Roche, P. A. and P. Cresswell. 1991. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:3150-3154.
6. Ghosh, P., M. Amaya, E. Mellins, and D. C. Wiley. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457-462.
7. 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.
8. Denzin, L. K., N. F. Robbins, C. Carboy-Newcomb, and P. Cresswell. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606.

9. 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.
10. Mosyak, L., D. M. Zaller, and D. C. Wiley. 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.
11. 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.
12. Fremont, D. H., F. Crawford, P. Marrack, W. A. Hendrickson, and J. Kappler. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385-393.
13. Denzin, L. K., C. Hammond, and P. Cresswell. 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J.Exp.Med.* 184:2153-2165.
14. Kropshofer, H., S. O. Arndt, G. Moldenhauer, G. J. Hammerling, and A. B. Vogt. 1997. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6:293-302.
15. Vogt, A. B., G. Moldenhauer, G. J. Hammerling, and H. Kropshofer. 1997. HLA-DM stabilizes empty HLA-DR molecules in a chaperone-like fashion. *Immunol.Let.* 57:209-211.
16. Katz, J. F., C. Stebbins, E. Appella, and A. J. Sant. 1996. Invariant chain and DM edit self-peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J.Exp.Med.* 184:1747-1753.
17. 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.
18. Van Ham, S. M., U. Grueneberg, G. Malcherek, I. Broecker, 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.
19. Busch, R., Z. Reich, D. M. Zaller, V. Sloan, and E. D. Mellins. 1998. Secondary structure composition and pH-dependent conformational changes of soluble recombinant HLA-DM. *J.Biol.Chem.* 273:27557-27564.

20. Ullrich, H. J., K. Doring, U. Grueneberg, F. Jaehnig, J. Trowsdale, and M. S. Van Ham. 1997. Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:13163-13168.
21. Doebele, C. R., R. Busch, M. H. Scott, A. Pashine, and D. E. Mellins. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity* 13:517-527.
22. Pashine, A., R. Busch, M. P. Belmares, J. N. Munning, R. C. Doebele, M. Buckingham, G. P. Nolan, and E. D. Mellins. 2003. Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides. *Immunity* 19:183-192.
23. Liljedahl, M., T. Kuwana, W. P. Fung-Leung, M. Jackson, P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-4824.
24. Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman, and P. Cresswell. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.
25. Van Ham, S. M., E. P. M. Tjin, B. F. Lillemeier, U. Gruneberg, K. E. Van Meijgaarden, L. Pastoors, D. Verwoerd, A. Tulp, B. Canas, D. Rahman, T. H. Ottenhoff, D. J. Pappin, J. Trowsdale, and J. Neefjes. 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7:950-957.
26. Brocke, P., E. Armandola, N. Garbi, and G. J. Hammerling. 2003. Downmodulation of antigen presentation by H2-O in B cell lines and primary B lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 33:411-421.
27. Liljedahl, M., O. Winqvist, C. D. Surh, P. Wong, K. Ngo, L. Teyton, P. A. Peterson, A. Brunmark, A. Y. Rudensky, W. P. Fung-Leung, and L. Karlsson. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-243.
28. Perraudeau, M., P. R. Taylor, H. J. Stauss, R. Lindstedt, A. E. Bygrave, D. J. Pappin, S. Ellmerich, A. Whitten, D. Rahman, B. Canas, M. J. Walport, M. Botto, and D. M. Altmann. 2000. Altered major histocompatibility complex class II peptide loading in H2- O-deficient mice. *Eur.J.Immunol.* 30:2871-2880.

29. Fallas, J. L., H. M. Tobin, O. Lou, D. Guo, D. B. Sant'Angelo, and L. K. Denzin. 2004. Ectopic expression of HLA-DO in mouse dendritic cells diminishes MHC class II antigen presentation. *J.Immunol.* 173:1549-1560.
30. Kropshofer, H., A. B. Vogt, C. Thery, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena, and G. J. Hammerling. 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.
31. van Ham, M., M. van Lith, B. Lillemeier, E. Tjin, U. Gruneberg, D. Rahman, L. Pastoors, K. van Meijgaarden, C. Roucard, J. Trowsdale, T. Ottenhoff, D. Pappin, and J. Neefjes. 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.
32. Chalouni, C., J. Banchereau, A. B. Vogt, V. Pascual, and J. Davoust. 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.
33. Chen, X., O. Laur, T. Kambayashi, S. Li, R. A. Bray, D. A. Weber, L. Karlsson, and P. E. Jensen. 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.
34. Lapointe, R., A. Bellemare-Pelletier, F. Housseau, J. Thibodeau, and P. Hwu. 2003. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 63:2836-2843.
35. Roucard, C., C. Thomas, M. A. Pasquier, J. Trowsdale, J. J. Sotto, J. Neefjes, and M. van Ham. 2001. In vivo and in vitro modulation of HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation. *J.Immunol.* 167:6849-6858.
36. Chen, X. and P. E. Jensen. 2004. The Expression of HLA-DO (H2-O) in B Lymphocytes. *Immunol.Res.* 29:19-28.
37. Jensen, P. E. 1998. Antigen processing: HLA-DO--a hitchhiking inhibitor of HLA-DM. *Curr Biol* 8:R128-31.
38. Marquardt, T. and A. Helenius. 1992. Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* 117:505-513.

39. 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-DO β . *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
40. 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.
41. Tonnelles, C., R. DeMars, and E. O. Long. 1985. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-2847.
42. Hammond, C., L. K. Denzin, M. Pan, J. M. Griffith, H. J. Geuze, and P. Cresswell. 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J.Immunol.* 161:3282-3291.
43. 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 β in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-382.
44. Glazier, K. S., S. B. Hake, H. M. Tobin, A. Chadburn, E. J. Schattner, and L. K. Denzin. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J.Exp.Med.* 195:1063-1069.
45. Graham, F. L. and A. J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467.
46. Deshaies, F., A. Brunet, D. A. Diallo, L. K. Denzin, A. Samaan, and J. Thibodeau. 2005. A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:6443-6448.
47. Samaan, A., J. Thibodeau, W. Mahana, F. Castellino, P. A. Cazenave, and T. J. Kindt. 1999. Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DR α and a chimeric DO β chain. *Int.Immunol.* 11:99-111.
48. Sanderson, F., C. Thomas, J. Neefjes, and J. Trowsdale. 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity.* 4:87-96.
49. Braunstein, N. S., R. N. Germain, K. Loney, and N. Berkowitz. 1990. Structurally interdependent and independent regions of allelic polymorphism in class II MHC molecules: implications for Ia function and evolution. *J.Immunol.* 145:1635-1645.

50. Layet, C. and R. N. Germain. 1991. Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A α B β dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2364-2350.

2.9 FIGURES

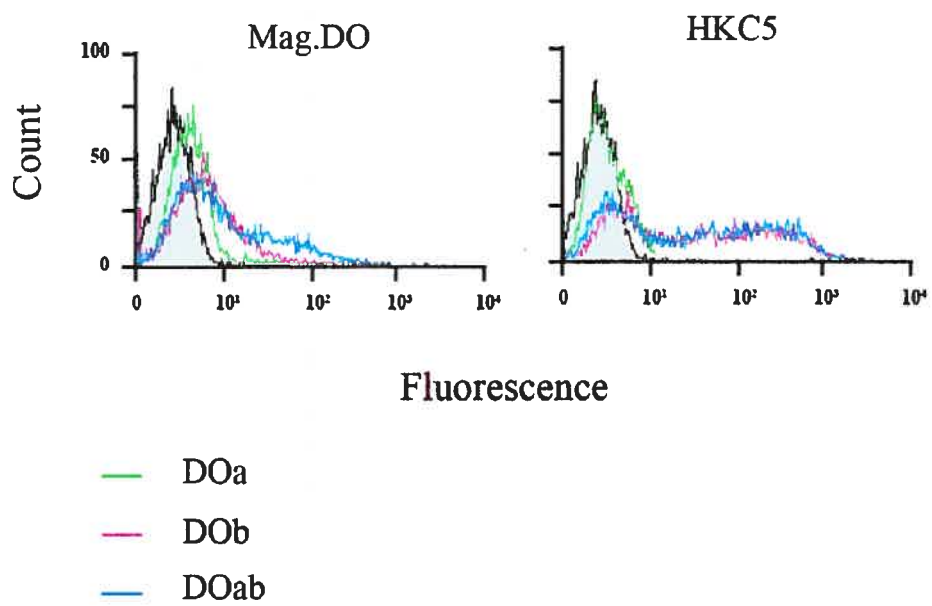


Figure 2.9.1 Mag.DO mAb is conformational

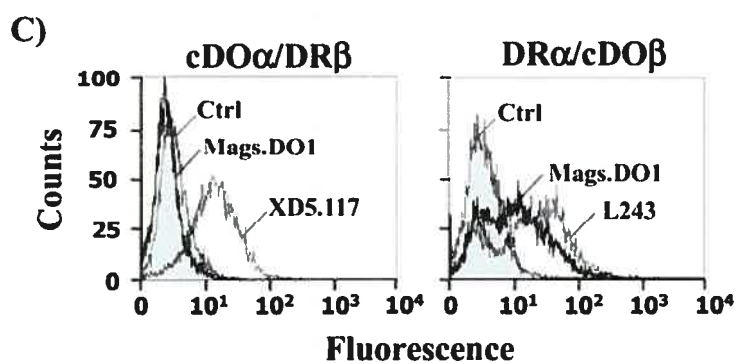
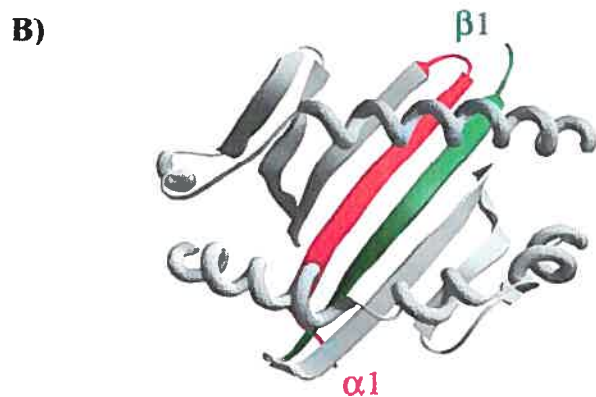
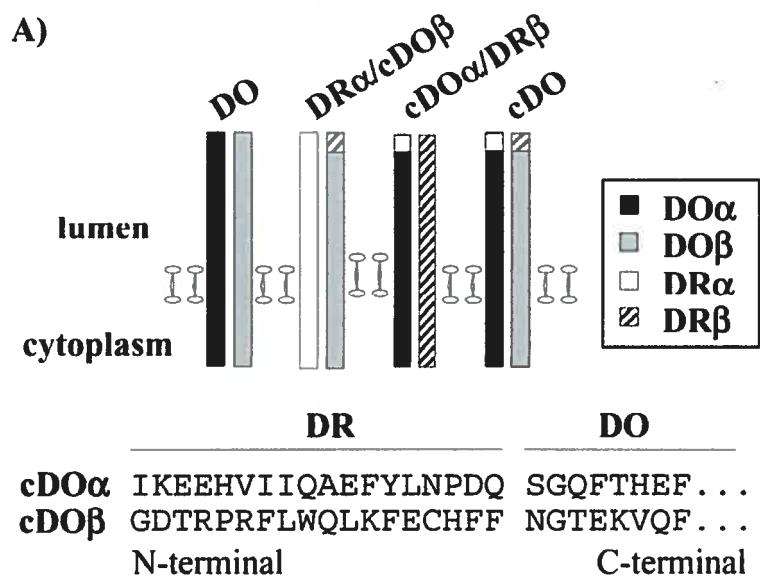


Figure 2.9.2 Monoclonal antibody Mags.DO1 maps to the β chain of DO

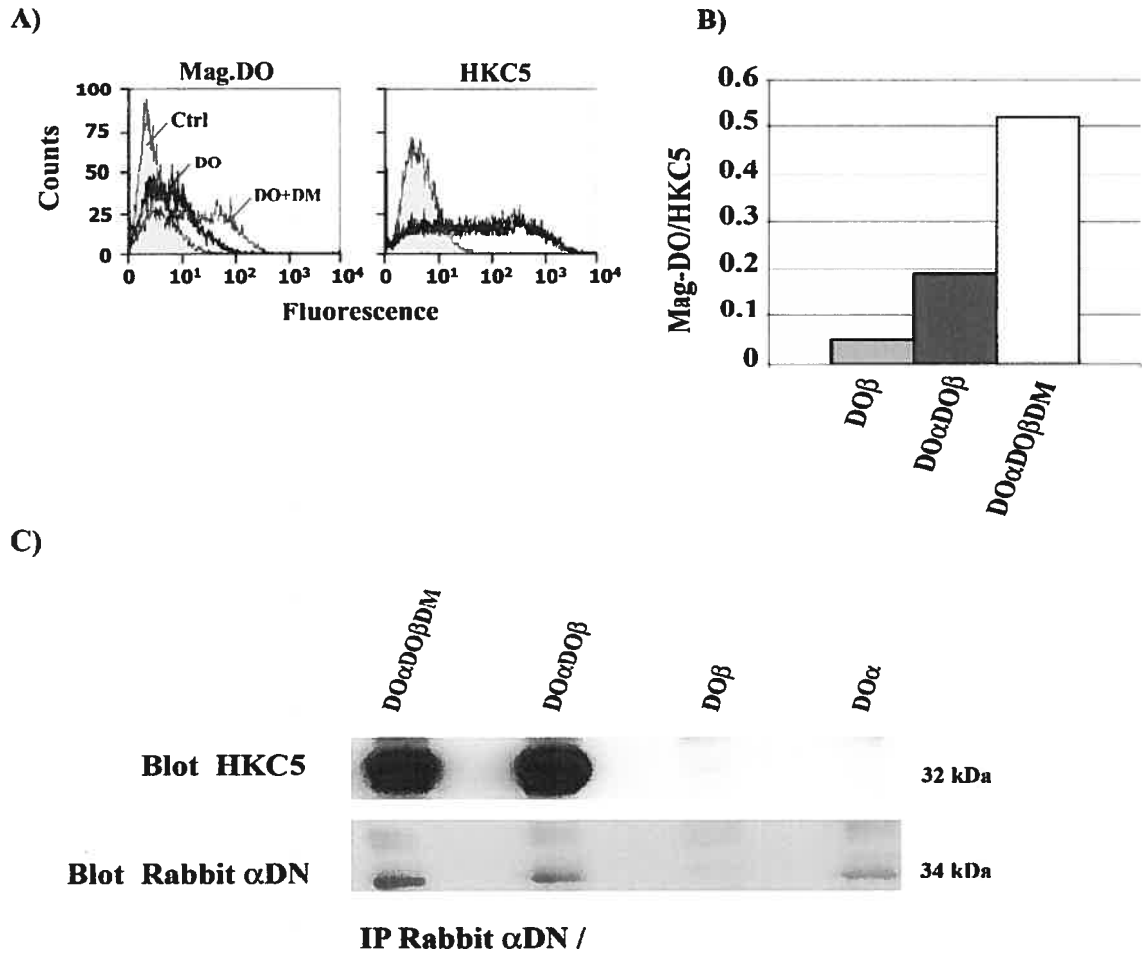


Figure 2.9.3 DM increases Mag.DO reactivity

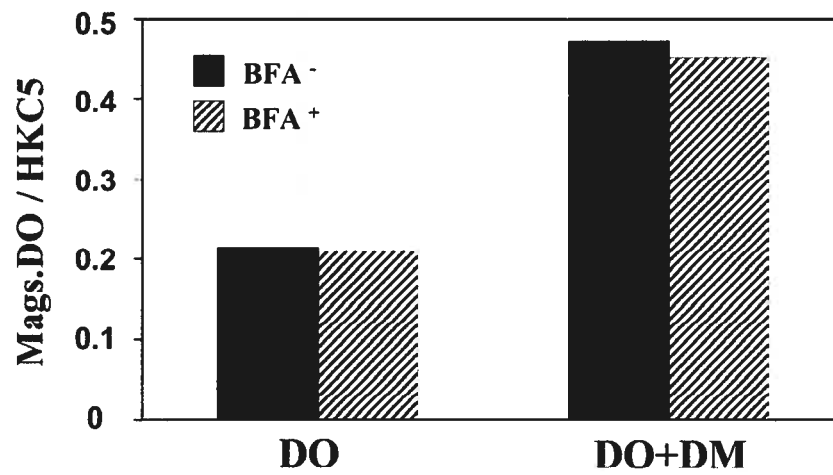
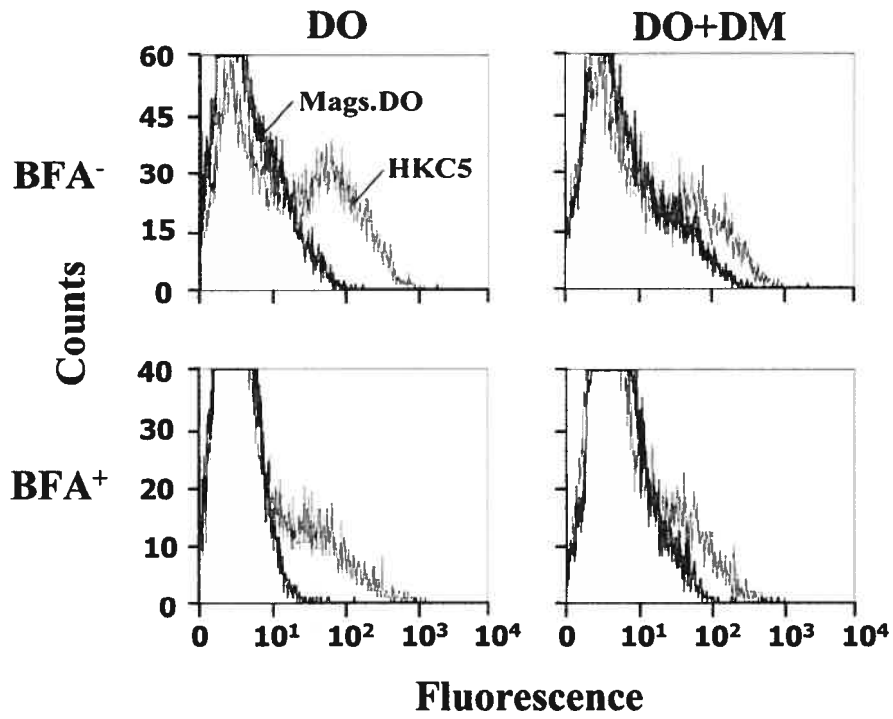


Figure 2.9.4 DM-induced conformation change occurs in ER

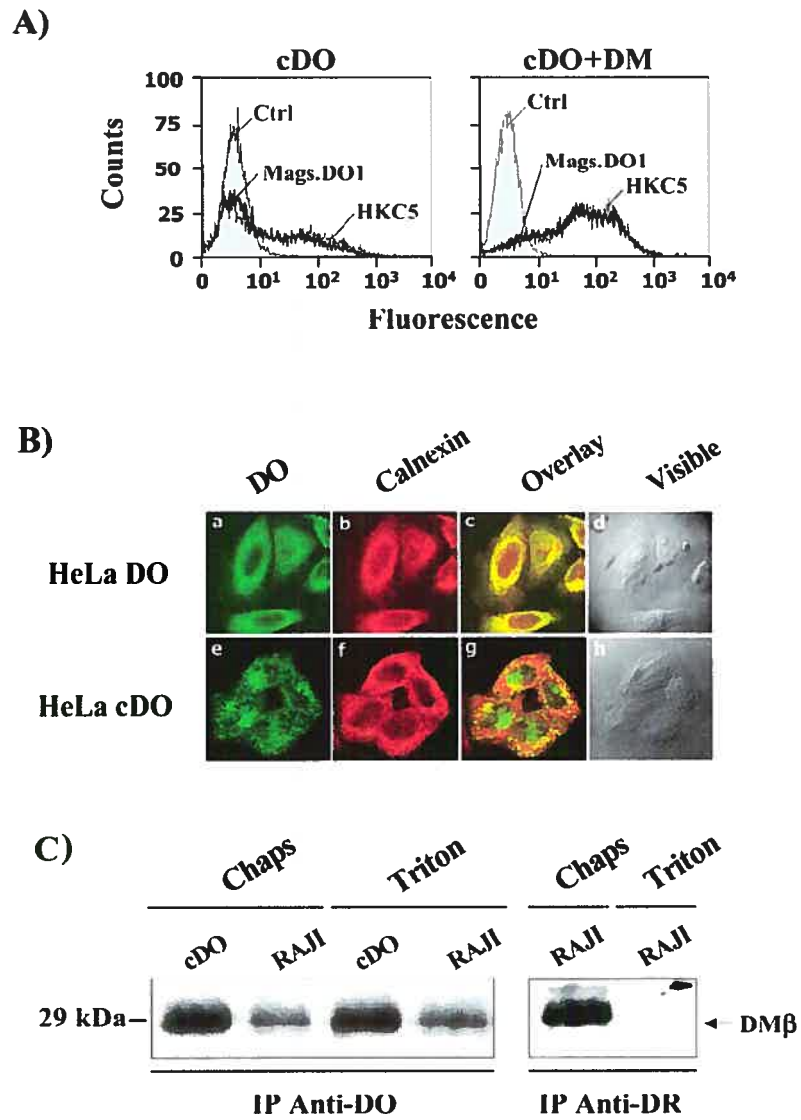


Figure 2.9.5 DO chimera with DR $\alpha\beta$ N-terminal domain is DM independent

2.10 FIGURE LEGENDS

Figure 2.8.1 Mag.DO mAb is conformational

Flowcytometry of transiently transfected HEK293T cells with either DO α alone or DO β alone or DO α + DO β cDNA and stained with Mag.DO and HKC5.

Figure 2.8.2 Monoclonal antibody Mag.DO1 maps to the β chain of DO

Flow cytometry analysis of HeLa cells expressing mixed pairs and stained using Mags.DO1 (bold line) or DR-specific (thin line) monoclonal antibody L243 (DR α /cDO β) or XD5.117 (cDO α /DR β). Control staining using HeLa cells incubated only with the Alexa-488-coupled secondary antibody is shown as a filled histogram.

Figure 3.8.3 DM increases Mag.DO reactivity

A) HEK 293T cells were transfected with either DO alone or DO+DM cDNA and stained 48 hours later with Mag.DO (left panel) and cytoplasmic DO β -specific HKC5 antibody. B) Ratio of fluorescence means. C) Western blots analysis. DO, DO+DM transfected cells and control cells (DO α alone and DO β alone) were lysed in Triton X-100 and immunoprecipitated with rabbit anti-DO α . Membrane were blotted with anti DO β cytoplasmic tail HKC5 and control Rabbit anti DO α .

Figure 2.8.4 DM induced conformation change occurs in ER

HEK293T were transfected with either DO alone (left panel) or DO and DM (right panel) and treated with BFA 6 hours later. After 16 hours cells were stained with Mag.DO and HKC5 antibodies and analysed by flowcytometry. The histogram represents the ratio of Mag.DO over HKC5 for BFA treatment and control (without BFA).

Figure 2.8.6 DO chimera with DR $\alpha\beta$ N-terminal domain is DM independent

A) Flow cytometry analysis of HeLa cells transfected with cDO alone (left panel) or cDO + DM (right panel). Cells were permeabilized and stained with Mag.DO and HKC5. **B)** Confocal microscopic analysis of cDO cellular localisation. HeLa DM negative cells were stably transfected with either cDO chimera (e to h) or wt DO (a to d), permeabilized and stained with Mag.DO and followed by Alexa 488-labeled goat anti-mouse antibodies (a-e) or with rabbit anti-calnexin followed by biotinylated goat anti-rabbit antibody and texas-red conjugate streptavidin (b-f). Panel c and g show colocalization of wt DO or cDO with calnexin. Panel d and h show the cells in visible light. **C)** Comparing cDO to wt DO from Raji for interaction with DM. cDO+DM transfected HEK 293T and Raji cells were lysed in 1% Chaps or Triton X-100, immunoprecipitated with anti DO and membrane were blotted with anti-DM β . As control Raji cells lysed with same reagent were immunoprecipitate with anti-DR XD5.

2.11 SUPPLEMENTAL DATA

2.11.1 Mapping of DO/DM contacting residues by site directed mutagenesis

We used site-directed mutagenesis on exposed residues to map contacting amino acids between DO and DM on both molecules. Our results with the putative anti-DM epitope location show that DM β 1 domain is the only DM exposed region that may be implicated in DO/DM interaction.

2.11.1.1 Mutagenesis

pBSDM β Y, pBud CE4-A, pBud CE4-A DO $\alpha\beta$, pBud DM, pBud DO α , pBud DO β and pBud DO α PV/DO β were previously described (1-3).

Mutant DM and DO molecules were generated by site directed mutagenesis by overlap PCR method (4) using Expand High fidelity PCR Taq polymerase[®] (Roche Diagnostic Inc). In summary, DM β mutants were generated from pBS-DM β Y (mutant Y226A) using pBluscript Reversal and Universal externals primers along with mutagenics internals primers (see below Table of mutagenic primers and Mutants DM and DO cDNA). After generating a 3'PCR product using Reversal with mutagenic primer B and Universal with mutagenic primer C, the two overlapping PCR product were mixed and a final amplification was perform using Reversal and Universal primers. Resultants PCR fragments was digested with Sal I and XbaI and then cloned in pBudCE4-A vector to generate pBud DM β Y mutant x (See Table of mutagenic primers and Mutants DM and DO cDNA). The same strategy was used to generate DM α mutants from a pBud DM α wt and DO α mutant from pBud DO α PV using corresponding and externals primers. Mutants DM α were subcloned in pBudCE4-A at NotI / XhoI site. For DO α PV mutants, PCR final

product was digested with Sall and Bsu36I and subcloned in pBud DO α PV/DO β digested with same enzyme

Table 1 HLA-DM mutagenic primers

MUTANT	OLIGO
DM α -D26N, G27P	C :5'GTGTACTGCCAGAATCCGAGTCCCAGTGTGGGACTC 3' B:5'GAGTCCCACACTGGGACTCGGATTCTGGCAGTACAC 3'
DM α - S28D, P29Q	C: 5'TGCCAGGATGGGGACCAGAGTGTGGGACTC 3' B: 5'GAGTCCCACACTCTGGTCCCCATCCTGGCA 3'
DM α -F47M, S48A	C: 5' TTCTTCTTCGACATGGCCAGAACACTCGG 3' B: 5' CCGAGTGTTCTGGGCCATGTCGAAGAAGAA 3'
DM α -Q49K, N50 K, T51E	5' CTTTTCTTCTTCGACTTTTCGAAGAAGGAGCGG 3' 5' CCGCTCCTTCTTCGAAAAGTCGAAGAAGAAGAA 3'
DM α - N15A	C :5' GATGACCTGCAGGCTCACACATTCCTG 3' B: 5' CAGGAATGTGTGAGCCTGCAGGTCATC 3'
DM β -D14F, D15A	C: 5' ACCTGTCTGTTGTTTCGCTGCTGGGACTCCAAAGGAT 3' B :5'ATCCTTTGGAGTCCCAGCAGCGAACAACAGACAGG T 3'
DM β - A17N	C:5' CTGTTGGATGATAACGGTACCCCAAAGGAT 3' B:5' TCCTTTGGGGTACCGTTATCATCCAACAGA 5'
DM β -P38S, E39A, E40V	C: 5'ACCTGCTGGGATTCTGCAGTGAATAAGATGGCC 3' B: 5'GGCCATCTTATTCAGTGCAGAATCCCAGCAGGT 3'
DM β -C35A, W36A	C: 5' CTG CTG ACC GCA GCA GAT CCA GAG 3' B: 5' CTC TGG ATC TGC TGC GGT CAG CAG 3'

DMβ-W36A, D37A	C: 5'CTG ACC TGC GCA GCA CCA GAG GAG 3' B: 5'CTC CTC TGG TGC TGC GCA GGT CAG 3'
DMβ-N41A, K42A	C: 5'CCA GAG GAG GCT GCA ATG GCC CCT 3' B: 5'AGG GGC CAT TGC AGC CTC CTC TGG 3'
DMβ-M43A	C: 5'GAG AAT AAG GCT GCC CCT TGC 3' B: 5'GCA AGG GGC AGC CTT ATT CTC 3'
DMβ-P45A, C46A	C: 5'AAG ATG GCC GCT GCA GAA TTT GGG 3' B: 5'GGG AAA TTC TGC AGC GGC CAT CTT 3'
DMβ- E47A, F48A	C: 5'GCC CCT TGC GCT GCT GGG GTG CTG 3' B: 5'CAG CAC CCC AGC AGC GCA AGG GGC 3'
DMβ-G49A, V50A, L51A	C: 5'TGC GAA TTT GCG GTG GCT AAT AGC TTG 3' B: 5'CAA GCT ATT AGC CAC CGC AAA TTC GCA 3'
DMβ-L51A, N52A	C : 5'GAA TTT GGG GTG CTG AAT AGC TTG 3' B : 5'CAA GCT ATT CAG CAC CCC AAA TTC 3'

Table2 HLA-DO mutagenic primers

MUTANT	PRIMERS
DOα - R89E	C : 5'CCT CCA GAG GTG ACC 3' B : 5' GGT CAC CTC TGG AGG 3'
DOα - R97P	C : 5' AAG TCT CCT GTG GAG 3' B': 5' CTC CAC AGG AGA CTT 3'
DOα- A134SQ135E	C : 5' GGA GTG TCA GAG ACC AGC 3' B : 5' GCT GGT CTC TGA CAC TCC 3'
DOα - Y139L	C : 5' AGC TTC CTG TCC CAG 3' B : 5' CTG GGA CAG GAA GCT 3'

DO α - Q141R	C : 5' TAT TCC AGG CCT GAC 3' B : 5' GTC AGG CCT GGA ATA 3'
---------------------	--

2.11.1.2 Cell transfection and flow cytometry

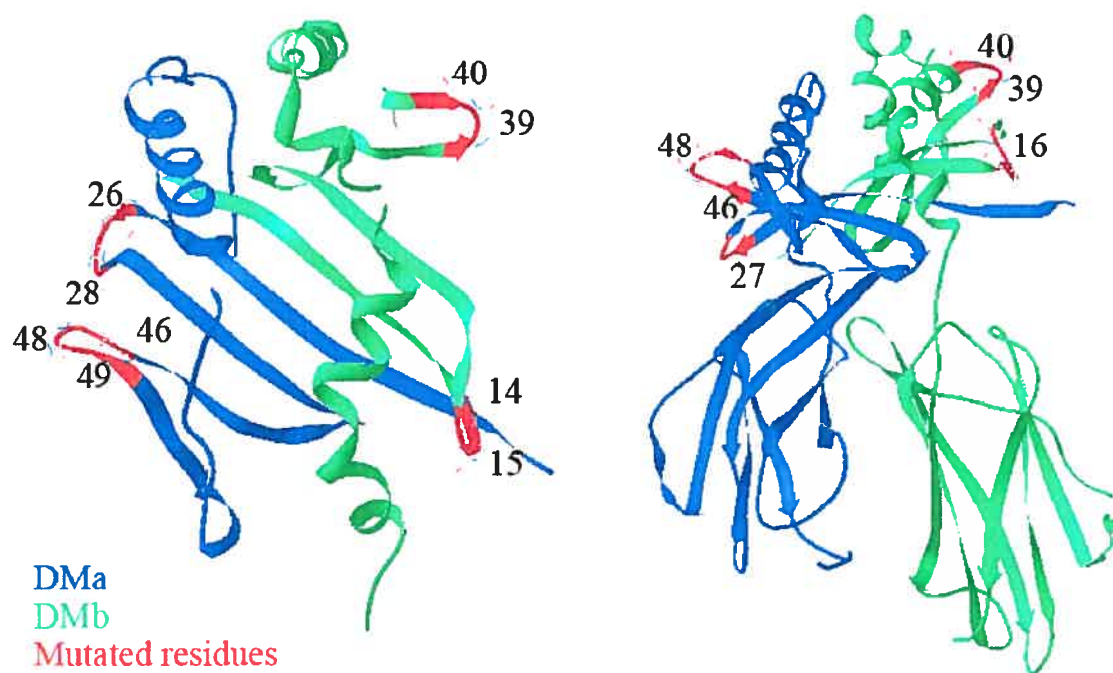
Mutant DM α or DM β cDNA were transfected in 293T cells with DM β Y or DMawt cDNA and DO α β wt cDNA using calcium phosphate precipitation method as describe in (3). Mutant DO cDNA were transfected with DM wt using the same calcium phosphate precipitation method. 48 hours cells were surface or total stained with Map and Mag as describe in Material and methods.

2.11.1.3 Supplemental data References

1. 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-DO β . *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
2. Deshaies, F., A. Brunet, D. A. Diallo, L. K. Denzin, A. Samaan, and J. Thibodeau. 2005. A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:6443-6448.
3. 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.
4. 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.

2.11.1.4 Supplemental Figures

A)



B)

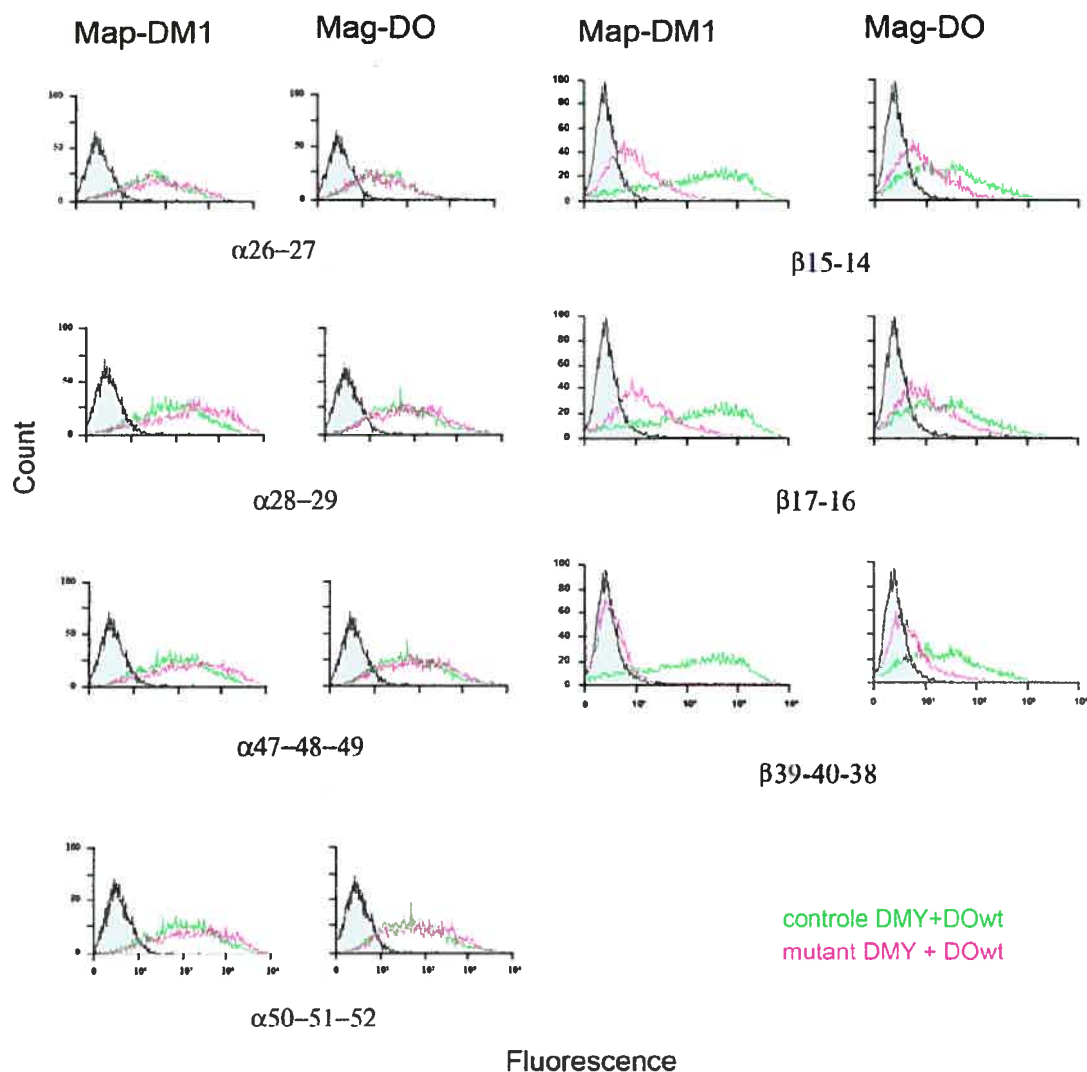
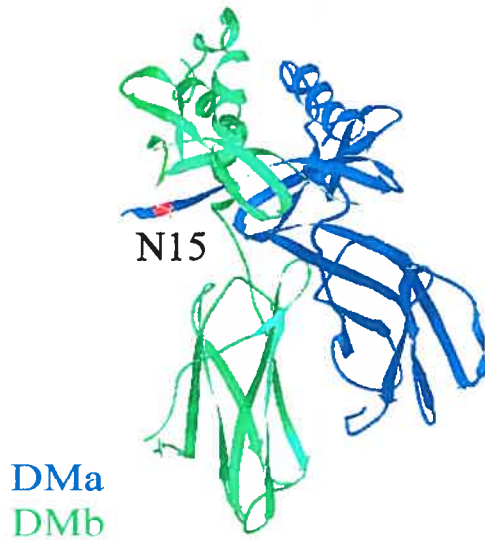


Figure 2.11.1 Mapping of HLA-DO and HLA-DM interacting residues on exposed loops of DM α 1 and β 1 domain

A) HLA-DM α and β cDNA was point mutated by overlapping PCR at sequence coding for the loops (α 26-27, α 28-29 and α 47-48-49, β 14-15, β 16-17 and β 39-40-41). Mutations of DM α were done in DMY, a DM variant targeted at cell surface. Mutated cDNA of DM α and β cloned in 2 distinct pBud expression vector containing respectively a non mutated DM β chain and non mutated DM α chain were transduced with HLA-DO in HEK 293T cell. Cells were surface stained with Map-DM1 and Mag-DO. B) All mutated DM α chain molecules were efficiently expressed at cell surface but mutations did not affect DO interaction either. All DM β mutants show reduced level of surface DO but level of DM itself was reduced. Mutant DM β 38-39-40 completely lost Map-DM1 staining but was still showing some DO at surface.

A)



B)

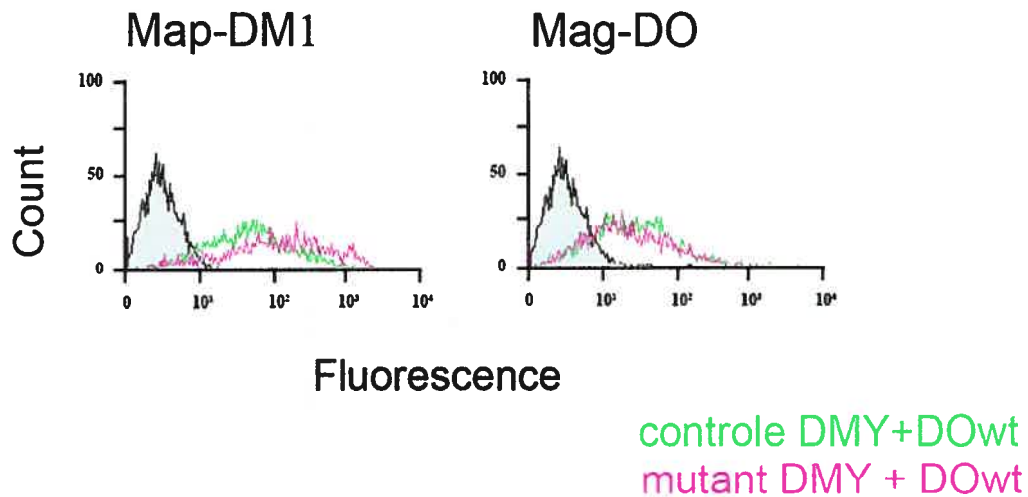
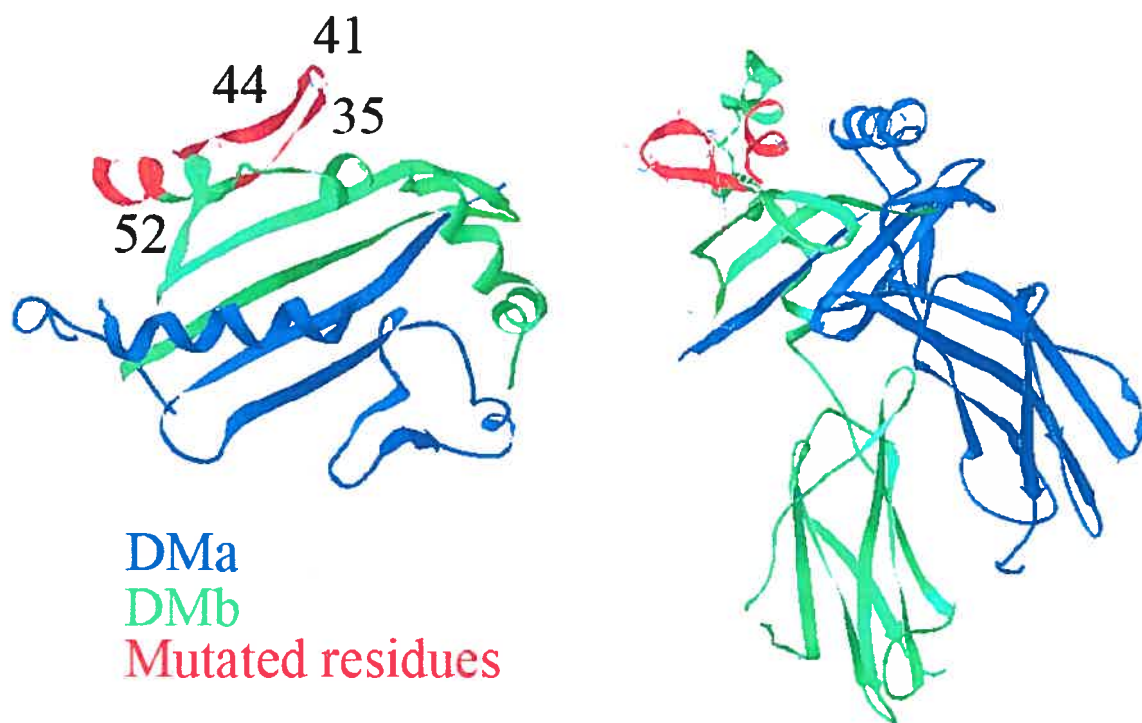


Figure 2.11.2 Mapping of DM-DO interaction site at HLA-DM α glycosylation asparagine residue

A) Asn₁₅ of HLA-DM α glycosylation motif was point mutated by overlapping PCR and cDNA were cloned in pBud expression vector containing DM β chain. The resulting pBud-DM $\alpha\beta$ was transduced with HLA-DO in HEK 293T cell and DM/DO interaction was assed by surface staining by Map-DM1 and Mag-DO. As shown in B), mutatae DM still interact with DO at same level to the control.

A)



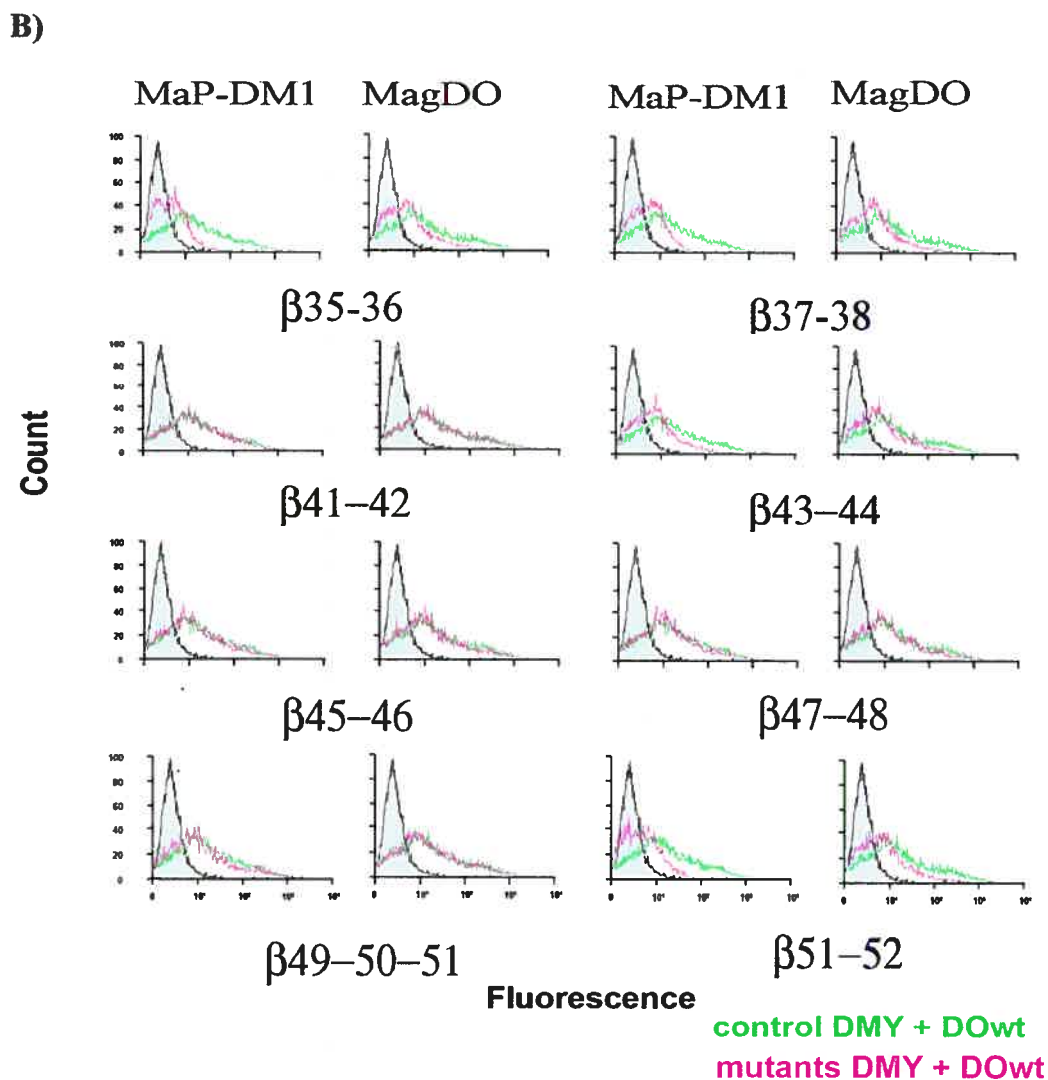


Figure 2.11.3 Mapping of HLA-DO interacting residues on HLA-DM β exposed lateral face

A) Exposed protruding lateral face of DM β was point mutate at every 2 or 3 amino acid residue. Mutate cDNA was then cloned in pBud expression vector containing a wt DM α and transduced with HLA-DO into 293T cell. After 48 hours, cell was stained with Map-DM1 and Mag-DO and analyse by flow cytometry **B)**. Of the 8 HLA-DM mutants, 4 were fully expressed at surface but were still interacting with HLA-DO (**B**, β 41-42, 45-46, 49-50-51, and 47-48). The 4 others mutants show reduced DO surface level, but also Map-DM1 was reduced, even more drastically than Mag-DO.

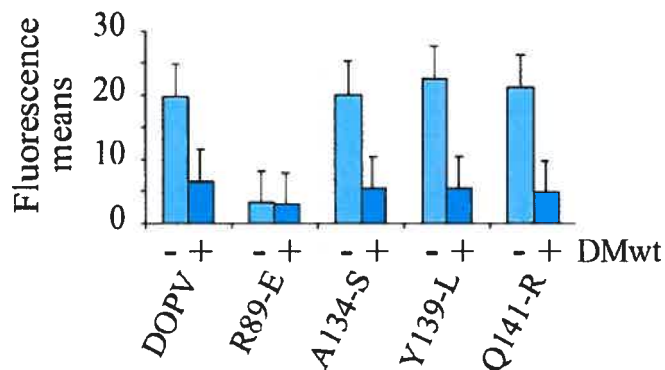
A)

```

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
H2-OA  IKADHMGSYG PAFYQSYDAS GQPTHEFDGE QIFSVDLRNE EVVWRLPEFG DPAHSDPQSG LMSISMIAH LDILVERSNR
HLA-DOA TKADHMGSYG PAFYQSYGAS GQPTHEFDEE QLFSVDLRKS EAVWRLPEFG DFARFDPOGG LAGIAAIKAH LDILVERSNR
HLA-DQA IVADHVASYG VNLVQSYGFS GQYTHEFDGD EQFYVDLGRK ETVWCLPVLR QF-RFDEQFA LTNIAVHKHN LNSLIKRSNS
HLA-DRA IKEEHV-IIQ AEFYLNPDQS GEPMFDFDGD EIFHVDMAKK ETVWRLEEFQ RFASFEAQGA LANIAVDKAN LEIMTKRSNY
HLA-DPA IKADHVSTYA -AFVQTHRPT GEPMPEFDED EMFYVDLDRK ETVWHLEEFQ QAFSFEAQGG LANIAILNHN LNTLIQRSNH
.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      90     100     110     120     130     140     150     160
H2-OA  TRAVSVPERV TVLPKTRVEL GKPNVICIV DDIFPPVINV TWLRNSQBIT KGVAQTSFYS QPNHRFRKPH YLTFVPSAED
HLA-DOA SRAINVPERV TVLPKSRVEL GQPNLICIV DNIFPPVINI TWLRNGQIVT EGVAQTSFYS QPDHLFRKPH YLPPVPSAED
HLA-DQA TAATNEVPERV TVPSKSPVTL GQPNLICLV DNIFPPVVNI TWLSNGHSVT EGVSEETSFLS KSDHSFFKIS YLTLPSAEE
HLA-DRA TEITHVPERV TVLTNSPVEL REPNVLCIFI DKFTPPVVNV TWLRNGKEVT TGVSETVFLP REDHLFRKPH YLPLPSTED
HLA-DPA TQATNDPERV TVFPKEPVEL GQPNLICHI DKFPFVPLNV TWLCNGELVT EGVAESIFLP RTDYSFHKPH YLTFVPSAED
.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      170     180     190     200     210     220     230
H2-OA  VYDCKVEHWG LDTPLLQHWE PQVITPPDPT IETLICGLGL VLGLMGCLLG TVLMITGTRR -PSIRR----
HLA-DOA VYDCQVEHWG LDAPLLRHWE LQVEIPPPDA METLVICALGL AIGLVGFLVG TVLIIMG--T YVSSVPR---
HLA-DQA SYDCKVEHWG LDKPLLKHWE PEIPAPMSEL TETVUCALGL SVGLVGIVUG TVPIIRGLRS VGASRHQGLI
HLA-DRA VYDCRVEHWG LDEPLLKHWE FDAPSPLET TENVUCALGL TVGLVGIIG TIFIIRGLRK SNAEARRGEL
HLA-DPA FYDCRVEHWG LDCPLLKHWE AQBEIQMPET TETVLCALGL VLGLVGIIG TVLIKSLRS GHPRAQGTI

```

B)



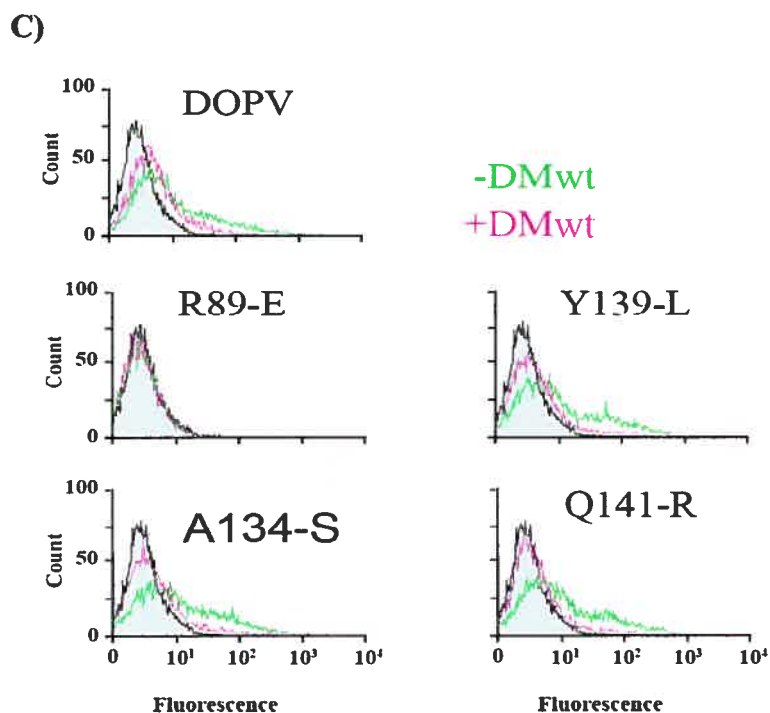


Figure 2.11.4 Looking for interacting sites at conserved residues in classe II $\alpha 2$ domain

A) Conserved amino acid in $\alpha 2$ domains of HLA-DO α and H2-O α were replaced by Overlapping PCR by the conserved amino acid of HLA-DR α , DP α and DQ α of the same position. Mutation was done in DO α PV and cDNA was cloned in pBud containing a wt DO β . The constructs were individually transduced along or with a wt HLA-DM in HEK 293T cell. After 48 hours, cells were surface stained with Map-DM1 and Mag-DO and then analyze by flow cytometry C). All constructs were fully assembled and expressed at cell surface except R89E as shown in histogram (B; light blue DMwt -). None of the mutated residues was of the interacting one with DM, as DMwt retains mutant DO as the control DO α PV (B; dark blue DMwt + and C).

CHAPITRE 3 DISCUSSION

Une régulation fine de la présentation antigénique chez les lymphocytes B est d'une importance capitale dans le contexte de la réponse humorale, ceci dans le sens que cette réponse pourrait être générée pour tout épitope ou peptide antigénique, y compris ceux du soit. Ainsi, en plus de HLA-DM qui contrôle le chargement de peptides dans les compartiments MIIC, les lymphocytes B expriment HLA-DO qui affine la fonction de DM. L'importance de DO apparaît mieux lorsque l'on analyse de plus près la présentation antigénique par les lymphocytes B. Comme nous l'avons décrit dans la section 1.5.4.1, ces cellules acquièrent les antigènes exogènes de deux façons principales, soit l'endocytose de phase fluide, et celle via les immunoglobulines de surface. Cependant, grâce à l'effet modulateur de HLA-DO sur l'activité catalytique de DM dans les compartiments de chargement, la présentation des épitopes issus des antigènes internalisés par phase fluide serait inhibée tandis que celle des épitopes issus des antigènes spécifiquement internalisés via les Igs serait favorisée. Ce modèle est concrètement appuyé par la démonstration de la modulation du répertoire peptidique des molécules de classe II par HLA-DO (91,127,128-131). Cependant les mécanismes moléculaires à la base de cette modulation ne sont pas encore clairement définis et mieux encore, la caractérisation de HLA-DO et HLA-DM, comme leur interaction, l'habilité de DM à sortir DO du RE ainsi que l'impact de DM sur l'assemblage de DO, est loin d'être complétée.

3.1 Localisation des sites d'interaction DO/DM

Dans les deux chapitres précédents, nous avons tenté de répondre à nos objectifs, à savoir la caractérisation des interactions entre DO et DM. Ainsi, nous avons donc tenté d'identifier des résidus médiant le contact entre les deux molécules d'une part et analyser l'impact de HLA-DM sur l'assemblage de HLA-DO et de sa sortie du RE d'autre part. Les études de cartographie de résidus médiant l'interaction entre HLA-DM et HLA-DO entreprises jusqu'à maintenant se sont avérées non productives (95,96), mise à part le résidu DO α E41 identifié dans notre laboratoire (Article annexé à ce memoire, (121). Par ailleurs, notre

approche par mutagenèse dirigée ne nous a pas non plus permis d'identifier clairement ces résidus. Cependant, les résultats préliminaires nous suggèreraient l'implication du domaine $\beta 1$ de DM. Ces mutants, qui semblent avoir une baisse d'interaction avec DO, montrent une faible reconnaissance par l'anticorps Map.DM1 (Supplemental data **figure 2.11.1B mutant DM β**). Cette perte apparente de l'interaction DO/DM pourrait donc être un simple reflet d'un mauvais assemblage de DM à cause des mutations. Les résidus pouvant être critiques pour la stabilisation de DM, leur mutation pourrait conduire au mauvais assemblage du dimère et DM serait donc majoritairement retenu à l'intérieur. Cette rétention pourrait être confirmée ou infirmée par une coloration intracellulaire. Cependant, advenant que l'épitope de Map.DM1 se situerait sur le domaine $\beta 1$ et que nos mutations l'aient également affecté, la baisse apparente de DM en surface pourrait aussi être imputée à la perte de l'épitope de Map.DM1. Par conséquent, la baisse de DO que l'on observe (Supplemental data **figure 2.11.1B et 2.11.3B**) refléterait une perte ou du moins une baisse d'interaction avec DM. Pashine *et al* ont montré effectivement que la mutation du résidu $\beta A55$ et dans une moindre mesure celle des résidus $\beta G17$ et $E47$, entraînaient la destruction de l'épitope de Map.DM1 (96). En analysant nos résultats, les mutants $\beta 38-39-40$ et $\beta 35-36$ montrent une perte quasi totale du signal de Map.DM1 alors qu'on note une certaine présence de DO comme le montre le signal de Mag.DO (Supplemental data **figure 2.11.1B et 2.11.3B**). Sachant que l'expression de DO en surface requiert celle de DMY (DMawt/BY226A), ce résultat suggérerait une perte de l'épitope Map.DM1. L'utilisation d'un autre anticorps reconnaissant une autre région luminale de DM apparaît donc nécessaire pour confirmer ce résultat. Par ailleurs, il est important de mentionner que nous n'avons pas effectué le contrôle cellules transfectées avec DO seul. Ceci nous aurait en effet donné le signal du bruit de fond de l'anticorps Mag.DO, et aurait donc confirmé ou infirmé l'expression de DO en surface que nous semblons voir. Toutefois, dans d'autres expériences que nous avons précédemment réalisé, la coloration en surface avec l'anticorps Mag.DO de cellules transfectées avec DO seul donne un signal négatif.

Par ailleurs, des résultats préliminaires dans notre laboratoire ont montré que DO pourrait entrer en compétition avec l'anticorps Map.DM1 ou du moins gêner celui-ci pour la liaison à DM. En effet, le marquage Map.DM1 de cellules co-transfectées avec DO et DM est nettement moins intense que celui de cellules transfectées avec DM seul. Cette compétition de DO avec Map.DM1 devra toutefois être confirmée par immunoprécipitation. En effet, si DO entre en compétition avec Map.DM1, ce dernier ne devrait pas immunoprécipiter le DM des complexes DO/DM ou du moins que très faiblement comparativement à un contrôle où DM est seul. L'idée d'une compétition entre DO et Map.DM pourrait expliquer pourquoi nous observons du DO en surface alors que DM est presque absent (**Supplemental data figure 2.11.1B et 2.11.3B**). En effet, les molécules de DM ayant lié DO ne seraient plus reconnues par Map.DM1.

Bien que nous n'ayons pas pu identifier clairement les résidus impliqués dans les interactions entre DO et DM, nos résultats suggèrent une analyse plus approfondie de la chaîne β de DM. La difficulté à conclure quant à l'implication des résidus de DM β que nous avons muté viendrait du fait que ces résidus pourraient être nécessaires au bon assemblage de DM. À cela s'ajoute la possibilité que ces résidus appartiennent à l'épitope de l'anticorps de Map.DM1 tout en faisant partie du site d'interaction avec DO. Les résultats d'immunoprécipitation et de Western-blot devraient être concluants quant à la possibilité de compétition entre Map.DM1 et DO. Cependant, cette hypothèse pourrait également être vérifiée de façon plus fonctionnelle. Par exemple nous savons qu'en présence de l'anticorps CerCLIP, HLA-DM est incapable de catalyser la dissociation de CLIP du fait que l'anticorps bloque stériquement l'interaction avec DM (80). L'idée serait ainsi de tester la libération de CLIP ou le chargement de peptides dans le contexte de Map.DM1 et de DO.

3.2 Effet chaperon de DM sur l'assemblage de DO et de sa sortie du RE

Il est connu que suite à leur synthèse dans le réticulum endoplasmique, les molécules classiques comme HLA-DR, DP et DQ doivent s'associer à la chaîne invariante afin d'atteindre leur conformation optimale et sortir du RE; autrement elles sont retenues par des chaperons résidents de ce compartiment (BiP, GRP94 et ERp72) et ultimement dégradées (39,42).

En absence de HLA-DM; dans un système de transfection cellulaire tout comme chez les lymphocytes B, HLA-DO est incapable de sortir du réticulum endoplasmique (60). Par ailleurs, contrairement aux molécules classiques, DO n'est pas secourue de cette rétention par l'association avec Ii (60). Et à ce jour, aucune étude n'a encore montré une association de DO aux chaperons de rétention au RE comme BiP, GRP94 et ERp72. Récemment, nous avons montré [Deshaies *et al* (2005) (121) en annexe] qu'en mutant la proline 11 de la chaîne α , celle-ci s'assemblait efficacement avec la chaîne β et le dimère HLA-DO formé sortait efficacement du RE et s'exprimait en surface et cela, indépendamment de HLA-DM. Ainsi, HLA-DO pourrait donc être retenue au RE du fait de son mauvais repliement et en présence DM, le dimère DO s'assemblerait proprement de sorte à échapper à cette rétention.

Ici nous apportons un supplément de preuves à l'hypothèse que DM pourrait fonctionner comme un chaperon pour le bon assemblage de DO et de sa sortie du RE.

En nous servant de l'anticorps conformationnel Mag.DO, nous avons montré qu'en présence de DM, DO était mieux reconnu par l'anticorps Mag.DO comme le montre l'augmentation de la moyenne de fluorescence en présence de DM (**Figure 2.9.3A et B**). Par ailleurs, cette augmentation de la moyenne de fluorescence de Mag.DO n'est pas due à la présence d'un plus grand nombre de molécules DO mais plutôt à un changement

conformationnel en présence de DM (**Figure 3.8.3A** et **Figure 3.8.3C**). De même, ce changement de conformation a lieu dès l'association des deux molécules dans le RE (**Figure 2.9.4**) et est par conséquent différent de celui dépendant du pH et qui résulte de la translocation dans les compartiments (128). Ainsi, l'association de DM à DO permettrait à ce dernier de se replier adéquatement pour sortir du RE. Cependant, la clarification du mécanisme impliqué nécessite d'autres études. En effet, la rétention de protéines mal repliées ou aberrantes au RE est opérée par plusieurs des chaperons résidents de ce compartiment (133) et les molécules classiques de classe II, en absence de la chaîne invariante sont retenues par BiP, GRP94 et ERp72 (39,42). L'implication de ces chaperons ou d'autres dans la rétention de DO pourrait donc être déterminée pour mieux comprendre comment DM agit sur le bon assemblage et la sortie du RE. Il s'agirait de vérifier l'existence d'une association physique entre HLA-DO et ces chaperons en présence tout comme en absence de DM. Dans les deux cas, DO pourrait être immunoprécipité de lysats cellulaires et l'association avec les chaperons serait ensuite vérifiée par Western blot avec des anticorps spécifiques aux chaperons de rétention (par exemple BiP, GRP94 et ERp72). Autrement, DO pourrait également être séparé des protéines avec lesquelles il serait co-immunoprécipité dans un gel 2 D et ces protéines pourraient être ultérieurement caractérisées par spectroscopie de masse, voir même séquencées. Les candidats potentiels pourraient par la suite être confirmés par Western blot.

La sortie de DO du RE par DM pourrait impliquer plusieurs mécanismes non exclusifs. Les molécules de DO synthétisées en absence de DM auraient un mauvais repliement et s'associeraient donc aux chaperons du RE qui les retiendraient dans ce compartiment. En présence de DM, DO se replierait adéquatement et échapperait donc à l'association aux chaperons. Par ailleurs, DM en s'associant à DO au cours de sa biosynthèse, pourrait bloquer stériquement l'interaction avec les chaperons de rétention. Comme nous venons de le montrer, DM induit un changement de conformation de DO. Il est donc envisageable que ce changement conduit à la dissociation des chaperons de rétention liés à DO. Des motifs de DO pouvant servir de site de liaison pour des chaperons de rétention n'ont pas encore été

clairement identifiés. Cependant la chaîne β étant particulièrement hydrophobe dans sa région N terminale (134), elles pourraient contenir des sites potentiels de liaison. En effet, des chaperons comme BiP lient des heptapeptides ayant des chaînes latérales constituées de résidus aliphatiques (135). Une interaction de DM avec la région $\alpha 2/\beta 2$ de DO pourrait donc bloquer stériquement l'association ou induire la dissociation de BiP.

La découverte récente par notre laboratoire que la mutation de la proline 11 de DO α libère HLA-DO de sa rétention au RE (121) pourrait constituer un début de clarification du mécanisme de rétention. En effet, comme hypothèse alternative à celle d'une structure instable de DO (12,121), ce résidu pourrait, par exemple, être impliqué, directement ou indirectement, dans l'interaction avec des chaperons du RE et donc suite à sa mutation, DO perdrait ainsi l'interaction avec ces chaperons et pourrait donc quitter ce compartiment. Il serait également nécessaire de vérifier, si en dépit de permettre la libération de DO de la rétention au RE, la mutation PV ne corrigerait que partiellement la conformation. Pour ce faire, du moment que DOPV s'associe physiquement à DM comme DO sauvage (Figure 2.8.10), on pourrait donc vérifier si DM augmente également le signal de l'anticorps conformationnel Mag.DO sur DO PV. Ceci constituerait ainsi une confirmation de l'effet positif de DM sur l'assemblage de DO.

3.2.1 DO comme co-chaperon?

Comme HLA-DO, la chaîne lourde des molécules du CMH I est retenue dans le réticulum endoplasmique suite à sa synthèse et comparativement au couple DM/DO (60), la chaîne lourde des molécules de classe I est libérée de cette rétention par son association à la $\beta 2$ microglobuline (136). Des études de van Lith *et al.*, (2003) ont montré que le dimère DO s'associait avec la chaîne lourde des molécules de classes I au sein du RE et le complexe s'exprimait à la surface des cellules transfectées et faiblement sur celle des lymphocytes B (137). D'une part, cette étude confirme l'hypothèse voulant que DO puisse effectivement

être secouru de la rétention au RE par une autre molécule. D'autre part, elle suggère également que la molécule DO pourrait elle-même servir de chaperon, ou du moins être impliquée dans le ciblage. Il avait déjà été suggéré que DO pourrait stabiliser DM pour que celui-ci ait une activité plus soutenue sur le chargement des peptides (122). Par ailleurs, même si DM se suffit à lui-même pour sa sortie du RE et son ciblage aux MIIC grâce à son motif YTPL (DM β Y226), pourrait-on considérer DO comme une molécule modulatrice du transport de DM aux différents compartiments cellulaires? En effet, DO β possède deux motifs potentiels de ciblage endosomal dans sa queue cytoplasmique (123). Ces motifs pourraient-ils être impliqués dans un ciblage différentiel des complexes DO/DM et DM libres? Nous discuterons de ce point dans la section suivante.

3.2.2 Importance d'un effet chaperon de DM sur la sortie de DO du RE

L'importance du contrôle qu'exerce DM sur la maturation de DO, notamment dans le contexte de la modulation du chargement de peptide n'est pas encore éclaircie. DO a un rôle modulateur sur l'activité catalytique de DM. Par ailleurs, dans les différents compartiments intracellulaires, en plus des complexes DO/DM, on retrouve également du DM libre. Quelle est l'importance des deux pools de DM sur le chargement des peptides dans le contexte de l'édition du répertoire antigénique? Autrement dit, serait-il possible que la cellule présentatrice d'antigènes module le chargement des peptides en ayant un mécanisme différentiel de ciblage de DM vers les compartiments? DO possède dans la queue cytoplasmique de sa chaîne β un motif de ciblage de type dileucine (124). Cependant, les études effectuées à ce jour impliquent plutôt ce motif dans la redistribution des complexes DO/DM sur la membrane externe des MIIC (125). Serait-il possible que DO, grâce à ce signal, puisse agir comme un modulateur du ciblage/transport de DM? HLA-DM, en s'associant à DO au sein du RE, pourrait ainsi être ciblé différemment du DM libre. Pour vérifier cette hypothèse on pourrait, par exemple, transférer des cellules HeLa DO⁺

avec DM et analyser la co-localisation dans les compartiments en utilisant la microscopie électronique. En incluant l'analyse du ciblage des complexes DO/chaîne lourde des classes I (137), on pourrait ainsi arriver à mieux comprendre le rôle du motif LL de DO β . Le mutant DO LL (Queue cytoplasmique de DO β ; mutation leucine \rightarrow alanine) (124) pourrait servir de contrôle. En effet le motif étant inactivé, son rôle dans le ciblage des complexes DO/chaîne lourde ou DO/DM pourrait ainsi être mieux édifié.

Par ailleurs, l'importance de ce rôle chaperon de DM sur DO pourrait être mieux caractérisée physiologiquement en générant des souris transgéniques DM $^{-}$ et DM $^{+}$ exprimant DOPV (α P11,V). Ce variant de DO étant capable de sortir du RE de par lui-même, ces souris pourraient permettre une meilleure compréhension de l'importance que revêt la rétention au RE, ou du moins la réquisition de DM pour la sortie de ce compartiment et le ciblage vers les MIIC. On pourrait par exemple, mesurer l'influence sur l'édition du répertoire peptidique. Comme l'ont montré Nanda *et al.*, (2005) chez des souris DM $^{-}$ infectées avec *Leishmania major*, l'activité éditrice de DM a un impact direct sur la présentation d'épitopes immunodominants et le développement *in vivo* de lymphocytes T CD4 $^{+}$ spécifiques (91). Dans le contexte de la rétention de DO au RE, on pourrait ainsi vérifier l'effet sur l'édition du répertoire de peptide, notamment l'influence sur la présentation des épitopes immunodominants. L'idée serait alors d'exprimer DOPV dans le modèle de Nanda *et al.*, (2005) et analyser la modulation de la présentation de ces épitopes comparativement à un contrôle exprimant DO sauvage.

3.2.3 DO dans la modulation de la présentation antigénique chez les cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques sont de loin les meilleures cellules présentatrices d'antigènes. Ceci pour plusieurs raisons dont la patrouille des tissus et la migration aux organes

lymphoïdes secondaires, la forte expression de molécules de classe II classique et l'habilité à activer directement les lymphocytes T naïfs (138,139). Ensemble, DO et DM modulent la présentation antigénique. Cependant, le rôle de DO a jusqu'ici été limité chez les lymphocytes B et certaines cellules épithéliales du thymus qui étaient considérés comme étant les seules à exprimer cette molécule. Avec la découverte récente de son expression chez de nombreuses populations de DC (116), l'analyse de la modulation du répertoire antigénique de classe II par DO chez les cellules dendritiques dans un contexte plus physiologique devrait donc être entreprise. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes n'expriment pas DO de façon naturelle (109,115). Cependant, en leur transduisant les cDNA de DO à l'aide d'un vecteur viral, des études de notre laboratoire ont montré que DO pouvait moduler négativement la présentation du peptide exogène gp100 par ces cellules dendritiques à un clone de lymphocyte T spécifique (140). Un résultat similaire avait préalablement été obtenu par le groupe de Denzin qui montrait que l'expression ectopique de HLA-DO dans les cellules dendritiques de souris transgéniques inhibait la présentation de certains peptides exogènes (141). Ainsi, les études sur la modulation du répertoire antigénique devraient donc être étendues aux cellules dendritiques exprimant naturellement DO ("LC-DC", "Tonsillar interdigitating DC" et certains DC en circulation). Ceci d'autant plus que ces cellules seraient un outil important pour le développement d'approches immunothérapeutiques pour le traitement du cancer et certaines maladies auto-immunitaires (142-144).

CHAPITRE 4 CONCLUSION

HLA-DM et HLA-DO sont deux molécules non classiques du CMH II dont la fonction principale est la régulation de la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4⁺. HLA-DM est exprimée chez toutes les cellules présentatrices d'antigènes et sa fonction est de catalyser le remplacement de CLIP et les peptides de faible affinité par ceux d'une plus grande stabilité dans la niche peptidique des classes II classiques. HLA-DO pour sa part, est également exprimée chez les lymphocytes B et certaines populations de cellules dendritiques; cependant, ce n'est encore que chez les premiers que sa fonction de modulateur de l'activité de DM a été clairement étudiée. Ensemble, DO et DM modulent le répertoire antigénique de classe II; cependant, le mécanisme moléculaire de leur fonctionnement est encore en quête de clarifications. HLA-DO comme HLA-DM est synthétisée dans le RE, et chez les lymphocytes B l'ensemble du DO en dehors de cette organelle est associé à DM. De même, en absence de DM, DO est retenue dans le RE et l'expression de DM restitue la maturation et le transport de DO en dehors du RE.

Pour mieux comprendre l'impact de DM sur DO comme sa maturation et sa sortie du RE, nous avons dans ce présent travail étudié l'effet de DM sur l'assemblage de DO en utilisant l'anticorps conformationnel Mag.DO, et tenté de cartographier par mutagenèse dirigée les résidus médiant l'interaction entre les deux molécules. Nos résultats montrent ainsi, que DM en s'associant à DO induit un changement de conformation sur celui-ci et cela au sein même du RE. Cette activité chaperon de DM sur DO permettrait ainsi à ce dernier d'atteindre son repliement optimal nécessaire pour sa sortie du RE. Il reste toutefois à établir le mécanisme par lequel DO est retenue au RE, par exemple, une implication possible des chaperons du RE dont BiP, GRP94 et ERp72 comme c'est les cas pour les molécules classiques synthétisées en absence de la chaîne invariante.

Par ailleurs, nos résultats de mutagenèse suggèrent une implication des résidus exposés du domaine β 1 de DM dans l'interaction avec DO. Cependant, d'autres caractérisations seront nécessaires pour confirmer ce résultat. En effet, la mutation de ces résidus conduit également à une baisse du signal de l'anticorps Map.DM1. Cette baisse pourrait être due à

la destruction de l'épitope Map.DM ou simplement une déstabilisation de la structure de DM conduisant ainsi à un mauvais repliement de la protéine.

L'importance de la réquisition de DM pour la sortie de DO du RE, ou du moins sa rétention dans ce compartiment jusqu'à l'arrivée de DM, notamment sur la modulation de la présentation antigénique reste inconnue. Par ailleurs, Il n'est toujours pas connu si les complexes DO/DM et DM seuls étaient ciblés différemment du fait de l'association de DO à une certaine partie de DM seulement. De même, l'impact sur l'activité éditrice de DM ainsi que la modulation de la présentation d'épitopes immunodominants dans le contexte de la sortie de DO du RE par DM ne sont pas encore édifiés. Par ailleurs, le rôle de DO était jusque ici limité chez les lymphocytes B, alors que les cellules dendritiques qui sont de loin parmi les meilleures APC l'expriment. D'autres études, pour ne pas dire plusieurs autres, sont donc encore nécessaires pour mieux comprendre la relation entre DO et DM ainsi que leur importance sur la modulation de la présentation antigénique. Cela, d'autant plus qu'une meilleure caractérisation de ces molécules dans le contexte de la modulation de la présentation antigénique pourrait avoir un impact positif sur le développement des approches immunothérapeutiques.

CHAPITRE 5 RÉFÉRENCES

1. Little, C. C. and E. E. Tyzzer. 1916. Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor, carcinoma (JWA) of the Japanese waltzing mouse. *J.Med.Res* 33:393-453.
2. Bover, K. H. 1927. Homoisotransplantation van Epidermis bei eineigen Zwillingen. *Klin.Chir.* 141:442-447.
3. Gorer, P. A. 1936. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br.J.Exp.Pathol.* 17:42-50.
4. Gorer, P. A. 1937. The genetic and antigenic basis for tumor transplantation. *J.Pathol.Bacteriol.* 44:691-697.
5. Snell, G. D. 1948. Methods for the study of histocompatibility genes. *J.Genet.* 49: 87-108.
6. Hjelmström, P. An historical introduction to the Mhc. [http: and depts.washington.edu/rhwlab/dq/history.html#history](http://depts.washington.edu/rhwlab/dq/history.html#history). 1996.

Ref Type: Report

7. Strominger, J. L. 2002. Human histocompatibility proteins. Past and future: a memoir (vol 185, pg 69, 2002). *Immunol.Rev.* 188:183.
8. The MHC sequencing consortium. 1999. **Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex.** *Nature* 401 401:921-923.
9. Horton, R., L. Wilming, V. Rand, R. C. Lovering, E. A. Bruford, V. K. Khodiyar, M. J. Lush, S. Povey, C. C. Talbot, M. W. Wrigtho, H. M. Wain, J. Trowsdale, A. Ziegler, and S. Beck. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics* 5:889-899.
10. Klein, J. and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.

11. Busch, R., C. H. Rinderknecht, S. Roh, A. W. Lee, J. J. Harding, T. Burster, T. M. Hornell, and E. D. Mellins. 2005. Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol.Rev.* 207:242-260.
12. Denzin, L. K., J. L. Fallas, M. Prendes, and W. Yi. 2005. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol.Rev.* 207:279-292.
13. York, I. A. and K. L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu.Rev.Immunol.* 14:369-396.
14. Lehner, P. J. and P. Cresswell. 1996. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr.Opin.Immunol.* 8:59-67.
15. Kumanovics, A., T. Takada, and K. F. Lindahl. 2003. Genomic organization of the mammalian Mhc. *Annual Review of Immunology* 21:629-657.
16. Murthy, V. L. and L. J. Stern. 1997. The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding. *Structure.* 5:1385-1396.
17. Gorga, J. C., J. H. Brown, T. Jardetzky, D. C. Wiley, and J. L. Strominger. 1991. Crystallization of HLA-DR antigens. *Res.Immunol.* 142:401-407.
18. Reinherz, E. L., K. M. Tan, L. Tang, P. Kern, J. H. Liu, Y. Xiong, R. E. Hussey, A. Smolyar, B. Hare, R. G. Zhang, A. Joachimiak, H. C. Chang, G. Wagner, and J. H. Wang. 1999. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 286:1913-1921.
19. Zavala-Ruiz, Z., I. Strug, M. W. Anderson, J. Gorski, and L. J. Stern. 2004. A polymorphic pocket at the P10 position contributes to peptide binding specificity in class II MHC proteins. *Chem.Biol.* 11:1395-1402.
20. Zhu, Y., A. Y. Rudensky, A. L. Corper, L. Teyton, and I. A. Wilson. 2003. Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide-binding motif. *J.Mol.Biol.* 326:1157-1174.
21. Wang, J. H., R. Meijers, Y. Xiong, J. H. Liu, T. Sakihama, R. Zhang, A. Joachimiak, and E. L. Reinherz. 2001. Crystal structure of the human CD4 N-

terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98:10799-10804.

22. Lee, K. H., K. W. Wucherpfennig, and D. C. Wiley. 2001. Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes.
Nat.Immunol. 2:501-507.
23. Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2001. *Antigen Recognition by B-cell and T-cell Receptors*. **Garland Publishing**, New York and London.
24. Arunachalam, B., M. Pan, and P. Cresswell. 1998. Intracellular formation and cell surface expression of a complex of an intact lysosomal protein and MHC class II molecules. *J.Immunol.* 160:5797-5806.
25. 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.
26. Sette, A., L. Adorini, S. M. Colon, S. Buus, and H. M. Grey. 1989. Capacity of intact proteins to bind to MHC class II molecules. *J.Immunol.* 143:1265-1267.
27. Trombetta, E. S. and I. Mellman. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 23:975-1028.
28. Stern, L. J., J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
29. Brown, J. H., T. Jardetzky, M. A. Saper, B. Samraoui, P. J. Bjorkman, and D. C. Wiley. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332:845-850.
30. Batalia, M. A. and E. J. Collins. 1997. Peptide binding by class I and class II MHC molecules. *Biopolymers* 43:281-302.
31. Waldburger, J. M., K. Masternak, A. Muhlethaler-Mottet, J. Villard, M. Peretti, S. Landmann, and W. Reith. 2000. Lessons from the bare lymphocyte syndrome:

- molecular mechanisms regulating MHC class II expression. *Immunol.Rev.* 178:148-165.
32. Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman, and I. Mellman. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388:787-792.
 33. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182:389-400.
 34. LeibundGut-Landmann, S., J. M. Waldburger, M. Krawczyk, L. A. Otten, T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2004. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur.J.Immunol.* 34:1513-1525.
 35. Mach, B., V. Steimle, E. MartinezSoria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: Lessons from a disease. *Annual Review of Immunology* 14:301-331.
 36. Nagarajan, U. M., P. Louis-Pence, A. DeSandro, R. Nilsen, A. Bushey, and J. M. Boss. 1999. RFX-B is the gene responsible for the most common cause of the bare lymphocyte syndrome, an MHC class II immunodeficiency. *Immunity.* 10:153-162.
 37. Steimle, V., L. A. Otten, M. Zufferey, and B. Mach. 1993. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75:135-146.
 38. Ting, J. P. and J. Trowsdale. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-S33.
 39. Cresswell, P. 1994. Assembly, Transport, and Function of Mhc Class-II Molecules. *Annual Review of Immunology* 12:259-293.
 40. 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.

41. Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.
42. Schaiff, W. T., K. A. Hruska, D. W. McCourt, M. Green, and B. D. Schwartz. 1992. HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J.Exp.Med.* 176:657-666.
43. Anderson, K. S. and P. Cresswell. 1994. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* 13:675-682.
44. Germain, R. N. and D. H. Margulies. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu.Rev.Immunol.* 11:403-450.
45. Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annual Review of Immunology* 15:821-850.
46. Li, P., J. L. Gregg, N. Wang, D. Zhou, P. O'Donnell, J. S. Blum, and V. L. Crotzer. 2005. Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing. *Immunol.Rev.* 207:206-217.
47. Kleijmeer, M. J., S. Morkowski, J. M. Griffith, A. Y. Rudensky, and H. J. Geuze. 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J.Cell Biol.* 139:639-649.
48. Pierre, P., L. K. Denzin, C. Hammond, J. R. Drake, S. Amigorena, P. Cresswell, and I. Mellman. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity.* 4:229-239.
49. Geuze, H. J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol.Today* 19:282-287.
50. Deng, H., R. Apple, M. Clare-Salzler, S. Trembleau, D. Mathis, L. Adorini, and E. Sercarz. 1993. Determinant capture as a possible mechanism of protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease. *J.Exp.Med.* 178:1675-1680.
51. Donermeyer, D. L. and P. M. Allen. 1989. Binding to Ia protects an immunogenic peptide from proteolytic degradation. *J.Immunol.* 142:1063-1068.

52. Lennon-Dumenil, A. M., A. H. Bakker, P. Wolf-Bryant, H. L. Ploegh, and C. Lagaudriere-Gesbert. 2002. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 14:15-21.
53. Wubbolts, R., M. Fernandez-Borja, L. Oomen, D. Verwoerd, H. Janssen, J. Calafat, A. Tulp, S. Dusseljee, and J. Neefjes. 1996. Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J. Cell Biol.* 135:611-622.
54. Chow, A., D. Toomre, W. Garrett, and I. Mellman. 2002. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* 418:988-994.
55. Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman. 2000. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522-527.
56. Denzer, K., M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* 113 Pt 19:3365-3374.
57. Amigorena, S., J. R. Drake, P. Webster, and I. Mellman. 1994. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369:113-120.
58. Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie, and H. J. Geuze. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273:20121-20127.
59. Kim, K. J., H. H. Jung, and Y. S. Bae. 1996. Blood dendritic cells express detectable amounts of class II-related DM protein on the cell surfaces. *Molecules and Cells* 6:684-691.
60. Liljedahl, M., T. Kuwana, W. P. Fung-Leung, M. Jackson, P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-4824.

61. Sanderson, F., M. J. Kleijmeer, A. Kelly, D. Verwoerd, A. Tulp, J. J. Neeffjes, 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.
62. Alfonso, C. and L. Karlsson. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 18:113-142.
63. Kropshofer, H., G. J. Hammerling, and A. B. Vogt. 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.
64. Fling, S. P., J. Rak, K. A. Muczynski, B. Arp, and D. Pious. 1997. Novel mutants define genes required for the expression of human histocompatibility leukocyte antigen DM: Evidence for loci on human chromosome 6p. *J.Exp.Med.* 186:1469-1480.
65. Denzin, L. K., N. F. Robbins, C. Carboy-Newcomb, and P. Cresswell. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606.
66. Kovats, S., C. E. Grubin, S. Eastman, P. DeRoos, A. Dongre, L. Van Kaer, and A. Y. Rudensky. 1998. Invariant chain-independent function of H-2M in the formation of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes in vivo. *J.Exp.Med.* 187:245-251.
67. 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.
68. Arndt, S. O., A. B. Vogt, S. Markovic-Plese, R. Martin, G. Moldenhauer, A. Wolpl, Y. Sun, D. Schadendorf, G. J. Hammerling, and H. Kropshofer. 2000. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J.* 19:1241-1251.
69. Santambrogio, L., A. K. Sato, G. J. Carven, S. L. Belyanskaya, J. L. Strominger, and L. J. Stern. 1999. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:15056-15061.

70. 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 β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* 131:351-369.
71. Liu, S. H., M. S. Marks, and F. M. Brodsky. 1998. A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. *J. Cell Biol.* 140:1023-1037.
72. Ferrari, G., A. M. Knight, C. Watts, and J. Pieters. 1997. Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J. Cell Biol.* 139:1433-1446.
73. Kleijmeer, M. J., G. Raposo, and H. J. Geuze. 1996. Characterization of MHC Class II Compartments by Immunoelectron Microscopy. *Methods* 10:191-207.
74. Robbins, N. F., C. Hammond, L. K. Denzin, M. Pan, and P. Cresswell. 1996. Trafficking of major histocompatibility complex class II molecules through intracellular compartments containing HLA-DM. *Human Immunology* 45:13-23.
75. Schafer, P. H., J. M. Green, S. Malapati, L. Gu, and S. K. Pierce. 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.
76. Mosyak, L., D. M. Zaller, and D. C. Wiley. 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.
77. Fremont, D. H., F. Crawford, P. Marrack, W. A. Hendrickson, and J. Kappler. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385-393.
78. Fling, S. P., B. Arp, and D. Pious. 1994. HLA-DM and -DMB genes are both required for complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368:554-558.
79. Ceman, S., R. A. Rudersdorf, J. M. Petersen, and R. DeMars. 1995. DMA and DMB are the only genes in the class II region of the human MHC needed for class II-associated antigen processing. *J. Immunol.* 154:2545-2556.

80. 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.
81. Morris, P., J. Shaman, M. Attaya, M. Amaya, S. Goodman, C. Bergman, J. J. Monaco, and E. Mellins. 1994. An essential role for the HLA-DM in antigen presentation by MHC class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368:551-554.
82. 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.
83. 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.
84. Vogt, A. B., H. Kropshofer, G. Moldenhauer, and G. J. Hammerling. 1996. Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:9724-9729.
85. Germain, R. N. and A. G. Rinker Jr. 1993. Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature* 363:725-728.
86. Sadegh-Nasseri, S. and R. N. Germain. 1991. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 353:167-170.
87. Stern, L. J. and D. C. Wiley. 1992. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty $\alpha\beta$ heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* 68:465-477.
88. 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.
89. Kropshofer, H., S. O. Arndt, G. Moldenhauer, G. J. Hammerling, and A. B. Vogt. 1997. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6:293-302.

90. Sant, A. J., F. A. Chaves, S. A. Jenks, K. A. Richards, P. Menges, J. M. Weaver, and C. A. Lazarski. 2005. The relationship between immunodominance, DM editing, and the kinetic stability of MHC class II:peptide complexes. *Immunol.Rev.* 207:261-278.
91. Nanda, N. K. and E. K. Bikoff. 2005. DM peptide-editing function leads to immunodominance in CD4 T cell responses in vivo. *J.Immunol.* 175:6473-6480.
92. Lich, J. D., J. A. Jayne, D. Zhou, J. F. Elliott, and J. S. Blum. 2003. Editing of an immunodominant epitope of glutamate decarboxylase by HLA-DM. *J.Immunol.* 171:853-859.
93. Sanderson, F., C. Thomas, J. Neefjes, and J. Trowsdale. 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity.* 4:87-96.
94. Denzin, L. K., C. Hammond, and P. Cresswell. 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J.Exp.Med.* 184:2153-2165.
95. Doebele, C. R., R. Busch, M. H. Scott, A. Pashine, and D. E. Mellins. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* 13:517-527.
96. Pashine, A., R. Busch, M. P. Belmares, J. N. Munning, R. C. Doebele, M. Buckingham, G. P. Nolan, and E. D. Mellins. 2003. Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides. *Immunity.* 19:183-192.
97. Busch, R., A. Pashine, K. C. Garcia, and E. D. Mellins. 2002. Stabilization of soluble, low-affinity HLA-DM/HLA-DR1 complexes by leucine zippers. *J.Immunol.Methods* 263:111-121.
98. Stratikos, E., L. Mosyak, D. M. Zaller, and D. C. Wiley. 2002. Identification of the lateral interaction surfaces of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM with HLA-DR1 by formation of tethered complexes that present enhanced HLA-DM catalysis. *J.Exp.Med.* 196:173-183.
99. Sant, A. J., C. Beeson, B. McFarland, J. Cao, S. Ceman, P. W. Bryant, and S. Wu. 1999. Individual hydrogen bonds play a critical role in MHC class II: peptide

interactions: implications for the dynamic aspects of class II trafficking and DM-mediated peptide exchange. *Immunol.Rev.* 172:239-253.

100. Marin-Esteban, V., K. Falk, and O. Rotzschke. 2004. "Chemical analogues" of HLA-DM can induce a peptide-receptive state in HLA-DR molecules. *J.Biol.Chem.* 279:50684-50690.
101. Stratikos, E., D. C. Wiley, and L. J. Stern. 2004. Enhanced catalytic action of HLA-DM on the exchange of peptides lacking backbone hydrogen bonds between their N-terminal region and the MHC class II alpha-chain. *J.Immunol.* 172:1109-1117.
102. Hammer, J., B. Takacs, and F. Sinigaglia. 1992. Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J.Exp.Med.* 176:1007-1013.
103. O'Sullivan, D., J. Sidney, E. Appella, L. Walker, L. Phillips, S. M. Colon, C. Miles, R. W. Chesnut, and A. Sette. 1990. Characterization of the specificity of peptide binding to four DR haplotypes. *J.Immunol.* 145:1799-1808.
104. Sato, A. K., J. A. Zarutskie, M. M. Rushe, A. Lomakin, S. K. Natarajan, S. Sadegh-Nasseri, G. B. Benedek, and L. J. Stern. 2000. Determinants of the peptide-induced conformational change in the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1. *J.Biol.Chem.* 275:2165-2173.
105. Tonnelle, C., R. DeMars, and E. O. Long. 1985. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-2847.
106. Karlsson, L., C. D. Surh, J. Sprent, and P. A. Peterson. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351:485-488.
107. Douek, D. C. and D. M. Altmann. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int.Immunol.* 9:355-364.
108. Chalouni, C., J. Banchereau, A. B. Vogt, V. Pascual, and J. Davoust. 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.
109. Chen, X., O. Laur, T. Kambayashi, S. Li, R. A. Bray, D. A. Weber, L. Karlsson, and P. E. Jensen. 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.
110. Chen, X. and P. E. Jensen. 2004. The Expression of HLA-DO (H2-O) in B Lymphocytes. *Immunol.Res.* 29:19-28.
 111. Glazier, K. S., S. B. Hake, H. M. Tobin, A. Chadburn, E. J. Schattner, and L. K. Denzin. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J.Exp.Med.* 195:1063-1069.
 112. Roucard, C., C. Thomas, M. A. Pasquier, J. Trowsdale, J. J. Sotto, J. Neefjes, and M. van Ham. 2001. In vivo and in vitro modulation of HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation. *J.Immunol.* 167:6849-6858.
 113. Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2001. The Development and Survival of Lymphocytes. Garland Publishing, New York and London.
 114. Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2001. The Humoral Immune Response. Garland Publishing, New York and London.
 115. Rohn, T. A., M. Boes, D. Wolters, S. Spindeldreher, B. Muller, H. Langen, H. Ploegh, A. B. Vogt, and H. Kropshofer. 2004. Upregulation of the CLIP self peptide on mature dendritic cells antagonizes T helper type 1 polarization. *Nat.Immunol.* 5:909-918.
 116. Hornell, T. M., T. Burster, F. L. Jahnsen, A. Pashine, M. T. Ochoa, J. J. Harding, C. Macaubas, A. W. Lee, R. L. Modlin, and E. D. Mellins. 2006. Human dendritic cell expression of HLA-DO is subset specific and regulated by maturation. *J.Immunol.* 176:3536-3547.
 117. Taxman, D. J., D. E. Cressman, and J. P. Ting. 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.
 118. Nagarajan, U. M., J. Lochamy, X. Chen, G. W. Beresford, R. Nilsen, P. E. Jensen, and J. M. Boss. 2002. Class II Transactivator Is Required for Maximal Expression of HLA-DOB in B Cells. *J.Immunol.* 168:1780-1786.

119. 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 β in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-382.
120. Hake, S. B., H. M. Tobin, V. Steimle, and L. K. Denzin. 2003. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *Eur.J.Immunol.* 33:2361-2371.
121. Deshaies, F., A. Brunet, D. A. Diallo, L. K. Denzin, A. Samaan, and J. Thibodeau. 2005. A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:6443-6448.
122. Kropshofer, H., A. B. Vogt, C. Thery, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena, and G. J. Hammerling. 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.
123. Samaan, A., J. Thibodeau, W. Mahana, F. Castellino, P. A. Cazenave, and T. J. Kindt. 1999. Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DR α and a chimeric DO β chain. *Int.Immunol.* 11:99-111.
124. 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-DO β . *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
125. van Lith, M., M. van Ham, A. Griekspoor, E. Tjin, D. Verwoerd, J. Calafat, H. Janssen, E. Reits, L. Pastoors, and J. Neeffjes. 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.
126. Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman, and P. Cresswell. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.
127. Van Ham, S. M., E. P. M. Tjin, B. F. Lillemeier, U. Gruneberg, K. E. Van Meijgaarden, L. Pastoors, D. Verwoerd, A. Tulp, B. Canas, D. Rahman, T. H. Ottenhoff, D. J. Pappin, J. Trowsdale, and J. Neeffjes. 1997. HLA-DO is a negative

- modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7:950-957.
128. Liljedahl, M., O. Winqvist, C. D. Surh, P. Wong, K. Ngo, L. Teyton, P. A. Peterson, A. Brunmark, A. Y. Rudensky, W. P. Fung-Leung, and L. Karlsson. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-243.
 129. Hammond, C., L. K. Denzin, M. Pan, J. M. Griffith, H. J. Geuze, and P. Cresswell. 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J.Immunol.* 161:3282-3291.
 130. Alfonso, C., G. S. Williams, and L. Karlsson. 2003. H2-O influence on antigen presentation in H2-E-expressing mice. *Eur.J.Immunol.* 33:2014-2021.
 131. Alfonso, C., G. S. Williams, J. O. Han, J. A. Westberg, O. Winqvist, and L. Karlsson. 2003. Analysis of H2-O influence on antigen presentation by B cells. *J.Immunol.* 171:2331-2337.
 132. Jemmerson, R. and Y. Paterson. 1986. Mapping epitopes on a protein antigen by the proteolysis of antigen-antibody complexes. *Science* 232:1001-1004.
 133. Marquardt, T. and A. Helenius. 1992. Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* 117:505-513.
 134. Serenius, B., L. Rask, and P. A. Peterson. 1987. Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO β gene is a divergent member of the class II β gene family. *J.Biol.Chem.* 262:8759-8766.
 135. Flynn, G. C., J. Pohl, M. T. Flocco, and J. E. Rothman. 1991. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353:726-730.
 136. Sege, K., L. Rask, and P. A. Peterson. 1981. Role of beta2-microglobulin in the intracellular processing of HLA antigens. *Biochemistry* 20:4523-4530.
 137. van Lith, M., M. van Ham, and J. Neefjes. 2003. Stable expression of MHC class I heavy chain/HLA-DO complexes at the plasma membrane. *Eur.J.Immunol.* 33:1145-1151.

138. Turnbull, E. and G. MacPherson. 2001. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol.Rev.* 184:58-68.
139. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18:767-811.
140. Bellemare-Pelletier, A., J. Tremblay, S. Beaulieu, M. R. Boulassel, J. P. Routy, B. Massie, R. Lapointe, and J. Thibodeau. 2005. HLA-DO transduced in human monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen processing. *J.Leukoc.Biol.*
141. Fallas, J. L., H. M. Tobin, O. Lou, D. Guo, D. B. Sant'Angelo, and L. K. Denzin. 2004. Ectopic expression of HLA-DO in mouse dendritic cells diminishes MHC class II antigen presentation. *J.Immunol.* 173:1549-1560.
142. Svane, I. M., A. Berntsen, R. Trepikak, and A. E. Pedersen. 2006. [Dendrite cell-based cancer vaccines--clinical application]. *Ugeskr.Laeger* 168:1415-1420.
143. Mende, I. and E. G. Engleman. 2005. Breaking tolerance to tumors with dendritic cell-based immunotherapy. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1058:96-104.
144. Chaput, N., J. Taieb, N. E. Scharz, F. Andre, E. Angevin, and L. Zitvogel. 2004. Exosome-based immunotherapy. *Cancer Immunol.Immunother.* 53:234-239.

CHAPITRE 6 ANNEXES

6.1 ANNEXE I ARTICLE 2

A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM.

Francis Deshaies*, Alexandre Brunet*, Djibril A. Diallo*, Lisa K. Denzin†‡, Angela Samaan§¶, and Jacques Thibodeau*¶

*Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre Ville, Montréal, QC, Canada H3T 1J4; †Immunology Program, Weill Graduate School of Medical Sciences, Cornell University, New York, NY 10021; ‡Immunology Program, Sloan–Kettering Institute, Memorial Sloan–Kettering Cancer Center, New York, NY 10021; and §Immunité Cellulaire Antivirale, Institut Pasteur, 28 Rue Du Dr Roux, 75015 Paris, France

Edited by Peter Cresswell, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, and approved March 17, 2005 (received for review February 1, 2005)

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 102:6443-6448

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500853102

RÉSUMÉ ET CONTRIBUTION

RÉSUMÉ

Les lymphocytes B expriment la molécule non classique du CMH II nommée HLA-DO qui module l'activité catalytique de HLA-DM sur le chargement des peptides au sein de la voie endocytaire. La liaison à HLA-DM est une étape nécessaire pour HLA-DO, notamment pour sa sortie du réticulum endoplasmique (RE). Afin de mieux comprendre le mode d'action de DO et le rôle de DM sur sa libération de la rétention au RE, nous sommes proposés d'identifier les résidus de DO qui médient le contact avec DM. Nos résultats nous ont montré que la chaîne DO α contenait effectivement des sites de liaison pour HLA-DM. En effet la mutation du résidu exposé E41 situé sur la boucle latérale du domaine α 1 affectait l'interaction avec DM ainsi que l'activité de DO. En utilisant une série de molécules chimériques DR/DO, nous avons par la suite confirmé l'implication de la chaîne α dans l'interaction et localisé un autre site potentiel de liaison dans la région C terminal au niveau du domaine α 2 (résidu DO α R80). Une des découvertes d'un grand intérêt fut celle de la proline 11. Suite à la mutation de ce résidu enfouis dans le plancher hypothétique, HLA-DO reste toujours fonctionnel mais devient indépendant de DM pour la sortie du RE ainsi que le ciblage intracellulaire. Ensembles, nos données suggèrent que la liaison de HLA-DM à DO α stabilise les contacts intramoléculaires entre les feuillets β N terminaux antiparallèles des chaînes DO α et DO β permettant à l'hétérodimère formé de sortir du RE.

LISTE DES MOTS CLÉ

Apprêtement antigénique, MHC, Classe II, HLA-DR

CONTRIBUTION

Dans ce travail, j'ai effectué les expériences permettant la confirmation l'implication du résidu DO α E41 dans l'interaction avec DM. En effet la perte d'interaction que l'on voit pourrait être due à un mauvais assemblage de DO à cause de la mutation introduite. La molécule aberrante serait donc retenue dans le RE. Pour confirmer que le résidu E41 est impliqué dans l'interaction avec DM et que sa mutation ne conduit pas à la production d'une molécule de DO aberrante, j'ai utilisé le mutant DO α P11V. Comme décrit ci haut, DOPV s'assemble proprement et s'exprime en surface indépendamment de DM. J'ai donc introduit les mutations dont on pensait qu'elles suppriment l'interaction de DO avec DM. La molécule DO α PV-E41 se comporte comme celle DO α E41 confirmant ainsi que la mutation n'altère pas la conformation et que ce résidu est bel et bien impliqué dans l'interaction avec HLA-DM.

A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM

Francis Deshaies*, Alexandre Brunet*, Djibril A. Diallo*, Lisa K. Denzin^{†‡}, Angela Samaan^{§¶}, and Jacques Thibodeau*[¶]

*Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre Ville, Montréal, QC, Canada H3T 1J4; [†]Immunology Program, Weill Graduate School of Medical Sciences, Cornell University, New York, NY 10021; [‡]Immunology Program, Sloan-Kettering Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021; and [§]Immunité Cellulaire Antivirale, Institut Pasteur, 28 Rue Du Dr Roux, 75015 Paris, France

Edited by Peter Cresswell, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, and approved March 17, 2005 (received for review February 1, 2005)

B lymphocytes express the nonclassical class II molecule HLA-DO, which modulates the peptide loading activity of HLA-DM in the endocytic pathway. Binding to HLA-DM is required for HLA-DO to egress from the endoplasmic reticulum (ER). To gain insights into the mode of action of DO and on the role of DM in ER release, we sought to identify DM-binding residues on DO. Our results show that DO α encompasses the binding site for HLA-DM. More specifically, mutation of residue DO α 41 on an exposed lateral loop of the α 1 domain affects the binding to DM, ER egress, and activity of DO. Using a series of chimeric DR/DO molecules, we confirmed the role of the α chain and established that a second DM-binding region is located C-terminal to the DO α 80 residue, most probably in the α 2 domain. Interestingly, after mutation of a buried proline (α 11) on the floor of the putative peptide-binding groove, HLA-DO remained functional but became independent of HLA-DM for ER egress and intracellular trafficking. Collectively, these results suggest that the binding of HLA-DM to DO α allows the complex to egress from the ER by stabilizing intramolecular contacts between the N-terminal antiparallel β -strands of the DO $\alpha\beta$ heterodimer.

antigen processing | MHC | class II | HLA-DR

Classical MHC class II proteins are highly polymorphic heterodimers expressed at the surface of antigen-presenting cells where they bind antigenic peptides derived from endocytosed antigens (1). The α and β subunits associate in the endoplasmic reticulum (ER) with the nonpolymorphic invariant chain (Ii), and the complex is sorted to endocytic compartments where Ii is degraded. A small fragment [class II-associated Ii peptide (CLIP)] of the Ii is protected inside the groove and must be released before the binding of antigenic peptides (2). HLA-DM (DM), a nonpolymorphic intracellular chaperone, is responsible for CLIP removal and also for editing the peptide repertoire to favor those of higher class II-binding affinity (3).

Class II-restricted antigen presentation in B lymphocytes is tightly regulated to ensure specificity of the activation process. These cells express another nonclassical class II molecule called HLA-DO (DO; H2-O in mice) that modulates the presentation of antigens in the endocytic pathway (4). Recently, it was shown that transfection of DO in class II transactivator (CIITA)⁺ cells caused the accumulation of classical class II molecules associated with CLIP (5, 6). These results clearly showed the inhibitory role of DO on class II-restricted antigen presentation.

The precise molecular mechanism by which DO inhibits the catalytic activity of DM remains to be clarified. DO is found mostly in endosomes but is retained in the ER of DM⁻ cells. Interestingly, DO-bound DM is not sequestered there but rather allows the complex to egress from the ER (7). Trafficking of DO/DM to and inside the endocytic pathway is regulated by sorting signals located in the cytoplasmic tails of both molecules (8, 9). The need for DO to access peptide-loading compartments and to modify the subcellular sorting of DM suggests an elaborate modulator role on the antigen-processing rather than a unique inhibitory function (10–

13). More recently, it was proposed that the capacity of H2-O to affect, positively or negatively, the presentation of antigens depends on the particular B cell receptor–antigen combination (14).

The mechanism by which DO is retained in the ER and how DM allows for efficient ER egress remains unknown. DO lacks ER-retention motifs such as the cytoplasmic di-basic sequences (15). Pulse–chase and immunoprecipitation experiments revealed that DO α - and β -chains associate early after biosynthesis. However, in the absence of DM, DO α - and β -chains do not show carbohydrate modifications to suggest a passage through the Golgi (7). To gain insights into the role of DM in ER release, we sought to delineate the DM binding site on DO and to characterize the defect in the assembly of DO α - and β -chains.

Materials and Methods

Plasmids and Mutagenesis. pBSDO α .9, pBSDO β , pBudCE4-A, pBudDO $\alpha\beta$, RSV.5gptDN1, RSV.3DR β 008, and pBudDM are described in refs. 8 and 16. pBudDR β is the BamHI fragment of RSV.3DR β 008 in pBudCE4-A. pREP4CIITA and pCDNA3CIITA cDNAs were obtained from J. Ting (University of North Carolina, Chapel Hill). pBudDO α is the BamHI fragment of pBSDO α .9 into the BglII site of pBudCE4-A. pBudDO β is the BamHI fragment from pBSDO β into BglII site of pBudCE4-A. The pBudDMY was generated by PCR to modify the cytoplasmic 226-YTPL motif (8). A frameshift past this motif resulted in a longer cytoplasmic tail (226-ATPLLGPIIQKDGTFPRGRIP-AARGIH).

A DR₁₈/DO α chimeric cDNA (cDO α) was made by PCR using the DR α cDNA cloned in the BamHI site of pBlueScript (Stratagene) and RSV.5gptDN1 as templates. The SalI–PvuII fragment encompassing the junction was cloned in RSV.5gptDN1. A 2-kbp BamHI fragment was cloned into the BglII site of pBudDR β to generate pBudDR₁₈/DO α + DR β . For pBudDR₄₂/DO α + DR β , pBudDR₆₃/DO α + DR β , pBudDR₇₇/DO α + DR β , and pBudDR₈₄/DO α , pBSDO α .9 and pBSDR α were used as templates. The NotI–BstEII fragment including the junction was cloned into pBudDR₁₈/DO α + DR β . The DO α mutations were created by using pBSDO α .9. PCR products were digested with SalI–PvuII and cloned in pBudDO $\alpha\beta$ (pBudDO α P11V/ β wt, pBudDO α Δ P11/ β wt, and pBudDO α A12N/ β wt). For other DO α mutations (E41K, F52S, and α EF-KS), a 450-bp SalI–BstEII PCR fragment was simultaneously cloned with a BstEII–XbaI fragment, digested from pBSDO α .9, into the SalI–XbaI sites of pBudCE4-A (pBudDO α E41K, pBudDO α F52S, and pBudDO α EF-KS). A pBSDO β BamHI fragment was cloned in

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; Ii, invariant chain; CLIP, class II-associated Ii peptide; CIITA, class II transactivator; cDO, chimeric DO.

[¶]To whom correspondence may be addressed. E-mail: [REDACTED]

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

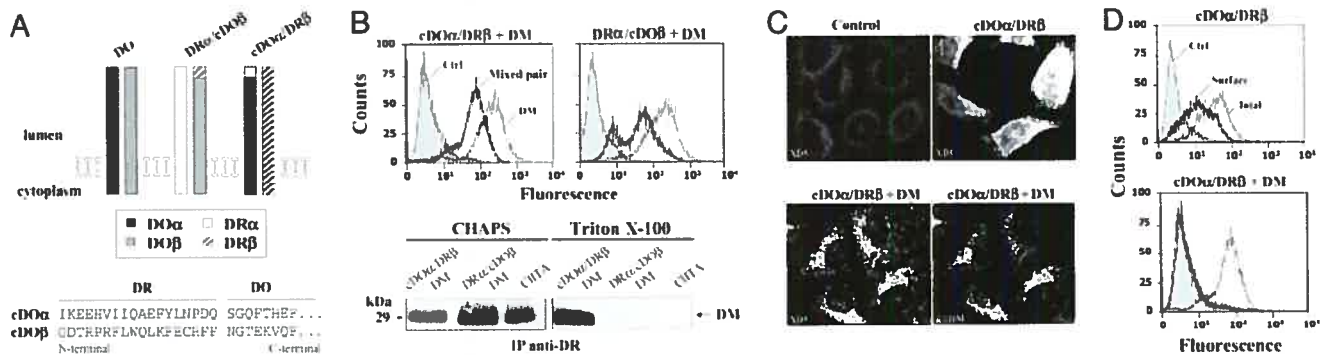


Fig. 1. DO α is responsible for the strong interaction with DM. (A) Mixed pairs between DR and chimeric DO chains. The N-terminal primary sequence of the mature cDO α and cDO β is shown. (B) HeLa cells stably expressing mixed pairs and DM were permeabilized and stained for class II (XD5 or L243) and DM (Map.DM1). Cells were lysed either in CHAPS or Triton X-100. DR α /cDO β and cDO α /DR β mixed pairs were immunoprecipitated with L243 and XD5, respectively. The association with DM was monitored by Western blotting with DM β -specific rabbit antiserum. HeLa cells transfected with CIITA were used as control, and DR was immunoprecipitated with L243. (C) Permeabilized HeLa cells expressing cDO α /DR β with or without DM and stained with XD5 and the DM-specific rabbit antiserum (R α DM). Untransfected HeLa cells were used as controls. (D) Surface expression of cDO α /DR β was monitored by using XD5 in DM $^{+}$ - and DM $^{-}$ -transfected HeLa cells (bold line). Total expression was assessed on permeabilized cells (thin line). The intracellular expression of DM is shown in B. Control cells were incubated with the secondary Ab alone (filled histogram).

BglII to generate pBudDO α E41K + β wt, pBudDO α F52S + β wt, and pBudDO α EF-KS + β wt.

Antibodies and Reagents. The following mAbs were used: L243 (DR α) (17), LB3.1 (DR α) (18), CerCLIP.1 (CLIP; Pharmingen) (19), XD5.117 (XD5; DR β) (20), MaP.DM1 (DM; Pharmingen) (19), Mags.DO5 (21), HKC5 (DO β) (22), and phycoerythrin (PE)-coupled anti-CD63 (Becton Dickinson). The rabbit sera against DO α and DM β are described in refs. 8 and 16. Secondary Abs were Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes), biotinylated goat anti-rabbit (BIO/CAN, Montreal), and Texas-red-coupled streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech). Biotinylated SEA was from Toxin Technology (Sarasota, FL).

Cell Lines and Transfections. HeLa and HeLa DM.5 cells were provided by R. P. Sekaly (Université de Montréal). HEK 293T cells were obtained from E. Cohen (Université de Montréal). Cells were cultured in DMEM, 10% FBS (Invitrogen), and selective agents. HeLa cells were transfected with FuGENE 6 (Roche Diagnostics) by using 1 μ g of each DNA (8). For transient expression, HEK 293T cells were transfected by using calcium phosphate (8).

Flow Cytometry and Fluorescence Microscopy. Cells were harvested, washed, and stained for surface expression. Alternatively, cells were permeabilized in saponin as described in ref. 8. Cells were analyzed by using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) or transferred on slides by centrifugation. Cells were analyzed by fluorescence microscopy on a Zeiss Axioplan 2 equipped with a Sony (Tokyo) DXC-390P camera.

Immunoprecipitations and Western Blotting. Cells (10^7) were harvested and lysed in 1% CHAPS or Triton X-100 (8). Immunoprecipitations were performed by using primary Abs bound to protein G coupled to Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biosciences), and samples were analyzed on immunoblots.

Results

DM Binds to the DO α Chain. First, we determined which chain of DO $\alpha\beta$ was responsible for the strong ER interaction with DM by generating mixed heterodimers between DO and DR (Fig. 1A). Such pairing overcomes ER retention but only when using chimeric DO chains (cDO chains) in which the first 18 residues are replaced by those of DR (23). Because DO α shows insertion of one extra

amino acid between corresponding residues 9 and 10 of DR (see *A Mutation in the Groove of DO Restores ER Egress*), position 18 of DR α is thus fused to residue 20 of DO α . The cDO α /DR β and DR α /cDO β molecules were stably expressed separately in DM $^{+}$ HeLa cells (Fig. 1B). To identify the key DM-interacting chain, we took advantage of the fact that DO-DM bonds persist in Triton X-100 and CHAPS whereas DR-DM complexes can only be coprecipitated in CHAPS (7, 24). The weak DR-DM binding was confirmed by immunoprecipitation of DR from CIITA $^{+}$ HeLa cells (22) after solubilization in Triton X-100 or CHAPS (Fig. 1B). Analysis of mixed DO/DR pairs showed that DM binds DR α /cDO β only in CHAPS, whereas it binds cDO α /DR β efficiently in both detergents, suggesting that DO α mediates strong DM binding. These results argue that cDO α /DR β and DR α /cDO β associate with DM in a DO- and DR-like fashion, respectively.

Because cDO α /DR β appeared to bind DM as efficiently as DO, we compared the subcellular localization of cDO α /DR β in DM $^{-}$ and DM $^{+}$ transfected cells (Fig. 1C). In the absence of DM, the mixed pair is found at the plasma membrane. The diffuse surface staining was expected given the absence of endosomal sorting motifs in DO α and DR β . However, upon coexpression of DM, staining for cDO α /DR β revealed punctate structures reminiscent of endosomes. Indeed, the pattern was indistinguishable from the one obtained for DM, suggesting a DM-induced intracellular sequestration (Fig. 1C). The same conclusion was reached from the flow cytometry analysis. Whereas cDO α /DR β reached the HeLa plasma membrane, the mixed pair was detected in DM $^{+}$ cells only upon permeabilization (Fig. 1D). Altogether, these results suggest that DM and cDO α /DR β interacted early in the ER, preventing the mixed pair from taking the default route to the surface. These data point to a major role for DO α in DM binding.

DM Contacts Residue DO α E41. Recently, it was shown that DR α E40, α F51, β L184, β V186, and β E187 are located on the same face and interact with DM (25). These residues are conserved in DO except for the equivalent of DR β L184, which is replaced by a valine (Fig. 2A). To test whether DO also uses this interface for DM binding, we generated mutants in this DR-like binding site on DO. Based on our described results, we concentrated our effort on DO α . The conserved DO α Glu-41 and Phe-52 residues (corresponding to DR α E40 and α F51) were replaced either separately or simultaneously with Lys and Ser residues, respectively. To evaluate their activity, each mutant was cotransfected together with CIITA into HeLa cells, and the level of cell-surface class II-CLIP complexes

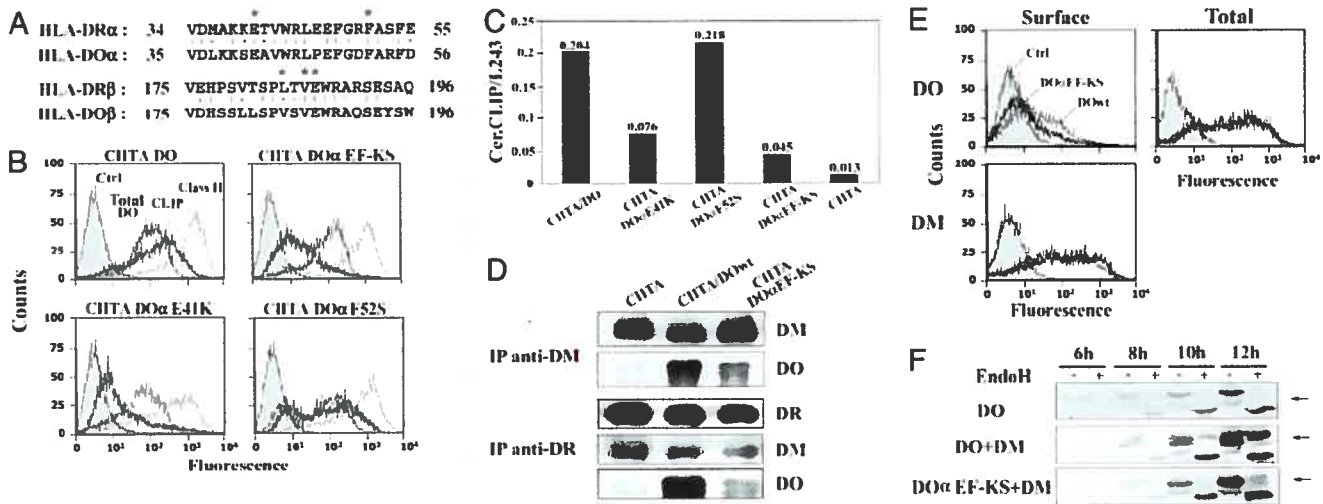


Fig. 2. Mutation of residue DO α E41 affects the interaction with DM. (A) Homology between DR and DO in the regions important for DR-DM association (25). Residues interacting with DM are denoted with asterisks. (B) HeLa cells were stably transfected with CIITA together with DO or DO mutants and purified with magnetic beads coated with L243. Cells were later analyzed after surface staining for DR (L243; gray line) or CLIP (CerCLIP.1; bold line) or after intracellular staining for DO (HKC5; thin line). Control represents untransfected HeLa cells stained with L243 (filled histogram). (C) Transfected HeLa cells were analyzed as above for class II and CLIP cell-surface expression. The histogram shows the ratios of the mean fluorescence values. (D) DM or DR were immunoprecipitated in CHAPS from stably transfected HeLa CIITA cells expressing DO (DOwt) or the DO α EF-KS mutant. Coprecipitating material was analyzed on immunoblots by using Abs for DM β , DO α , or DR β . As a control, HeLa cells transfected with CIITA alone were used. (E) 293T cells were transiently transfected with DO α EF-KS (bold line) or wild-type DO (thin line) along with DM lacking its cytoplasmic tyrosine sorting motif (DMY). Surface expression of DO was monitored by using Mags.DOS Ab (Upper Left). Cells were permeabilized and total expression of DO was assessed by using HKC5 (Upper Right). Control cells were incubated with the secondary Ab alone (filled histogram). Cells were also stained for surface DM by using Map.DM1 (Lower). (F) 293T cells were transfected with DO, DO + DM, or DO α EF-KS + DM and lysed 6, 8, 10, or 12 h posttransfection. Half of each sample was treated with EndoH and analyzed on immunoblots by using a DO α -specific rabbit antiserum. Arrows indicate the position of glycosylated DO α .

was determined by flow cytometry. Although CIITA alone slightly up-regulated DO expression, the level of CLIP remained low (22). The ratio of class II-CLIP (CerCLIP.1) to DR (L243) shows that cotransfection of DO strongly inhibits peptide loading (Fig. 2B and C). In contrast, the double mutant DO α EF-KS no longer inhibits DM function because only low levels of class II-CLIP were generated (Fig. 2B and C). Staining of permeabilized cells revealed that the observed difference was not due to DO expression levels (Fig. 2B). Next, we found that DO α 41 alone is critical for DM inhibition, whereas mutation of α 52 had no effect (Fig. 2B and C). The fact that the conserved glutamate is involved in the binding of DM for both DO and DR suggests possible models for the inhibition of antigen processing by DO (see Discussion). However, the lack of involvement of α 52F indicates that DO interacts with DM through a region that is not completely analogous to the one described for DR (26). Moreover, point mutations β V184H or β E187A did not affect the function of DO (data not shown).

Despite comparable levels of DO and DM expression (Fig. 2B and data not shown), immunoprecipitations showed that DM interacts less efficiently with DO α EF-KS than with wild-type DO (Fig. 2D). However, the DM/DO α EF-KS interaction was not totally abolished, perhaps explaining the low level of class II-CLIP at the surface of these cells (Fig. 2B and C). Trimolecular DO-DM-DR complexes can be precipitated from B cell lysates as well as from isolated MHC class II compartments (10, 27). DR was immunoprecipitated from the stable transfectants described above and the level of associated DM/DO complexes was determined by Western blotting (Fig. 2D). Results show that both DO and DM are coprecipitated with DR but that the α E41K mutation reduced the amount of DO in the complex.

We confirmed the weak DO α E41K-DM interaction by using transient transfections. We took advantage of the fact that a DM molecule devoid of its cytoplasmic YTPL motif (DMY) is expressed at the cell surface (28, 29) and drags DO to the plasma

membrane (Fig. 2E). As expected from the immunoprecipitation data, the DO α EF-KS mutant was expressed at lower levels on the cell surface than wild-type DO. Overall, DO levels were comparable as assessed by staining of permeabilized cells with a mAb specific for the cytoplasmic tail of DO β (HKC5; Fig. 2E Upper Right). Because DO α and DO β are encoded on the same plasmid, DO α levels were also identical. Finally, the low surface expression of DO α EF-KS could not be attributed to lower DM expression (Fig. 2E Lower).

To measure DO egress from the ER, we transfected DO and tested for the acquisition of complex carbohydrates over time. In cells expressing DO only, the β chain remained sensitive to EndoH even 12 h posttransfection (Fig. 2F). This finding confirms that DO does not transit through the Golgi in the absence of DM. However, a substantial proportion of the DO pool had acquired EndoH resistance as early as 8 h posttransfection in the presence of DM. On the other hand, DO α EF-KS showed little EndoH resistance at 12 h, confirming its reduced capacity to assemble with DM in the ER.

DM Binds Other Regions of DO α . To further characterize the DM-binding region, we generated a series of chimeric DR α /DO molecules. We reasoned that a stepwise increase in the content of DR α should, at some point, abrogate the capacity of DM to interact in the ER and sequester the chimeric molecules in endosomes (Fig. 1). Four more chimeric α -chains were generated to cover most of the α 1 domain. Assuming a classical class II-like structure, the DR α 40/DO covers two β -strands of the groove floor and most of the two exposed external loops. The DR α 63/DO molecule includes DR residues up to about half of the α -helix lining the putative groove. The DR portion in DR α 77/DO covers almost the entire α -helix (30).

To assess the interaction with DM, the chimeric molecules were transiently transfected into 293T cells together with DR β and with

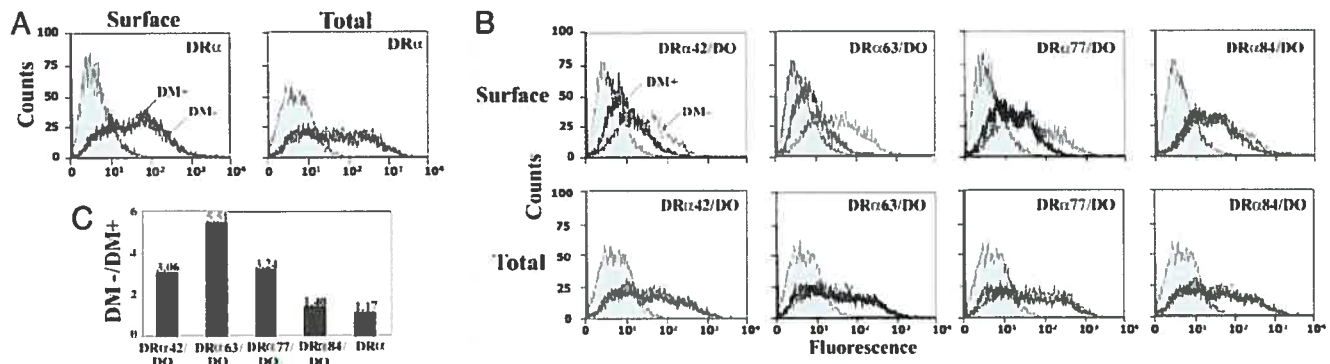


Fig. 3. The DM binding site includes a region C-terminal of the DO α 1 domain. 293T cells were transiently transfected with DR β along with DR α (A) or different cDO α -chains (B) in the presence (bold line) or absence (thin line) of DM. The capacity of DM to sequester the various class II molecules was assessed by surface staining with the nonconformational DR β -specific Ab XD5. Cells were also permeabilized and total expression of the molecules was determined. Control cells were incubated with the secondary Ab alone (filled histogram). (C) Ratios between the XD5 mean fluorescence value obtained for each heterodimer at the surface of DM⁻ and DM⁺ cells.

or without DM. Surface expression of control DR $\alpha\beta$ was unaffected by the presence of DM (Fig. 3A). This was expected because DR takes the default pathway to the surface without Ii, whereas DM is sorted to lysosomes. Also, the DR-DM interactions that might occur in this context would be transient (31). Staining of the permeabilized cells demonstrated that the total amount of class II was comparable in DM⁺ and DM⁻ cells (Fig. 3A). Fig. 3B shows that all chimeras are efficiently expressed at the surface of DM⁻ cells. However, with DM, the surface expression of DR α 42/DO, DR α 63/DO, and DR α 77/DO was reduced (Fig. 3B and C). This result suggests that DM interacted in the ER with a substantial fraction of the mixed pairs pool in a DO-like fashion, as shown in Fig. 1 for cDO α /DR β . Staining of permeabilized cells confirm that these variations in surface expression were not attributable to differences in class II (Fig. 3B) or DM (data not shown) levels. Interestingly, a DR α 84/DO construct was not sequestered by DM. However, introduction of the DR α 80–84 stretch into DO affected its overall conformation, precluding drawing any conclusions regarding the role of this region in DM binding (see Discussion). Given the fact that residues DR α N78 is conserved in DO (N79) and that mutation of DO α 80 does not affect DM binding (32), these results suggest that other DO residues C-terminal to α 80 are critical for the interaction with DM.

Next, we used the DR α 63/DO + DR β mixed pair to confirm the importance of the α chain in the interaction with DM. On classical

class II molecules, the region analogous to the DO α 41 loop is part of the epitopes recognized by several mAbs. We hypothesized that these might recognize DR α 63/DO and compete for the association with DM. First, we tested the binding of L243 and LB3.1, two DR α -specific monoclonal antibodies recognizing conformational epitopes that include residues DR α 18 and DR α 39 on the two separate loops beneath the α -helix (33). As a control, we used XD5, which recognizes a linear epitope on the β chain α -helix and which is destroyed by the double mutation β E59A/Q64A (data not shown). DR α 63/DO and DR were efficiently recognized by the L243, LB3.1, and XD5 Abs in the absence of DM (Fig. 4A). Interestingly, coexpression of DMY (mutated at its YTPL motif to avoid sequestration) had a dramatic negative effect on the binding of L243 and LB3.1 to the mixed pair but not to DR. The residual Ab staining is most likely because of DR α 63/DO molecules that have left the ER before encountering DM. The reduced binding of these α chain-specific Abs in the presence of DM is specific because recognition by XD5 was unaffected. The L243 over XD5 staining ratio for DR was clearly not affected by the presence of DM as compared with the chimeric molecule (Fig. 4B). The inability of L243 and LB3.1 to bind the cell-surface DR α 63/DO-DM complex strongly supports our conclusion that DM interacts with the α chain of DO, close to residue E41. Importantly, the lack of L243 binding reflects a DO-like rather than DR-like interaction because this Ab would efficiently bind DR/DM complexes (Fig. 1). This result is in

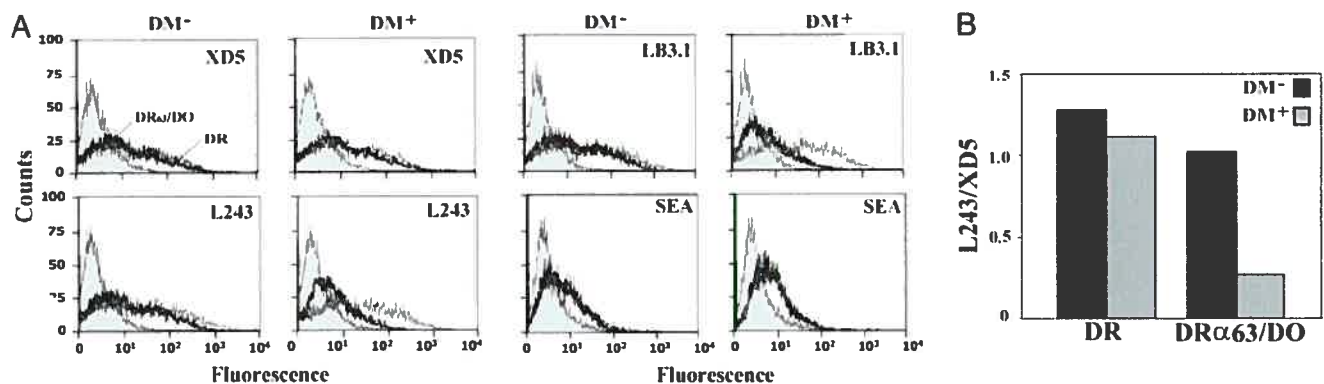


Fig. 4. HLA-DM competes with DR α -specific antibodies for binding to DR α 63/DO. (A) 293T cells were transfected with DR α (thin line) or DR α 63/DO (bold line) along with the DR β chain in absence or presence of DMY. Surface expression was assessed by using the DR β -specific Ab (XD5), the DR α -specific Abs (L243 or LB3.1), or SEA. Control cells were incubated with the secondary Ab alone or represent class II-negative HeLa cells incubated with SEA (filled histogram). (B) Ratio of the mean fluorescence values obtained for L243 and XD5.

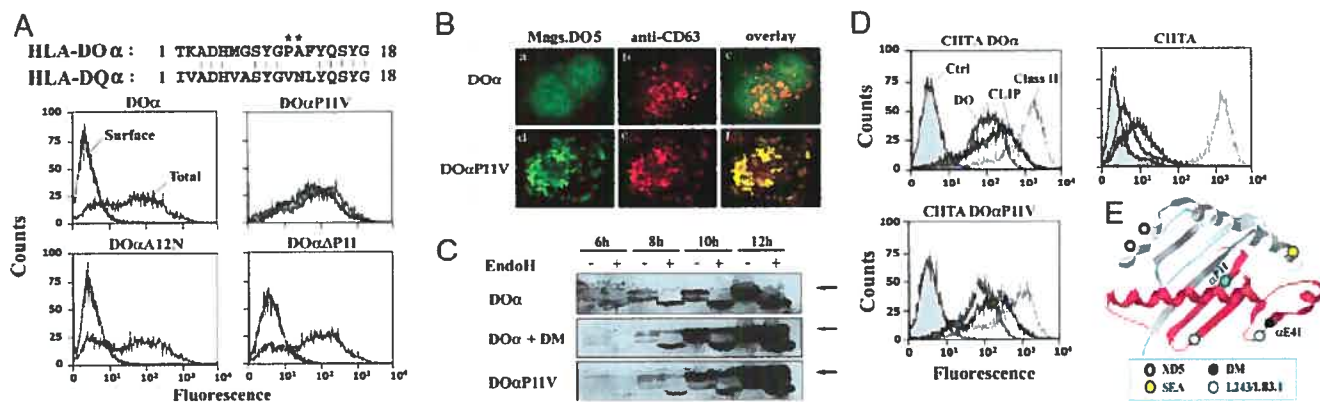


Fig. 5. Mutation of DO α P11 abrogates DM-dependency for ER egress. (A) Alignment between the DO α and DQ α N-terminal regions. Mutated residues on DO are denoted with asterisks. 293T cells were transfected transiently with DO $\alpha\beta$ -chains (DO) or mutated versions of DO α (DO α P11V, DO α ΔP, or DO α A12N) along with DO β chain. Cells were stained for surface expression of DO with Mags.D0 (bold line) or permeabilized and stained with HKC5 (total; thin line). (B) Fluorescence microscopy on permeabilized HEK 293T cells expressing DO (a–c) or DO α P11V mutant (d–f). (C) 293T cells were transfected with DO, DO + DM, or DO α P11V and analyzed as in Fig. 2F. (D) HeLa cells were stably transfected with CIITA alone or together with DO or DO α P11V + DO β and purified with magnetic beads coated with L243. Cells were subsequently analyzed by flow cytometry after surface staining for DR (L243; gray line) and CLIP (CerCLIP.1; bold line) and after intracellular staining for DO (HKC5; thin line). Control cells represent untransfected HeLa cells stained with L243 (filled histogram). (E) Generic class II structure showing the probable location of key DO residues.

line with our statement made above that DO interacts with DM through a region that is not akin to the interface on DR.

Although the lack of competition between XD5 and DM suggests that the latter does not significantly contact the β 1 chain, we confirmed this by analyzing the binding of the superantigen SEA to DR α 63/DO + DR β . SEA binds through coordination of a zinc ion with DR β H81 (23), and our results show that its interaction with the chimeric molecule was as effective in the presence or absence of DMY (Fig. 4A). Collectively, these competition experiments with class II ligands confirm that DM binds to DO α .

A Mutation in the Groove of DO Restores ER Egress. Next, we addressed the functional importance of the newly identified DM binding site for the maturation of DO. The inability of classical class II molecules to leave the ER has been previously reported in the context of mismatched $\alpha\beta$ pairs between various isotypes or haplotypes. In some cases, surface expression was restored after site-directed mutagenesis or by the construction of chimeric molecules, often implicating regions close to the N terminus of either the α or β chain (34–36). Thus, we postulated that the DO $\alpha\beta$ interaction was suboptimal and that the binding of DM may stabilize the DO heterodimer. Indeed, introducing the first 18 aa of DR into DO allows the formation of mixed DR/DO pairs (Fig. 1). A sequence alignment of DR, DO, and DQ revealed the presence of an amino acid insertion in both DQ α and DO α . This extra Gly residue (α G10) was numbered 9a in I-A (the mouse equivalent of DQ), and the crystal structure revealed that it protrudes in a β bulge conformation outward from the floor of the class II peptide binding groove (37). This bulge maintains the respective arrangement, seen in other class II, of the conserved $\alpha\beta$ residues involved in interchain contacts. However, in DO α , this glycine is next to a proline (α P11) that we thought might disrupt the β -sheet and prevent the glycine from bulging (Fig. 5A). This finding is especially interesting given the fact that this proline is close to the α chain loops supporting DM interactions.

We investigated the importance of this region in DO α by generating a series of mutants (α ΔP11, α P11V, α A12N, α Y9Q, and α ΔP11/A12E). After transfection of these DO α -chains together with DO β , the transport and subsequent cell-surface expression of DO in the absence of DM was assessed by staining with a DO-specific mAb. Remarkably, DO α P11V + DO β was efficiently expressed at the cell surface in the absence of DM (Fig. 5A). Surface

expression of this DO mutant was also observed in stably transfected HeLa cells (data not shown). None of the other mutations that were introduced in this region (α ΔP11, α A12N, α Y9Q, α P11/A12E, and β 19Y/A11F) restored surface DO expression in the absence of DM (Fig. 5A and data not shown).

The strong surface expression of DO α P11V suggested that ER egress was highly efficient. DO contains a functional dileucine motif in its β chain cytoplasmic tail (8). This sorting signal should allow DO α P11V to gain access to endosomes, probably after endocytosis. Transfected cells were permeabilized, stained for DO, and analyzed by fluorescence microscopy. The presence of scattered vesicles colocalizing with the endocytic marker CD63 (Fig. 5B) further confirms the overall integrity of DO α P11V mutant and its intrinsic capacity to transport and accumulate in the absence of DM.

To compare the kinetics of maturation between DO α P11V and DO/DM, the acquisition of EndoH resistance by the α -chains was analyzed at various time points after transfection (Fig. 5C). DO was retained in the ER in the absence of DM and, therefore, did not acquire complex sugars. However, the same analysis showed the emergence of EndoH-resistant forms of DO α P11V as early as 8 h posttransfection. Importantly, the kinetic of EndoH resistance was similar for DO molecules coexpressed with DM. Altogether, these results suggest that mutation of the proline to a valine at residue α P11 allows ER egress by correcting a conformation defect in DO.

Finally, we tested the ability of DO α P11V to inhibit CLIP release from classical class II molecules. HeLa CIITA cells were transfected with either DO α P11V or wild-type DO. After selection, the levels of cell-surface class II-CLIP were measured by flow cytometry (Fig. 5D). The results show that both mutant and wild-type DO are functional in terms of their ability to inhibit DM and peptide loading.

Discussion

The regulation of antigen processing and peptide binding to classical class II molecules is a complex process that varies depending on the type of APC or the receptors used for antigen internalization. In B cells, DM is the target of regulatory control through the expression of DO. Although the role and mechanism of action of DM are well characterized, the need for DM modulation in B cells is not well understood.

The crystal structure of DR-DM complexes remains unknown, but models for the mechanism of peptide exchange has been

proposed (26, 38). Here, we have identified a region of DO that interacts with DM. As opposed to the results obtained after mutation of the $\alpha 80$ –84 stretch (data not shown), mutation of $\alpha E41K$ in the DM-independent DO $\alpha P11V$ molecule (DO $\alpha P11V$ + $\alpha E41K$) did not affect surface expression (Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site). This finding suggests that the reduced interaction between DO $\alpha E41K$ and DM is not the result of a conformational defect. Interestingly, the mouse Glu $\alpha 41$ is polymorphic in H2-O, and CBA/J mice of the *k* haplotype have a Glu to Ala substitution at position $\alpha 41$ (39). This change most probably affects, to some extent, the interaction with H2-M. The fact that DM covers the DO α -chain may explain why immunization of mice with DO-DM complexes yielded only DO β -specific mAbs (L.K.D., unpublished work).

The fact that DM mutations affecting DR did not prevent DO-DM association strongly suggests that DO and DR have distinct binding sites (26). A noteworthy point is that DO $\alpha E41$ is analogous to the DR $\alpha E40$ residue and both are involved in contacting DM. It will be interesting to see whether this is coincidental or whether both residues interact with the same amino acids on DM. We could envisage that although DO and DR bind to nonoverlapping faces on DM, DO contacts and disengages key DM residues such as DM $\alpha F100$ that play a role in the destabilization of DR-CLIP bonds (26). At low pH, a conformational change in DO could free the catalytic DM residue.

The discovery that a point mutation renders DO independent of DM for ER egress is of the utmost interest. Karlsson and collaborators showed that even in the absence of DM, the DO α - and β -chains associate and can be coimmunoprecipitated (7). The relative efficiency of DO $\alpha\beta$ heterodimer formation but lack of ER egress is reminiscent of results obtained previously with some mismatched $\alpha\beta$ class II gene products. Whereas there are clear examples of haplotype-, isotype-, and even species-mismatched heterodimers that can be expressed at the cell surface (40–42), other pairs like E $\alpha A\beta^k$, DR $\alpha A\beta^b$, DQ1 $\alpha A\beta^k$, DR αDP^b , and DQ1 $\alpha DQ\beta 2$ could not be detected on transfected cells (35, 36, 43, 44). As for DO in DM⁻ cells, some mismatched $\alpha\beta$ classical class II pairs do form in the ER but are not exported beyond the *cis*-Golgi (43, 44). Although there were doubts in the past that products of the

DOA (formerly known as DZ or DN) and DOB genes were part of the same heterodimer, it has become clear from immunoprecipitation and transfection experiments that DO α and DO β associate (7, 45). The DOA and DOB genes are virtually nonpolymorphic, and it is surprising that they have not evolved to maximize pairing. A selective pressure must exist to explain the instability of DO in the absence of DM. Such safety mechanism might prevent surface expression of DO molecules that could potentially activate autoreactive T cells. Indeed, we have previously shown that DO β can interact with CD4 (23).

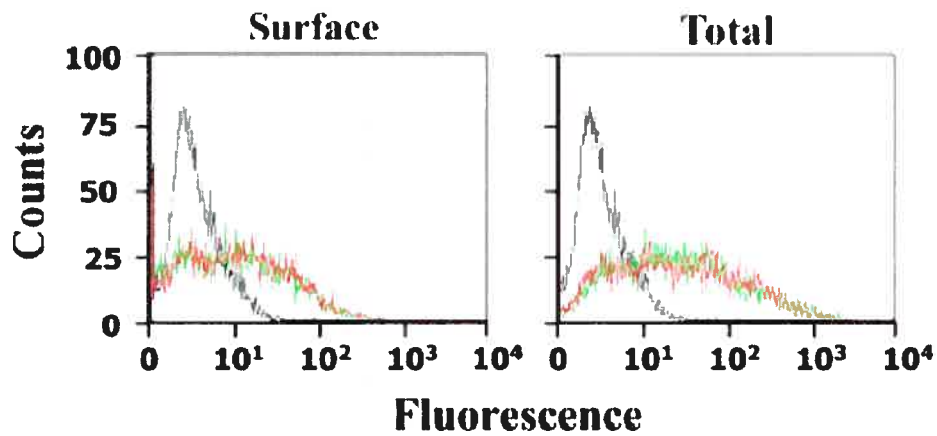
How DM rescues DO from degradation in the ER is a matter of speculation. Classical class II molecules bind calnexin and/or binding luminal protein (BiP) during assembly (46, 47). DM might compete with these chaperones for binding to the loosely associated, most probably aggregated DO α - and β -chains. Another nonmutually exclusive possibility is that DM binding directly affects the conformation of DO to release ER chaperones bound on other regions of the molecule. DO is particularly hydrophobic in its membrane-distal domains (48) and could expose patches recognized by binding luminal protein in the absence of DM. The fact that the DO $\alpha P11V$ mutation restores egress in the absence of DM would favor the latter mechanism. By strongly interacting with the external loops and the α -helix of the DO $\alpha 1$ domain, DM could affect the intra- and/or interchain interactions. Whether DO $\alpha P11V$ binds peptides that could stabilize the groove is currently unknown. Interestingly, DO $\alpha P11V$ binds DM very efficiently as judged by their coimmunoprecipitation in Triton X-100 and the fact that DM sequesters the mutant DO in endosomes (Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site). These properties suggest that DO $\alpha P11V$ represents a useful tool to study the function of DO and why free forms must be retained in the ER.

We thank E. O. Long, J. Ting, and R. P. Sekaly for providing cDNAs and cell lines and E. Mellins and A. Pachine for helpful discussions. F.D. and A.B. were supported by studentships from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Quebec). J.T. holds a Senior Fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. This work was supported by grants to J.T. from the Canadian Institutes of Health Research and the Cancer Research Society, Inc.

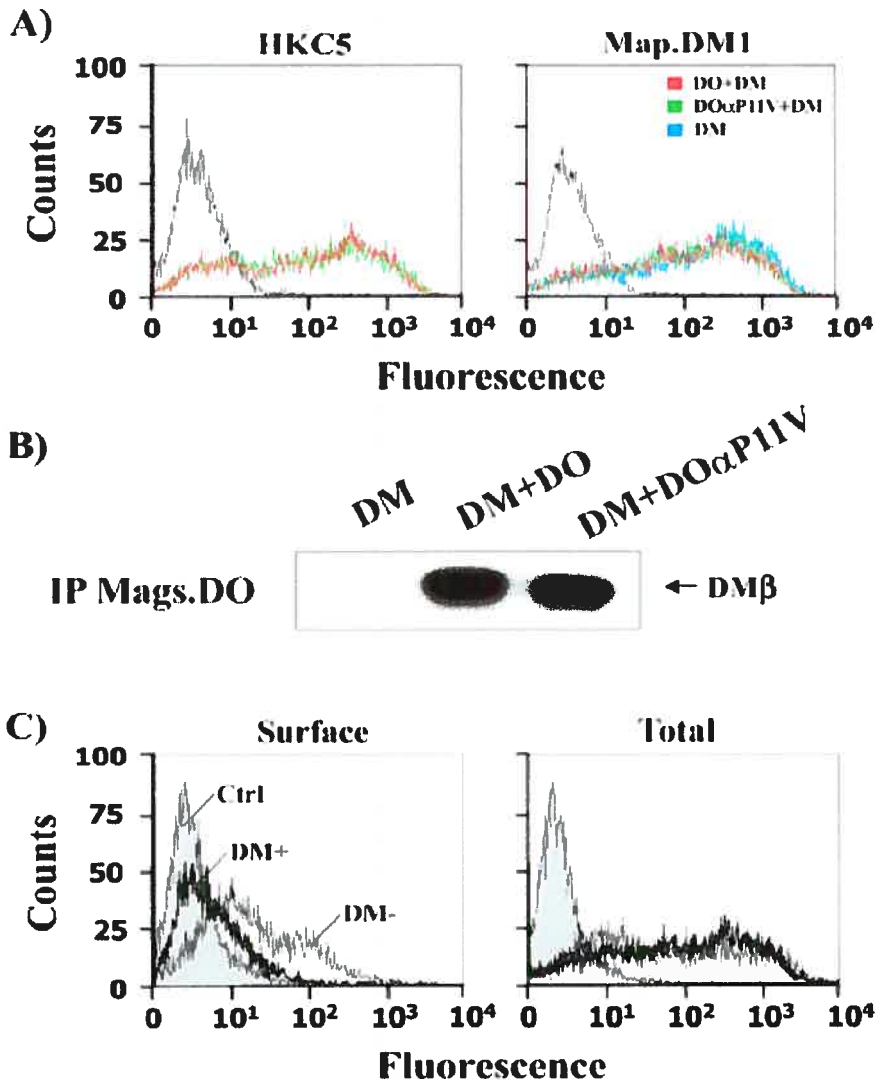
- Cresswell, P. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259–293.
- Riberdy, J. M., Newcomb, J. R., Surman, M. J., Barbosa, J. A., & Cresswell, P. (1992) *Nature* **360**, 474–477.
- Kropshofer, H., Hammerling, G. J., & Vogt, A. B. (1997) *Immunol. Today* **18**, 77–82.
- Chen, X., & Jensen, P. E. (2004) *Immunol. Res.* **29**, 19–28.
- Denzin, L. K., Sant'Angelo, D. B., Hammond, C., Surman, M. J., & Cresswell, P. (1997) *Science* **278**, 106–109.
- Van Ham, S. M., Tjin, E. P. M., Lillemeier, B. F., Gruneberg, U., Van Meijgaarden, K. E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulip, A., Canas, B., Rahman, D., et al. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 950–957.
- Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W. P., Jackson, M., Peterson, P. A., & Karlsson, L. (1996) *EMBO J.* **15**, 4817–4824.
- Brunet, A., Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. J., & Thibodeau, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 37062–37071.
- van Lith, M., van Ham, M., Griekspoor, A., Tjin, E., Verwoerd, D., Calafat, J., Janssen, H., Reits, E., Pastoors, L., & Neefjes, J. (2001) *J. Immunol.* **167**, 884–892.
- Kropshofer, H., Vogt, A. B., Thery, C., Armandola, E. A., Li, B. C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., & Hammerling, G. J. (1998) *EMBO J.* **17**, 2971–2981.
- van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., et al. (2000) *J. Exp. Med.* **191**, 1127–1136.
- Perraudieu, M., Taylor, P. R., Stauss, H. J., Lindstedt, R., Bygrave, A. E., Pappin, D. J., Ellmerich, S., Whitten, A., Rahman, D., Canas, B., et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* **30**, 2871–2880.
- Brocke, P., Armandola, E., Garbi, N., & Hammerling, G. J. (2003) *Eur. J. Immunol.* **33**, 411–421.
- Alfonso, C., Williams, G. S., Han, J. O., Westberg, J. A., Winqvist, O., & Karlsson, L. (2003) *J. Immunol.* **171**, 2331–2337.
- Trowsdale, R. D., & Jackson, M. R. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 27–54.
- Faubert, A., Samaan, A., & Thibodeau, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 2750–2755.
- Lampson, L. A., & Levy, R. (1980) *J. Immunol.* **125**, 293–299.
- Gorga, J. C., Knudsen, P. J., Foran, J. A., Strominger, J. L., & Burakoff, S. J. (1986) *Cell Immunol.* **103**, 160–173.
- Denzin, L. K., Robbins, N. F., Carboy-Newcomb, C., & Cresswell, P. (1994) *Immunology* **1**, 595–606.
- Radka, S. F., Machamer, C. E., & Cresswell, P. (1984) *Hum. Immunol.* **10**, 177–188.
- Glazier, K. S., Hake, S. B., Tobin, H. M., Chadburn, A., Schattner, E. J., & Denzin, L. K. (2002) *J. Exp. Med.* **195**, 1063–1069.
- Khalil, H., Deshaies, F., Bellemare-Pelletier, A., Brunet, A., Faubert, A., Azar, G. A., & Thibodeau, J. (2002) *Tissue Antigens* **60**, 372–382.
- Thibodeau, J., Lavoie, P. M., Samaan, A., Corre, J. P., Sekaly, R. P., & Cazenave, P. A. (1998) *Mol. Immunol.* **35**, 885–893.
- Sanderson, F., Thomas, C., Neufjes, J., & Trowsdale, J. (1996) *Immunology* **4**, 87–96.
- Doebble, C. R., Busch, R., Scott, M. H., Pashine, A., & Mellins, D. E. (2000) *Immunology* **13**, 517–527.
- Pashine, A., Busch, R., Belmares, M. P., Munnings, J. N., Doebble, R. C., Buckingham, M., Nolan, G. P., & Mellins, D. E. (2003) *Immunology* **19**, 183–192.
- Hammond, C., Denzin, L. K., Pan, M., Griffith, J. M., Geuze, H. J., & Cresswell, P. (1998) *J. Immunol.* **161**, 3282–3291.
- Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J., & Bonifacio, J. S. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 351–369.
- Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P. A., & Karlsson, L. (1995) *Immunology* **3**, 561–572.
- Brown, J. H., Jarletzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., & Wiley, D. C. (1993) *Nature* **364**, 33–39.
- Denzin, L. K., & Cresswell, P. (1995) *Cell* **82**, 155–165.
- van Lith, M., van Ham, M., & Neefjes, J. (2002) *Immunogenetics* **54**, 591–595.
- Fu, X.-T., & Karr, R. W. (1994) *Hum. Immunol.* **39**, 253–260.
- Sant, A. J., Braunstein, N. S., & Germain, R. N. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8065–8069.
- Karp, D. R., Teletski, C. L., Jaraquemada, D., Maloy, W. L., Coligan, J. E., & Long, E. O. (1990) *J. Exp. Med.* **171**, 615–628.
- Lechier, R. I., Sant, A. J., Braunstein, N. S., Sekaly, R., Long, E. O., & Germain, R. N. (1990) *J. Immunol.* **144**, 329–333.
- Fremont, D. H., Monnaie, D., Nelson, C. A., Hendrickson, W. A., & Unanue, E. R. (1998) *Immunology* **8**, 305–317.
- Stratikos, E., Mosyak, L., Zaller, D. M., & Wiley, D. C. (2002) *J. Exp. Med.* **196**, 173–183.
- Karlsson, L., & Peterson, P. A. (1992) *J. Exp. Med.* **176**, 477–483.
- Germain, R. N., & Quill, H. (1986) *Nature* **320**, 72–75.
- Norcross, M. A., Raghupathy, R., Strominger, J., & Germain, R. N. (1986) *J. Immunol.* **137**, 1714–1717.
- Lotteau, V., Teyton, L., Burroughs, D., & Charron, D. (1987) *Nature* **329**, 339–341.
- Sant, A. J., Hendrix, L. R., Coligan, J. E., Maloy, W. L., & Germain, R. N. (1991) *J. Exp. Med.* **174**, 799–808.
- Kwok, W. W., Kovats, S., Thurtle, P., & Nepom, G. T. (1993) *J. Immunol.* **150**, 2263–2272.
- Doek, D. C., & Altman, D. M. (1997) *Int. Immunol.* **9**, 355–364.
- Anderson, K. S., & Cresswell, P. (1994) *EMBO J.* **13**, 675–682.
- Bonnerot, C., Marks, M. S., Cossin, P., Robertson, E. J., Bikoff, E. K., Germain, R. N., & Bonifacio, J. S. (1994) *EMBO J.* **13**, 934–944.
- Servenius, B., Rask, L., & Peterson, P. A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8759–8766.

Supporting Information

PNAS | May 3, 2005 | vol. 102 | no. 18 | 6443-6448



Supporting figure 6. HEK 293T cells were transiently transfected with the DM-independent (DO α P11V)+DO β (red) or (DO α P11V+E41K)+DO β (green) mutants. After 48h, cells were either stained for expression at the plasma membrane (using Mags.DO mAb) or permeabilized and stained for total expression (using HKC5 mAb).



Supporting figure 7. (A) HEK 293T cells were transiently transfected with DM alone, DM and the (DO α P11V)+DO β molecule, or DM and DO $\alpha\beta$. After 48 h, cells were permeabilized and stained for DO (HKC5) and DM (Map.DM1) expression. For the HKC5 staining, DM-transfected cells were used as negative control (black curve). For the Map.DM1 staining, the negative control represents untransfected cells stained with the secondary antibody alone (black curve). (B) Cell lysates were prepared in Triton X-100 and DO was immunoprecipitated using Mags.DO. Coprecipitating DM was revealed by immunoblotting with a DM β -specific rabbit serum. (C) HEK 293T cells were transiently transfected with the DM-independent (DO α P11V)+DO β molecule with or without DM and stained at the cell surface using Mags.DO mAb. Total DO expression was measured following permeabilization of the cells and staining with the HKC5 mAb.

6.2 ANNEXE II ACCORD DES CO-AUTEURS

6.2.1 CO-AUTEURS ARTICLE 1

ANNEXE II

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Francis Deshaies, Djibril A. Diallo, Helen Tobin, Angélique Bellemare-Pelletier, Nathalie Bédard, Alexandre Brunet, Lisa K. Denzin, and Jacques Thibodeau. Evidence for a DM-induced conformation change in HLA-DO? (Manuscript en préparation)

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Djibril Amadou Diallo inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et HLA-DO.

Francis Deshaies

Signature

Date

Coauteur :

2006-04-12

**ANNEXE II
ACCORD DES COAUTEURS**

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Francis Deshaies, **Djibril A. Diallo**, Mammad Pezeshki, Helen Tobin, Angélique Bellemare-Pelletier, Nathalie Bédard, Alexandre Brunet, Lisa K. Denzin, and Jacques Thibodeau.
Evidence for a DM-induced conformation change in HLA-DO β .

Manuscrit prêt pour soumission.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Djibril Amadou Diallo** inclue cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre **Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et HLA-DO**.

Coauteur : Mammad Pezeshki

(Signature

Date

17.07.06

2 pages in total

Hello Helen,
Dr Denzin just give your E-mail address. I am a graduate student at Dr Thibodeau's lab. I would like to have your agreeem to include in my thesis a paper witch we are both co-authors .
I have past the agreement form below so you can sign it and send back by faxe to

(514) 343-5985.
Thanks,
Djibril.

Francis Deshaies, Djibril A. Diallo, Helen Tobin, Angélique Bellemare-Pelletier, Nathalie Bédard, Alexandre Brunet, Lisa K. Denzin, and Jacques Thibodeau. Evidence for a DM-induced conformation change in HLA-DO?

Manuscrit in preparation

ANNEXE II

ACCORD DES COAUTEURS

Co-authors agreement

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Francis Deshaies, Djibril A. Diallo, Helen Tobin, Angélique Bellemare-Pelletier, Nathalie Bédard, Alexandre Brunet, Lisa K. Denzin, and Jacques Thibodeau. Evidence for a DM-induced conformation change in HLA-DO?

Article en phase de finale de préparation

04/21/2000 10:00 FAX 1111100700 04/21/2000

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Djibril Amadou Diallo inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et HLA-DO.

[Redacted Name]

4/21/06

: Helen Tobin

Signature

Coauteur
Date

Co-author

ANNEXE II

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Francis Deshaies, Djibril A. Diallo, Helen Tobin, Angélique Bellemare-Pelletier, Nathalie Bédard, Alexandre Brunet, Lisa K. Denzin, and Jacques Thibodeau.

Evidence for a DM-induced conformation change in HLA-DO?

Manuscrit en préparation

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Djibril Amadou Diallo inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et HLA-DO.

Coauteur :

Signature

Date 24 avril 2006

ANNEXE II

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Francis Deshaies, **Djibril A. Diallo**, Helen Tobin, Angélique Bellemare-Pelletier, Nathalie Bédard, Alexandre Brunet, Lisa K. Denzin, and Jacques Thibodeau.
Evidence for a DM-induced conformation change in HLA-DO β

Article en phase de finale de préparation

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Djibril Amadou Diallo** inclue cet article dans **son mémoire de maîtrise** qui a pour titre **Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et HLA-DO**.

Coauteur : Nathalie Bédard


Signature

13/04/2006
Date

**ANNEXE II
ACCORD DES COAUTEURS**

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Francis Deshaies, **Djibril A. Diallo**, Helen Tobin, Angélique Bellemare-Pelletier, Nathalie Bédard, Alexandre Brunet, Lisa K. Denzin, and Jacques Thibodeau.
Evidence for a DM-induced conformation change in HLA-DO β

Article en phase de finale de préparation

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Djibril Amadou Diallo** inclue cet article dans **son mémoire de maîtrise** qui a pour titre _____ **Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et HLA-DO_____.**

ALEXANDRE BRUNET
Coauteur : Alexandre Brunet



Signature

3 Av. C 2006
Date

ANNEXE II

**Co-author agreement (1/2)
 ACCORD DES COAUTEURS (1/2)**

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Francis Deshaies, **Djibril A. Diallo**, Helen Tobin, Angélique Bellemare-Pelletier, Nathalie Bédard, Alexandre Brunet, Lisa K. Denzin, and Jacques Thibodeau.
 Evidence for a DM-induced conformation change in HLA-DOβ
Article en phase de finale de préparation

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Djibril Amadou Diallo** inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre **Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et HLA-DO.**

[Redacted signature area]

Coauteur : Lisa K. Denzin
 Co-author

Signature

13 April 04

Date

6.2.2 CO-AUTEURS ARTICLE 2

ANNEXE II

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Deshaies F, Brunet A, Diallo DA, Denzin LK, Samaan A, Thibodeau J.
A point mutation in the groove of IILA-DO allows egress from the endoplasmic
reticulum independent of H1A-DM. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May
3:102(18):6443-8.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Djibril
Amadou Diallo inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre
Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité II
de l'homme ; IILA-DM et IILA-DO.

Francis Deshaies

Signature

Date

2006-04-12

Coauteur :

**ANNEXE II
ACCORD DES COAUTEURS**

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

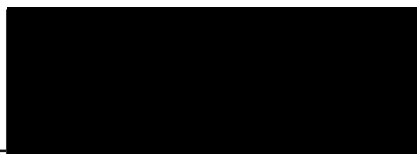
2. Description de l'article

Deshaies F, Brunet A, **Diallo DA**, Denzin LK, Samaan A, 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. 2005 May 3;102(18):6443-8.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que
Djibril Amadou Diallo inclue cet article dans **son mémoire de maîtrise**
qui a pour titre _____ **Caractérisation des molécules non classiques**
du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et
HLA-DO _____.

ALEXANDRE BRUNET
Coauteur : Alexandre Brunet



Signature

13 avril 2006
Date

ANNEXE II

**Co-author agreement (2/2)
ACCORD DES COAUTEURS (2/2)**

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiant : Djibril Amadou Diallo

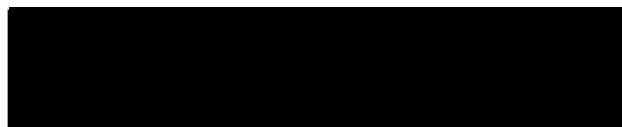
Sigle et titre du programme : M.Sc. Microbiologie et Immunologie

2. Description de l'article

Deshales F, Brunet A, **Diallo DA**, Denzin LK, Samaan A, 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. 2005 May 3;102(18):6443-8.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que
Djibril Amadou Diallo inclue cet article dans son mémoire de maîtrise
qui a pour titre _____ **Caractérisation des molécules non classiques**
du complexe majeur d'histocompatibilité II de l'homme ; HLA-DM et
HLA-DO _____.



13 April 06

Coauteur : Lisa K. Denzin
Co-author

Signature

Date

Google Gmail Calendar more »

Settings | Help | Sign out



Search Mail

Search the Web

Show search options
Create a filter

Compose Mail

Related Topics: [Drosophila - DNA Sequence Analysis - Molecular Biology](#) - [Mitochondrial DNA](#)

Inbox (60)

Starred ☆

Chats ☺

Sent Mail

Drafts (6)

All Mail

Spam (235)

Trash

Contacts

Quick Contacts

Search, add, or invite

● djibril diallo

Set status here ▼

● Georges Azar

● Mammad pezeshki

a.diallo

chrystele betty In...

d_djib

Demba.Ba@t-onli...

djibril.diallo

haydar.alturaihi

Thibodeau Jacques

wassim chatoo

Add contact

Show all

Labels

I tune

Memoire (7)

Edit labels

Invite a friend

Give Gmail to:

Send Invite 95 left

preview invite

« Back to Inbox

Archive

Report Spam

Delete

More actions...

« Newer

25 of 260

Older »

Mémoire Djibril Diallo [Inbox](#)

[New window](#)

★ THIBODEAU, Jacques to me

[More options](#) Jul 4

[Print](#)

Sponsored Link:

[Analyze Apoptosis Pathw](#)

Find gene cell death relatio
PathwayArchitect Software
www.Stratagene.com

[Serotec Antibodies poste](#)

Free apoptosis & macrophz
antibody catalogue, brochu
www.serotec.com

[Knockout mice and data](#)

Over 900 lines of KO mice
phenotypic data available n
www.deltagen.com

[Cell Signaling Technolog](#)

Innovative antibodies and a
for signal transduction rese
www.cellsignal.com

[more sponsored links »](#)

[About these link:](#)

----- Original Message -----

Subject:Re: [Fwd: figures francis]

Date:Fri, 20 May 2005 16:01:23 +0200
(CEST)

From: [REDACTED]

To:Jacques Thibodeau
[REDACTED]

References:<4120C334.6060009@umontreal.ca>
<a05100301bd47af393ef6@[157.99
.2.163]>
<4140D81F.40409@umontreal.ca>
<a05100300bd67767cdbc4@[157.99
.2.163]>
<414AE597.7060408@umontreal.ca>
<a05100301bd7607820809@[157.99
.2.163]>
<42850ED2.2010205@umontreal.ca>

I agree that Mr. Djibril Diallo includes in
his thesis the paper
entitled : A point mutation in the groove of
HLA-DO allows egress from
the endoplasmic reticulum independent of HLA-
DM and published in PNAS,
PNAS vol.102 May 3, 2005. "

[Reply](#) [Forward](#) [Invite Jacques to Gmail](#)

« Back to Inbox

Archive

Report Spam

Delete

More actions...

« Newer

25 of 260

Older »