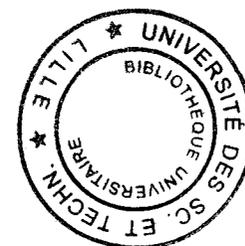


Th 20 000 442

50376-  
1999-  
279

Université des Sciences et Technologies Lille  
Lille I

N° d'ordre



## THESE DE DOCTORAT

Présentée pour obtenir le grade  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE I  
Discipline : Sciences de la vie - option immunologie

par

**Bertrand GEORGES**

# Influence du ligand peptidique sur la conformation et la stabilité des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

Présentée et soutenue publiquement le 26 Mai 1999 devant la commission  
d'examen dont le jury est composé de :

<b>Président</b>	<b>Madame le Professeur Geneviève Spik</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>Monsieur le Docteur Claude Auriault</b>
<b>Rapporteurs</b>	<b>Madame le Docteur Patricia Krief</b> <b>Monsieur le Docteur Jean-Gérard Guillet</b>
<b>Examineurs</b>	<b>Monsieur le Docteur Sebastian Amigorena</b> <b>Monsieur le Docteur Guy Lippens</b>

# Sommaire

## INTRODUCTION

### **I. Les peptides de synthèse pour une approche pharmacologique de la vaccination**

p1

- A. Une approche pharmacologique de la vaccination
- B. Concept de vaccination par des peptides de synthèse
  - a. Les peptides, supports de l'immunité spécifique T et B
  - b. Intérêts et limites des peptides en vaccination
- C. L'activité CD4 "helper" : un prérequis à l'induction d'une réponse immunitaire par des peptides.

### **II. Présentation du sujet**

p6

- A. Notre stratégie de caractérisation des épitopes T CD4 peptidiques
- B. Recherche d'épitopes T potentiels par test de liaison sur les molécules de CMH de classe II : Problématique de notre étude

### **III. Les molécules présentatrices d'antigènes du CMH de classe II**

p9

- A. Le complexe génique HLA de classe II
- B. Structure des molécules de CMH de classe II
- C. Polymorphisme HLA classe II
- D. Expression des molécules de CMH de classe II
- E. Distribution de l'expression des molécules de CMH de classe II
- F. Bases cellulaires de la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II
  - a. Synthèse
  - b. Le chargement des peptides antigéniques
  - c. Recyclage des molécules de CMH de classe II
  - d. Rôle de la protéine HLA-DM
  - e. Rôle de la protéine HLA-DO
  - f. Origines multiples des peptides présentés par les molécules de CMH de classe II
  - g. Taille des peptides naturels
- G. Les différentes formes de molécules de CMH de classe II
  - a. Les superdimères ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>
  - b. Les structures relâchées ou "floppy"
  - c. Les formes solubles des molécules de CMH de classe II

### **IV. Les ligands des molécules du CMH de classe II**

p27

- A. Interaction des peptides antigéniques avec les molécules de CMH de classe II
  - a. Les poches d'ancrage
  - b. Influence du polymorphisme sur les interactions peptide/CMH de classe II
  - c. Structure conservée de la chaîne principale du peptide

- d. Rôle des molécules d'eau et ajustement du site de liaison à différents peptides
- e. Les peptides naturels présentés par les molécules de CMH de classe II
- f. Les motifs d'ancrage des molécules de classe II quantitatifs
- g. Hypothèse d'un site "accessoire/alternatif"
- B. Les autres ligands des molécules de classe II
  - a. Le récepteur des cellules T (TCR)
  - b. La molécule CD4
  - c. Les superantigènes
  - d. La molécule LAG-3 (Lymphocytes Activation Gene-3)

## V. La stabilité des molécules de classe II

- A. Mise en évidence de la stabilité élevée des complexes peptide/CMH de classe II
- B. Contribution du peptide à la stabilité des molécules de CMH de classe II
- C. Influence de la stabilité des molécules de classe II sur la réponse immune in vitro et in vivo
- D. L'acquisition de la stabilité : marqueur de maturation des molécules de CMH de classe II
- E. L'interaction peptide/CMH II : un processus de maturation de la stabilité en plusieurs étapes
  - a. Caractérisation d'un intermédiaire cinétique instable
  - b. Caractérisation d'une isoforme de molécule de classe II inactive
- F. Bases moléculaires impliquées dans la stabilité des molécules de CMH de classe II
  - a. Facteur intrinsèque à la molécule de CMH de classe II influençant la stabilité
  - b. Le peptide ligand induit la stabilité des molécules de CMH II

p42

## MATERIELS ET METHODES

### I. Techniques de biologie moléculaire

- A. Extraction des ARN messagers et rétro-transcription en ADN complémentaires
- B. Amplification des gènes d'intérêt par PCR.
- C. Clonage des fragments de PCR en vecteur pCR II
- D. Séquençage et authentification des gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules HLA-DR.
- E. Transformation bactérienne
- F. Amplification et purification des plasmides.
- G. Extraction des fragments d'ADN codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules de CMH de classe II contenus dans le plasmide pCRII.
- H. Ligation des fragments codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dans le vecteur pVL1393

### II. Système d'expression baculovirus/cellules d'insectes.

- A. Description générale du système d'expression
- B. Cellules d'insectes
- C. Recombinaison homologue avec le baculovirus

p53

p58

- D. Amplification du virus et clonage.
- E. Titration virale par la technique de dilution "point-limite".
- F. Conditions d'expression des molécules de CMH de classe II
- G. Culture des cellules d'insectes en bioréacteur

### **III. Purification des molécules de CMH de classe II**

p66

- A. Purification d'anticorps sur colonne de protéine A-sépharose
- B. Préparation des colonnes d'immunoaffinité pour la purification des molécules HLA-DR.
  - 1. Couplage des anticorps sur billes de sépharose-protéine A.
  - 2. Préparation des colonnes non spécifiques
- C. Purification des molécules de CMH de classe II solubles.
  - 1. A partir du surnageant de culture
  - 2. A partir des lysats cellulaires

### **IV. Techniques générales de biochimie, de chimie et de spectroscopie**

p70

- A. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.
- B. Dosage protéique
- C. Mesure des paramètres de liaison de peptides sur les molécules de CMH de classe II
  - 1. Mesure de l'affinité de peptides de synthèse pour les molécules de CMH de classe II (IC50)
  - 2. Mesure de la thermostabilité des complexes
  - 3. Mesure de la demi-vie des complexes stables
- D. Synthèse peptidique
  - 1. Principe général
  - 2. Purification et contrôles

### **V. Composition des tampons**

p79

### **Annexes techniques**

Annexe n°1 : *Construction des baculovirus recombinants pour les molécules HLA-DR solubles*

p77

Annexe n°2 : *Optimisation des conditions d'expression des molécules de CMH HLA-DR en cellules d'insectes : Adaptation des cellules BTI-TN5B1-4 (High Five) pour la culture en bioreacteur*

p83

## **RESULTATS**

### **I. Analyse des peptides naturels s'associant aux molécules de CMH de classe II HLA-DR3**

p89

### **II. Comparaison de la thermostabilité de complexes solubles peptide/HLA-DR1**

p101

**III. Existence de multiples conformations de molécules de CMH de classe II induites par les peptides ligands** p119

**Résultats complémentaires : influence des extrémités N et C terminales de peptides sur la stabilité et la conformation de la molécule HLA-DR1** p136

**IV. Analyse en dichroïsme circulaire de l'interaction peptide/HLA-DR1** p145

**Conclusion générale** p157

**Bibliographie**

# **I. Les peptides de synthèse pour une approche pharmacologique de la vaccination**

Actuellement, les vaccins utilisés pour la prophylaxie de maladies infectieuses sont les héritiers directs de techniques anciennes basées sur l'utilisation de l'agent pathogène, ou de ses sous-produits. Utilisé en l'an mille en Asie, le procédé dit de variolisation, dangereux voire mortel, consistait à inoculer des pustules de personnes atteintes de formes bénignes de variole pour induire la résistance à la maladie. Mais, c'est en 1798 que Jenner introduisit la vaccination par le virus de la vaccine (maladie des bovins bénigne pour l'homme) comme moyen de protection contre la variole. Louis Pasteur définit, quant à lui, les conditions de vaccination par l'utilisation de germes atténués, notamment pour lutter contre la rage et le choléra aviaire. En 1938, Goebel réussit à protéger des animaux contre une infection bactérienne par injection d'extraits bactériens, et ouvrit ainsi la voie vers de nouveaux vaccins ne nécessitant plus la présence de l'agent pathogène complet.

Les vaccins utilisés actuellement sont de plusieurs types :

- Les vaccins à base d'organismes entiers vivants atténués, inactivés ou tués (vaccins contre la rougeole, la rubéole, la tuberculose, la coqueluche, la grippe, le choléra);
- Les vaccins à base de dérivés de micro-organismes comme les toxines bactériennes inactivées (vaccin antitétanique) ou des protéines de micro-organismes produites par génie génétique (vaccin contre l'hépatite B), ou encore de polysides couplés à une protéine porteuse (vaccin contre la typhoïde).

## *A. Une approche pharmacologique de la vaccination*

Ces méthodes de vaccination dites "traditionnelles" ont fait leurs preuves mais s'avèrent non applicables ou inefficaces dans le cas d'un certain nombre de pathogènes à mécanismes d'infection complexes, comme le virus de l'immunodéficience humaine ou comme certains parasites protozoaires. Sans que les raisons de ces échecs aient réellement pu être expliquées, ils ont permis toutefois d'imposer une réflexion de fond sur une orientation nouvelle à apporter à la vaccination. L'émergence des connaissances sur les mécanismes moléculaires de l'immunité a ouvert la voie de l'immunopharmacologie, permettant d'envisager une approche plus "rationnelle" de la vaccination.

## *B. Concept de vaccination par des peptides de synthèse*

### *a. Les peptides, supports de l'immunité spécifique T et B*

Bien que les antigènes soient souvent des protéines, les récepteurs spécifiques du système immunitaire, récepteurs B et T, ne reconnaissent qu'une petite partie de l'antigène. Les récepteurs B reconnaissent directement l'antigène sous sa forme native via des épitopes linéaires ou conformationnels. Les récepteurs T reconnaissent, quant à eux, un peptide, issu de la protéolyse de l'antigène, en association avec une molécule présentatrice du CMH. Ces étapes de la reconnaissance de fragments antigéniques constituent l'événement clé dans l'induction d'une immunité spécifique. De nombreuses études ont montré que les épitopes T et B peuvent être mimés par des peptides de synthèse. Longtemps utilisés comme des outils d'investigation de la réponse immunitaire, les peptides sont actuellement considérés comme des immunogènes pouvant être utilisés dans des approches vaccinales.

### *b. Intérêts et limites des peptides en vaccination*

La vaccination via l'utilisation de peptides de synthèse est attrayante à plusieurs titres. Les peptides sont, dans la plupart des cas, faciles à synthétiser et peuvent être produits à une échelle industrielle. Ils offrent l'avantage d'être facilement purifiables et caractérisables par les moyens performants de chimie analytique (RP-HPLC, spectrométrie de masse), ce qui en fait des outils pharmacologiques assimilables, en terme de conception, à des médicaments. De plus, comparativement aux vaccins basés sur l'utilisation des agents pathogènes eux-mêmes ou de leurs sous-produits, les peptides sont d'une totale innocuité.

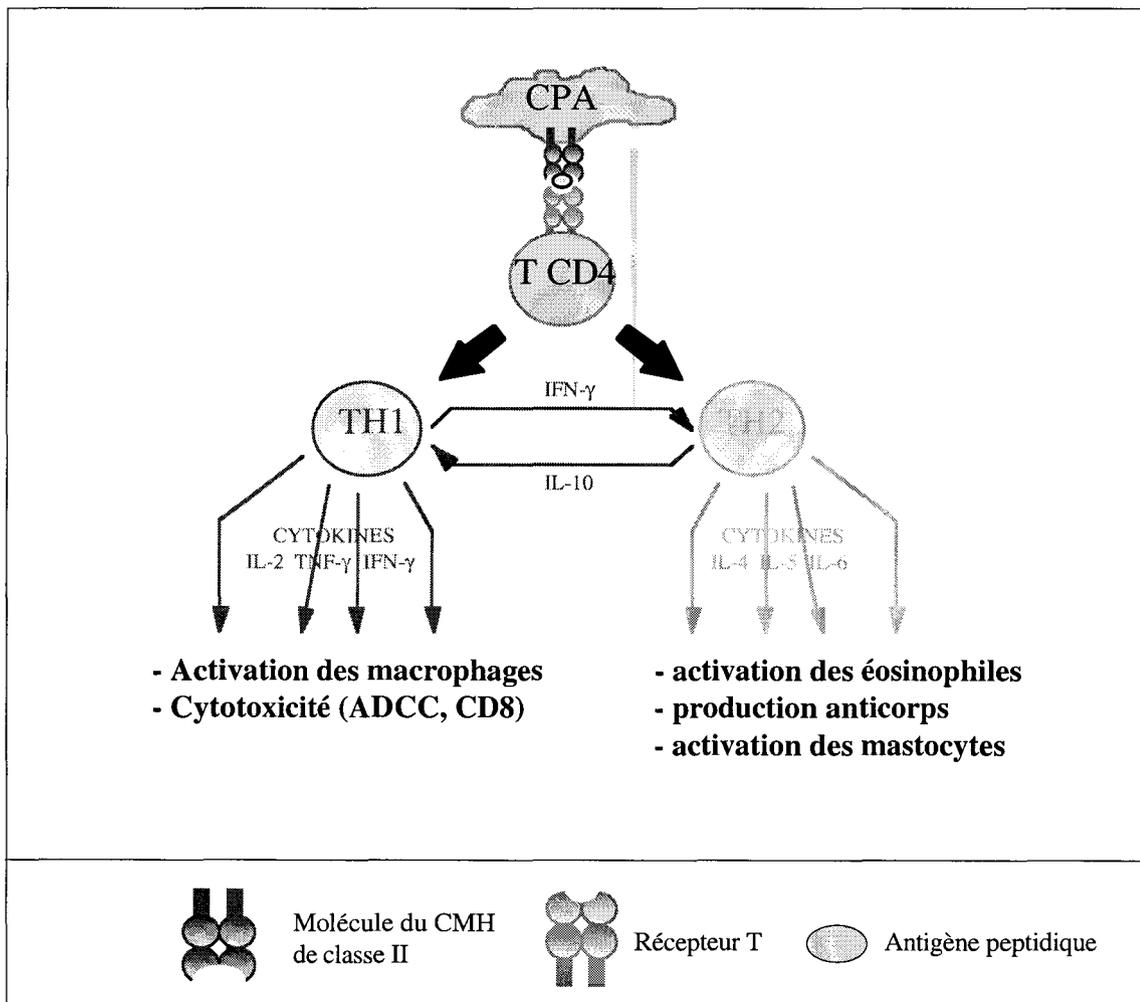
Toutefois, ces épitopes synthétiques s'avèrent, dans la majorité des études effectuées chez l'animal, peu immunogènes lorsqu'ils sont administrés sous une forme simple. Leur demi-vie est courte *in vivo*, mais les possibilités de formulation offertes par la chimie des peptides (synthèse en rétro-inverso, multimérisation des séquences, utilisation d'acides aminés modifiés etc...) permettent actuellement de limiter le processus protéolytique. De plus, de nombreuses études concernant la formulation des peptides injectables (couplage à des acides gras, des protéines porteuses, des vecteurs permettant une rétention prolongée du peptide), les voies d'administration *in vivo* ainsi que l'utilisation combinée de molécules immunostimulatrices (cytokines) permettent d'améliorer l'immunogénicité des peptides.

### *C. L'activité CD4 "helper" : un prérequis à l'induction d'une réponse immunitaire par des peptides*

Stratégiquement, la vaccination peptidique nécessite la caractérisation des séquences peptidiques cibles des mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire protectrice. Toutefois, les déterminants T CD8 ou B ne sont pas intrinsèquement capables de déclencher une réponse immunitaire efficace. En effet, l'initiation de la réponse et le contrôle des mécanismes effecteurs, à médiation cellulaire ou humorale, sont sous le contrôle de lymphocytes CD4.

Les lymphocytes T CD4 ou "helper" jouent un rôle central dans l'induction et l'organisation de la réponse immunitaire. Ils sont capables de reconnaître de manière spécifique

les cellules présentatrices d'antigènes présentant les peptides antigéniques associés aux molécules de CMH de classe II. Cette étape initiale permet d'activer la cellule T CD4 et d'induire un mécanisme de différenciation selon deux voies distinctes majeures (Fig.1). Les sous-classes de cellules T "helper" se caractérisent essentiellement par le panel de cytokines qu'elles produisent : Interleukine (IL)-2 et Interféron (IFN)- $\gamma$  pour les Th1, tandis que les cellules Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-6, et de IL-10. Ces deux voies permettent d'induire des mécanismes effecteurs différents en fonction du pathogène. Ainsi, l'activation des macrophages ou l'induction des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendent essentiellement d'une modulation de la réponse vers la voie de type Th1, tandis que l'activation des cellules B pour la production d'anticorps nécessite l'orientation vers la voie Th2 (Fig. 1) .



**Figure 1 :** Les cellules CD4 auxiliaires contrôlent les mécanismes effecteurs spécifiques de la réponse immunitaire.

Ainsi, dans l'optique d'une stratégie vaccinale, les préparations doivent contenir une source d'épitopes CD4, inducteurs d'une activité spécifique "helper" ou auxiliaire. Si ce n'est pas le cas, la réponse immunitaire engendrée sera de faible amplitude voire inexistante. Différentes stratégies ont été développées en tenant compte de ce paramètre. Notamment, Mitchison en 1971 a démontré que l'induction d'une réponse humorale contre un épitope B nécessite la présence simultanée d'une source d'épitopes T (CD4). Il mit ainsi en évidence que les épitopes B peptidiques, couplés à une protéine porteuse, source des épitopes T (CD4), permettaient d'induire une production importante d'anticorps spécifiques. Afin d'éviter les inconvénients majeurs liés à l'utilisation de protéines porteuses, cibles majoritaires de la réponse immunitaire et pouvant induire des phénomènes d'hyper-réactivité ou de suppression immunologique, cette source d'épitopes CD4 a été remplacée par des peptides synthétiques. Les formulations résultant de la combinaison d'un peptide CD4 "helper" avec un épitope peptidique B ou CD8, sous forme libre ou couplés chimiquement l'un à l'autre, permettent d'induire de manière efficace la réponse effectrice cytotoxique ou humorale souhaitée.

## II. Présentation du sujet

### A. Notre stratégie de caractérisation des épitopes T CD4 peptidiques

Notre objectif est de caractériser des épitopes T CD4 peptidiques pour le développement de vaccins pour l'homme. La stratégie que nous développons s'articule autour de trois axes (Fig.2) :

- (1) Dans un premier temps, une étude moléculaire de l'interaction de peptides de synthèse issus de séquences d'antigènes avec des molécules de CMH de classe II humaines purifiées permet de définir des épitopes potentiels.

La recherche de peptides capables d'être présentés par les molécules de CMH de classe II au sein d'une population ne représente qu'une étape préalable dans l'élaboration d'un vaccin peptidique. En effet, le développement d'une immunité protectrice induite par vaccination doit reposer sur des mécanismes effecteurs efficaces, tout en évitant un éventuel effet exacerbateur de la réponse immunitaire sur la pathologie. Une évaluation fonctionnelle de la réponse induite par immunisation avec ces peptides est donc essentielle. L'étude fonctionnelle est réalisée dans deux systèmes différents :

- (2) Immunisation *in vitro* de cellules de donneurs HLA typés ;
- (3) Immunisation *in vivo* dans les modèles de souris transgéniques pour les molécules de CMH de classe II humaines.

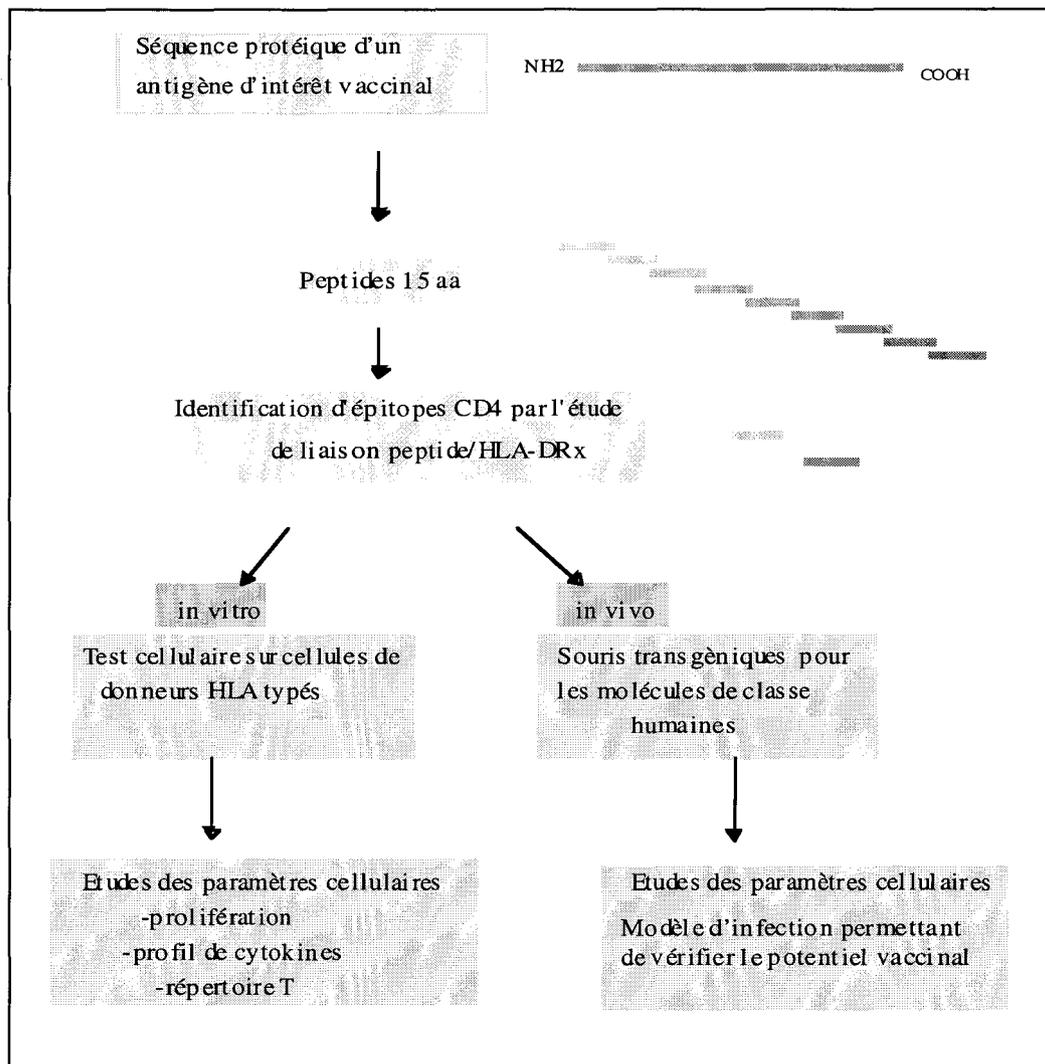


Figure 2 : Stratégie de caractérisation d'épitopes CD4 d'intérêt vaccinal

### *B. Recherche d'épitopes T potentiels par test de liaison sur les molécules de CMH de classe II : problématique de notre étude*

Dans une approche préliminaire, la caractérisation d'épitopes T potentiels peut être réalisée par l'étude de leur capacité à interagir avec les molécules de CMH de classe II (Buss et al, 87 ; Rothbard et al, 91 ; Sette et al, 87). L'obtention des molécules de CMH de classe II purifiées a permis de réaliser des tests de liaison pour la caractérisation de peptides ligands (Buss et al, 86).

Toutefois, même s'il existe une corrélation entre la capacité d'interaction d'un peptide avec une molécule de CMH de classe II et son immunogénicité, celle-ci n'est pas toujours évidente et ce pour plusieurs raisons. En effet, les paramètres fondamentaux régissant la formation d'un complexe peptide/CMH de classe II ne sont pas clairement définis.

- La liaison du peptide sur les molécules de CMH de classe II induit une augmentation de la stabilité du complexe. L'acquisition de ce phénotype est observé au cours du mécanisme de présentation des antigènes (Germain et al, 92 ; Neffjes et al, 92 ; Théry et al, 98) et corrèle avec la capacité d'induire une réponse immunitaire (Fairchild et al, 93 ; Rabonowitz et al, 97 ; Nelson et al, 94). L'induction de cette stabilité ne semble pas en relation avec l'affinité de la liaison peptide/CMH II, paramètre quantitatif utilisé actuellement pour la caractérisation des ligands. Ainsi, le développement d'une approche technique permettant d'accéder directement aux facteurs régissant l'induction de la stabilité, ainsi que la mise en évidence des bases moléculaires impliqués dans le processus de stabilisation, sont des éléments importants pour la caractérisation d'épitopes CD4 potentiels.

- La liaison d'un peptide sur une molécule de CMH de classe II semble avoir une influence sur la structure même de ces dernières (Chervonsky et al, 98 ; Srinivasan et al, 91 ; Denzin et al, 94 ; Rath et al, 92 ; Fling et al, 94 ; Thibodeau et al, 94 ; Lavoie et al, 97 ; Albert et al, 98 ; Woodland et al, 97). La description des modifications structurales a été réalisée de manière indirecte (par utilisation de superantigènes ou d'anticorps) sans que les bases moléculaires du mécanisme ne soient pour l'instant définis. Ce paramètre devrait avoir des conséquences fonctionnelles importantes sur l'induction de la réponse T.

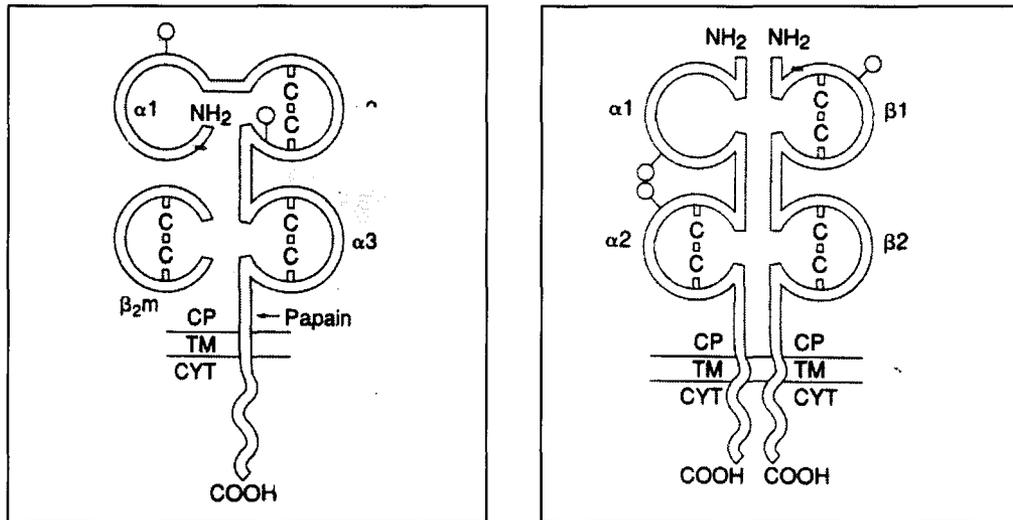
C'est dans le but d'éclaircir ces différents points que nous avons mené une étude moléculaire afin d'évaluer les différents niveaux d'influence de l'interaction des peptides sur les molécules de CMH de classe II.



### **III. Les molécules présentatrices d'antigènes du CMH de classe II**

Il y a 26 ans, le phénomène de restriction par les complexes majeurs d'histocompatibilité fut découvert par Shevach et Rosenthal (Rosenthal et Shevach, 73 ; Shevach et Rosenthal, 73). Un an plus tard, Zinkernagel et Doherty firent l'observation fondamentale que la reconnaissance des antigènes par les cellules T est dépendante de l'expression d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité. Ce n'est qu'en 1985 que Babbitt (Babbitt et al., 85 ; 86 ) puis Buus et al, 86 et Guillet et al, 86 démontrèrent que les molécules de CMH de classe II présentent des peptides de manière spécifique. Buus mit formellement en évidence que le complexe formé par le peptide antigénique et la molécule de CMH de classe II était reconnu directement par les cellules T en utilisant des complexes peptides/CMH de classe II préformés (Buus et al., 86 ; Buus et al., 87)).

Les molécules de CMH de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires de 55 à 60 kD composées de deux chaînes associées de façon non-covalente : une chaîne  $\alpha$  de 31-34 kD et une chaîne  $\beta$  de 26-29 kD. La structure secondaire est présentée figure 3. Chaque chaîne est composée de 2 domaines extracellulaires N-terminaux, un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine C-terminal intra-cytoplasmique. Les deux domaines extracellulaires de la chaîne  $\alpha$  ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) et de la chaîne  $\beta$  ( $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) comportent chacun environ 90 acides aminés. La molécule présente une symétrie des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  d'une part, et  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  d'autre part. Les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  se trouvent sous la forme d'une structure immunoglobulinique comparable à celle des domaines  $\alpha 3$  et  $\beta 2m$  de la molécule de classe I.



Molécule de CMH de classe I

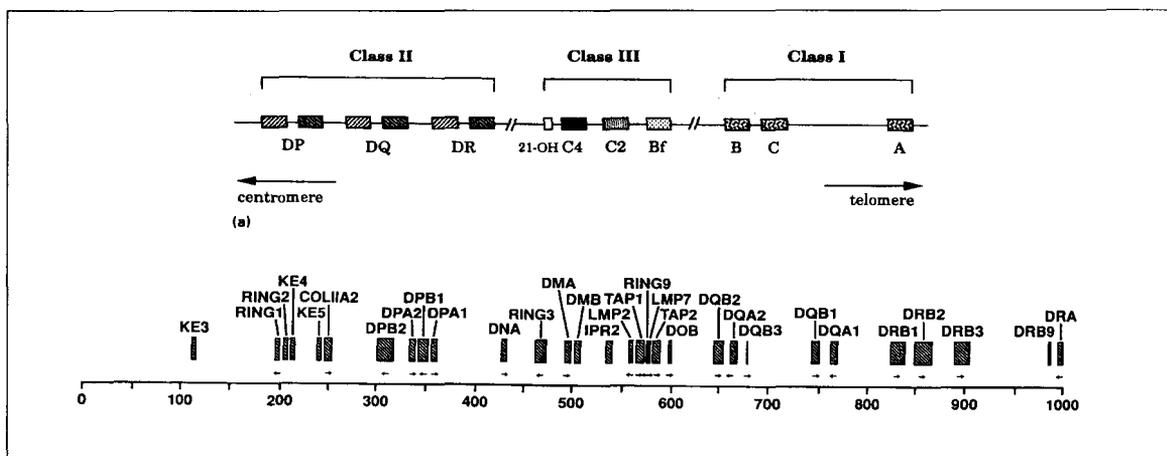
Molécule de CMH de classe II

**Figure 3 :** Représentation schématique des molécules de CMH de classe I et de classe II

### A. Le complexe génique HLA de classe II

La région HLA contient les gènes codant pour les molécules présentatrices du complexe majeur d'histocompatibilité humain (Fig.4). Elle est située sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3) et occupe un segment de 3500 à 4000 kb. Elle est subdivisée en trois parties (Colombani, 93). C'est dans la région HLA-D de classe II que l'on trouve les gènes codant pour les molécules de CMH de classe II : les régions DR, DQ, DP. Chacune des régions contient les gènes A et B codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules correspondantes. Les gènes A et DQB1 comportent 5 exons, les gènes DRB1 et DPB1 6 exons ; les exons 2 et 3 correspondent aux deux domaines  $\alpha$  des chaînes polypeptidiques. La taille des gènes varie de 7 (DQB1) à 18kb (DRB1). La région de classe II contient 23 à 25 gènes ou pseudogènes.

Seul les gènes DRA, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 sont fonctionnels. Les autres gènes de classe II sont soit des pseudogènes (DRB2, DPA2, DPB2, DQB3), soit des gènes sans défaut structurel apparent mais non transcrits (DQA2, DQB2).



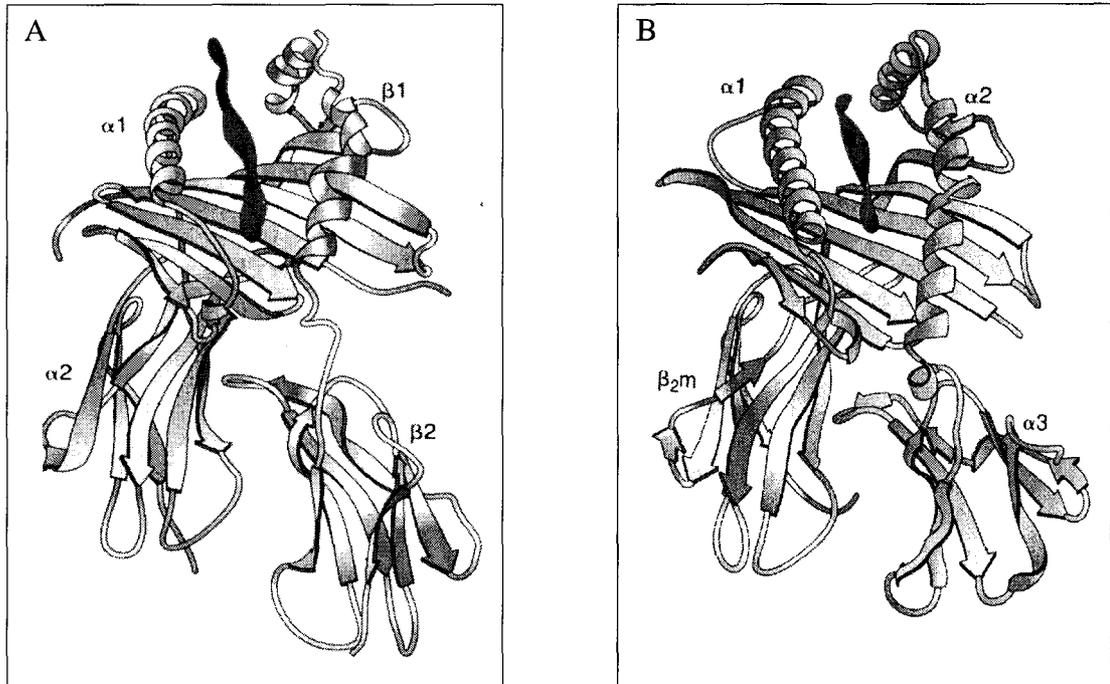
**Figure 4 :** Complexe génique HLA (Human Leucocyte Antigen) (extrait de "Fundamental immunology" Paul. W. 3<sup>ème</sup> édition)

D'autres gènes sont également exprimés dans la région de classe II notamment, les gènes DM, DO, RING, TAP, ou LMP, impliqués dans des mécanismes de présentation des antigènes de classe II mais aussi de classe I.

## B. Structure des molécules de CMH de classe II

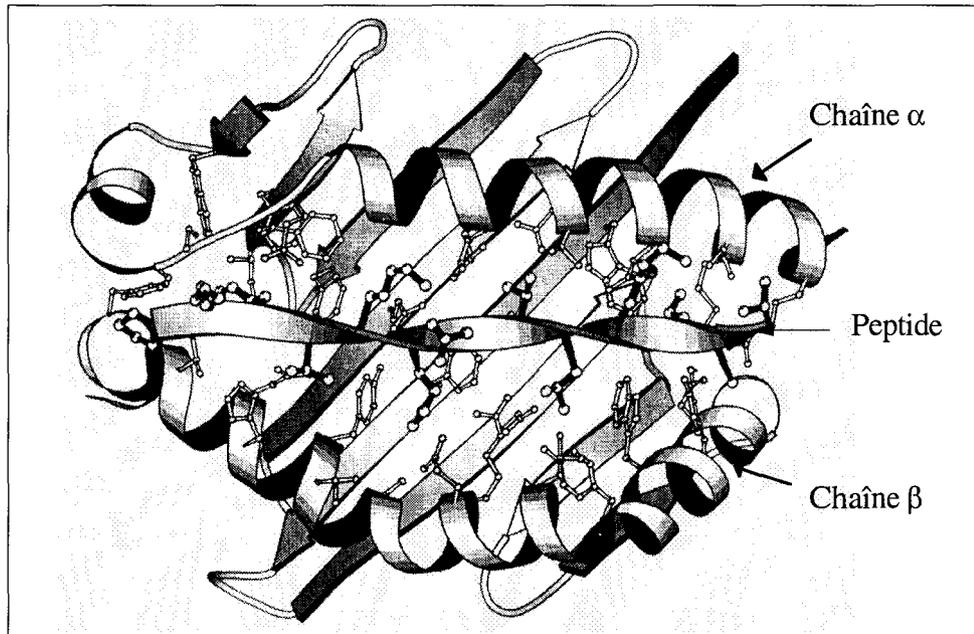
En 1987, Bjorkman, P.J. et al. publiaient la première structure cristallographique d'une molécule de CMH de classe I. Six ans plus tard, la première résolution structurale d'un cristal de la molécule HLA-DR1 a pu être réalisée, mettant en évidence une structuration très proche des molécules de CMH de classe I. Depuis, neuf structures ont été résolues.

Allèle	ligand	référence
IA-d	OVA(323-339) et HA(126-138)	Scott et al, 98
IA-k	HEL(50-62)	Fremont et al. , 98
HLA-DR4(b1*0401)	Coll II (361-273)	Dessen et al, 97
HLA-DR1(b1*0101)	A2(107-119)	Murthy et al, 97
HLA-DR3(b1*0301)	CLIP	Ghosh et al, 95
HLA-DR1(b1*0101)	SEB	Jardetzky et al, 94
HLA-DR1(b1*0101)	HA(307-319)	Stern et al, 94
HLA-DR1(b1*0101)	mixture	Brown et al, 93



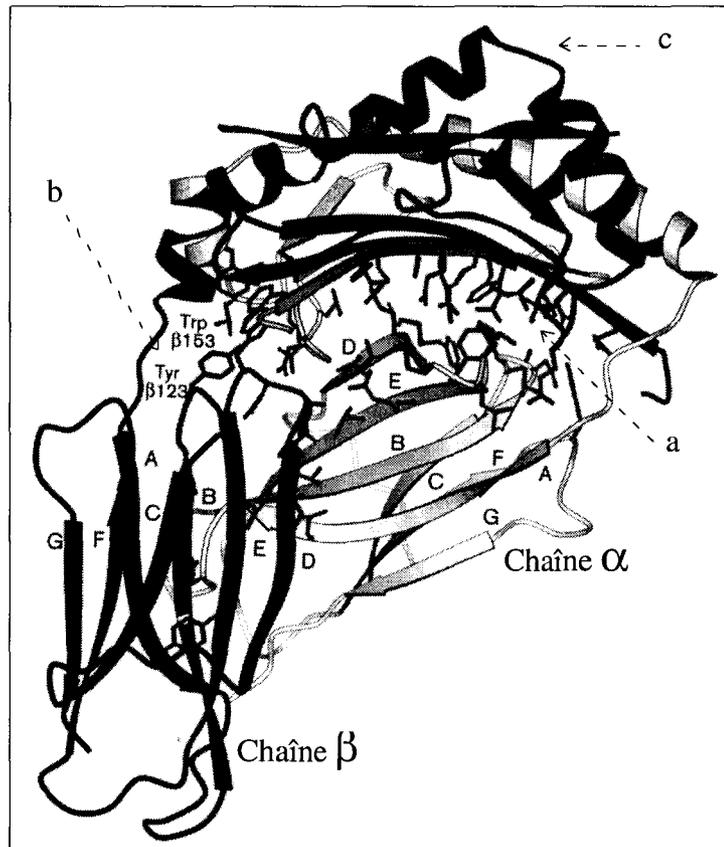
**Figure 5** : Structure tridimensionnelle des molécules de CMH de classe II HLA-DR1( $\beta 1^*0101$ ) d'après Brown et al, 93 et (A) de classe I HLA-A2\*0201(B) d'après Bjorkman et al, 87

Contrairement aux molécules de CMH de classe I, les domaines en hélices aux deux extrémités du site de liaison sont positionnés de manière à laisser émerger les extrémités N- et C-terminales des ligands peptidiques de part et d'autre du sillon. Deux tours d'hélice, proches de la partie N terminale du domaine  $\alpha 1$  des molécules de classe I, sont remplacés par une portion de chaîne étirée sur les molécules de classe II. L'extrémité opposée de l'hélice  $\alpha 1$  des molécules de classe II est inclinée vers le plancher au regard du résidu Arg  $\alpha 76$  situé  $2\text{\AA}$  plus bas que la Tyr 84 homologue sur les molécules de classe I. Ces différences aux deux extrémités du site de liaison permettent d'expliquer la présence de peptides ligands plus longs sur les molécules de classe II que sur celles de classe I. Ces altérations en effet permettent "d'ouvrir" la cavité autorisant les extrémités N et C terminales des peptides à émerger de part et d'autre du site de liaison. De plus, un résidu Trp 167 et un pont salin fermant le sillon ne sont pas présents au niveau des molécules de classe II.



**Figure 6 :** *Vue de dessus du site de liaison des molécules de CMH de classe II pour les peptides . (Extrait de Brown et al, 93).*

La structure quaternaire des molécules de classe II est maintenue par un réseau de liaisons non covalentes, bien caractérisé pour la molécule HLA-DR1 (Murthy et al, 97). Le domaine d'interaction avec les peptides est en contact avec les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  sous-jassant au niveau de deux poches. Le plus large est formée par la partie inférieure du feuillet  $\beta$ , appuyant sur le sommet d'une boucle du quatrième brin du domaine  $\alpha 2$  (fig 7. a). Cette interaction recouvre 1200 Å de surface moléculaire accessible au solvant sur les chaînes dissociées et réalisant un contact hydrophobe. Plusieurs résidus encadrant ce domaine réalisent des contacts hydrophobes réciproques chaînes latérales - chaînes principales. L'autre site correspond à un domaine de 750 Å hydrophobe, dominé par l'interaction du résidu Trp 153, émergeant du domaine  $\beta 2$ , avec  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ , à proximité de la poche P1 (Fig. 7 b). De plus, les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  interagissent directement sur une surface de 450 Å dominée par des contacts polaires.



**Figure 7** : Liaison intermoléculaire de la molécule de CMH de classe II HLA-DR1 ( $\beta 1^*0101$  ;  $\alpha 1^*0101$ ) (extrait de Dessen et al, 97)

### C. Polymorphisme HLA classe II

Au sein de l'espèce humaine, une grande variété d'allèles peut être exprimée au niveau de chaque locus. Cette variabilité allélique est appelée polymorphisme. La répartition des allèles au sein d'une population est aléatoire et leurs fréquences géniques variables. Le nombre réel des allèles HLA de classe II est certainement supérieur au nombre reconnu dans la nomenclature. On décrit actuellement 69 allèles HLA-DR  $\beta$  et 2  $\alpha$ , 19  $\beta$  et 13  $\alpha$  pour la série HLA-DQ, 31  $\beta$  et 8  $\alpha$  pour la série HLA-DP.

Depuis, le 10<sup>ème</sup> *International Histocompatibility Workshops* en 1987, les spécificités HLA définies par les méthodes immunologiques (sérologique ou cellulaire) ont été mises en relation avec le génotype des allèles défini par séquençage. Par convention, dans la nomenclature

officielle actuelle, les allèles sont définis par leur spécificité sérotypique suivie du code génotypique, par exemple pour un allèle DR4 : HLA-DR4 (DR $\alpha$ \*0101 ; DR $\beta$ \*0401).

### D. Expression des molécules de CMH de classe II

L'hétérozygotie et la codominance font que chaque cellule présentatrice peut exprimer deux allèles par locus. De plus, concernant l'expression des gènes de la région DR, 2 chaînes  $\beta$  peuvent être en cis donnant lieu à la formation de deux molécules exprimées en trans. La chaîne  $\beta$  est codée par le gène DRB1 pour la 1ère molécule DR et par l'un des gènes DRB3, DRB4 ou DRB5 pour la 2ème molécule.

D'autre part, les associations intra-isotypiques peuvent former des hybrides en trans (Fig.8). Des cas d'association de chaînes DR $\alpha$  et DQ $\beta$  sont connus également et laissent envisager un nombre important de combinaisons inter-isotypiques (Fig.9). Par contre, certains allèles ne sont jamais rencontrés indiquant que toutes les combinaisons intra-spécifiques ne sont pas envisageables. Ainsi, les chaînes DQB1\*0201 et 0302 ne s'associent pas à la chaîne DQA1\*0101.

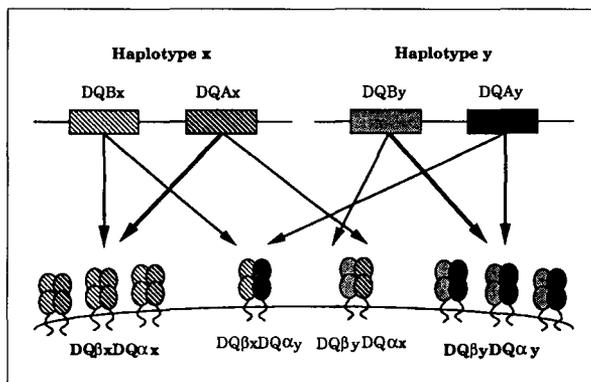


Figure 8 : association intra-spécifique

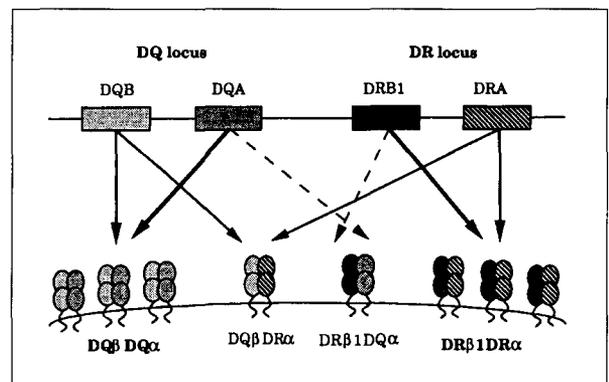


Figure 9 : association inter-spécifique

De plus, il existe un phénomène de déséquilibre de liaison qui affecte de manière importante la distribution des allèles au sein de la population. En effet, concernant par exemple les gènes DRB et DQB, leur présence au sein du génome est plus fréquente que ne laisse supposer la distance séparant les deux gènes.

## *E. Distribution de l'expression des molécules de CMH de classe II*

Les produits de classe II sont exprimés constitutivement sur les lymphocytes B, les macrophages-monocytes, les cellules épithéliales thymiques, les endothéliums des vaisseaux capillaires et certains épithéliums. L'expression de ces molécules est également inductible sur de nombreuses cellules, en particulier sur les lymphocytes T activés.

## *F. Bases cellulaires de la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II*

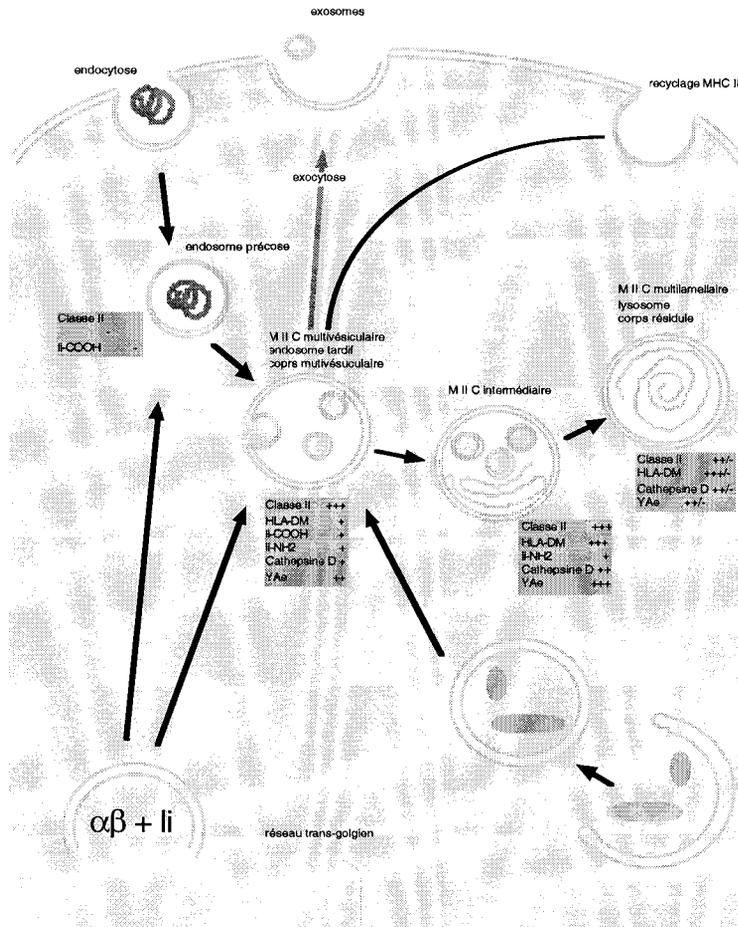
### *a. Synthèse*

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , après leur synthèse au niveau du réticulum endoplasmique, s'associent entre elles et forment transitoirement des complexes de très haut poids moléculaire associés à la protéine BiP. Puis, la chaîne li s'associe avec les hétérodimères ( $\alpha\beta$ ), ainsi qu'à la calnexine (Anderson et al, 94). Le relargage de la calnexine coïncide avec la formation d'un trimère de 270 kD dont l'unité de base est ( $\alpha\beta$ )li (Cresswell,94 ; Anderson et al, 94). La chaîne li existe sous deux formes lip33, lip31 selon le site d'initiation de la transcription utilisé. Sa fonction est d'une part, d'empêcher la fixation de peptides endogènes aux molécules de CMH de classe II au niveau du réticulum endoplasmique et du Golgi par obstruction du site de liaison des peptides, et d'autre part, d'adresser le complexe dans un compartiment spécialisé du réseau trans-golgien (Roche et al, 93 ; Peters et al, 91 ; Adorizzi et al, 94 ; Romagnoli et al, 93). La glycosylation des molécules de classe II a lieu au niveau du réticulum endoplasmique et se poursuit dans le Golgi. Les sites de glycosylation ont été identifiés (lié à l'asparagine N-glycosylation) et on trouve deux types d'oligosaccharides, une forme riche en mannose et une forme complexe.

### *b. Le chargement des peptides antigéniques*

Les complexes nonamériques accèdent ensuite à la voie d'endocytose, principalement dans les structures appelées endosomes tardifs (Fig.10). Ces structures désignées collectivement sous

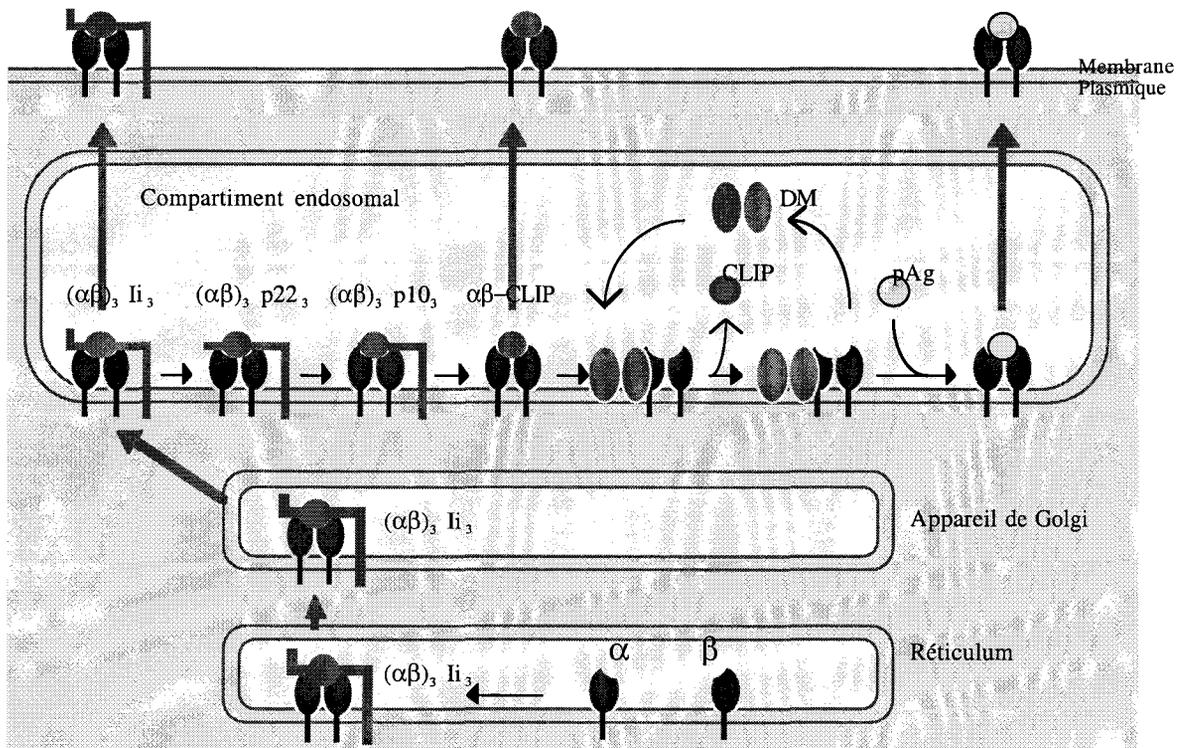
l'appellation MIICs (MHC class II compartments) contiennent des taux importants de molécules de classe II mais également des marqueurs membranaires des lysosomes, des protéases et peu de transferrines (revue : Geuze, 98). L'ensemble apparaît évoluer d'un stade multivésiculaire à un stade multilaminaire. Les MIIC ont été identifiés dans les cellules B, les lignées B, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, les monocytes et les macrophages.



**Figure 10** : Schéma général du trafic intracellulaire des molécules de CMH de classe II (d'après Geuze,98)

Dès son arrivée dans le compartiment d'endocytose précoce, la chaîne li est dégradée par étapes séquentielles en P22 puis P10 (Amigorena et al, 95, Cresswell et al, 94), en aboutissant finalement au stade où un fragment peptidique de li appelé CLIP (class II MHC associated li derived peptide) reste associé au site de liaison des molécules de CMH de classe II de manière identique à un peptide antigénique (Fig.11). Cette association est toutefois transitoire puisque ce

complexe  $(\alpha\beta)/CLIP$  devient le substrat d'une molécule HLA-DM (Denzin et al, 95 ; Morris et al, 95 ; Denzin et al, 94). Ce complexe dimérique s'associe aux molécules de classe II-CLIP, libère le peptide CLIP, et stabilise un état conformationnel avec un site de liaison libre permettant l'association de peptides antigéniques (Fig.11).



**Figure 11** : Schéma du processus de chargement des peptides au niveau du compartiment endosomal

### c. Recyclage des molécules de CMH de classe II

Les molécules de CMH de classe II au niveau de la membrane cellulaire sont mobiles et peuvent être endocytées et recyclées. Ce recyclage est rapide de sorte que le flux de molécules recyclées est d'environ 60 fois celui des molécules néosynthétisées arrivant à la surface. Le temps d'internalisation et réexpression a été estimé entre 3 et 45 minutes. Le rapport des molécules internalisées contre celles exposées à la surface est de 7%. Le temps nécessaire pour renouveler la moitié des molécules de CMH de classe II est de 33 min en

surface et de 36 heures à la membrane. Le compartiment cellulaire où s'effectue le chargement des peptides sur les molécules de CMH recyclées est distinct de celui concernant les molécules de CMH néosynthétisées. La particularité de ce processus est qu'il est indépendant de la présence de la chaîne li et de HLA-DM (Pinet et al, 97). Ce compartiment où s'effectue le recyclage, présente les caractéristiques des endosomes précoces. Ainsi, le temps de présentation d'un antigène par cette voie alternative permet un déclenchement rapide de la réponse immunitaire.

#### *d. Rôle de la protéine HLA-DM*

La molécule HLA-DM (H2-M chez la souris) est un hétérodimère homologue aux molécules de CMH de classe II (Kelly et al, 91). Cette molécule est très faiblement polymorphe et n'est pas capable d'interagir avec un peptide ligand. La première mise en évidence du rôle d'HLA-DM a été réalisée sur des cellules déficientes pour les deux gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces cellules (cellules T2) présentent un pourcentage important de peptides CLIP associés aux molécules de classe II, phénotype perdu après transfection des gènes codant pour HLA-DM (Fling et al, 94 ; Ava et al, 94 ; Riderberg et al, 92 ; Sette et al, 92 ; Denzin et al, 94 ; Monji et al, 94). Cette expérience mettait en évidence le rôle de HLA-DM dans le relargage du peptide CLIP avec les peptides antigéniques.

Des expériences *in vitro* ont pu mettre en évidence que HLA-DM favorise la dissociation du peptide CLIP (mais également d'autres peptides) des molécules HLA-DR, à des pH proches des conditions endosomales (pH 4,5-5) (Kropshofer et al, 97; Sloan et al, 95; Van Hham et al, 96; Werber et al, 96). La cinétique d'échange du peptide CLIP pour différents peptides apparaît suivre la cinétique de Michaelis-Menten avec un taux de conversion de 3 à 12 complexes par minute par molécule DM (Vogt et al, 96). Vogt a notamment mis en évidence que la présence d'HLA-DM permettait d'augmenter la vitesse d'interaction des peptides antigéniques d'un facteur 10 *in vitro*. Des expériences de co-immunoprécipitations ont montré que HLA-DM interagissait préférentiellement avec le complexe DR-CLIP comparativement aux complexes formés par des peptides antigéniques (Sanderson et al, 96; Kropshofer et al, 96, 97). HLA-DM aurait également pour effet de stabiliser la molécule de CMH vide, la maintenant dans un état capable d'interagir

avec un peptide antigénique (Kropshofer et al, 97; Denzin et al, 96). Ce phénomène permettrait ainsi de maintenir le complexe vide dans une conformation intermédiaire favorisant le chargement de peptides antigéniques.

HLA-DM joue un rôle important dans la sélection des peptides présentés par les molécules de classe II (voir revue Kropshofer et al, 97). Ces critères sont en apparence indépendants de l'affinité du peptide, et plutôt en relation avec la stabilité du complexe peptide/CMH. De plus, HLA-DM semble avoir un rôle dans le choix de la longueur des peptides induisant préférentiellement les complexes supérieurs à 11 résidus, ce qui pourrait ainsi expliquer la longueur classique des peptides naturellement présentés, variant de 12 à 25 résidus (Kropshofer et al, 96 ; Siklodi et al, 98).

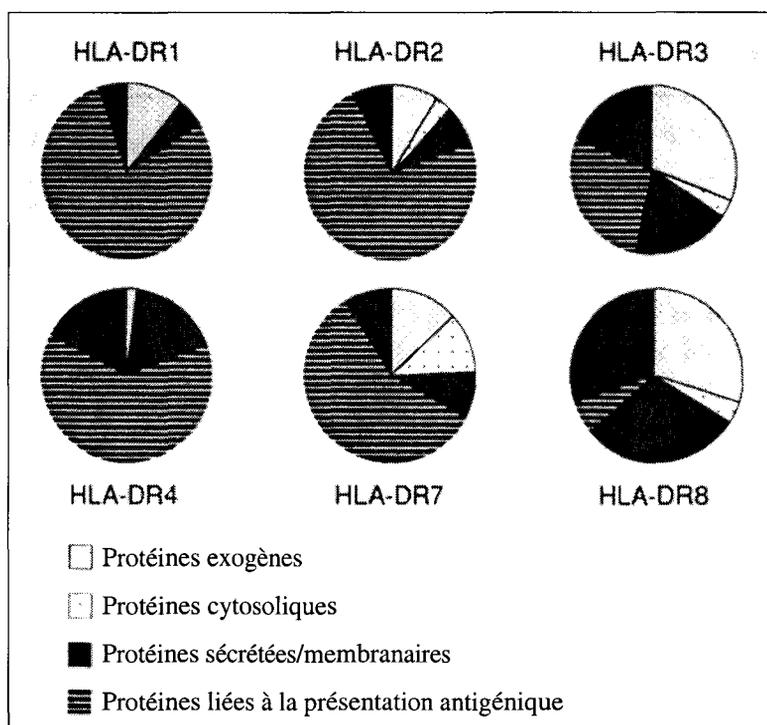
#### *e. Rôle de la protéine HLA-DO*

Deux gènes de classe II non classiques, HLA-DNA et HLA-DOB, ont été décrits. Les produits de ces gènes, DN $\alpha$  et DO $\beta$ , respectivement, ont été trouvés sous forme d'hétérodimères désignés HLA-DO (H2-0 chez la souris). Récemment, des études ont pu montrer que DO forme un complexe avec DM dans le réticulum endoplasmique pour être ensuite exporté vers les compartiments lysosomiaux. Des résultats très récents montrent que DO agit comme une co-chaperonne, assistant DM dans son rôle de stabilisation des molécules de classe II vides (Kropshofer et al, 98).

De plus, il apparaît que l'influence de DO permette d'accroître la stabilité des molécules de CMH de classe II. De manière contradictoire, DO serait également capable de faciliter le relargage de peptides sélectionnés par DM, voire de bloquer la fonction d'HLA-DM et d'altérer la présentation antigénique (Liljedahl et al, 98 ; Van Ham et al, 97 ; Denzin et al, 97). Ainsi, DO peut avoir un effet positif mais également négatif .

*f. Origines multiples des peptides présentés par les molécules de CMH de classe II*

Classiquement, la voie de présentation par les molécules de classe II est décrite pour la présentation de protéines exogènes préalablement dégradées après leur internalisation soit par endocytose, pinocytose ou phagocytose. L'analyse des peptides associés aux molécules de CMH de classe II indique que l'origine de ces peptides est plus diverse. En effet, la figure 12 présente une étude basée sur le séquençage des peptides associés à différents allèles de molécules de CMH de classe II. Les résultats indiquent que des protéines cytosoliques peuvent être présentées. Il n'existe donc pas vraiment d'exclusivité des voies de présentation par les molécules de CMH de classe I et de classe II. Différents mécanismes peuvent expliquer ce phénomène (Fig.12). D'une part, des portions de cytoplasme peuvent être englobées par autophagie et fusionner avec la voie de présentation classe II (Liou et al, 97). D'autre part, la translocation de protéines cytosoliques vers les compartiments MIIC peut également se produire (Cuervo et al, 96).



**Figure 12** : Origines des peptides naturellement présentés par différents allèles de molécules de CMH de classe II (extrait de Urban et al, 93)

## g. Taille des peptides naturels

Les peptides naturels associés avec les molécules de classe II ont une partie centrale qui interagit avec le site de liaison tandis que les extrémités N- et C- terminales émergent de part et d'autre du sillon. En moyenne, les études de séquençage des peptides en mélange nous indiquent que la longueur de la partie entre l'extrémité N terminale et la poche P1 est de 3+/-1 résidus (Röttschke et al, 94 ; Falk et al , 94 ; Malcherek et al, 93 ; Kropshofer et al, 93). On observe la présence d'une proline avec une fréquence élevée (Röttschke et al, 94 ; Falk et al , 94).

De plus, on peut observer des différences au niveau de la taille des extrémités pour un même peptide. Une étude réalisée par Urban et al, 93 met en évidence qu'un épitope T 52-61 de la protéine HEL existe sous de multiples formes dépendant de l'hétérogénéité des extrémités N- et C-terminales.

Ces extrémités sont générées lors du clivage protéolytique des antigènes peptidiques vraisemblablement après leur interaction avec la molécule de CMH de classe II (processus appelé "trimming") (Larsen et al, 96 ; Nelson et al, 97). De plus, les exopeptidases ont une activité résistante à la présence d'un motif XP- expliquant la raison de la fréquence élevée de ces résidus aux extrémités.

fraction	résidus sur HEL	séquence	Longueur
49/50	49-61	<u>G</u> STDY <u>GILQINSE</u>	13
49/50	48-61	D <u>G</u> STDY <u>GILQINSE</u>	14
50	52-66	<u>DYGILQINSE</u> FWWCND	15
50	49-64	G <u>STDYGILQINSE</u> FWC	16
52	40-67	TQATNRNTDG <u>STDYGILQINSE</u> FWWCNDG	28
57	43-62	TNRNTDG <u>STDYGILQINSE</u> W	20
57	45-68	RNTDG <u>STDYGILQINSE</u> FWWCNDGR	24
58	50-69	<u>STDYGILQINSE</u> FWWCNDGRT	20
61/62	49-62	G <u>STDYGILQINSE</u> W	14
61/62/63	48-62	D <u>G</u> STDY <u>GILQINSE</u> W	15
62	44-66	NRNTDG <u>STDYGILQINSE</u> FWWCND	23
63	44-62	NRNTDG <u>STDYGILQINSE</u> W	19
66	41-68	QATNRNTDG <u>STDYGILQINSE</u> FWWCNDGR	28
70	46-69	NTDG <u>STDYGILQINSE</u> FWWCNDGRT	24
71/72	43-65	TNRNTDG <u>STDYGILQINSE</u> FWWCN	23
72	48-69 and/ or 47-68	D <u>G</u> STDY <u>GILQINSE</u> FWWCNDGRT TD <u>G</u> STDY <u>GILQINSE</u> FWWCNDGR	22

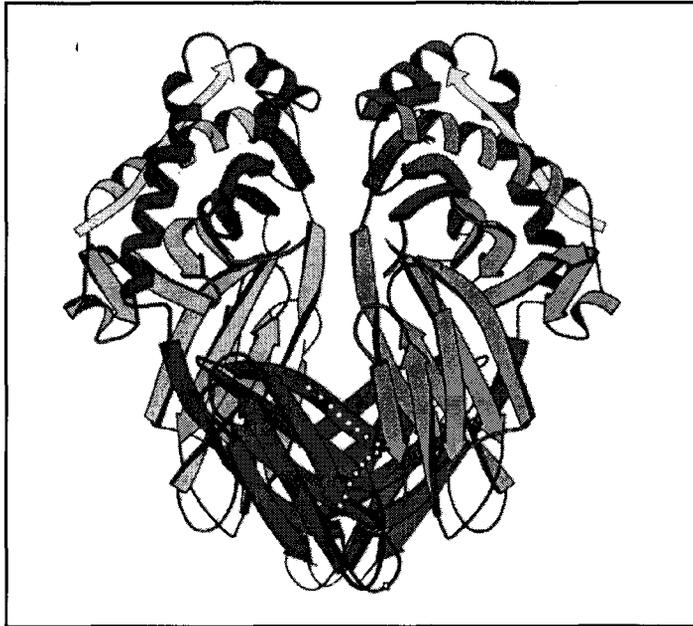
Peptides de la protéine HEL associés naturellement aux molécules de CMH de classe II IAk (d'après Urban et al, 93) Différentes fraction séparées par HPLC ont été analysées par séquençage.

## *G. Les différentes formes de molécules de CMH de classe II*

### *a. Les superdimères ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>*

Les différentes études cristallographiques menées sur les molécules de CMH de classe II humaine et murine ont souligné leur capacité lors de la cristallisation à se dimériser (Brown et al, 93). Toutefois, la mise en évidence directe de ces structures sous leur forme membranaire ou soluble s'avère plus délicate. De même, des expériences hydrodynamiques n'ont pas montré la présence de ces dimères bien que les CMH solubles aient une tendance à s'aggréger sous certaines conditions. Néanmoins, deux études biochimiques ont permis de caractériser ces superdimères par immunoprécipitation. Chez la souris d'abord, où une forme analysée en gel d'acrylamide apparaît à 120 kD se dissociant sous forme de chaîne  $\alpha$  et  $\beta$  après chauffage à 100°C (Schafer et al, 95 ; 98). Chez l'homme ensuite, où une immunoprécipitation sur cellules monocytaires et sur cellules B de sang périphérique avec l'anticorps monoclonal B1.12 permet d'isoler préférentiellement une structure proche de 120kD (Roucard et al, 96). Cette forme stable en SDS-PAGE se dénature partiellement après chauffage à 50°C formant un intermédiaire proche de 60 kD avant de se dissocier à 100°C en chaîne  $\alpha$  et  $\beta$ .

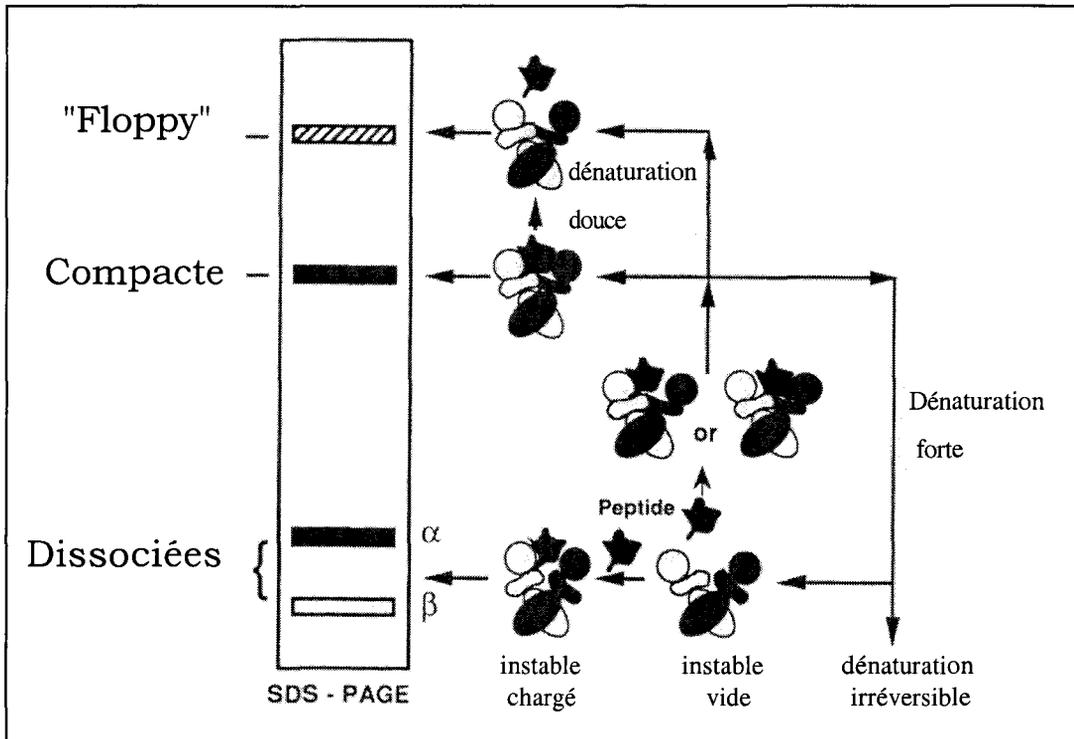
L'existence de ces superdimères pourrait avoir une importance au niveau de l'induction de la réponse T. En effet, cette structuration permettrait de "cross-linker" deux récepteurs T dont le rôle serait de potentialiser la réponse cellulaire T, mais à la condition que les deux épitopes peptidiques soient identiques ou agonistes. Ce type d'activation peut s'apparenter au mode d'activation via un anticorps monoclonal qui par divalence va regrouper les récepteurs T pour activer la cellule. De plus, l'intervention de la molécule CD4 sous sa forme tétramérique pourrait avoir tendance à former avec les dimères de CMH de classe II un réseau CD4-MHC visant à "cross-linker" les récepteurs T.



**Figure 13 :** *Structure de la molécule HLA-DR1 associée sous forme d'un superdimère (Extrait de Brown et al, 93)*

*b. Les structures relâchées ou "floppy"*

Les molécules de classe II sont capables d'adopter des structures alternatives assimilables à des structures de type "molten globule". Ainsi, les molécules de CMH de classe II purifiées et incubées brièvement à un pH acide de 4,5 (analogue à celui régnant dans les compartiments endolysosomiaux) ou à des températures proches de 55 °C peuvent adopter une structuration relâchée appelée "floppy". Cette structure, observable en gel SDS-PAGE, possède de manière caractéristique une mobilité réduite par rapport à la forme native plus compacte (Dornmair et al, 89 ; Sadegh-Nasseri et Germain, 91, 92). L'influence du pH acide sur la formation de cette structure a été interprétée comme un mécanisme analogue à celui réalisé dans les compartiments endolysosomiaux acides, lieu où s'effectue le chargement des peptides antigéniques. Ainsi, l'obtention d'une forme relâchée pourrait s'apparenter à la forme "réceptive" aux peptides. Toutefois, cette hypothèse n'a pu être vérifiée depuis.



**Figure 14 :** *Obtention et observation des formes "floppy" de molécules de CMH de classe II (Extrait de Sadegh-nasseri et Germain, 92)*

*c. Les formes solubles des molécules de CMH de classe II*

Les molécules de CMH de classe I et de classe II circulent dans les fluides corporels et en particulier dans les sérums sous forme soluble (Van Rood et al, 70, Charlton et al, 70, Mijewski et al, 70, Callahan et al, 76, Wilson et al, 79). L'existence de molécules de classe I solubles a été rapportée il y a 25 ans mais ce n'est que récemment qu'un rôle fonctionnel a pu leur être attribué, celui de bloquer les anticorps anti-classe I ainsi que l'activité cytotoxique lymphocytaire (CTL) (Puppo et al, 97). De plus, elles sont capables d'induire l'apoptose de CTL alloréactifs et de CD8 activés à la phytohemagglutinine (PHA) (revue dans Mc Donald et Adamashili, 98). Les mécanismes impliqués dans ce phénomène sont distincts : l'un s'expliquant par le signal délivré par l'interaction des s-HLA-I avec les récepteurs T, l'autre par le signal délivré par l'interaction avec les molécules CD8 des cellules T activées par la PHA. D'une manière générale, l'une des fonctions de l'augmentation du taux de CMH solubles serait de contrôler l'expansion cellulaire T. Cette

augmentation est observée lors des phénomènes de rejet d'organe transplanté et au cours d'une phase aiguë de rejet de greffe (GVHD) après transplantation de moelle osseuse. Concernant les molécules de CMH de classe II, les données disponibles sur leur rôle fonctionnel sont plus rares. Néanmoins, les molécules de CMH solubles recombinantes chargées avec un peptide unique ont montré : - *in vitro* leur capacité d'induire l'apoptose de cellules T spécifiques (Amirili et al, 96) ; - *In vivo*, dans un modèle murin, celle de favoriser la tolérance spécifique du peptide responsable de l'induction de la réponse autoimmunitaire (Nicolle et al, 94).

## IV. Les ligands des molécules du CMH de classe II

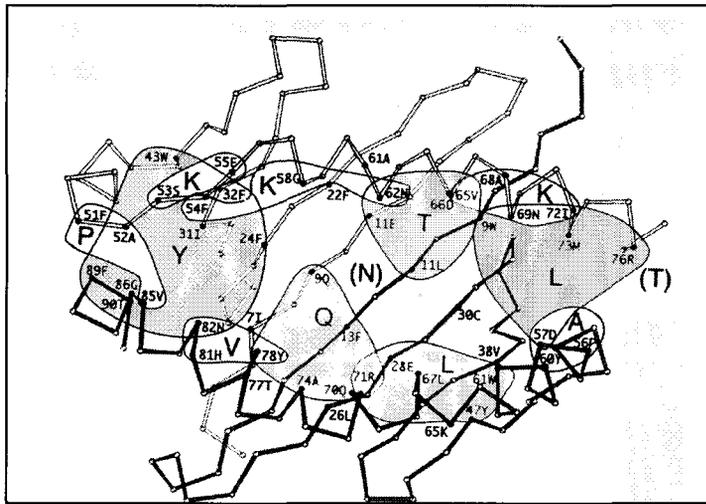
### *A. Interaction des peptides antigéniques avec les molécules de CMH de classe II*

La capacité des molécules de CMH de classe I et de classe II à présenter un large panel d'antigènes peptidiques nécessite un compromis entre une haute affinité d'interaction et une large spécificité. Les structures tridimensionnelles révèlent une solution à ce problème : la formation d'une liaison forte avec la chaîne principale du peptide complétée par une interaction plus ou moins restrictive pour les chaînes latérales.

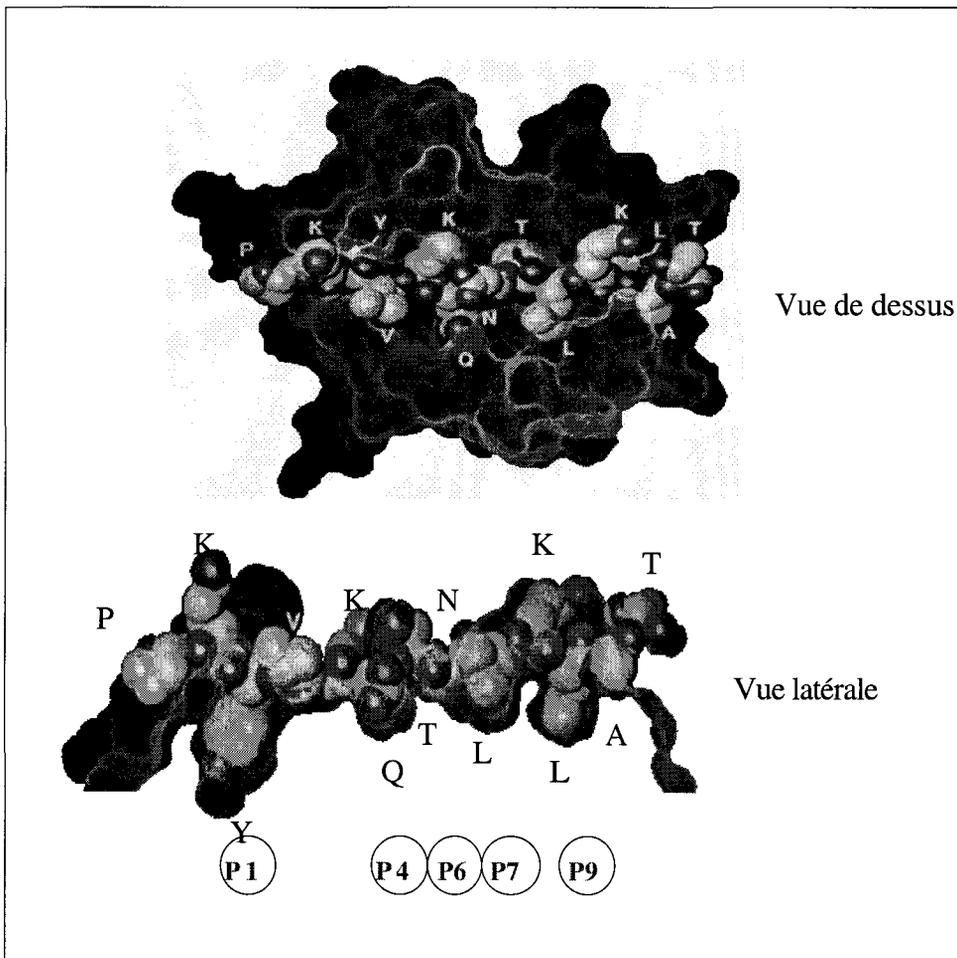
#### *a. Les poches d'ancrage*

Les peptides s'associent au niveau de la cavité par interaction de certaines de leurs chaînes latérales au niveau de micro-environnements formant des poches d'ancrage. Ces poches d'ancrage sont appelées par convention P1 à P9, et sont alignées sur la position des résidus composant la séquence du peptide. Par convention, le premier résidu en position N terminale interagit avec la poche P1. Classiquement, quatre à cinq poches participent à la liaison spécifique du peptide (Smith et al, 98 ; Fremont et al, 98 ; Dessen et al, 97 ; Murthy et al, 97 ; Ghosh et al, 95 ; Stern et al, 94 ; Brown et al, 93). Chacune des poches possède une spécificité physico-chimique qui lui permet de n'accepter que les chaînes latérales complémentaires du peptide.

Sur la figure 16, sont représentés les résidus de la molécule de CMH de classe II HLA-DR1( $\beta$ 1\*0101) interagissant avec le peptide HA(307-310) (Stern et al, 94). Les ensembles mis en couleur correspondent aux 5 poches principales participant à l'interaction.



**Figure 15 :** Représentation des résidus impliqués dans la constitution des poches d'ancrage de la molécule HLA-DR1. (adapté de Stern et al, 94)



**Figure 16 :** Vue de dessus et latérale de la structure du peptide HA(307-319) avec la molécule de CMH de classe II HLA-DR1. (adapté de Stern et al, 94)

Sur la figure 16, la structure du peptide HA(307-319) est représentée en association avec HLA-DR1( $\beta 1^*0101$ ) (Stern et al, 94). On observe, sur la coupe latérale, le positionnement des chaînes latérales du peptide avec les 5 poches d'ancrage, résidus totalement inaccessibles au solvant. Les résidus du peptide orientés de manière opposée sont accessibles à l'interaction avec le récepteur T.

**La poche P1** est la plus large (200 Å de surface de contact), globalement hydrophobe montrant une préférence pour les longues chaînes aromatiques mais également aliphatiques (Trp, Tyr, Phe, Leu et Ile).

**La poche P4** est plus petite, moins profonde que la poche P1, présente des préférences pour les chaînes aliphatiques mais d'autres résidus sont tolérés notamment la glutamine (Fig. 16). Par contre, les résidus chargés positivement sont défavorables à cette position probablement en raison des interactions électrostatique avec l' Arg  $\beta 71$ .

**La poche P6** préfère les résidus à chaînes courtes comme la glycine ou l'alanine mais avec une tolérance importante pour d'autres résidus moins favorables. Concernant le peptide HA (307-319), l'interaction au niveau de cette poche apparaît énergétiquement défavorable comme l'indique la substitution de la thréonine naturelle par une alanine qui augmente l'affinité de liaison .

**La poche P7** est également peu profonde et ne contribue pas de manière importante à la spécificité mais elle peut être importante pour d'autres allèles.

**La poche P9** est de petite taille et globalement hydrophobe acceptant principalement des résidus aliphatiques.

### *b. Influence du polymorphisme sur les interactions peptide/CMH de classe II*

La majorité des résidus polymorphes des molécules de CMH de classe II se situent au niveau du site de liaison des peptides, notamment au niveau des poches d'ancrage. Ainsi, d'un allèle à l'autre, la spécificité de la liaison est fortement affectée. Chaque allèle possède en fait des règles de liaison pour les peptides qui lui sont propres (Fig.17).

Concernant les molécules de CMH de classe II HLA-DR, le polymorphisme étant uniquement porté par la chaîne  $\beta$ , on observe que la poche P1 n'est influencée que par un dimorphisme Val/Gly en position 86. La présence de ces résidus influence de manière majeure la spécificité de la poche. En effet, lorsque que la glycine est présente, comme dans le cas d'HLA-DR1( $\beta 1^*0101$ ) ou HLA-DR4( $\beta 1^*0401$ ), les résidus aromatiques interagissent préférentiellement tandis qu'en présence d'un résidu plus encombrant tel que la valine, seuls les résidus aliphatiques interagissent.

Allèles	P1	P4	P6	P9
DR1(B1*0101) (1) résidus polymorphes spécificité	Gly86 <b>Aromatique,</b> Aliphatique	Phe13,Gln70,Arg74, Ala74,Tyr78 Aliphatique. Polaire, pas de charge +	Ieu 11, Phe 13 <b>A, G, S, T, P</b>	Trp9, Asp57 Aliphatique, Aromatique
DR3(B1*0301) (2) résidus polymorphes spécificité	Gly86 <b>Aliphatique, F</b>	Ser13, Gln70, Lys71, Arg74, Tyr 78 <b>D, E</b>	Ser 11, Ser 13 <b>K, R, E, Q, N</b>	Glu9, Asp57 Aromatique, Aliphatique
DR4(B1*0401) (3) résidus polymorphes spécificité	Gly 86 <b>Aromatique,</b> Aliphatique	His13, Gln70, Lys71, Ala 74, Tyr78 Aromatique, Aliphatique. Pas de +	Val 11, His 13 <b>N, S, T, Q, H, R</b>	Glu9, Asp57 Polaire, Aliphatique. <b>K</b>
DR4(B1*0405) (4) résidus polymorphes spécificité	Gly86, <b>Aromatique,</b> Aliphatique	His13, Gln70, Arg 71, Ala74, Tyr78 <b>V, I, L, M, F, D, E</b>	Val11, His13 <b>N, S, T, Q, K, D</b>	Glu9, Ser57 <b>D, E, Q</b>
DR4(B1*0402) (5) résidus polymorphes spécificité	GVal86, <b>Aliphatique</b>	His13, Asp70, Gln71, Ala74, Tyr78 Aromatique, Aliphatique. pas de +	Val11, His13 <b>N, T, S, Q, K</b>	Glu9, Asp57 polaire, Aliphatique, <b>H</b>

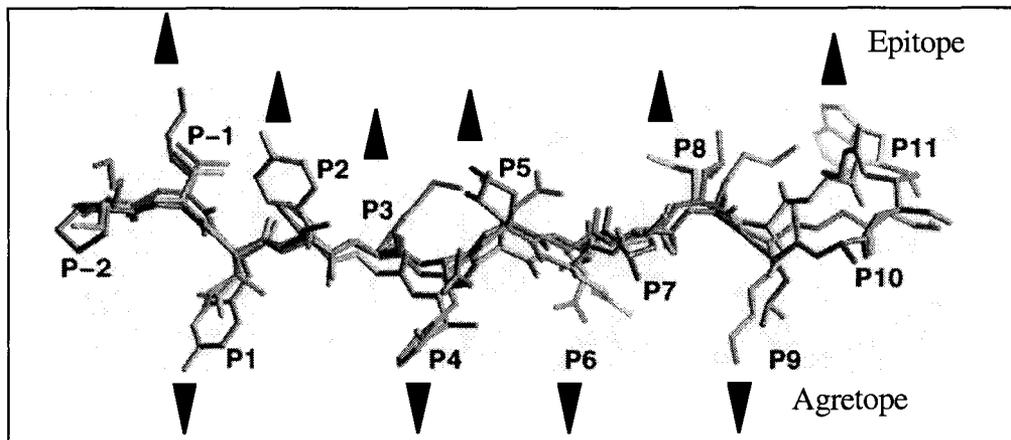
**Figure 17** : Exemple de la spécificité de poches d'ancrage des molécules de CMH de classe II HLA-DR

- (1) Stern et al, 94 ; Murthy et al, 97 ; Hammer et al, 92 ; Hammer et al, 93 ; Hill et al, 94 ; Falk et al, 94
- (2) Malcharek et al, 93 ; Geluk et al, 94 ; Georges et al, 96 ; Ghosh et al, 95
- (3) Dessen et al, 97 ; Sette et al, 93 ; Hammer et al, 93 ; Hill et al, 94.
- (4) Freide et al, 96 ; Rammensee et al, 95, 96
- (5) Hayden et al, 94 ; Rammensse et al, 95, 96

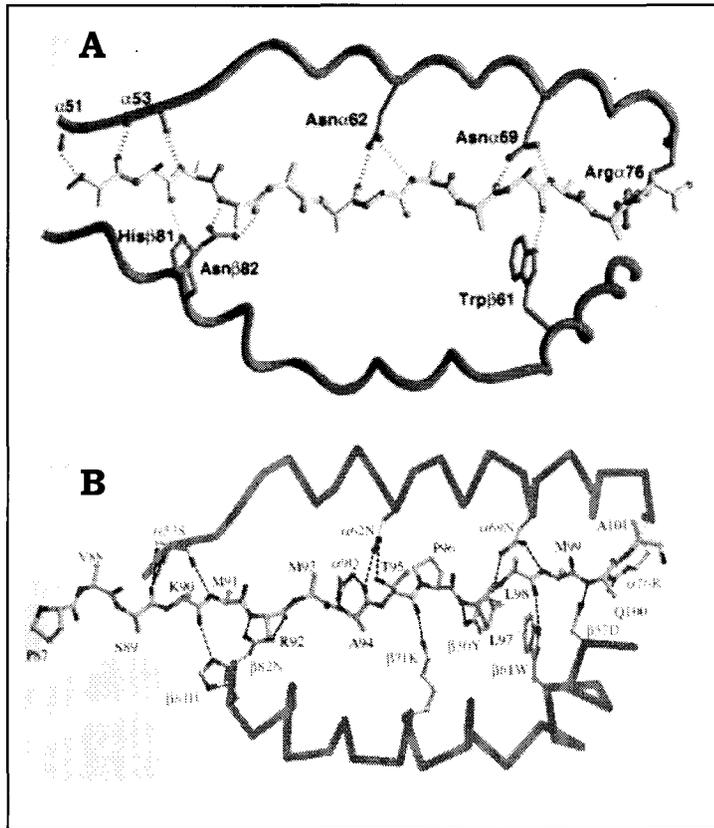
c. Structure conservée de la chaîne principale du peptide

La structure des peptides associés aux molécules de CMH de classe II semble très conservée d'un allèle à l'autre. Ainsi, le positionnement et l'espacement des chaînes latérales qui interagissent avec les poches d'ancrage mais surtout les chaînes principales des peptides sont quasi-identiques (Fig.18).

Cette structure conservée est obtenue par un réseau de ponts hydrogène présents d'un allèle à l'autre (HLA-DR, I-E<sup>k</sup> et I-A<sup>d</sup>). De plus, l'espacement quasi-régulier des poches d'ancrage (P1, P4, P6-7, P9) donne une contrainte supplémentaire au peptide : celle d'adopter une structure conservée en hélice s'approchant d'une structure polyproline de type PII (angles  $\Phi$  et  $\Psi$  proches respectivement des valeurs de  $-80^\circ$  et  $130^\circ$ ) (Jardetzky et al, 96 ; Siligardi et al, 95).



**Figure 18** : Superposition de la structure de peptides associés à trois molécules de CMH de classe II : en jaune le peptide HEL associé à I-A<sup>k</sup>, en magenta le peptide HA(307-319) associé à HLA-DR1, en bleu le peptide Hb associé à I-E<sup>k</sup> (extrait de Fremont et al, 98)



**Figure 19** : Interaction entre la chaîne principale du peptide et les résidus conservés des molécules de classe II : (A) peptide HA(307)319 associé à HLA-DR1 (Stern et al, 94) ; (B) peptide CLIP associé à HLA-DR3 (Ghosh et al, 95)

*d. Rôle des molécules d'eau et ajustement du site de liaison à différents peptides*

Plusieurs molécules d'eau interviennent dans le mécanisme d'interaction peptide/CMH I et II (Murthy et al, 97 ; Meng et al, 97 ; Smith et al, 96 ; Stern et al, 94), et peuvent ainsi contribuer de manière importante à la sélectivité des poches d'ancrage. Elles peuvent s'immiscer entre la molécule de CMH et le peptide pour créer une liaison complémentaire qui peut aider à rattraper une variabilité conformationnelle du peptide (Murthy et al, 97). Ainsi, concernant l'interaction du peptide A2(103-117) avec la molécule HLA-DR1( $\beta 1^*0101$ ), le résidu glycine présent en position P6 est remplacé par une molécule d'eau. Concernant l'interaction du peptide HA(307-319) sur le même allèle, la thréonine en position P6 interagit sans molécule d'eau. D'autre part, certains ponts hydrogène peuvent être substitués par des molécules d'eau. C'est

notamment le cas, pour la formation du double pont hydrogène réalisé par le résidu Asn62 avec le peptide HA(307-319).

La comparaison des structures du complexe HLA-DR1/A2(103-117) et HLA-DR1/HA(307-319) met en évidence une déviation de la chaîne principale (1.0-1.5 Å), survenant au niveau d'un pli dans la région en hélice de la chaîne  $\beta$  proche de la poche 7 (Murthy et al, 97). Cette région présente un facteur B élevé, témoignant d'un certain degré de flexibilité n'affectant pas la structure des peptides associés au niveau du site de liaison.

#### *e. Les peptides naturels présentés par les molécules de CMH de classe II*

L'analyse des peptides naturellement présentés a pu être réalisée par la mise au point d'une technique permettant l'extraction des peptides associés aux molécules de classe II purifiées. Après purification par immunoaffinité, les molécules de CMH de classe II sont dénaturées par un choc acide et les peptides séparés par gel filtration. Après séparation par HPLC en phase inverse, les peptides peuvent être analysés par séquençage.

La variété des peptides présentés par les molécules de CMH II est très importante et est estimée supérieure à 2000 peptides (Hunt et al, 92 ; Chicz et al, 92). D'une manière générale, les peptides ont une taille de 12 à 25 résidus en moyenne, contre 8 à 10 pour les molécules de CMH de classe I (Rudensky et al, 91; Hunt et al, 92 ; Chicz et al, 92a ; Chicz et al, 92b ; Nelson et al, 92 ; Rudensky et al, 92). Cette longueur s'explique par le fait que les extrémités N- et C-terminales émergent de part et d'autre du sillon, contrairement aux molécules de classe I où les extrémités du peptide sont maintenues au sein de la cavité, limitant ainsi leur taille.

La mise en évidence des motifs d'ancrage spécifiques des allèles étudiés reste difficile par cette approche. Toutefois, la séquence des peptides en mélange a permis d'obtenir des résultats intéressants (Falk, et al, 94 ; Malcharek et al, 93). Notamment, il a été montré que la présence de proline au niveau des extrémités N- et C- terminales était une caractéristique commune à l'ensemble des molécules de classe II. Ce phénomène peut être interprété comme un signe de l'activité des exopeptidases en N- et C- terminales intracellulaires, capables d'être stoppées par la présence d'une proline (Falk et al, 94).

*f. Les motifs d'ancrage des molécules de classe II quantitatifs*

Les règles d'ancrage des peptides sur les molécules de classe II s'avèrent complexes. En effet, la présence ou l'absence de certaines chaînes latérales indépendantes des points d'ancrage peut intervenir dans la liaison avec la molécule de CMH (Hammer et al, 94a ; Sette et al, 93 ; Boehncke et al, 93). Les études de liaison de peptides ont permis d'identifier les positions préférentielles spécifiques d'allèles de ces résidus inhibiteurs (Hammer et al, 94a ; Hammer et al, 94b). Ainsi, d'un point de vue quantitatif, l'interaction d'un peptide avec une molécule de classe II va dépendre de la somme des influences des interactions de chaînes latérales au niveau des points d'ancrage, des acides aminés d'influence négative et des acides aminés neutres. Diverses études ont pu mettre en évidence que chaque acide aminé situé au sein de la séquence influence la liaison de manière indépendante des acides aminés voisins (Hammer et al, 94 ; Boehncke et al, 93 ; Hammer et al, 95 ; Parker et al, 94 ; Reay et al, 94). Par conséquent, il est possible de prédire de manière quantitative l'affinité de peptide pour les molécules de CMH de classe II, une fois déterminé l'effet de chaque amino-acide à chaque position. Cette approche a été développée avec succès dans un test d'évaluation de l'affinité de liaison par Hammer (Hammer et al, 94) sur l'allèle HLA-DR4, puis par Fleckenstein sur HLA-DR1 (Fleckenstein et al, 96). Ainsi, les résultats peuvent être présentés sous forme d'un tableau répertoriant l'influence de chaque acide aminé à chaque position (Fig 20).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Y	1,25	2,67	1,39	1,88	1,22	0,93	0,2	1,19	1,18	0,71	0,96
M	1,15	2,67	1,09	1,91	3,17	2,64	2,17	1,66	1,39	2,04	2,39
L	1,23	1,87	1,34	1,72	2,66	2,16	1,41	1,38	1,71	2,97	2,65
F	1,21	3,05	1,36	1,87	0,93	0,53	0,31	0,83	0,97	1,29	1,08
I	1,32	2,94	1,58	1,73	2,36	1,32	1,02	1,60	1,56	2,56	2,80
W	1,26	3,30	1,26	1,66	0,88	0,28	0,05	1,23	0,72	0,88	0,99
V	1,00	2,11	1,43	1,69	1,57	0,51	0,94	1,94	1,70	3,10	2,21
B	1,16	1,79	1,26	1,83	2,63	1,67	2,06	2,83	1,63	3,58	2,83
A	1,40	1,93	1,43	1,81	1,62	1,95	2,96	3,21	1,77	2,88	1,81
G	1,05	0,47	0,79	0,44	0,64	0,69	2,29	3,39	1,51	0,94	0,74
S	0,97	0,30	1,41	1,36	0,82	0,95	2,03	2,74	1,65	1,34	1,60
T	0,96	0,52	0,92	0,97	0,36	0,38	1,03	1,90	1,06	1,44	0,99
P	1,43	1,20	0,55	0,24	0,80	1,01	2,51	2,88	1,62	0,86	0,38
D	0,80	0,11	0,68	0,60	0,09	0,47	0,42	0,96	0,62	0,32	1,41
Q	1,02	1,77	1,04	1,51	0,95	1,50	1,30	1,82	1,41	1,82	2,04
E	0,91	0,99	1,13	0,96	1,09	0,82	0,97	1,20	0,83	0,13	0,87
K	1,25	1,28	1,15	1,25	0,24	0,52	0,96	1,00	1,12	0,98	0,58
H	1,16	1,15	1,06	1,45	0,41	0,71	1,70	1,61	1,36	1,09	0,48
R	1,22	1,07	1,49	1,61	0,63	1,26	1,04	1,48	1,33	0,72	0,73
N	0,94	0,85	0,70	0,70	0,11	0,82	1,37	2,28	1,36	0,75	0,25

	inhibiteur		neutre
	positif		positif dominant

Figure 20 : Matrice représentative de la spécificité d'interaction des peptides de 11 résidus avec les molécules de classe II HLA-DR1. (D'après Fleckestein et al, 96)

### g. Hypothèse d'un site "accessoire/alternatif"

Classiquement, les molécules de CMH de classe II présentent des peptides de 12 à 25 résidus dont une portion centrale de 9 résidus de la poche P1 à P9 interagissent directement avec le site de liaison, formé par le plancher en feuillet  $\beta$  bordé par les deux hélices  $\alpha$ . Les résidus de part et d'autre du sillon émergent en position N- et C- terminales. Il est généralement accepté que la stoechiométrie fonctionnelle d'un complexe peptide CMH de classe II est de 1:1.

Toutefois, il a été montré par la technique de transfert énergétique entre deux fluorochromes fixés sur deux peptides antigéniques différents, ainsi que par l'utilisation d'un marquage en photoaffinité, que la molécule de CMH possédait un deuxième site de liaison (Luescher et al, 90 ; Kropshofer et al, 93 ; Tampé et al 91). Parallèlement, différents groupes ont caractérisé des peptides capables d'influencer positivement la liaison d'un second peptide sur les molécules de CMH de classe II (De Kroon et al, 90 ; Hernandez et al, 94 ; De Kroon et

al, 94 ; Kropshofer et al, 95 ; Liang et al, 95 ; Vogt et al, 95 ; Kropshofer et al, 95 ; Adams et al, 95) (résumé figure 21).

Augmente l'effet de	nom	séquence	références
<b>Présentation par les CMH II aux cellules T</b>	mut-Cvt	KAERADLIAALKQATAK	Rhavani et al. 89
	DynA(1-13) poly (L-Lys)	YGGFLRRIPKLLK (K)14-19	De Kroon et al. 90
	m-li76-91 hli77-92 PH-1.0	YRMKLPKSAKPVSQMR YRMKLPKSAKPVSQMR LYQELQKLTQTLK	Adams et al. 95
	A10R A10I H10A r53HEL52-61	AYAIAAAAAAR ARAAAAAAAIAI HAAAAEAAGA DY(CH2-NH)GILQINSR	Gerlier et al. 98
<b>Association sur les molécules de classe II</b>	DynA(1-13) poly (L-Lys)	YGGFLRRIPKLLK (K)14-19	De Kroon et al. 90
	m-li76-91 hli77-92	YRMKLPKSAKPVSQMR YRMKLPKSAKPVSQMR	Adams et al. 95
<b>Dissociation des molécules de classe II</b>	DynA(1-13) RLI RHI	YGGFLRRIPKLLK ARRLKARRLKARRLK AWRNRAAKAWRNRAKAWR	Pedrazzini et al. 91
	poly (L-Lys) (HEL (107-102))2 PRES	(K)14-19 (AWVAWRNRCK)2 MLSLRQSIRFFKPATRTLCS	De Kroon et al. 94
	HLI(81-89)	LPKPPKPV	Kropshofer et al. 95

**Figure 21** : Séquence des peptides connus pour avoir une influence sur la liaison d'un second ligand (D'après Gerlier et al, 98)

Certaines données expérimentales indiquent qu'il existe, en dehors du site de liaison classique, un site accessoire de liaison pour ces extrémités émergentes ou pour un second peptide. En effet, certains peptides sans affinité détectable pour les molécules de CMH et non stimulateurs pour un lymphocyte T peuvent accroître la liaison d'un peptide stimulateur. Plusieurs peptides ayant cette capacité ont été décrits dans différents modèles d'association de peptides avec des molécules de CMH de classe II humaines ou murines (Fig.21). L'un des modèles les plus intrigants concerne la liaison du peptide CLIP(81-104) sur les molécules de CMH de classe II (Kropshofer et al, 95). En effet, la partie N- terminale de ce peptide (81-89) réduit de manière importante la stabilité de la molécule HLA-DR3. Cette partie N-terminale

située nettement en dehors du site de liaison (voir structure tridimensionnelle Ghosh et al, 95) possède un effet "allostérique" réduisant la demi-vie du complexe. Ainsi, le peptide CLIP aurait la capacité de contrôler son auto-relargage du site de liaison, phénomène relié au processus de chargement des peptides antigéniques sur les molécules de classe II au niveau intracellulaire.

Toutefois, la caractérisation de ce ou ces sites secondaires ainsi que leur spécificité n'ont pas, à l'heure actuelle, été mis en évidence.

## *B. Les autres ligands des molécules de classe II*

### *a. Le récepteur des cellules T (TCR)*

Les cellules T reconnaissent des peptides antigéniques associés aux molécules présentatrices du CMH. La liaison du récepteur de cellules T détermine le destin de ces cellules lors de la sélection thymique mais aussi leur survie en périphérie et éventuellement leur activation et leur expansion. Pour la réponse immunitaire dite acquise, les cellules T ont pour rôle, via ce TCR, de surveiller et de détecter la présence d'antigène étranger dérivé des protéines d'origine exogène (non-soi) et/ou endogène (soi défectueux). Les structures cristallines de TCR associé à un complexe spécifique peptide/CMH ont été récemment publiées (Garcia et al, 96 et 98 ; Housset et al, 97).

Comme les anticorps, les récepteurs T sont codés par une famille de segments géniques : Variable (V), Diversity, (D), Joining (J), et Constant (C) qui se réarrangent pour générer la diversité du répertoire estimée à  $10^{14}$  séquences différentes. Quatre régions hypervariables se trouvent au niveau des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dont trois d'entre elles sont analogues aux CDRs des anticorps qui sont au contact direct de l'antigène (Eisen et al, 96).

Les structures cristallographiques des complexes TCR/peptide et TAX/HLA-A2 mettent en évidence une liaison en diagonale qui doit être un mécanisme général aussi bien pour les CMH de classe I que pour les CMH de classe II. Le TCR montre une certaine flexibilité comme pour les anticorps avec les antigènes. De plus, les TCR ne présentent que peu de grandes chaînes latérales émergentes de ces domaines mais par contre plusieurs résidus alanine et

glycine positionnés au niveau du contact avec le complexe peptide/CMH. Cette caractéristique permet ainsi au TCR d'avoir un contact plus intime avec le complexe. La surface totale de contact TCR-peptide/CMH est de 998 Å donc le contact avec le peptide représente 326 Å.

Au contact du complexe peptide/CMH, le récepteur T expose contre toute attente une région aplatie avec une seule poche à la jonction des régions V $\alpha$  et V $\beta$ .

### *b. la molécule CD4*

La molécule CD4 est exprimée par une sous-population de lymphocyte T appelée T auxiliaires (lymphocytes T CD4 ou « helper »). Cette molécule interagit avec la molécule de CMH de classe II et participe à l'activation cellulaire.

Les études structurales du récepteur CD4 ont révélé quatre domaines extracellulaires homologues aux immunoglobulines (D1-D4) (Lange et al, 94). D'autre part, des travaux ont identifié une arête appelée C'C'' au niveau du domaine distal D1 qui apparaît essentielle pour la liaison aux molécules de CMH de classe II mais également à la protéine GP120 de l'enveloppe du VIH (Moebius et al, 93 ; Konig et al, 95). Toutefois, la liaison au CMH semble également dépendre d'une autre portion du domaine D1, du domaine D2 et de l'interdomaine D1-D2 (Konig et al, 95).

Un modèle moléculaire de l'interaction a été développé pour l'association CD4-CMH de classe II dans lequel la sous-unité  $\beta$ 2 semble essentiellement impliquée, et plus particulièrement les résidus 137 à 143, avec une surface de contact faible de 280 Å (Nag et al, 93 ; Konig et al, 93 ; Mazerolles et al, 96 ; Vignali et al, 92). D'autre part, un domaine  $\beta$ 1 formant une boucle accessible au solvant, constitué des résidus 41 à 55, peut interagir avec les acides aminés de la boucle FG du second domaine D2 (Brogdon et al, 98). Une barrière d'espèce semble exister au niveau de la reconnaissance CD4-molécules de CMH de classe II entre humain et souris (Ito et al, 96 ; Altmann et al, 95). De plus, le polymorphisme des molécules de classe II pourrait affecter sa reconnaissance (Fleury et al, 95). En effet, les souris transgéniques pour HLA-DR4 ne développent pas de bonnes réponses immunitaires, en raison d'une incapacité du CD4 murin

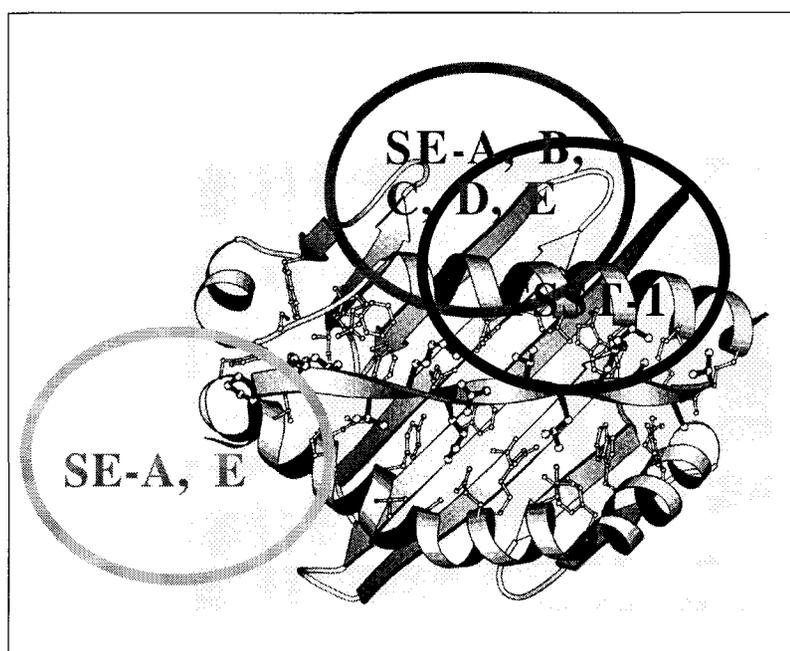
à reconnaître efficacement la molécule de CMH humain. En revanche, une souris transgénique exprimant une molécule HLA-DR4 chimérique, pour laquelle les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  humains ont été substitués par les domaines murins homologues, développe une réponse T restreinte par DR4 (Ito et al, 96).

### c. Les superantigènes

Ces molécules sont produites par des bactéries ou virus et activent des cellules T dont les récepteurs expriment un V $\beta$  particulier ; La reconnaissance de ces superantigènes n'est pas restreinte par les molécules du CMH II (Seth et al, 94 ; Fraser, 89). L'activation cellulaire est suivie par une anergie ou une délétion de la cellule T. Les superantigènes les mieux caractérisés sont les entérotoxines produites par *Staphylococcus aureus* : SEA, SEB, SEC1-3, SED, SEE, SEH et la toxine du syndrome de choc toxique TSST-1. Les structures de SEA, SEB, SEC2, SED et TSST-1 ont été résolues et montrent une topologie commune avec deux domaines d'environ 120 acides aminés (Schad et al, 95; Swaminathan et al, 92 ; Papageorgiou et al, 95 ; Achaya et al, 94). Toutefois, ils se distinguent par leur mode de liaison aux molécules de CMH de classe II (Fig.22).

Les structures cristallographiques de superantigènes complexés aux molécules de classe II ont été obtenues pour certains d'entre eux (TSST-1, SEB). Plus particulièrement, le SEB a été co-cristallisé avec HLA-DR1 et HLA-DR4 mettant en évidence une interaction sur la molécule de classe II au niveau du domaine  $\alpha 1$ , à l'extérieur du site de liaison des peptides (Dessen et al, 97 ; Jardetzky et al, 94 ; Thibodeau et al, 94). Certains superantigènes peuvent être influencés par la nature du peptide présent au niveau du site de liaison. C'est le cas de TSST-1 qui semble interagir au niveau d'un domaine commun avec le SEB, mais qui s'étend également au dessus du site de liaison jusqu'au domaine  $\beta 1$ , en contact avec l'extrémité C-terminale du peptide (Thibodeau et al, 94). Le SEA est le superantigène le plus affiné pour HLA-DR1, interagissant de manière coordonnée sur deux sites au niveau des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  (Hudson et al, 95). Il interagit notamment avec le résidu histidine  $\beta 81$ , qui est important pour la formation d'un pont hydrogène avec la chaîne principale du peptide (Stern et al, 93).

Ainsi, la nature du peptide présent au niveau du site de liaison peut influencer la reconnaissance des superantigènes par le biais de modifications conformationnelles affectant la structure même des molécules de CMH de classe II (Thibodeau et al, 94 ; Woodland et al, 97). En effet, dans les cellules déficientes dans l'expression de HLA-DM (exprimant des molécules de CMH de classe II de stabilité réduite) les conditions de liaison de SEA et TSST-1 sont modifiées (Lavoie et al, 97 ; Albert et al, 98). D'autre part, l'expression de la chaîne li est indispensable pour la liaison de TSST-1 et de SEA sur les molécules de CMH de classe II. Ainsi, les superantigènes sont sensibles aux variations structurales des molécules de CMH II et pourraient être utilisés pour évaluer les modifications conformationnelles fines et proches du site de liaison.



**Figure 22 :** Vue schématique de la liaison de superantigènes à différents sites sur les molécules de CMH de classe II. (D'après Shookry et al, 97)

*d. La molécule LAG-3 (Lymphocytes Activation Gene-3)*

La molécule LAG-3, récemment identifiée, est une protéine apparentée au niveau génétique et structural au CD4 (Triebel et al, 90). Elle est constituée de 4 domaines homologues aux immunoglobulines (D1-D4). Elle possède un site de liaison pour les molécules de CMH de

classe II au niveau des domaines D1-D2. Son expression est restreinte aux lymphocytes T et NK. Sa fonction n'est pas actuellement bien définie. Elle permettrait toutefois d'influencer de manière négative l'activité des cellules T (Huard et al, 96; Subramanyam et al, 98) et également de faire produire de l'IL-12 et du TNF- $\alpha$  par les monocytes et les cellules dendritiques (Avice et al, 99).

## V. La stabilité des molécules de classe II

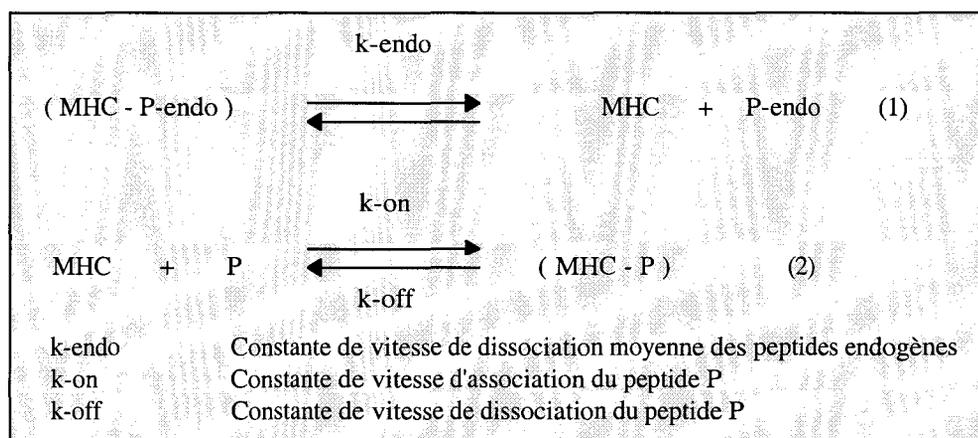
Les complexes peptides/CMH de classe II exposés à la surface de cellules présentatrices d'antigènes ont la particularité d'avoir une demi-vie élevée (supérieure à 48 heures). Cette stabilité élevée est le résultat d'un processus de maturation conformationnelle complexe induit spécifiquement par la nature du ligand peptidique. Ce paramètre, facteur clé dans l'induction d'une réponse immunitaire, est considéré actuellement comme un critère d'évaluation de l'immunogénicité. Toutefois, les bases moléculaires régissant ce mécanisme restent à être élucidées.

### *A. Mise en évidence de la stabilité élevée des complexes peptide/CMH de classe II*

Les études d'interaction entre les peptides de synthèse avec les molécules de CMH de classe II ont révélé une cinétique inhabituelle avec des vitesses d'association (Buss et al., 86a) et de dissociation lentes (Buss et al. 86a ; Watt et al. , 86), correspondant en général à une constante d'équilibre apparente de  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$  M ( Buss et al., 86b ; Babbitt et al., 85). La cinétique d'association particulière ( $K_{on} = 1-100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) tient au fait que les molécules de CMH de classe II purifiées à partir de cellules lymphoïdes (lymphocytes B transformés par le virus d'Epstein-Barr - EBV) présentent des peptides endogènes naturellement associés au niveau du site de liaison et pouvant être élués par simple passage à pH acide (Falk et al., 94 ; Rudensky et al., 91 ; Rudensky et al., 92 ; Hunt et al., 92 ; Nelson et al., 92 ; Chicz et al., 92).

La liaison de ces peptides naturels s'avère quasi-irréversible (Lanzavecchia et al.,92), limitant de manière très importante le déplacement par des peptides exogènes lors des études de liaison. Ainsi, même après des temps d'incubation supérieurs à 96 heures, le taux d'occupation d'un peptide compétiteur sur les molécules de CMH de classe II dépasse rarement 20%. L'interaction de peptides

avec les molécules de CMH de classe II purifiées à partir de cellules lymphoïdes répond à l'équation présentée figure 23.



**Figure 23:** *Modèle d'interaction de peptides de synthèse avec les molécules de CMH de classe II purifiées contenant des peptides endogènes.*

De plus, les molécules de CMH de classe II purifiées possèdent une propriété remarquable de résistance à la dénaturation par de fortes concentrations en SDS (Billing et al., 76 ; Cresswell, 77). La dissociation des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  en SDS nécessite des températures élevées, supérieures à 57°C (Springer et al., 77 ; Dornmair et al., 89).

## *B. Contribution du peptide à la stabilité des molécules de CMH II*

En 1990, Mellins (Mellins et al., 90) met en évidence qu'une cellule mutante, incapable de présenter des antigènes, ne pouvait pas produire des molécules de CMH de classe II résistantes au SDS, mais exprimait des molécules de CMH se dissociant en chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  à basse température. Cette découverte permettait d'évoquer la possibilité que le peptide contribuait à la stabilité des molécules de classe II. Celle-ci est en effet contrôlée par l'association de peptides correctement présentés naturellement (Wettstein et al., 91 ; Sadegh-Nasseri et Germain, 91 ; Stern and Wiley, 92). La liaison d'un peptide antigénique induit notamment un changement de la structure quaternaire, mesurable par

une augmentation de la résistance des molécules de classe II à la dissociation en chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  en gel SDS-PAGE et ce de manière dépendante de la séquence du peptide (Witt et al., 92 ; Lanzavecchia et al., 92 ; Nelson et al., 96 ; Verreck et al., 96 ; Humbert et al., 93 ; Siklodi et al., 98).

### *C. Influence de la stabilité des molécules de classe II sur la réponse immunitaire in vitro et in vivo*

Les molécules de classe II en surface cellulaire ont en général une stabilité de plusieurs heures à plusieurs jours (Stern and Wiley, 92) et un temps de persistance sur cellules vivantes allant de plusieurs minutes à 20 à 50 heures selon le type cellulaire (Lanzavecchia et al., 92 ; Nelson et al., 94). Bien qu'au niveau cellulaire, la demi-vie soit régulée par le taux de recyclage des molécules de classe II en surface et le taux de synthèse, il apparaît que la nature du peptide présenté joue un rôle déterminant. Ce gain de stabilité apporté par un peptide se traduit directement sur la réponse cellulaire *in vitro*, où la persistance d'un antigène peptidique peut être un facteur contribuant à l'immunogénicité, aussi bien pour la présentation via les molécules de classe I (Bush et al., 98 ; Van der Burg et al., 96) que dans le cas de la présentation par les molécules de CMH de classe II (Fairchild et al., 93 ; Rabinowitz et al., 97 ; Nelson et al., 94). En effet, le groupe de Unanue a pu montrer que la pré-incubation de deux constructions peptidiques, présentant le même épitope mais de demi-vie différente sur les molécules de CMH de classe II membranaires, permettait de les distinguer selon la durée de la production d'IL2 : le peptide le moins stabilisant n'est pas capable de faire produire de l'IL2 par un clone T spécifique de manière persistante dans le temps (Nelson et al., 94).

Un complexe peptide/CMH, une fois formé de manière stable, peut ainsi faire durer le temps de stimulation et ce durant plusieurs jours, compte-tenu de la demi-vie de certains complexes. La stabilité des molécules de classe II est d'autant plus importante que dans le contexte d'une réponse immune primaire, le site de contact avec l'antigène diffère du lieu où s'effectue la réponse immunitaire. En effet, les cellules dendritiques immatures, après un temps de contact avec l'antigène, augmentent leur niveau de synthèse des molécules de classe I et II, accumulant des taux très importants de complexes peptide/CMH stables ; Ces cellules migrent alors vers les organes

lymphoïdes secondaires, au niveau des aires riches en cellules T afin d'initier la réponse immunitaire (Ingulli et al., 97 ; Silverberg-Sinakin et al., 76 ; Romani et al., 89). Ces cellules présentatrices devenues matures perdent rapidement leur capacité à synthétiser des molécules de CMH de classe II et donc à présenter de nouveaux déterminants (Romani et al., 89). L'acquisition de la stabilité paraît donc être un événement important pour l'induction d'une réponse T efficace (Sallusto et al., 94 ; Kleijmeer et al., 95 ; Puré et al., 90).

L'activation cellulaire T a été modélisée et semble favorable à un système d'activation sériel puisqu'un nombre restreint de molécules de CMH (quelques dizaines) est capable d'interagir avec un très grand nombre de récepteurs T et permet d'induire l'activation cellulaire T (Kimachi et al., 97). Ainsi, l'activation de cellules T dépend d'une cinétique optimale d'interaction TCR-peptide-CMH (Tobbs et al., 98, Lord et al., 99). Le nombre de récepteurs T pouvant être activés par un seul complexe peptide/CMH dépend donc : (1) du temps de liaison nécessaire pour activer le récepteur T ; (2) de la stabilité du complexe. De ce fait, la stabilité du complexe peptide/CMH de classe II est un paramètre essentiel dans ce processus : si la demi-vie du complexe peptide/CMH est plus courte que le temps requis pour une activation complète (inférieure à 10s ), le signal délivré à la cellule T peut être altéré .

#### *D. L'acquisition de la stabilité : marqueur de maturation des molécules de CMH de classe II*

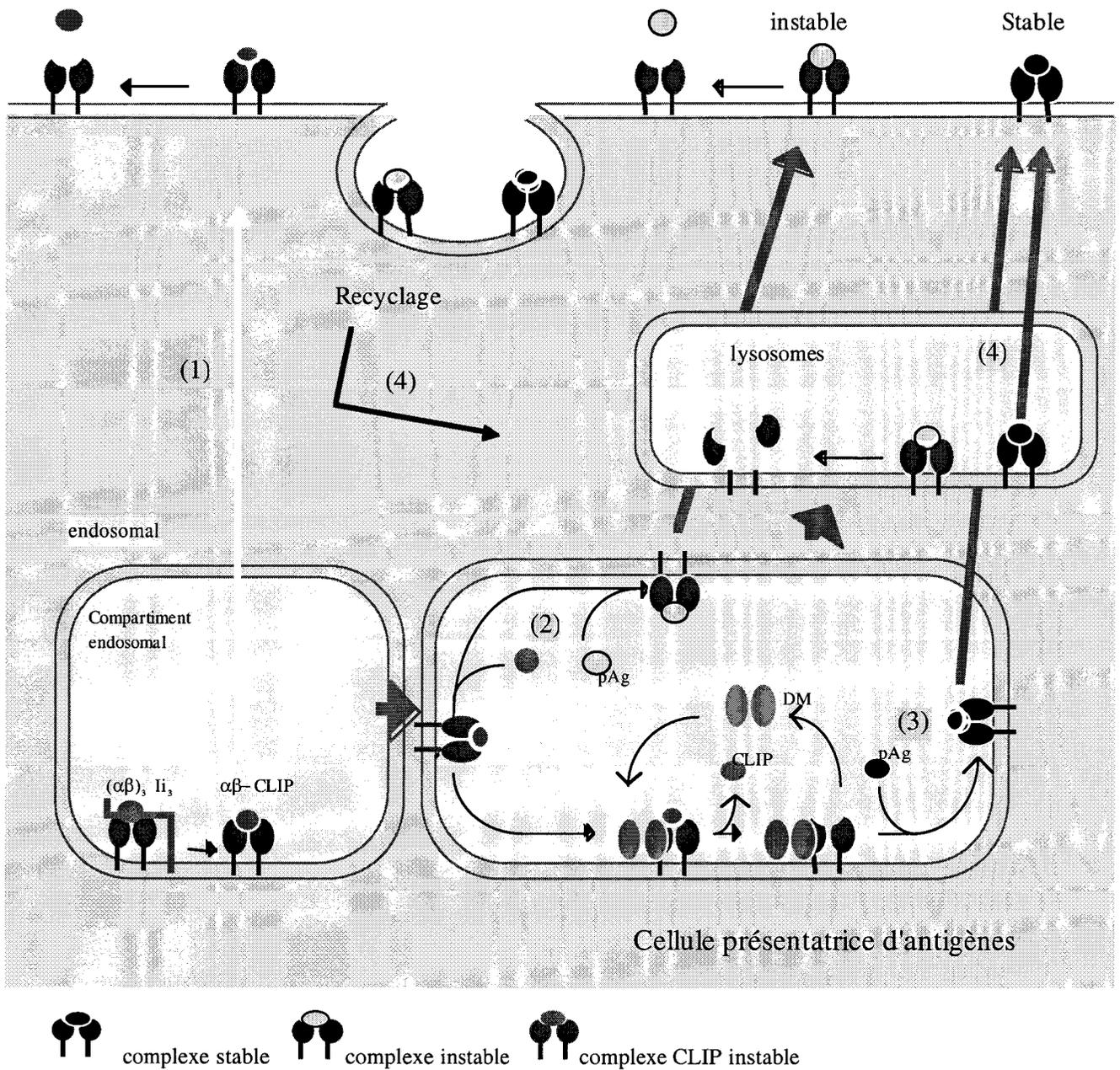
L'acquisition d'un phénotype stable par les molécules de CMH de classe II a été utilisée comme marqueur de maturation des molécules de CMH de classe II lors du processus de présentation antigénique. Les molécules de CMH de classe II néo-synthétisées interagissent avec les antigènes après relargage de la chaîne invariante et deviennent résistantes à la dissociation en SDS-PAGE avant d'atteindre la surface cellulaire (Germain et al., 91 ; Neefjes et al., 92, ).

La molécule HLA-DM joue un rôle important dans l'apparition de complexes stables. En effet, les cellules déficientes pour l'expression de la protéine chaperonne HLA-DM expriment des molécules de classe II en surface, occupées en majeure partie par le peptide CLIP très instable (Morris et al., 94 ; Fling et al., 94 ; Karlsson et al., 94 ; Denzin et al., 94). Les fonctions chaperonne et catalytique de HLA-DM ont un rôle d'éditeur des peptides qui seront associés aux molécules de classe II, catalysant

d'une part les peptides ayant plutôt une demi-vie faible (Sloan et al., 95 ; Werber et al., 96), et d'autre part permettant sélectivement l'association de peptides de taille supérieure à 11 résidus (Kropshofer et al., 96 ; Siklodi et al., 98), longueur favorisant la stabilité des complexes par une occupation optimale du site de liaison.

La conversion des complexes instables vers les formes stables semble intervenir également dans le mécanisme d'exportation du compartiment endolysosomal vers la membrane plasmique. En effet, les peptides sont capables de réguler l'expression en surface des molécules de classe II (Germain et al., 91 ; Agrawal et al., 94). D'autre part, le passage des complexes peptide/CMH de classe II des lysosomes vers la surface cellulaire semble dépendre de l'association stable du peptide antigénique, tandis que ce phénotype ne semble pas requis pour le transport des endosomes vers la surface (Théry et al., 98). Ainsi, il existe une certaine sélectivité dans le transport vers la surface cellulaire qui réside dans une rétention préférentielle des complexes instables dans les lysosomes. Le mécanisme de rétention sélectif des complexes instables est probablement lié au fait que dans cette conformation, les molécules de classe II semblent moins résistantes à la dégradation par les protéases que les formes stables plus compactes.

La chaîne li semble également avoir un rôle dans la conversion vers la forme stable. En absence de cette chaîne, on observe la formation d'isoformes de type "floppy", c'est à dire de mobilité réduite en gel SDS-PAGE, au niveau des compartiments endosomiaux tardifs (Viville et al., 93 ; Humbert et al., 93) .

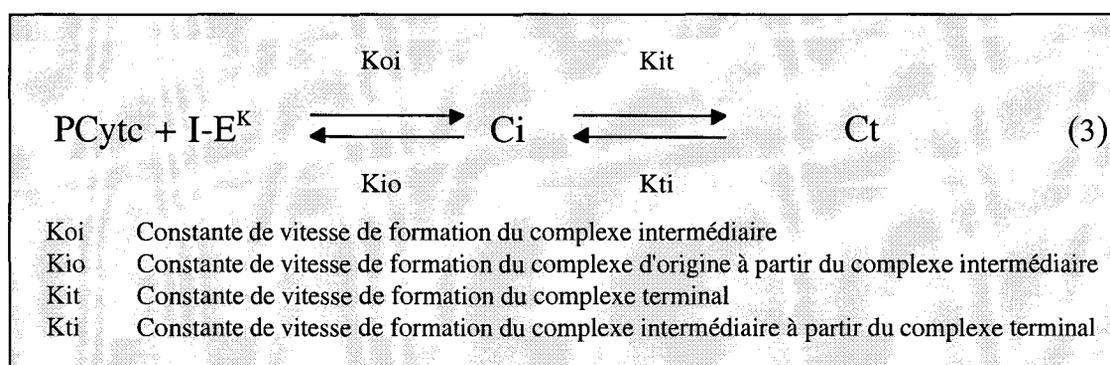


**Figure 24 :** Schématisation de la voie de biosynthèse des molécules de CMH de classe II en fonction de la stabilité des complexes : (1) Morris et al., 95 , Fling et al., 94, Karlson et al., 94, Denzin et al., 94 ; (2) Kovats et al., 95 ; Pinet et al., 95, Kropshofer et al., 95 (3) Kropshofer et al., 95, 95, 96 ; Stebbins et al., 95, Siklodi et al., 98 (4) Théry et al., 98.

## E. L'interaction peptide/CMH II : un processus de maturation de la stabilité en plusieurs étapes

### a. Caractérisation d'un intermédiaire cinétique instable

McConnell et al.. (Scheherazade et al., 89) ont pu mettre en évidence l'existence de deux complexes de nature différente, générés lors de l'incubation du peptide pCytic(88-104) avec I-E<sup>K</sup> et reconstitués en bicouche lipidique. L'un des complexes correspond en terme cinétique à ceux trouvés à la surface cellulaire, avec des vitesses apparentes d'association et de dissociation lentes. L'autre se distingue par des vitesses d'association et de dissociation beaucoup plus rapides (Fig.25). Au cours d'une incubation, ces deux isomères cinétiques semblent co-exister en tout début d'incubation avec le peptide puis progressivement la proportion de complexes à longue demi-vie augmente (Scheherazade et al., 89 ; Beeson et al., 96 ; Scheherazade et al., 94). En effet, lors de la dissociation du peptide, une courbe biphasique est observée, correspondant à l'existence des deux formes avec des demi-vies différentes. La première partie de la courbe, correspondant au complexe instable, diminue progressivement si on augmente le temps d'incubation avec le peptide. Ainsi, les deux formes sont interdépendante, mettant en évidence que le complexe instable subit progressivement une modification structurale pour aboutir à une forme stable (Scheherazade et al., 94). Ainsi, la liaison du peptide sur les molécules de CMH de classe II s'apparente à une maturation sous contrôle cinétique.



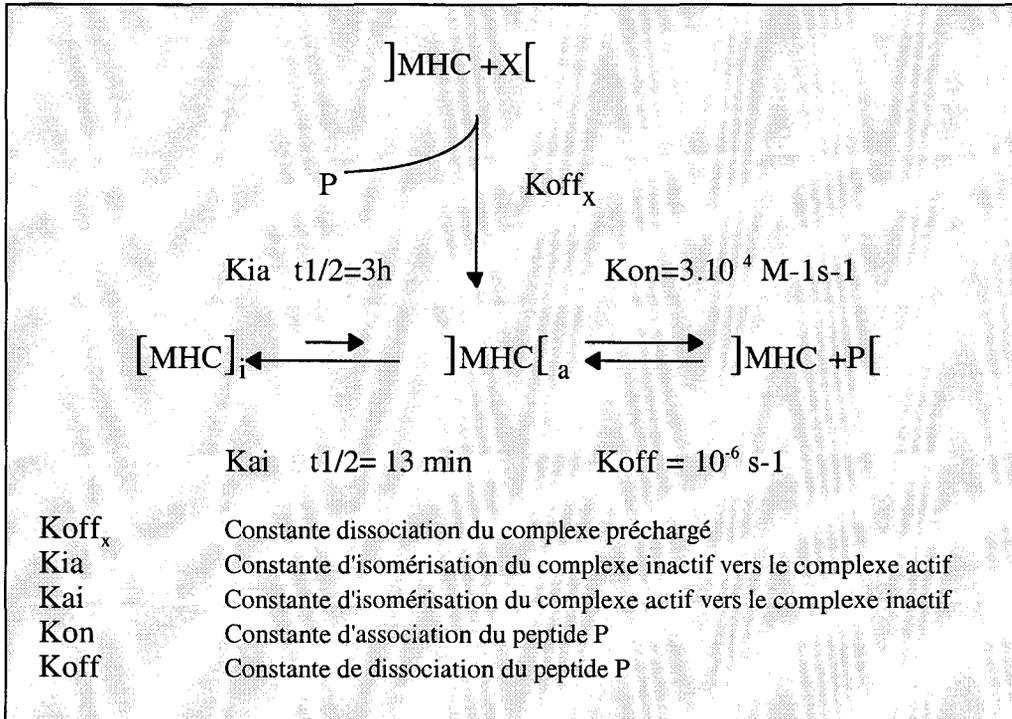
**Figure 25:** Modèle d'interaction du peptide de synthèse avec les molécules de classe II en tenant compte du complexe intermédiaire. D'après Scheherazade Sadegh-Nasseri & Harden M. Mc Connell, *Nature*, 1989. 337 : 274

Ces différentes isoformes ont finalement pu être distinguées selon leur capacité à résister à la dénaturation en gel SDS-PAGE. Les HLA-DR1 vides obtenus à des temps précoces d'incubation avec un peptide spécifique ont une demi-vie courte et sont instables en gel SDS-PAGE. Progressivement, ils se convertissent en complexes à longue demi-vie, stables en gel SDS-PAGE (Scheherazade et al., 94).

### *b. Caractérisation d'une isoforme de molécule de classe II inactive*

L'utilisation de molécules de classe II solubles et vides permet d'éviter l'étape limitante de l'équation 1 (Fig.23, p42), c'est à dire la faible dissociation des peptides endogènes. La vitesse d'association obtenue avec les molécules de classe II solubilisées par un détergent ( $k_{on} = 1-100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Buus et al., 86 ; Roche et Cresswell, 90 ; Roof et al., 90) se trouve augmentée ( $k_{on} = 10-100 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Wettstein et al., 91 ; Stern and Wiley, 92). Toutefois, les molécules de classe II vides ont des vitesses de liaison environ  $10^5$  fois plus lentes qu'une interaction peptide/protéine classique (Goldberg and Baldwin, 98) et surtout  $10^4$  fois plus lentes que l'interaction peptide/CMH de classe I (Springer et al., 98). Récemment, le groupe de McConnell a démontré l'existence de différentes formes de complexes vides : un complexe actif mais instable qui peut se convertir en complexe stable mais inactif (Rabinowitz et al., 98). Le complexe stable inactif limiterait ainsi de manière importante la réaction de liaison (Fig.26).

D'autre part, l'obtention d'une forme active, peut également être obtenue à partir d'un complexe peptide/CMH pré-chargé avec un peptide. La vitesse d'interaction du peptide est alors augmentée, mettant en évidence une transition directe vers la forme active. Ce mécanisme est vraisemblablement en relation avec le processus de présentation antigénique au cours duquel la liaison des peptides antigéniques peut être favorisée par le relargage du peptide CLIP des molécules de classe II.



**Figure 26** : Représentation des différentes réactions impliquées dans l'interaction de peptides avec les molécules de CMH de classe II.

### F. Bases moléculaires impliquées dans la stabilité des molécules de CMH de classe II

Selon leur stabilité en gel SDS-PAGE, deux formes de molécules de CMH II peuvent être distinguées : une conformation stable avec une demi-vie longue, résistante à la dissociation en gel SDS-PAGE et une conformation instable, avec une demi-vie courte, se dénaturant rapidement en gel SDS-PAGE (Fig.26). Le mécanisme moléculaire régissant cette propriété demeure mal compris; toutefois, deux paramètres semblent prépondérants : d'une part la stabilité intrinsèque de l'allèle, d'autre part, la nature du peptide ligand.

#### a. Facteur intrinsèque à la molécule de CMH de classe II influençant la stabilité

La stabilité des CMH de classe II est dépendante de l'allèle. Cette observation a pu être réalisée sur les molécules de classe II HLA-DR qui possèdent en commun la même chaîne DR $\alpha$ . Il s'avère que

la stabilité des molécules de classe II est influencée par le polymorphisme HLA. Chaque allèle peut être défini par sa stabilité intrinsèque, analysable en gel SDS-PAGE ou par la mesure de la demi-vie des complexes. (Verreck et al., 93 ; Devaux et al., 95). De plus, ces différences sont indépendantes de la nature des peptides endogènes (Devaux et al., 95).

Différents résidus situés au niveau du site de liaison semblent impliquer dans la stabilité intrinsèque des molécules de classe II. Le dimorphisme val/gly en position 86 de la chaîne  $\beta$  des molécules de classe II HLA-DR a un impact majeur sur la stabilité. La position 86 correspond à un résidu situé au niveau de la poche d'ancrage P1. Cette poche, globalement hydrophobe, est conditionnée par la présence d'une valine en position 86, limitant le positionnement de résidus aliphatiques et permettant l'interaction préférentielle de résidus aromatiques (Tyr, Phe, Trp).

D'autre part, des analyses comparatives menées sur les allèles DR $\beta$ 1\*0101 et DR $\beta$ 1\*0401 ont permis d'établir un modèle d'étude de la stabilité intrinsèque. DR1 possède une stabilité largement supérieure à 300h, la demi-vie de DR4 n'est que de 75h, différences qui ne dépendent pas de la nature des peptides endogènes associés au niveau du site de liaison. Au niveau structural, les variations alléliques se limitent à 9 résidus situés sur la chaîne  $\beta$ , au niveau du site de liaison. Une série de molécules hybrides DR1-DR4 ont permis d'identifier les résidus impliqués dans ces différences de stabilité. La substitution sur la chaîne DR $\beta$ 1\*0401 des résidus 26, 28, 30, 31, 33 et 71 par ceux de l'allèle DR $\beta$ 1\*0101 a permis de revenir à un phénotype de forte stabilité.

### *b. Le peptide ligand induit la stabilité des molécules de CMH II*

Pour un allèle spécifique, l'isomérisation de la forme instable vers la forme stable est fortement dépendante de la nature du peptide ligand. En effet, en fonction de leur séquence, les peptides sont capables de stabiliser les molécules de classe II. Chaque peptide en fonction de ses capacités de liaison influence quantitativement le degré de stabilité.

Différentes études ont pu mettre en évidence que les résidus impliqués dans l'interaction du peptide au niveau des poches d'ancrage jouent un rôle essentiel dans le processus de stabilisation. Sur la molécule de classe II HLA-DR1, les chaînes latérales du peptide ancrées au niveau de la poche P1 jouent un rôle dominant sur la stabilité (Wu et al., 96 ; Verreck et al., 96). D'autres positions semblent

avoir un rôle non négligeable, notamment les poches P6-P7, mais les études concernant ces sites sont incomplètes.

Les résidus N- et C- terminaux du peptide situés à proximité des poches P1 et P9 respectivement, jouent un rôle majeur sur la stabilité et ce de manière indépendante de l'affinité (Siklodi et al. , 98 ; Nelson et al., 93). L'établissement de liaisons spécifiques au niveau des poches d'ancrage ainsi que celui de ponts hydrogène sont autant de paramètres lié à la spécificité de l'allèle. Toutefois, d'une manière générale, l'occupation complète du site de liaison selon le modèle d'une "fermeture à glissière", via le réseau de ponts hydrogène, semble être une garantie pour l'acquisition de la stabilité.

# I. Techniques de biologie moléculaire

## *A. Extraction des ARN messagers et rétro-transcription en ADN complémentaires*

L'extraction des ARNm est basée sur la technique de séparation en phénol/chloroforme. 5 à 50x10<sup>6</sup> cellules sont récupérées par centrifugation puis lysées dans 1ml de réactif RNazol (Bioprobe, France). Le lysat est congelé à -20°C jusqu'à l'extraction. A la suite de la décongélation, 200 µl de chloroforme sont ajoutés. Après centrifugation à 15000 tours pendant 20 min à 4°C, la phase supérieure est récupérée puis mélangée à 400 µl d'isopropanol. Le mélange est vortexé puis congelé une nuit à -20°C. Après une centrifugation à 15000 tours durant 30 min, le surnageant est éliminé. Après lavage à l'éthanol 70%, le matériel est solubilisé dans de l'eau, analysé en gel d'agarose pour être enfin congelé à -20°C.

Les ARNm extraits sont ensuite mis en présence d'une ADN polymérase (la reverse transcriptase M-MLV issue du virus de Moloney), d'amorces d'oligonucléotides polydT et d'un mélange de desoxynucléotides. Cette technique est réalisée avec le kit de rétro-transcription (Promega, France). Les ADNc sont ensuite stockés à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

## *B. Amplification des gènes d'intérêt par PCR*

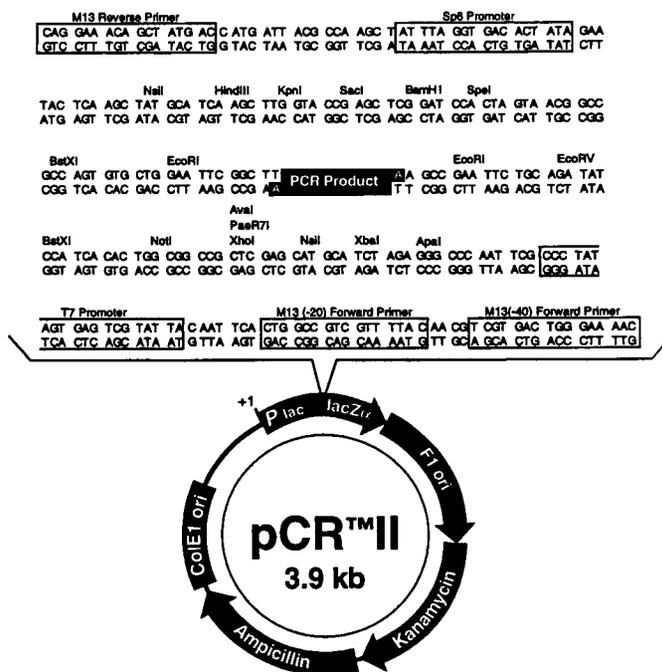
L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl en présence de 0,625 unités de Taq DNA polymérase (Promega, France), de 25 pmol de dNTP, 25 pmol d'un mélange d'amorces sens et antisens spécifiques, 1,5 µl de tampon Taq 10X (Promega) et 1,5 µl d'ADNc.

Les cycles d'amplification sont réalisés de la manière suivante :

94°C	5 min		} 30 cycles
94°C	1 min	dénaturation	
60°C	1 min	hybridation	
72°C	3 min	élongation	
4°C	-		

### C. Clonage des fragments de PCR en vecteur pCR II

Cette étape de clonage permet de vectoriser facilement un fragment de PCR directement dans un vecteur intermédiaire lequel permettra par la suite de séquencer l'insert par l'utilisation des amorces universelles M13. Ce clonage est réalisé par des réactifs vendus en Kit sous l'appellation TA cloning (Invitrogen, France). Il est basé sur l'insertion des fragments d'ADN comportant des adénosines aux extrémités 3' au sein d'un vecteur compatible pCR II.



Vecteur pCR II du système TA cloning (Invitrogen, France)

### *D. Séquençage et authentification des gènes codant pour les chaînes $\alpha$ et $\beta$ des molécules HLA-DR*

30  $\mu$ g de plasmide pCR II contenant les fragments d'ADN à séquencer sont dénaturés dans un tampon NaOH 0,4 N pendant 10 minutes à température ambiante puis neutralisés par addition d'acide acétique. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol. Le culot est solubilisé dans 10  $\mu$ l d'eau puis réparti en 12 tubes : 4 pour la séquence sens, 4 pour la séquence antisens et 4 pour la séquence centrale. Une amorce interne a été réalisée pour permettre d'obtenir une séquence intermédiaire couvrant la zone d'incertitude laissée par les séquences sens et antisens. La séquence de l'amorce interne, marquée à la fluorescéine, spécifique pour les chaînes  $\beta$  est la suivante : 5'-GAGTACTGGAACAGC- 3'. Le séquençage est réalisé par la technique de Sanger selon le protocole du kit Autoread (Pharmacia, France). L'analyse des séquences s'effectue automatiquement sur le séquenceur A.L.F. (Pharmacia).

L'authentification des séquences a été effectuée par comparaison avec celles des allèles codant pour les molécules HLA-DR, dont la liste a été publiée lors du 12<sup>ème</sup> Workshop sur le système HLA en 1996.

### *E. Transformation bactérienne*

La transformation des bactéries est réalisée par la technique suivante : une colonie bactérienne est prélevée sur une boîte de Pétri en milieu minimum M9 puis mise en culture durant la nuit dans 5 ml de milieu LB sous agitation à 37°C. Le lendemain, 300  $\mu$ l de cette culture sont prélevés pour ensemercer un nouveau milieu composé de 30 ml de milieu LB, 300  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> à 1M, et 300  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> à 1M sous agitation à 37°C. Après 2 heures environ de culture, la densité optique doit être comprise entre 0,5 et 1. Les cellules sont centrifugées puis reprises dans 2 ml de milieu TFB auxquels sont ajoutés successivement, 84  $\mu$ l de DMSO, 84  $\mu$ l de DTT et à nouveau 84  $\mu$ l de DMSO à intervalles réguliers de 10 minutes. 50 ng du plasmide (ou le produit de ligation) sont incubés 30 min à 4°C avec 200  $\mu$ l de bactéries compétentes. Après un choc thermique à 42°C durant 90 s, les bactéries sont remises en culture dans 800  $\mu$ l

de milieu SOB. Les bactéries sont ensuite étalées en boîte de Pétri sur milieu LB/agar contenant de l'ampicilline à 50 µg/ml et du X-gal à 1mg/ml.

### *F. Amplification et purification des plasmides*

Les colonies positives sont prélevées sur une boîte de Pétri et sont mises en culture dans 50 à 500 ml de milieu LB selon la quantité de plasmide nécessaire. Après une culture durant une nuit sous agitation à 37°C, les bactéries sont centrifugées puis l'ADN plasmidique est extrait des lysats bactériens pour être purifié par la technique QIAGEN (QIAGEN, France), basée sur l'utilisation d'une matrice échangeuse d'ions.

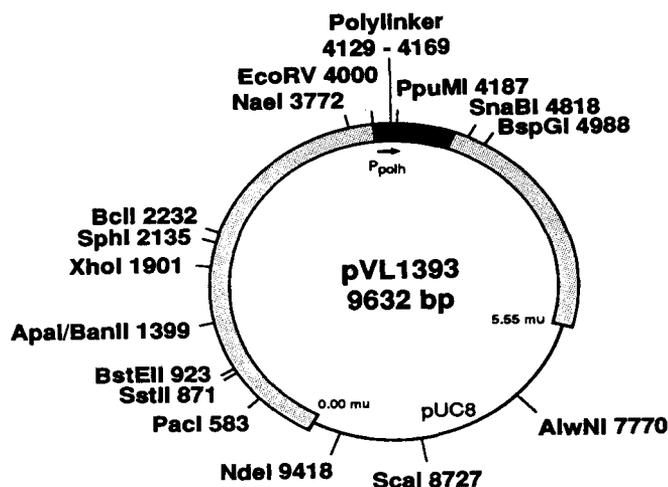
### *G. Extraction des fragments d'ADN codant pour les chaînes $\alpha$ et $\beta$ des molécules de CMH de classe II contenus dans le plasmide pCRII*

Les inserts codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules de classe II en vecteur pCR II sont extraits par coupure au niveau des sites de restriction introduits lors de l'amplification des gènes par PCR (les sites de restriction Bam HI et Xba I pour la chaîne  $\beta$ , Eco RI et Not I pour la chaîne  $\alpha$ ). La coupure par les enzymes de restriction s'effectue de la manière suivante : 20 unités de chaque enzyme de restriction sont ajoutées à 20 µg de vecteur pCR II contenant l'insert dans un volume de tampon final de 25 µl compatible pour l'activité des deux enzymes. Une fois digérés, les inserts sont séparés du reste du plasmide par migration sur gel à 1,5 % d'agarose. La bande correspondant à la taille de l'insert est découpée et le fragment d'ADN est extrait grâce à un kit d'extraction Wizard DNA Clean-up (Promega, France).

## H. Ligation des fragments codant pour les chaînes $\alpha$ et $\beta$ dans le vecteur pVL1393

Le plasmide pVL1393 est un vecteur navette permettant la recombinaison homologue avec le génome du baculovirus. Il contient en effet deux domaines homologues au génome du baculovirus, de part et d'autre du site d'insertion. Il contient un promoteur fort du baculovirus, le promoteur polyhédrique, permettant l'expression de protéines recombinantes en cellules d'insectes. Le plasmide est linéarisé par digestion par des enzymes de restriction pour permettre l'insertion spécifique des fragments d'ADN codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules HLA-DR. 20  $\mu$ g de vecteur pVL1393 sont digérés par 20 unités de chaque enzyme, BamHI et XbaI, pour l'insertion de la chaîne  $\beta$  et, EcoRI et NotI, pour l'insertion de la chaîne  $\alpha$ . Le plasmide linéarisé est séparé du petit fragment excisé par migration en gel d'agarose et extrait du gel par la technique Wizard DNA Clean-up (Promega, France).

Le plasmide pVL1393 linéarisé et l'insert sont ensuite assemblés spécifiquement par ligation. La technique utilisée est basée sur l'utilisation d'une enzyme, la ligase T4, qui permet la ligation de deux fragments d'ADN compatibles. 100 ng de vecteur pVL1393 ouvert sont incubés en présence de 50 ng d'insert de 5 unités de ligase T4 (Promega, France) dans un tampon compatible avec l'activité de l'enzyme commercial et contenant de l'ATP (Promega, France). L'échantillon est incubé une nuit à 12°C.



Carte du plasmide navette pVL1393

## **II. Système d'expression baculovirus/cellules d'insectes**

### *A. Description générale du système d'expression*

Le virus *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis* est le plus communément utilisé pour l'expression de protéines recombinantes en cellules d'insectes. Il permet d'obtenir des taux d'expression importants sur un temps d'infection bref. Classiquement, l'infection virale se déroule en trois phases. La phase 1 correspond à l'entrée du virus dans la cellule hôte par endocytose. Les nucléocapsides migrent du cytoplasme vers le noyau. L'ADN viral suit alors les processus de transcription et de traduction. La phase 2 se situe entre 6 et 24 heures après infection. Elle correspond à la formation de bourgeonnements viraux et à leur libération dans le milieu extracellulaire. Les particules virales ainsi protégées par une membrane plasmique peuvent infecter de proche en proche des cellules saines, en fusionnant avec la membrane de celles-ci. La dernière phase commence 24 heures après infection. Elle correspond à la synthèse d'une matrice homogène, constituée essentiellement d'une seule protéine : la polyhédrine dans laquelle sont assemblées des particules virales. On parle de corps d'occlusion. Pendant cette phase, la formation de bourgeonnements viraux est réduite. En fin de cycle, les particules virales sont libérées dans le milieu extracellulaire, à la suite de la lyse de la cellule.

La polyhédrine, de poids moléculaire 29kDa, constitue le composant majeur des corps d'occlusion. Malgré son abondance, cette protéine n'est pas essentielle *in vitro* pour le cycle de vie du baculovirus, c'est pourquoi la stratégie du système d'expression baculovirus/cellules d'insectes est basée sur le remplacement de la polyhédrine par le transgène.

## B. Cellules d'insectes

La lignée SF9 (Invitrogen, France) est celle utilisée traditionnellement avec le baculovirus. Ces cellules sont dérivées de la lignée IPLBSF-21, provenant de tissus ovariens de *Spodoptera frugiperda* (O'reilly et al, 92). Ces cellules sont adhérentes et se cultivent en milieu de Grace complémenté (Gibco BRL, France) avec 10% de sérum de veau foetal. Les cellules se divisent toutes les 24 heures environ et se repiquent par dilution au 1/5 dans du milieu frais lorsque le tapis cellulaire atteint la confluence, soit  $2-2,5 \times 10^6$  cellules/ml.

L'utilisation des cellules High Five ou BTI-TN-5B1-4 (Invitrogen, France) a été développée par l'Institut Boyce-Thompson (Davis et al, 92 ; Wickham et al, 92). Ces cellules proviennent de tissus ovariens de *Trichoplusia ni*. Ultra-adhérentes, elles sont habituellement cultivées en milieu EXCELL 400 (Gibco BRL, France). Dans cette étude, nous les avons adaptées au milieu X-press développé par Biowhittaker (Belgique), permettant ainsi de rendre leur croissance indépendante de leur ancrage au support et de les cultiver en bioréacteur (voir annexe technique n°2).

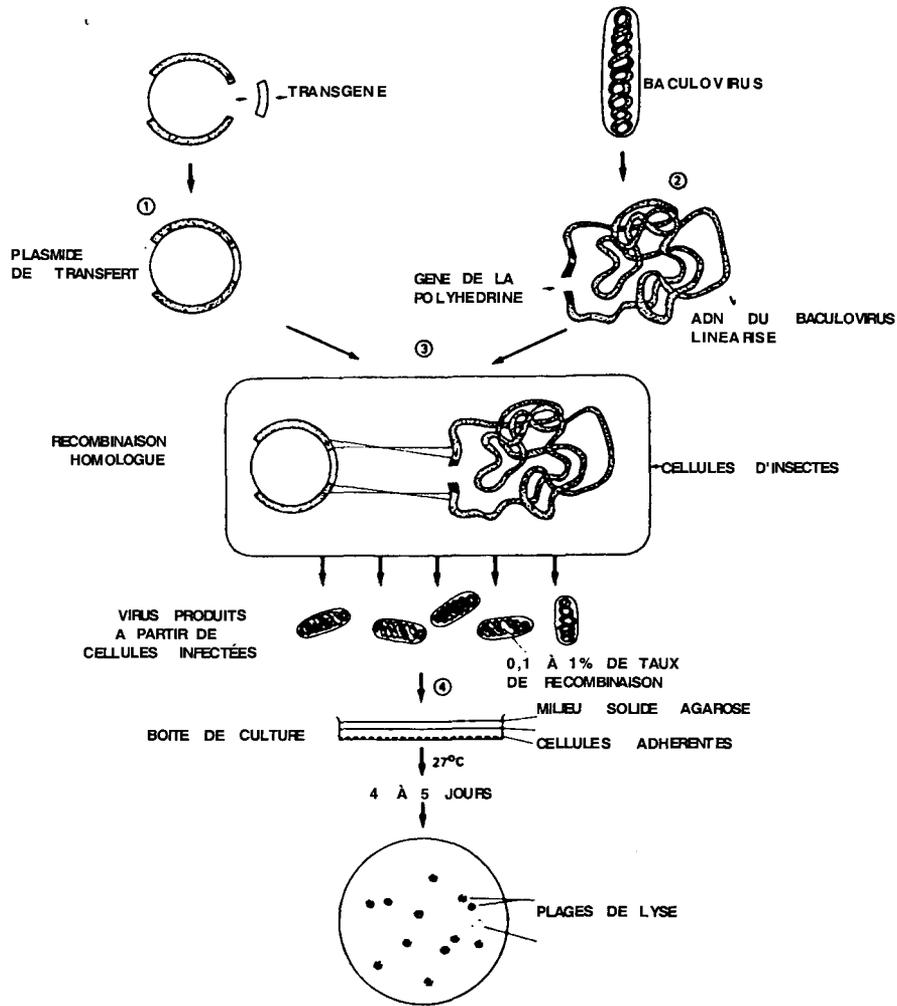
## C. Recombinaison homologue avec le baculovirus

1 $\mu$ g d'ADN linéarisé Baculogold (Pharmingen, France) est mis en présence de 5  $\mu$ g de vecteur navette pVL1393 contenant les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , chacune sous la dépendance d'un promoteur pour la polyhédrine. Le plasmide et l'ADN du baculovirus sont co-transfectés sur un tapis de cellules SF9 à mi-confluence par mise en contact durant 30 minutes. Le surnageant est ensuite remplacé par du milieu de Grace complémenté (Gibco BRL) avec 10% de sérum de veau foetal. L'enrichissement du surnageant en particules virales est ensuite réalisé par passages successifs sur des cellules SF9 en culture.

## *D. Amplification du virus et clonage*

Le surnageant est prélevé 6 jours après co-transfection du plasmide navette contenant les gènes d'intérêt et le génome du baculovirus. Ce surnageant, correspondant au premier passage, sert ensuite à inoculer une nouvelle culture de cellules SF9 à mi-confluence par dilution du surnageant infectieux au 1/50<sup>ème</sup>. L'opération est répétée en général 4 à 5 fois avant d'obtenir un surnageant infectieux fortement enrichi en particules virales.

La recombinaison homologue étant un phénomène aléatoire, l'obtention d'un clone viral caractérisé s'avère indispensable afin de travailler sur une population homogène de virus infectieux. Des cellules SF9 en milieu de Grace complétement sont mises en culture la veille de l'infection à la densité de  $2 \times 10^6$  cellules par boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Le lendemain, le surnageant est éliminé puis remplacé par 1 ml d'une dilution du stock viral de  $10^{-5}$  à  $10^{-9}$ . Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, ce surnageant infectieux est éliminé. Les cellules adhérentes sont ensuite recouvertes par un milieu de culture solide contenant : 50% de milieu de Grace 2X (Gibco BRL), 10% de sérum de veau foetal et 1,9 % d'agarose Agarplaque plus (Pharmingen, France) à basse température de solidification. Après la mise en solution de l'agarose à 85°C, le milieu est refroidi dans un bain-marie à 35°C avant d'en recouvrir le tapis de cellules SF9 infectées. 5 à 7 jours sont nécessaires pour observer l'apparition de plages de lyse. Une plage de lyse est prélevée à l'aide d'une pipette de transfert pour ré-infecter une nouvelle culture. Un nouveau stock viral est préparé par passages successifs. Le clonage est renouvelé une fois afin de s'assurer de la clonalité. Les surnageants d'infection sont stockés à 4°C pendant plusieurs mois. Une fraction est congelée en 10% de DMSO dans l'azote liquide afin de conserver un échantillon à très long terme.



### E. Titration virale par la technique de dilution "point-limite"

La détermination du titre viral par dilution "point-limite" est une méthode statistique impliquant l'inoculation de nombreuses cultures avec différentes dilutions virales. L'estimation du titre s'effectue par détermination de la dilution qui permet d'infecter 50 % des cultures (TCID<sub>50</sub>). Le titre viral, généralement mesuré en nombre de PFU/ml (Plaque Forming Units), est obtenu par conversion directe de la valeur du TCID<sub>50</sub>/ml par un facteur spécifique du couple virus/cellule hôte.

10 µl de cellules SF9 à la densité de  $1 \times 10^5$  cellules/ml sont déposés par puit dans une microplaque de type Terasaki (Nunc, Polylabo, France). Une gamme de dilution du stock viral de  $10^{-5}$  à  $10^{-10}$  est réalisée dans le milieu de Grace complété. 10 µl de chacune des dilutions

du stock viral à tester sont ajoutés dans au moins 10 puits pour que le test ait une valeur statistique. Les signes d'infection se développent en 5 à 7 jours. A ce stade, on compte le nombre de puits où une infection s'est développée afin de déterminer la dilution pour laquelle 50% des puits sont infectés (TCID<sub>50</sub>). Pour convertir ce facteur en nombre de PFU par unité de volume, l'inverse du TCID<sub>50</sub> est multiplié par 0,69 (facteur spécifique au couple baculovirus/cellules SF9) et par le volume en ml dans lequel a été réalisée l'infection (ici,  $2 \times 10^{-2}$  ml). Un stock viral utilisable pour l'expression d'une protéine recombinante doit être généralement supérieur à  $10^8$  PFU/ml.

### *F. Conditions d'expression des molécules de CMH de classe II*

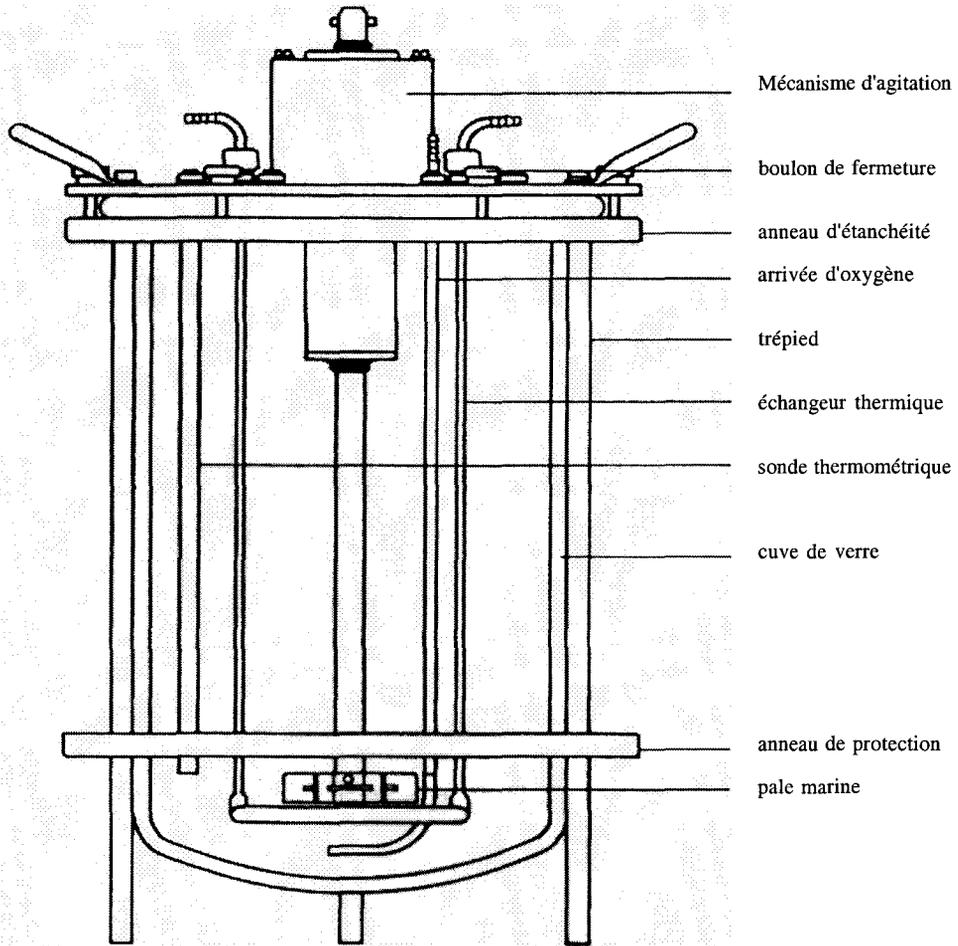
Pour obtenir une expression optimale d'une protéine recombinante en système baculovirus/cellules d'insectes, plusieurs paramètres sont à évaluer, notamment la MOI (Multiplicity of Infection) et le délai après infection pour la récupération des surnageants. La MOI correspond au nombre de particules virales/ml rapporté au nombre de cellules/ml. L'obtention d'une infection synchrone pour l'ensemble des cellules nécessite une MOI significative supérieure à 1. Toutefois, afin de ne pas réduire trop rapidement le métabolisme des cellules d'insectes par l'activité lytique du virus, la valeur de la MOI est le plus souvent inférieure à 10. Ici, nous avons déterminé que, pour l'expression des molécules de HLA-DR, la MOI spécifique doit être supérieure ou égale à 10.

Concernant le temps nécessaire après infection pour récupérer les surnageants, une étude cinétique de la production des molécules de CMH de classe II dans les surnageants de culture est réalisée en ELISA à chaque nouvelle culture massive selon le protocole suivant : un échantillon du surnageant est dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans un tampon carbonate/bicarbonate pH 9,6 afin d'adsorber les protéines en plaques 96 puits. La détection s'effectue par l'utilisation de l'anticorps monoclonal L243 biotinylé et la révélation par le système avidine-péroxydase. Dès que l'on atteint une phase plateau initiale, les surnageants sont récoltés.

## *G. Culture des cellules d'insectes en bioréacteur*

Le système de culture à grande échelle que nous utilisons est un bioréacteur en verre d'une capacité de 15 litres à enceinte simple, entièrement autoclavable (Applikon, France). L'agitation est assurée par une motorisation électrique externe à vitesse variable au sommet du réacteur entraînant une pale marine, ce qui permet l'homogénéisation par effet vortex et limite les forces de cisaillement. La température du réacteur est contrôlée par une ceinture chauffante à l'extérieur et un système de refroidissement par circulation d'eau à l'intérieur d'un échangeur thermique directement en contact avec le volume de culture. Certains paramètres chimiques sont contrôlés par des sondes autoclavables, notamment l'oxygène dissous (O<sub>2</sub>-sensor 19/420, Mettler, Toledo, France), ainsi que le pH (électrode gel Sensor, 420, Mettler). L'oxygénation du milieu est assurée par une canule dont l'extrémité est située dans la partie inférieure et à l'extrémité de laquelle se trouve un embout fritté permettant la dissémination des gaz sous forme de microbulles.

La cuve est entièrement autoclavée avec de l'eau déminéralisée durant 2 heures à 121°C avec une purge lente. L'eau est ensuite retirée de l'enceinte et est remplacée par 4 litres de milieu de culture X-press (Biowhitteker, Belgique). La sonde oxygène est ensuite calibrée dans le milieu de culture par saturation en azote pour faire la mesure du "zéro" et par saturation en air (air qualité médicale, Air Liquide Santé, France) pour le "100 %".



Bioréacteur Applikon d'une capacité de 15 litres en verre

L'utilisation d'air pour l'oxygénation du milieu de culture s'est avérée être problématique pour les cellules High five puisque les taux d'oxygène dissous nécessaires pour le maintien de la phase de croissance exponentielle occasionnent la formation de bulles et de mousse, induisant une mortalité cellulaire importante. Afin d'éviter l'utilisation d'agent anti-mousse, nous avons opté pour l'utilisation d'oxygène pur (oxygène qualité C, pureté 99,5 %, Air liquide, France). De cette manière, le volume de gaz délivré pour maintenir le taux d'oxygène dissous au cours de la croissance est faible, ce qui permet de maintenir la mortalité cellulaire en dessous de 5-10%.

L'initiation de la culture s'effectue par addition, dans le réacteur, de  $1,5 \cdot 10^9$  cellules High Five dans un volume d'1 litre de milieu X-press, permettant d'obtenir une concentration finale de  $2,5 \times 10^5$  cellules/ml (concentration minimale déterminée pour le retour en phase de croissance exponentielle). Cette manipulation s'effectue sous hotte à flux laminaire par le biais

d'une tubulure flexible raccordée directement à la cuve. De cette manière, les prélèvements de culture ainsi que les additions de substrats peuvent s'effectuer stérilement.

### **III. Purification des molécules de CMH de classe II**

#### *A. Purification d'anticorps sur colonne de protéine A-sépharose*

La solution d'ascites ou les surnageants de culture sont ajustés à pH 8 en ajoutant du Tris 1 M pH 8 (environ 1/10<sup>e</sup> du volume de départ). La solution est passée directement sur une colonne de billes de protéines A-sépharose CL-4B (Sigma). Laver la colonne successivement avec 10 volumes de tampon Tris 100 mM pH 8, 10 volumes de Tris 10 mM pH 8. Eluer la colonne avec de la glycine 100 mM pH 3 et collecter la totalité de l'éluat au moment où le pH en sortie de colonne commence à s'acidifier. Une solution de Tris 1 M à pH 8 est ajoutée progressivement pour neutraliser l'éluat. Après passage d'un volume 2 fois supérieur au volume de la colonne, l'échantillon est dialysé dans une membrane Spectrapor 15000 (Polylabo, France) contre un tampon PBS une nuit à 4°C. La concentration protéique de la solution est ensuite déterminée par dosage BCA (voir dosage protéique) pour permettre d'ajuster la solution d'anticorps à 2 mg/ml par dilution ou par concentration sur système Centriplus 100 (Amicon, Millipore, France). La pureté et l'intégrité des anticorps sont évaluées en gel SDS-PAGE en condition réductrice et non réductrice. Les anticorps sont ensuite congelés à -80°C.

## *B. Préparation des colonnes d'immunoaffinité pour la purification des molécules HLA-DR*

### *a. Couplage des anticorps sur billes de sépharose-protéine A*

Les billes de sépharose-protéine A CL-4B (Sigma, France) sont gonflées sur verre fritté en tampon phosphate 10 mM à pH 7,4. Les anticorps sont incubés avec les billes, à raison de 10 mg d'anticorps par ml de gel, 1 heure à température ambiante sous agitation. Centrifuger 10 mn à 1000g à 4°C puis laver 2 fois les billes dans 10 volumes de tampon borate 0,2 M pH 9. Resuspendre à nouveau les billes dans 10 volumes de tampon borate 0,2 M pH 9 et ajouter 5,2 mg de diméthylpimélimidate (Sigma, France) par ml de sodium borate. Agiter 30 minutes à température ambiante puis stopper la réaction par 2 lavages en éthanolamine 0,2 M pH 8. Incuber 2 heures à température ambiante avec un excès d'éthanolamine 0,2 M pH 8,0 puis laver les billes en PBS 3 fois par centrifugations successives. La matrice de billes est coulée dans une colonne et est stockée à 4°C en PBS - NaN<sub>3</sub> 0,02 %.

### *b. Préparation des colonnes non spécifiques*

Faire gonfler 10 g de billes de Sépharose -CNBr CL-4B (Sigma, France) par 200 ml d'HCl 1 mM. Laver en tampon carbonate pH 8,5 puis incuber un nuit à 4°C avec un sérum de lapin. Laver les billes une fois en tampon carbonate puis stopper la réaction par incubation des billes avec un tampon éthanolamine 1 M pH 9 une heure sous agitation. Laver les billes 3 fois en PBS -NaN<sub>3</sub> 0,02 % puis couler cette matrice dans une colonne et la stocker à 4°C.

## *C. Purification des molécules de CMH de classe II solubles*

### *a. A partir du surnageant de culture*

Décongeler 2 litres de surnageant de culture de cellules d'insectes une nuit à 10°C avant passage sur la colonne. Laisser sédimenter les précipités obtenus après décongélation. Ajouter le PMSF à 0,1 mM final et passer les surnageants, directement ou après centrifugation, sur les colonnes en réglant la pompe péristaltique de manière à obtenir un débit de 15 ml /heure.

### *b. A partir des lysats cellulaires*

Reprendre les culots de cellules d'insectes congelées à -80°C dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 + 0,1 mM de PMSF + NaCl 150 mM + NP40 0,5 % à raison de 5 ml pour 10<sup>9</sup> cellules (1g de culot équivaut à 10<sup>9</sup> cellules). Incuber sous agitation 30 minutes à 4°C puis centrifuger 10 minutes à 4°C à 3000g. Récupérer le surnageant puis centrifuger 1 heure à 10<sup>4</sup>g à 4°C. Récupérer les surnageants en prenant soin de ne pas prélever la fraction riche en lipides.

### *c. Lavage des colonnes et élution des molécules de CMH*

Chaque colonne est lavée successivement par 5 volumes de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 + NP40 0,1 % + Iodoacétamide 20 mM (Sigma, France), 2 volumes de tampon MOPS 20 mM pH8 + NaCl 140 mM + Iodoacétamide 20 mM + Déoxycholate 0,1 %, 4 volumes de Tris-HCl 10 mM pH8+ Iodoacétamide 20 mM + Déoxycholate 0,1 %.

Procéder à l'élution avec un tampon Glycine 50 mM pH11,5 + Iodoacétamide 20 mM + Déoxycholate 0,1 % avec un débit de l'ordre de 2 ml/min. Attendre le changement de pH en sortie de colonne et dès que le pH vient à augmenter, recueillir la fraction. Après collecte d'un volume équivalent à celui de la colonne, neutraliser l'éluat avec un tampon glycine 2 M pH 2 en prenant soin de ne pas descendre à un pH inférieur à 6-7 (risque de précipitation du

Déoxycholate). Rincer les colonnes avec un tampon PBS + NaN<sub>3</sub> 0,02 % et remettre les billes en suspension une fois pour décompacter la matrice. Stocker à 4°C.

Dialyser l'éluat contre un tampon PBS en utilisant des boudins de dialyse SpectraPor 6 avec un seuil de coupure 15000 (Sigma, France) une nuit à 4°C. Concentrer les échantillons sur Centricon 30 (Millipore, France) en centrifugeant à 1000g à 4°C durant 45 minutes environ. Faire un dosage protéique ainsi qu'une analyse en gel SDS-PAGE (conditions dénaturante et réductrice) avec une gamme étalon d'anhydrase carbonique (Biorad, France) de 2 mg/ml à 0,1 mg/ml, suivi d'une mesure densitométrique. Ajouter un cocktail d'inhibiteurs de protéases PMSF 1 mM, Leupeptine, Pepstatine, EDTA puis congeler les CMH à -80°C jusqu'à leur utilisation.

## IV. Techniques générales de biochimie, de chimie et de spectroscopie

### A. *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS*

La technique d'électrophorèse des protéines en gel d'acrylamide utilisée dans cette étude est basée sur un système développé par Laemmli en 1972 (Laemmli et al, 72). Elle repose sur l'utilisation d'un tampon discontinu appelé tampon Ornstein-Davis en présence du détergent anionique le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS). Ainsi, le détergent hydrophobe se fixe sur la protéine selon un rapport moyen de 1,4 g de SDS pour 1 g de polypeptide et la charge intrinsèque du polypeptide devient négligeable par rapport aux charges négatives apportées par le détergent. Les différents complexes SDS-polypeptides ont donc une densité de charges équivalente, et migrent dans la matrice d'acrylamide uniquement en fonction de la taille du polypeptide. Cette technique offre une excellente résolution pour la séparation de mélanges complexes de protéines et permet de déterminer avec une bonne précision une valeur approchée du poids moléculaire théorique d'une protéine lorsque les échantillons ont été dénaturés par chauffage à 100°C et après réduction des ponts disulfures. Toutefois, des variantes peuvent être apportées à cette technique, notamment dans le cas où l'on désire analyser des complexes protéiques associés de manière non-covalente. Dans ce cas, la migration s'effectue en fonction de la globularité de la protéine ainsi que de sa flexibilité en présence de SDS.

Préparer le gel de séparation en ajoutant à la solution d'acrylamide à 12,5 %, 5 µL de TEMED pour 10 ml de solution et 33 µl de persulfate d'ammonium à 10 %. Couler la solution entre les plaques de verre et ajouter une pellicule d'isobutanol saturé en eau pour lisser la surface. Préparer le gel de concentration en ajoutant, à la solution d'acrylamide à 5 %, 4 µL de TEMED pour 5 ml de solution et 40 µl de persulfate d'ammonium à 10 %. Couler cette solution après

polymérisation du gel de séparation et insérer un peigne permettant la formation des dents pour le dépôt des échantillons. Après polymérisation du gel de concentration, la migration peut être effectuée dans un tampon d'électrode composé de 6 g Tris-base, 28,8 g de glycine et 20 ml de SDS à 10 % pour 2 litres d' eau. Un échantillon contenant une gamme étalon de protéines de poids moléculaires connus est utilisé (Biorad, France). Le courant appliqué pour un mini-gel type Biorad est de 100 à 150 volts pour un ampérage de 50 mA maximum pendant 1 à 2 heures.

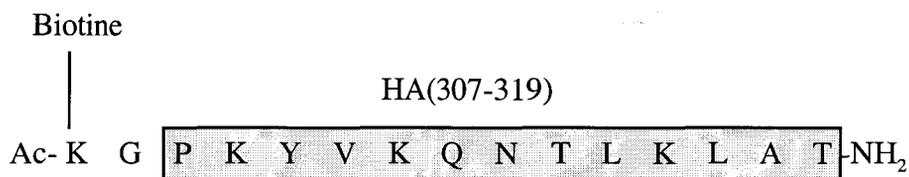
## *B. Dosage protéique*

Le dosage est effectué par la méthode BCA (Biorad) basée sur l'utilisation d'acide bisynchroninique. Une gamme étalon d'albumine est préparée à partir d'une solution à 2 mg/ml (Sigma, France) : 2, 1, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 mg/ml H<sub>2</sub>O. Dans une plaque 96 puits, déposer en triplicate 10 µl de l'échantillon pur à doser, dilué au 1/5 et 1/10 ainsi qu'une gamme étalon d'albumine. Ajouter 200 µl de réactif BCA et agiter doucement la plaque. Incuber 30 mn à 37°C et effectuer la lecture à 550 nm.

## *C. Mesure des paramètres de liaison de peptides sur les molécules de CMH de classe II*

### *a. Mesure de l'affinité de peptides de synthèse pour les molécules de CMH de classe II (IC<sub>50</sub>)*

La mesure d'affinité s'effectue dans un test de compétition hétérologue entre un peptide de référence et le peptide à tester. Le peptide de référence est dans notre cas le peptide biotinylé HA(307-319). Ce peptide a été modifié en position N-terminale par l'addition d'une biotine sur la chaîne latérale d'une lysine espacée de la séquence épitopique naturelle par une glycine. Cette construction s'est avérée être celle qui donne la meilleure sensibilité de détection.



Peptide rapporteur HA<sub>biot</sub> pour le test de compétition

Le peptide HA<sub>biot</sub> est utilisé à la concentration standard de 0,1 µM. Les peptides compétiteurs sont utilisés le plus souvent aux concentrations suivantes : 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 µM. Les molécules de classe II sont utilisées à la concentration de 10 µg/ml.

Préparer en PBS un mélange de peptide rapporteur à 0,2 µM final et de peptide compétiteur de 200 à 0,002 µM par dilution de 10 en 10. Ajouter 10 µl de chacun de ces mélanges à 10 µl de solution contenant les molécules de CMH HLA-DR1 purifiées à la concentration de 20 µM. Incuber 48 heures à 37°C. La veille de la révélation, adsorber l'anticorps monoclonal L243 à la concentration de 1 µg/ml sur les plaques 96 puits en tampon carbonate/bicarbonate pH 9.6, en déposant 200 µl par puit. Incuber la nuit à 4°C. Laver les plaques 2 fois en tampon PBS-Tween. Ajouter 200 µl de chaque échantillon à analyser après dilution au 1/40<sup>ème</sup> dans du PBS en triplicate. Incuber 2 heures à 37°C. Laver 5 fois en PBS-Tween. Ajouter 150 µl de streptavidine couplée à la peroxidase (Interchim, France) à la concentration de 0,1 µg/ml et incuber 30 minutes à 37°C. Laver 5 fois en PBS-Tween. Procéder à la révélation à l'orthophényldiamine (OPD) , laisser développer la coloration 30 minutes puis neutraliser la réaction 30 minutes à l'acide chlorydrique 2N. Effectuer la lecture des plaques à 492 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la fixation du peptide rapporteur.

*b. Mesure de la thermostabilité des complexes*

La formation des complexes stables est réalisée par incubation de 80 µg de CMH purifiés avec une concentration importante de peptide synthétique (de 100 à 500 µM). Après 96 heures d'incubation à 37°C, les échantillons sont dialysés une nuit à 4°C contre un tampon PBS à l'aide

d'une membrane de dialyse SpectraPor 6 avec un seuil de coupure de 15000 Da (Polylabo, France). La dialyse des échantillons de volume inférieur à 100  $\mu$ l est effectuée dans le capuchon d'un tube Eppendorf. Les échantillons sont ensuite répartis en 8 tubes et chacun des tubes est incubé 10 minutes à différentes températures comprises entre 40 et 85 °C. Les échantillons non chauffés, non réduits sont ensuite analysés en gel SDS -PAGE à 12,5 % d'acrylamide. L'analyse quantitative des résultats s'effectue par lecture densitométrique par le système Biorad Molecular Analysis I. Les résultats sont exprimés en pourcentage de stabilité selon le calcul suivant :  $DO \text{ (forme stable)} / [DO \text{ (forme stable)} + DO \text{ chaîne } \alpha + DO \text{ chaîne } \beta]$ .

### *c. Mesure de la demi-vie des complexes stables*

La formation des complexes stables est réalisée par incubation de 10  $\mu$ g de CMH purifiés avec une concentration importante de peptide synthétique (de 100 à 500  $\mu$ M) dans un volume final de 100  $\mu$ l. Après 96 heures d'incubation à 37°C, les échantillons sont dialysés une nuit à 4°C contre un tampon PBS à l'aide d'une membrane de dialyse SpectraPor 6 avec un seuil de coupure de 15000 Da (Polylabo, France). La dialyse d'échantillon de volume inférieur à 100  $\mu$ l est effectuée dans la capuchon d'un tube Eppendorf. Les échantillons sont ensuite incubés avec 20  $\mu$ M de peptide HA<sub>biot</sub> à 37°C. A intervalle de temps régulier, un échantillon de 10  $\mu$ l est prélevé puis congelé immédiatement à -80°C. La dissociation des peptides est évaluée en estimant par la quantité de site de liaison libéré et devenu accessible au peptide HA<sub>biot</sub>. La fixation du peptide HA<sub>biot</sub> est analysée en test ELISA selon la technique décrite pour le test de compétition.

## *D. Synthèse peptidique*

### *a. Principe général*

Elle se déroule de manière récurrente et est décrite sur le schéma de la page suivante: la fonction carboxylique du premier acide aminé en position C-terminale est protégée par ancrage covalent au support solide. Cette protection est dite permanente car elle subsistera jusqu'à la fin de la synthèse. Elle est compatible avec toutes les réactions ultérieures permettant de former le

peptide. La fonction amine est protégée par une protection dite temporaire qui est supprimée avant chaque cycle de couplage. Les chaînes latérales sont protégées par des protections permanentes ou semi-permanentes, stables dans les conditions de synthèse. Ces fonctions sont déprotégées lors de la séparation du peptide de la résine

Pour la majorité des peptides utilisés dans ce travail, les synthèses ont été effectuées selon la stratégie Boc/benzyle, en effectuant des doubles couplages avec déprotection par le TFA. Les couplages ont été réalisés en présence d'agents activants (HOBt/HBTU, 0,45 M) avec neutralisation *in situ* par la DIEA (diisopropyléthylamine) (Schnölzer *et al*, 1992). La neutralisation *in situ* permet de limiter la racémisation et augmente significativement l'efficacité des couplages en diminuant l'agrégation de la chaîne peptidique en cours de synthèse. Chaque double couplage a été suivi d'un *capping* systématique par l'anhydride acétique évitant ainsi la formation de peptides comportant des délétions.

### *b. Purification et contrôles*

Les peptides subissent différentes étapes de contrôle et de purification qui s'organisent généralement dans l'ordre suivant : purification par RP-HPLC préparative, contrôle par deux méthodes orthogonales d'analyse (RP-HPLC et électrophorèse capillaire) du degré de pureté du peptide, confirmation de l'identité du peptide par spectrométrie de masse.

#### \* RP-HPLC préparative

Les peptides que nous avons synthétisés ont été élués par un gradient de concentration croissant en acétonitrile maintenu à pH acide par l'acide trifluoroacétique. Cet acide volatil sert de contre-ion et joue un rôle important dans la séparation ; il sera facilement éliminé par lyophilisation. L'éluat est détecté par spectrométrie ultraviolette. La détection est réalisée à 215 nm. Les peptides ont été solubilisés dans du DMSO ou de l'acide acétique purs, puis dilués avant injection.

#### \* Spectrométrie de masse

Les spectres de masse sont enregistrés sur un spectromètre à désorption de plasma (PDMS) couplé à un système d'analyse à temps de vol (TOF), de type BIO-ION 20. Les ions

formés sont accélérés grâce à une différence de potentiel de 15 KV et séparés dans un tube où règne un vide poussé. Leur temps de vol est mesuré et est proportionnel à leur masse.

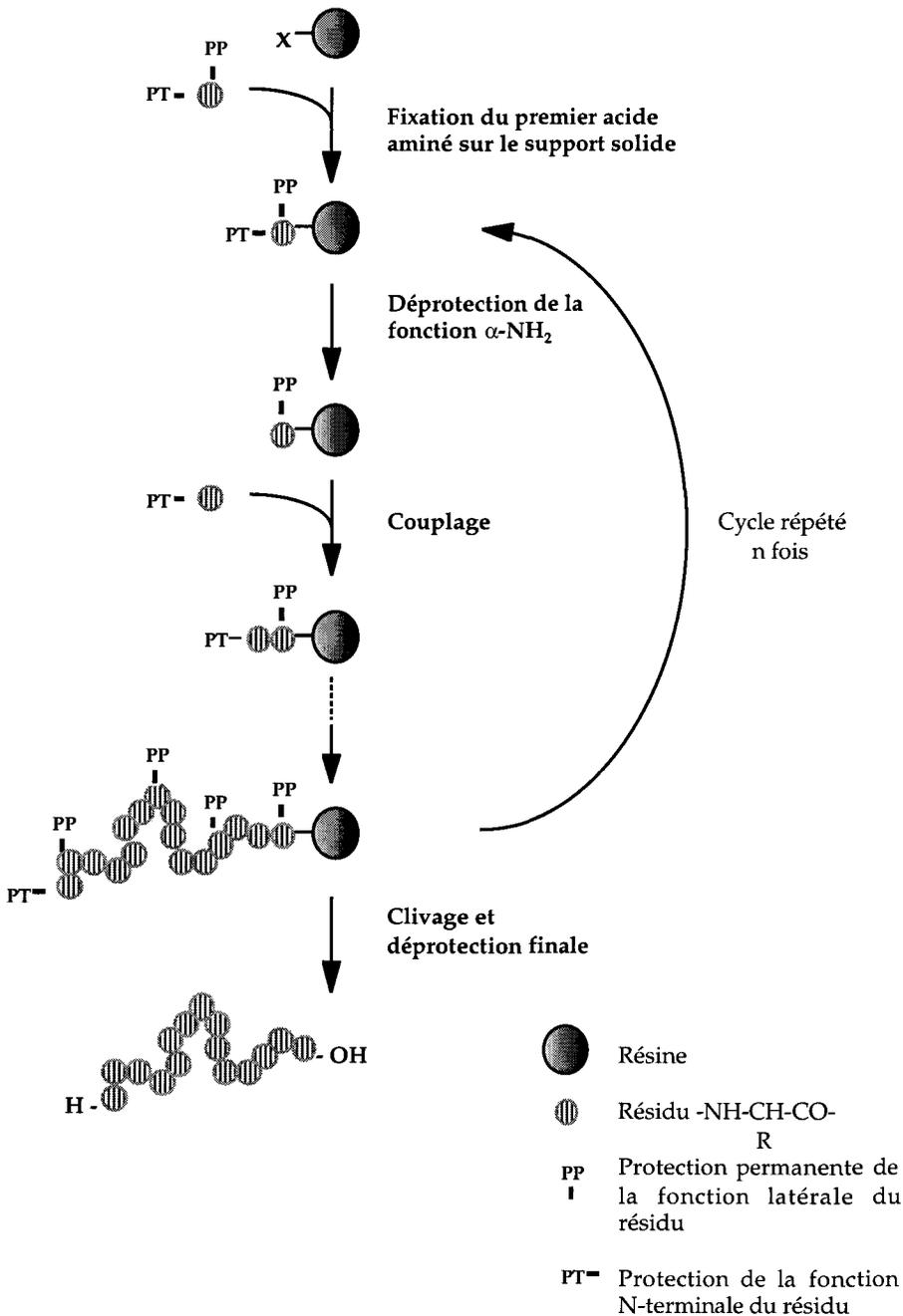


Schéma général de la synthèse des peptides en phase solide

### *E Dichroïsme circulaire*

L'analyse en dichroïsme circulaire (DC) a été réalisée sur un spectromètre U.V. Jobin-Yvon CD-6 couplé à un bain thermostaté. Les mesures ont été réalisées dans un cellule de 0,05 cm.

Concernant les études de thermostabilités (partie résultats III), les spectres ont été réalisés entre 190 et 260 nm avec un pas de 0,5nm. La gradient de température a été réalisé de la manière suivante : la température est augmentée de 10 en 10°C à partir de 25°C. Après chaque montée en température, un temps d'équilibration de 1 minutes est prévu avant de lancer la mesure du spectre. Cette analyse a été réalisée avec une concentration en molécule de CMH de classe II HLA-DR1 de 300 µg/ml avec ou sans préincubations les différents peptides puis dialysé contre un tampon PBS.

Concernant la partie IV des résultats, les molécules de CMH de classe II HLA-DR1 ont été analysées en tampon phosphate 10mM à la concentration de 250 µg à 300µg/ml. Les spectres ont été réalisés de 190 à 260 nm avec un pas de 0,5nm à 37°C.

Les valeurs moyennes pour 5 spectres a été exprimée ellipticité molaire par résidus représentant  $10^{-3}$  (deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>)

## V. Composition des tampons

### **PBS 10X**

Ajouter 18 g de NaCl par litre de Tampon phosphate 0,1 M. Conserver à température ambiante.

### **Tampon phosphate 1 M**

Mélanger 1 volume de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1 M) à 3 volumes de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (1 M)

### **Tampon de coloration**

Mélanger 0,25 % de bleu de commassie R-250 , 50 % de méthanol et 10 % d'acide acétique et 40 % d'eau déminéralisée. Après électrophorèse, transférer le gel dans cette solution 2 heures à une nuit. La sensibilité de cette technique est de l'ordre de 0,1-0,5  $\mu\text{g}$  par piste.

### **Tampon de décoloration**

Mélanger 2,5 litres de méthanol et 700 ml d'acide acétique glacial. Ajuster le volume à 10 litres avec de l'eau déminéralisée. Conserver à température ambiante.

### **Tampon d'électrophorèse (10X)**

Dans 800 ml d'eau, ajouter 30,3 g de tris-base, 144,2 g de glycine et 100 g de SDS. Ajuster le pH à 8,3 et compléter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée. Conserver à température ambiante.

### **Solution pour gel de séparation à 12,5 %**

Mélanger 31,25 ml d'une solution commerciale d'acrylamide à 40 % (Biorad), 16,67 ml d'une solution commerciale de bis-acrylamide à 2 %, 25 ml d'une solution de Tris à pH 8,8, 26,08 ml d'eau déminéralisée et 1 ml de SDS à 10 %.

### **Solution pour gel de concentration à 5 %**

Mélanger 6,25 ml d'une solution commerciale d'acrylamide à 40 % (Biorad), 3,33 ml d'une solution commerciale de bis-acrylamide à 2 %, 12,5 ml d'une solution de Tris à pH 6,8, 27,42 ml d'eau déminéralisée et 0,5 ml de SDS à 10 %.

## **Annexe 1**

# **Construction des baculovirus recombinants pour l'expression des molécules HLA-DR solubles**

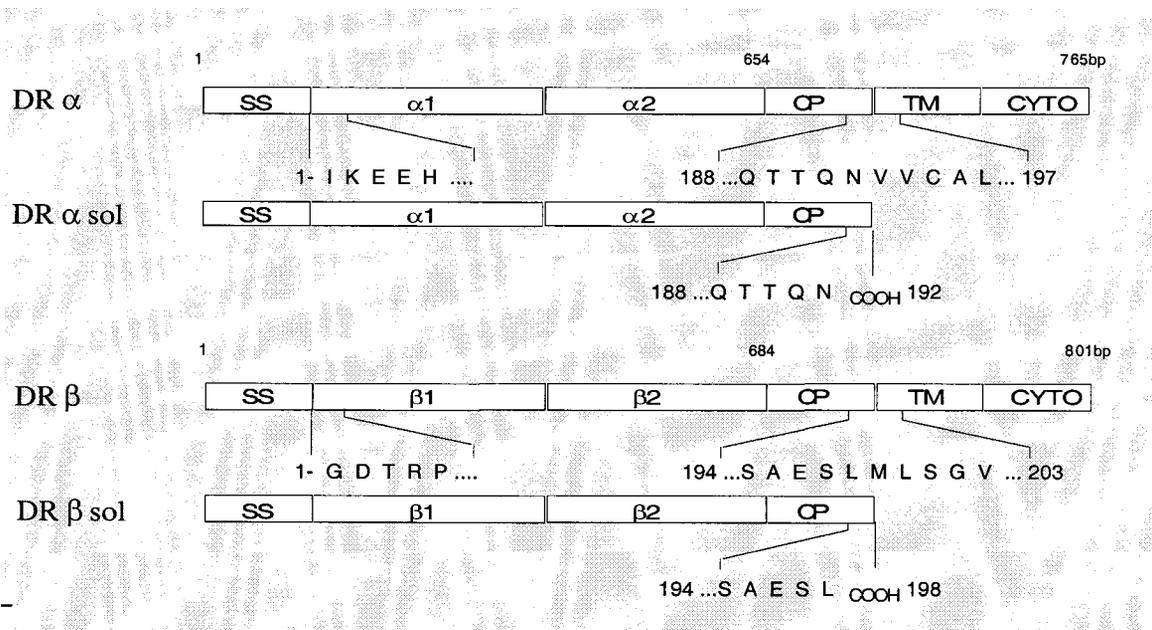
### *A.Introduction*

Notre objectif est de produire un panel de molécules de CMH de classe II représentatif, en terme de distribution, d'un groupe ethnique. Les allèles de molécules de CMH de classe II que nous avons sélectionnés sont les suivants : HLA-DR1, DR2, DR3, DR4, DR7, DR11, DR51, DR52, DR53. Ils permettent de couvrir environ 70 % de la population européenne-caucasienne. La construction des baculovirus recombinants pour l'expression de ces différentes molécules de CMH s'effectue sur la base des travaux de Stern et Wiley. Cette construction nécessite la réalisation d'un plasmide navette possédant des domaines homologues au baculovirus et permettant une recombinaison homologue avec le génome du virus pour le transfert du gène d'intérêt (voir matériel et méthodes). Les molécules de CMH de classe II étant des protéines hétérodimériques, nous avons opté pour la construction d'un baculovirus recombinant pour les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans un premier temps, nous avons procédé à l'amplification et au clonage des gènes codant pour les domaines extracellulaires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  afin de procéder à leur authentification par séquençage. La construction du plasmide navette contenant les gènes codant pour les deux chaînes a été réalisée.

## B. Amplification des gènes codants pour les domaines extracellulaires des chaînes $\alpha$ et $\beta$

### a. Sélection des amorces pour l'amplification des gènes codants pour les chaînes $\alpha$ et $\beta$ tronquées

Le clonage des fragments d'ADN codant pour les chaînes tronquées des parties transmembranaires et intracellulaires (domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour la chaîne  $\alpha$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$  pour la chaîne  $\beta$ ) a été effectué par RT-PCR. Les ARNm correspondants aux gènes d'intérêt ont été obtenus à partir de lymphocytes B transformés par le virus d'Epstein-Barr. Ces cellules génotypées pour les gènes du HLA ont la particularité d'être homozygotes pour certains allèles ou haplotypes du CMH de classe II. Ces cellules font partie d'une collection détenue par différents laboratoires faisant partie de l'organisation internationale WHO.



**Figure 1** : Structure des molécules de CMH de classe II HLA-DR et des molécules recombinantes exprimées en cellules d'insectes. (SS, séquence signal ; CP, peptide de connexion ; TM, partie transmembranaire ; CYTO, domaine cytoplasmique)

L'élimination des domaines trans-membranaires et intra-cellulaires est réalisée par introduction, au sein des amorces de PCR antisens, d'un codon "stop". Concernant la chaîne  $\alpha$ , le codon stop est introduit au niveau du codon correspondant au résidu Val<sub>193</sub>. Pour la chaîne  $\beta$ , le codon stop est introduit au niveau du codon correspondant au résidu Met<sub>199</sub> (Fig 1).

Compte-tenu du polymorphisme des chaînes  $\beta$ , l'amorce sens du côté 5', contenant le codon start, a été choisie sur la base d'une séquence consensus obtenue par alignement des séquences provenant des différents allèles (Fig 2).

Amorce sens Dr $\beta$

BamHI                      Start

5' GACTTGGATCCTATAAATATGGTGTGCTGAAGCTCCT 3'

Tm(%GC)= 65,4°C

Amorce antisens Dr $\beta$

XbaI                      Stop prématuré (682)

5' ACAGCTCTAGATTACTTGCTCTGTGCAGATTCAGA 3'

Tm(%GC)= 56,9°C

Amorce sens DR  $\alpha$ 1\*0101

EcoRI                      Start

5' CTGAGAATTCAAATGGCCATAAGTGGAGTCCT 3'

Tm(%GC)= 58,1°C

Amorce antisens DR  $\alpha$ 1\*0101

Not I                      Stop prématuré (652)

5' CTGAGCGGCCGCACTTAGTTCTCTGTAGTCTCTGG 3'

Tm(%GC)= 64,1°C

**Figure 2** : Séquence des amorces utilisées pour le clonage des fragments des gènes codant pour les domaines extracellulaires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules HLA-DR.

Après l'amplification par RT-PCR, les fragments de PCR sont sous-clonés dans un plasmide intermédiaire (pCR II, TA cloning). Un séquençage de l'insert est alors effectué de manière systématique jusqu'à obtention d'une séquence d'ADN complètement authentifiée par comparaison avec celle obtenue dans la nomenclature publiée lors du "12th international histocompatibility workshop" en 1996. Les différents fragments, correspondant aux chaînes d'intérêts clonées, sont présentés dans le tableau I.

<b>WSWO</b>	<b>Origine</b>	<b>génotype</b>	<b>spécificité sérologique</b>
9003	KAS116	DR $\alpha$ 1*0101	DR1
9003	KAS116	DR $\beta$ 1*0101	DR1
9013	SCHU	DR $\beta$ 1*1501	DR15(2)
9019	DUCAF	DR $\beta$ 1*0301	DR17(3)
9025	DEU	DR $\beta$ 1*0401	DR4
9036	SPOO10	**	**
9052	DBB	DR $\beta$ 1*0701	DR7
9019	DUCAF	DR $\beta$ 4*0202	DR52
9052	DEU	DR $\beta$ 4*0101	DR53

**Tableau I** : Liste des gènes clonés et authentifiés par séquençage, codant pour les parties extracellulaires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de différentes molécules HLA-DR (\*\* non authentifié).

### *b. Construction du plasmide navette pBacDRx*

Les molécules de CMH de classe II sont des protéines hétérodimériques constituées de deux chaînes associées de manière non covalente. L'association des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  nécessite leur co-expression au niveau cellulaire afin d'obtenir un appariement fonctionnel de celle-ci. De ce fait, contrairement à l'approche utilisée par Stern et Wiley consistant à co-infecter les cellules d'insectes avec deux baculovirus recombinants différents, codant séparément pour l'une des deux chaînes, nous avons opté pour la construction d'un unique baculovirus recombinant pour les deux chaînes. La stratégie que nous avons choisie pour la construction de ce vecteur d'expression nécessite l'obtention d'un plasmide navette, recombinant pour les deux chaînes, qui comporte deux domaines homologues au baculovirus afin de permettre une recombinaison homologue.

La construction de ce plasmide navette a été réalisée en trois étapes (Fig.3) :

1 - Le fragment codant pour la chaîne  $\alpha$ 1\*0101 est inséré dans le vecteur pVL1393 sous la dépendance du promoteur de la polyhédrine et celui codant pour la chaîne  $\beta$  est inséré dans un autre plasmide pVL1393 sous la dépendance du même promoteur.

2 - Le fragment contenant la chaîne  $\beta$  et son promoteur est excisé du plasmide pVL1393-DR $\beta$  par coupure au niveau du site Eco RV et Bgl II. L'extrémité cohésive, générée par la coupure de l'enzyme de restriction Bgl II, est "remplie" par la polymérase "Klenow". On obtient de cette manière une extrémité à bout franc.

3 - Ce fragment est ensuite introduit par ligation dans le plasmide contenant la chaîne  $\alpha$  au niveau du site de restriction à coupure franche Eco RV.

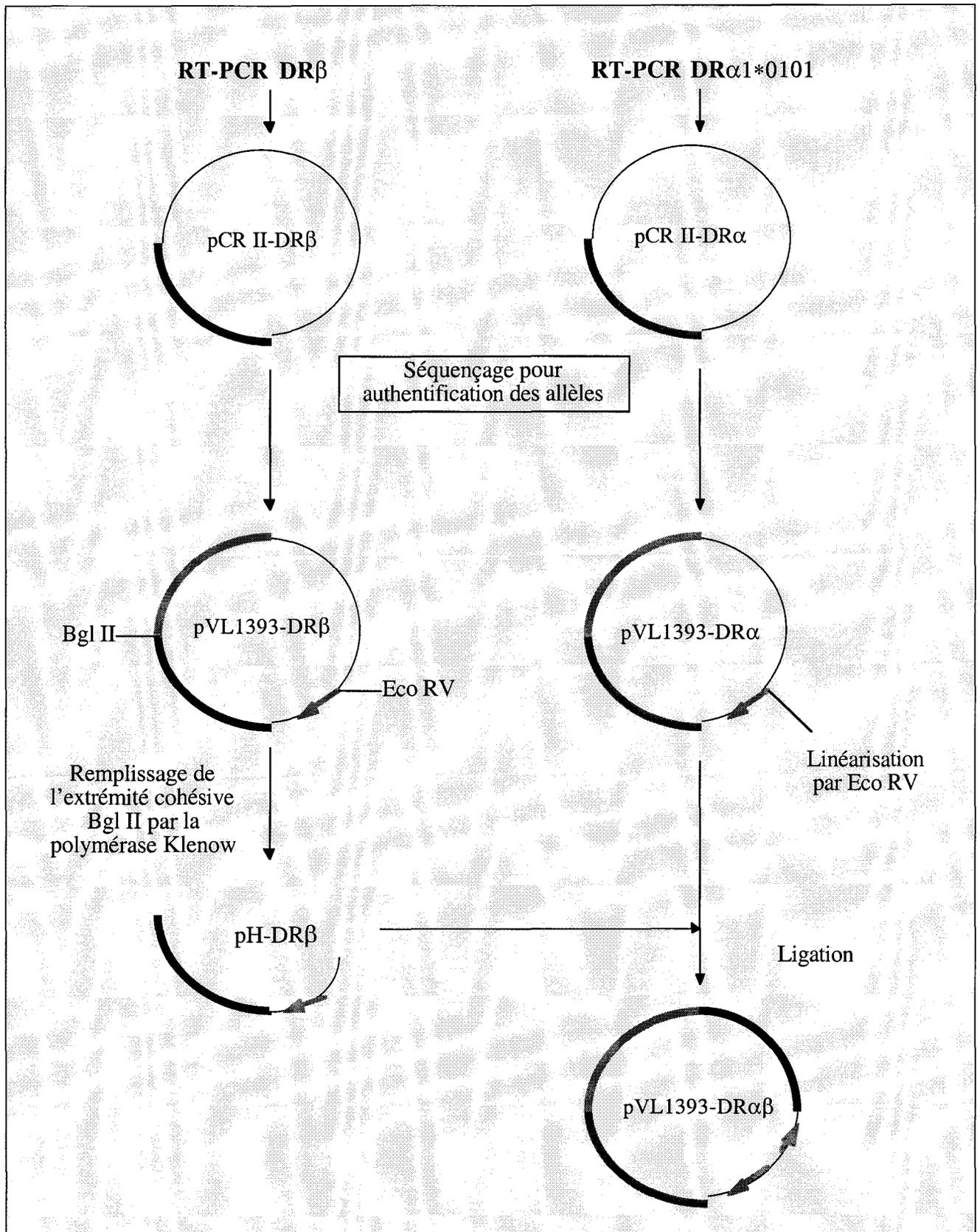
Les deux gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  se trouvent ainsi au sein d'un même vecteur navette.

### *c. Recombinaison homologue*

Le système d'obtention du baculovirus recombinant est basé sur un processus de recombinaison homologue entre le plasmide pVL1393-DR $\alpha\beta$  avec le génome d'un baculovirus linéarisé. Cet ADN viral (AcMNPV), commercialisé par la société Pharmingen, comporte une délétion létale empêchant la formation de particule virale qui peut être compensée au cours de la recombinaison homologue lors du transfert du ou des transgènes.

Cette étape est réalisée par simple co-transfection des cellules d'insectes par les deux fragments d'ADN. La recombinaison a lieu au niveau de la cellule et permet la formation de particules virales ayant intégré les deux transgènes.

Après amplification et clonage d'un virus capable de produire la molécule de CMH de classe II fonctionnelle, les fragments codant pour les séquences des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont à nouveau contrôlés, afin de s'assurer que les amplifications successives du virus n'ont pas introduit de mutations.



**Figure 4 :** Construction du plasmide navette pVL 1393-DR $\alpha\beta$  contenant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dépourvues des domaines codant pour les parties transmembranaire et intracellulaire.

## Annexe n°2

# Optimisation des conditions d'expression des molécules de CMH HLA-DR en cellules d'insectes :

## Adaptation des cellules BTI-TN5B1-4 (High Five) pour la culture en bioreacteur

### *A Introduction*

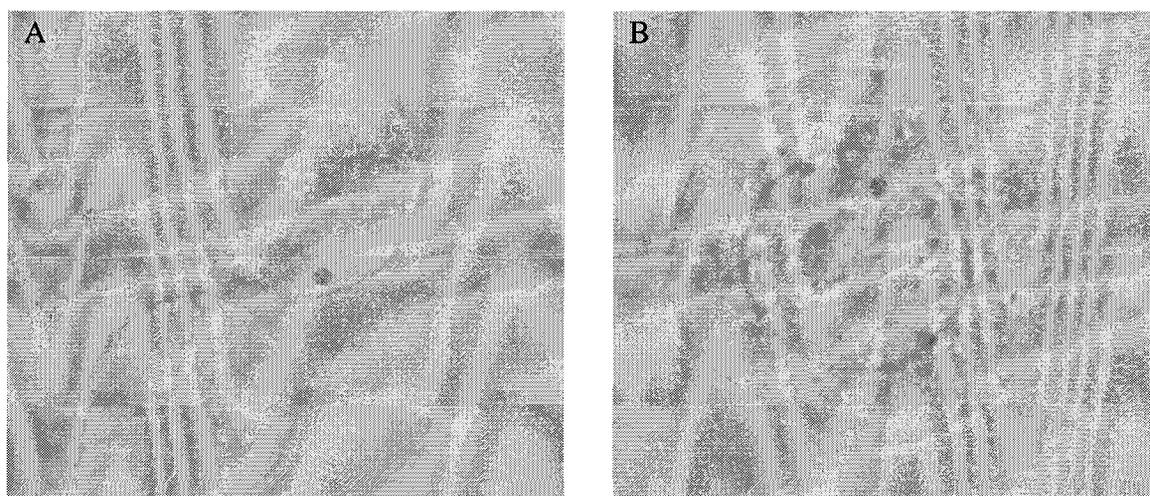
Classiquement, les lignées SF9 ou SF21 de *Sprodoptera frugiperda* sont utilisées pour l'expression de protéines avec le baculovirus. Ce système d'expression est largement utilisé actuellement car il permet d'obtenir des taux d'expression élevés de protéines recombinantes. Alors que la production de  $\beta$ -galactosidase peut atteindre 100 mg/l de culture, les quantités de molécules de CMH de classe II HLA-DR, après purification, sont inférieures à 1 mg/l de culture. Ce rendement de production relativement faible est vraisemblablement lié au rendement d'interaction des chaînes  $\alpha$  avec les chaînes  $\beta$  au niveau intracellulaire, nécessaire à la formation d'hétérodimères fonctionnels. En effet, d'un allèle de CMH de classe II à l'autre, on observe des variations importantes du taux d'expression en cellules d'insectes pouvant aller jusqu'à l'impossibilité totale de former les dimères ( $\alpha\beta$ ). Face à ce problème de rendement d'expression et compte-tenu des quantités de molécules de CMH de classe II nécessaires pour nos études, nous avons cherché à développer un système d'expression en cellules d'insectes offrant des taux d'expression supérieurs et parallèlement à augmenter notre échelle de production par utilisation d'un bioréacteur.

Récemment, la lignée de cellules d'insectes BTI-TN5B1-4 (High Five) a été caractérisée pour ses capacités à produire des taux de protéines recombinantes supérieurs à ceux obtenus dans les systèmes

d'expression utilisant la lignée SF9. Les cellules High Five permettent la production de 26 fois plus de phosphatase alcaline humaine et 28 fois plus de  $\beta$ -galactosidase, comparativement aux cellules SF9. Néanmoins, l'inconvénient majeur de ces cellules High-Five est leur ultra-adhérence, caractéristique rendant leur culture en fermenteur difficile voire impossible, même avec l'utilisation de systèmes micro-porteurs. Des tentatives ont été menées pour adapter ces cellules à la culture en fermenteur soit par une adaptation sur de très longues périodes au système d'agitation, soit par l'utilisation de polyanions afin de rendre leur croissance indépendante de l'ancrage sur un support. Dans cette étude, nous proposons une méthode alternative permettant d'adapter directement les cellules High Five à la culture en suspension par l'utilisation d'un milieu défini, sans sérum : le milieu X-press. Ce milieu de culture a été développé par la société Biowhittaker pour la culture de cellules d'insectes, en particulier les cellules SF9. Il s'est avéré être le seul, parmi les différentes formulations que nous avons testées, capable de modifier le phénotype des cellules High Five en rendant leur croissance indépendante de l'ancrage au support. Nous avons donc défini pour cette lignée, les conditions opératoires permettant l'expression optimisée de molécules de CMH de classe II (courbe de croissance, MOI optimale, densité cellulaire à l'infection et comparaison des taux d'expression avec le système SF9), puis nous avons déterminé les conditions de culture en fermenteur : densité cellulaire initiale, paramètres mécaniques, biochimiques (oxygénation) ainsi que les paramètres relatifs à l'expression des molécules de CMH de classe II recombinants (TOI, temps de récupération des surnageants après infection) .

## B. Résultats

Les cellules High Five (BTI-TN5B1-4) ont été obtenues auprès de la société Invitrogen. Elles sont habituellement cultivées en milieu Excell. Après décongélation, elles sont directement adaptables au milieu X-press. Il suffit de 2 à 3 passages pour qu'un changement phénotypique soit observable sur la totalité des cellules. Elles perdent leur adhérence au support et se cultivent alors comme des cellules en suspension. Le temps moyen de doublement est de 16 heures, et la densité maximale peut atteindre  $3,5 \times 10^6$  cellules /ml. Les cellules High Five adaptées à la culture en suspension évoluent sous forme de cellules individualisées. Elles ont une taille importante, de 30 à 35  $\mu\text{M}$  de diamètre, environ deux fois supérieure à celle des cellules SF9. Les signes d'infection sont aisément visibles par l'augmentation importante de la taille et de la densité optique du noyau (Figure 1).



**Figure 1** : Aspect des cellules High Five adaptées au milieu X-press avant (A) et après infection (B) (J+4) par le baculovirus.

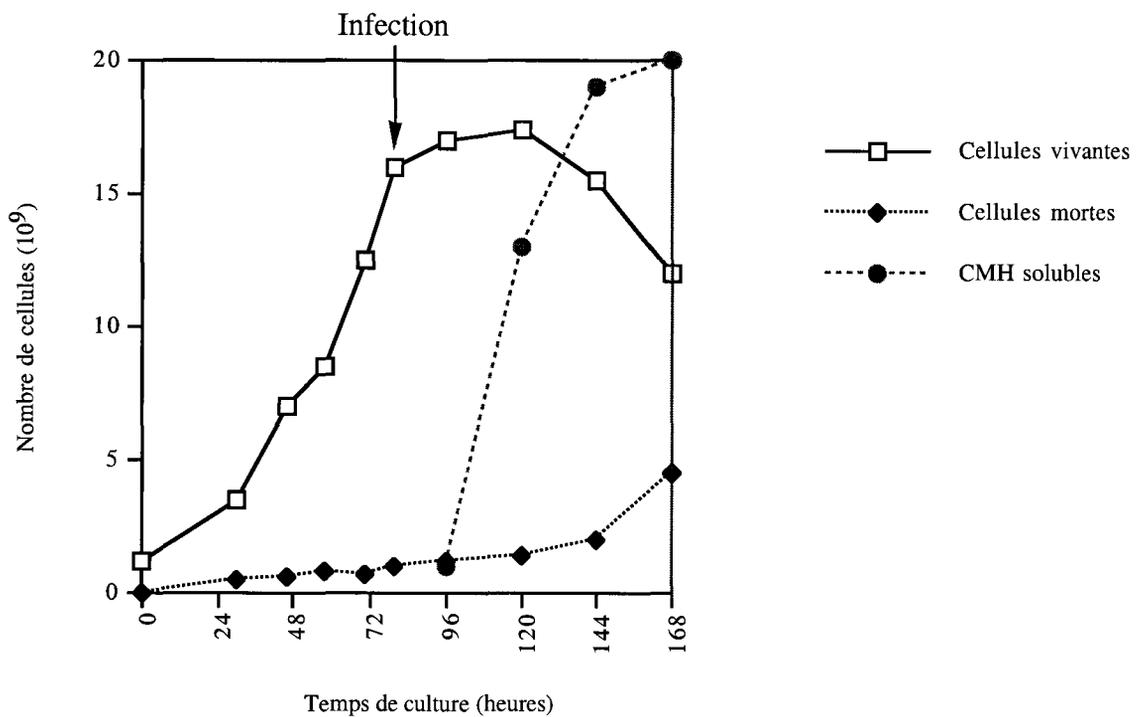
*Culture en bioréacteur des cellules High Fives non adhérentes.*

La culture des cellules High Five non adhérentes en fermenteur nous a conduit à définir certains paramètres de culture en agitation. Les cellules High Five en bioréacteur ont tendance à former des grappes lorsque la densité cellulaire est trop faible ou que les conditions de culture deviennent défavorables (carence en oxygène dissous ou en nutriments). Leur culture en bioréacteur nécessite une surveillance afin de maintenir ces différents paramètres constants. Elles ont un métabolisme très important nécessitant un apport conséquent d'oxygène dissous. Afin d'éviter une mortalité excessive occasionnée par l'apport important d'air, nous avons été contraint d'utiliser de l'oxygène pur (qualité C, Air Liquide - Santé) permettant le maintien du taux d'oxygène dissous avec des débits de gaz peu importants. Le maintien de la densité cellulaire en phase exponentielle ( de 0,7 à 1,6x10<sup>6</sup> cellules/ml) est effectué par addition de milieu X-press frais par paliers. Les autres paramètres définis pour la culture des cellules High Five non adhérentes en fermenteur sont présentés dans le tableau I.

PARAMETRES ETUDIES	RESULTATS
Nombre initial de cellules	2x10 <sup>5</sup> cellules /ml
Vitesse d'agitation	100 tours / min
Densité cellulaire optimale pour l'infection	1x10 <sup>6</sup> cellules /ml
MOI	10
Taux d'oxygène dissous	80% de saturation en air

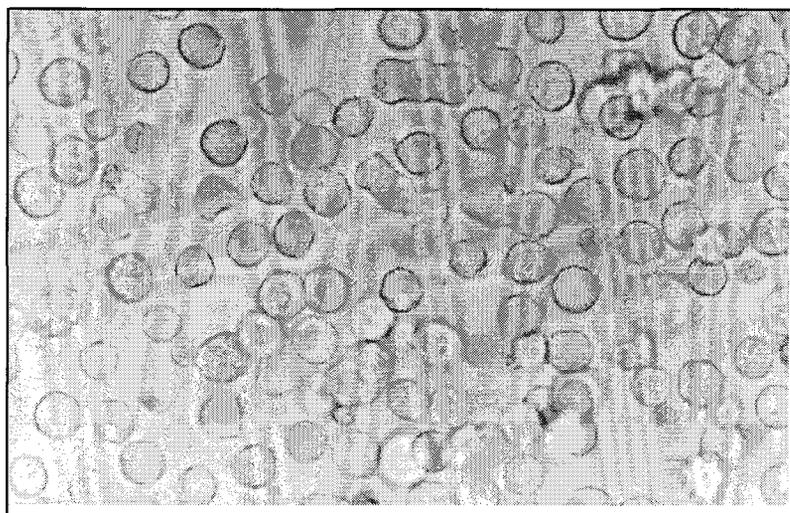
**Tableau I:** *Conditions opératoires pour la culture de cellules High Five non adhérentes en fermenteur (15 litres).*

En l'espace de 72 heures seulement, on atteint la densité cellulaire optimale pour l'infection (Fig.2). Le taux de cellules mortes reste inférieur à 10% et les cellules sont parfaitement individualisées au moment de l'infection (Fig.3). Avec une MOI de 10 (Multiplicity Of Infection), la mortalité cellulaire n'augmente que très lentement, permettant ainsi le maintien d'un métabolisme élevé favorable à l'expression des protéines recombinantes. L'expression des molécules de CMH de classe II atteint un plateau 4 jours après l'infection. Le milieu de culture est ensuite collecté. Les surnageants sont séparés des cellules par centrifugation, puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la purification.

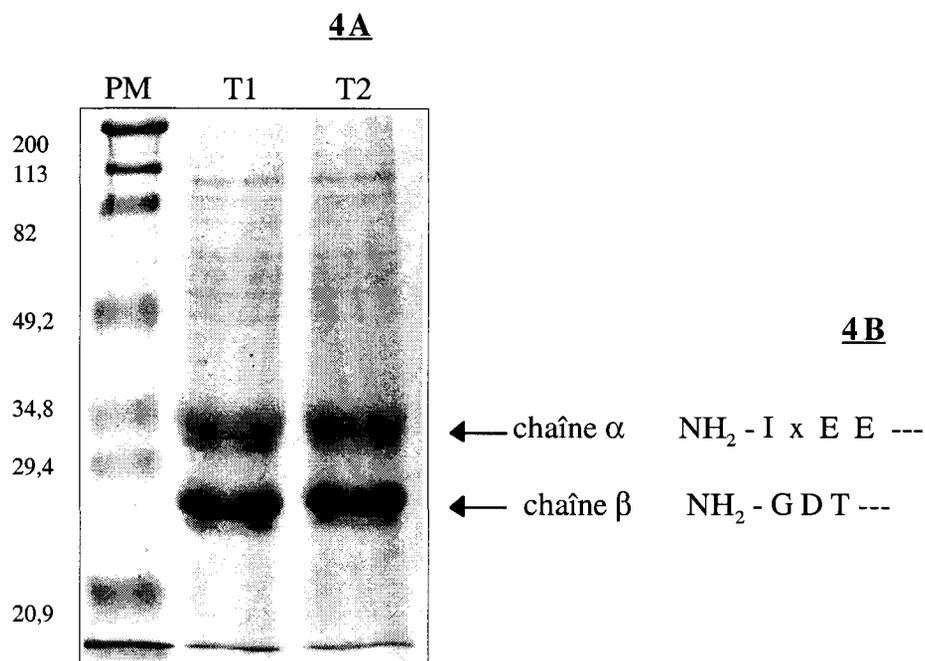


**Figure 2 :** Culture des cellules High Five en bioréacteur de 15 litres pour la production des molécules HLA-DR1 solubles. Le nombre de cellules viables (échelle de gauche) est évalué par le test d'exclusion du bleu Trypan. Après l'infection par le baculovirus, l'expression des molécules HLA-DR1 a été suivie en ELISA (échelle de droite).

Les molécules de CMH de classe II purifiées possèdent des extrémités N-terminales correspondant exactement au site de clivage du peptide signal (Fig.4). Après purification, nous obtenons 2 mg de molécules de molécules HLA-DR1 par litre de culture ce qui est 2 à 4 fois supérieur que le rendement que nous obtenions avec les cellules SF9.



**Figure 3 :** Morphologie des cellules High Five en fermenteur avant infection. Les cellules apparaissent individualisées avec une mortalité inférieure à 10% (test d'exclusion du bleu Trypan).



**Figure 4 :** Analyse en gel SDS-PAGE à 12,5% des molécules HLA-DR1 solubles purifiées à partir des cellules High Five cultivées en fermenteur

*(A) et séquençage des extrémités N-terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  libérées après élimination du peptide signal (B).*

# I. Analyse des peptides naturels s'associant aux molécules de CMH de classe II HLA-DR3

## A. Résumé

Les molécules de CMH de classe II exprimées à la surface de cellules présentatrices d'antigènes présentent une grande variété de peptides issus de la dégradation de protéines exogènes, mais également endogènes. Le mécanisme de présentation des antigènes par la voie de classe II exerce une sélection sur la nature des peptides présentés (rôle d'édition d'HLA-DM, acquisition de molécules de classe II stables, influence des protéases et du processus dit de « trimming »), et la définition de ces règles représentent un enjeu pour la caractérisation d'épitopes T.

Les résidus polymorphes, situés au sein du site de liaison varient d'un allèle de molécules de classe II à l'autre, influencent de manière critique la liaison des peptides. Ces peptides peuvent être extraits des molécules de CMH, puis séquencés afin d'établir leurs caractéristiques communes. Notre étude a été réalisée sur les molécules de CMH de classe II HLA-DR3/DRw52. Un séquençage a été effectué sur les ligands peptidiques naturels en mélange complexe et après séparation par RP-HPLC. En confrontant nos résultats avec ceux obtenus par d'autres groupes, et en considérant la structure des poches d'ancrage de la molécule HLA-DR3, un motif peut être défini : Quatre positions d'ancrage spécifiques apparaissent de manière dominante dont la poche P4 spécifique quasi-exclusivement pour l'acide aspartique, tandis que deux sites accessoires P2 et P3 pourraient également intervenir dans la liaison. De plus, il apparaît que l'absence d'un ou deux points d'ancrage n'affecte pas la capacité des peptides à être présentés par les molécules de classe II. Ces informations peuvent ainsi être utilisées pour l'identification de ligands spécifiques des molécules HLA-DR3 utilisables en immunothérapie.

## *B. Introduction*

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II sont des glycoprotéines membranaires ayant pour rôle de présenter aux lymphocytes T, les peptides issus de la dégradation des protéines du soi et du non soi. La spécificité de cette reconnaissance dépend de la formation d'un complexe trimoléculaire constitué d'une molécule présentatrice du CMH, d'un peptide et du récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (TCR). Les molécules de classe I ont pour rôle essentiel de présenter les antigènes endogènes aux lymphocytes cytotoxiques de type CD8 tandis que les molécules de classe II présentent principalement les antigènes exogènes aux lymphocytes auxiliaires de type CD4.

Les études cristallographiques des molécules du CMH de classe I et II ont permis la caractérisation d'une structure identifiée comme site de fixation (Bjorkman et al, 87 ; Brown et al, 93 ; Stern et al, 94 ; Guo et al, 92 ; Saper et al, 91 ; Ghosh et al, 95) ; Constitué de deux hélices  $\alpha$  et d'un plateau en feuillet  $\beta$ , ce site regroupe la majorité des résidus polymorphes. Plusieurs micro-environnements, formant des poches d'ancrage, permettent d'établir des interactions spécifiques avec les chaînes latérales de peptides ligands. Pour les molécules de classe I, deux à trois chaînes latérales particulières garantissent la spécificité de l'interaction tandis que des ponts hydrogène, maintenant les extrémités N- et C- terminales, limitent la taille des peptides à 8 - 12 résidus (Rammensee et al, 95). Les molécules de classe II présentent des peptides d'une longueur variant de 12 à 25 résidus, dont les extrémités peuvent s'étendre de part et d'autre de la cavité (Chicz et al, 93 ; Falk et al, 94 ; Kropshofer et al, 93 ; Malcherek et al, 94). Le squelette peptidique est maintenu par un ensemble de ponts hydrogène contraignant le peptide à adopter une structure de type polyproline (Jardetzky et al, 96).

La nature des peptides naturellement présentés par les molécules de CMH de classe II s'avère différente de celle des ligands peptidiques identifiés par les tests de liaison sur les molécules de classe II purifiées. Cette différence est essentiellement liée au fait que le mécanisme de présentation des antigènes exerce une pression de sélection sur les antigènes selon des critères qui peuvent être indépendants de l'affinité de la liaison. En effet, la molécule HLA-DM et la chaîne Ii ont une influence sur la nature des peptides présentés naturellement. Notamment, la protéine HLA-DM intervient dans le

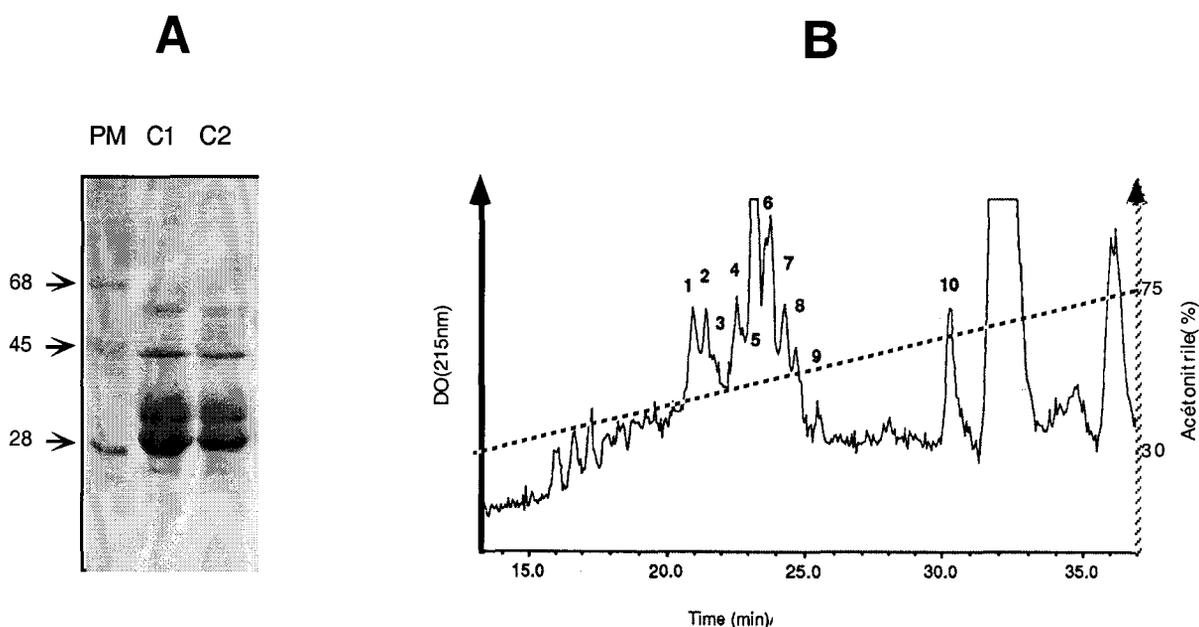
mécanisme de chargement des peptides en remplissant une fonction « d'édition » sur la nature des ligands. Elle sélectionne les formes les plus stabilisantes pour les molécules de classe II (Sloan et al, 95 ; Werber et al, 96; Kropshofer et al, 96a, 96b; Siklodi et al, 98). De plus, des mécanismes de dégradations protéolytiques des complexes instables favorisent les complexes stables pour la présentation en surface (Germain et al, 91; Thery et al, 98). Ainsi, la mise en évidence des règles régissant les mécanismes de sélection des peptides naturels pour la présentation représente un enjeu pour l'identification d'épitopes T.

C'est dans cet optique que nous avons réalisé le séquençage des peptides issus des molécules HLA-DR3/DRw52 en mélange et après séparation par HPLC. Les résultats obtenus, ainsi que ceux d'autres laboratoires, nous permettent de préciser certaines règles d'ancrage spécifiques de l'allèle DR3.

## C. Résultats

### a. Extraction des peptides provenant des molécules de classe II purifiées

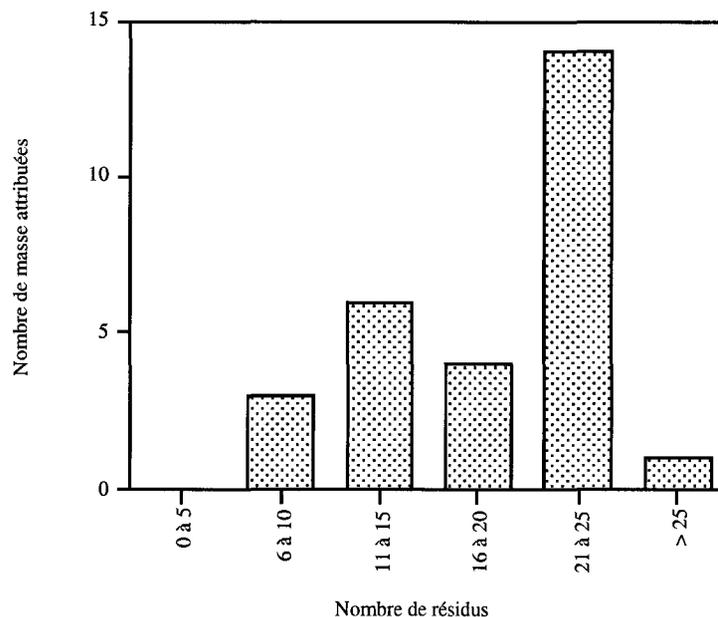
Les molécules du CMH HLA-DR3/DRw52 ont été isolées par chromatographie d'immuno-affinité (Gorga et al, 87) à l'aide de l'anticorps L243 (anti HLA-DR), à partir d'une lignée cellulaire B transformée par l'EBV (lignée Steinlin). Les molécules purifiées, sont analysées en gel SDS-PAGE (Fig.1A). Le taux de pureté de la préparation a été estimé à 85 % par densitométrie. Les peptides sont extraits par choc à l'acide acétique 10 % puis séparés par HPLC en phase inverse (Fig.1B). La proportion de l'allèle supplémentaire, HLA-DRw52 est très minoritaire (<à 10 %) (Malcherek et al, 93) mais non négligeable d'où l'appellation HLA-DR3/DRw52.



**Figure 1 :** *Caractérisation des molécules de CMH de classe II HLA-DR3:DRw52 purifiées et des peptides spécifiques élués. (A) Analyse en gel SDS-PAGE dénaturant des molécules de CMH de classe II HLA-DR3/DRw52 purifiées par immuno-affinité avec l'anticorps monoclonal L243, à partir de lysats de lignée lymphoblastoïde Steinlin. PM poids moléculaire de référence, C1 éluats concentrés de la colonne 1, C2 éluats concentrés de la colonne 2, montée en série sur la colonne 1 (B) Profil de séparation en HPLC en phase inverse des peptides élués par choc acide des molécules de classe II.*

b. Analyse des peptides issus des molécules HLA-DR3/DRw52 par spectrométrie de masse

Les dix pics majeurs obtenus après séparation par RP-HPLC ont été analysés en spectrométrie de masse. Ces dix échantillons contiennent en réalité 28 peptides dont les masses ont pu être attribuées (Fig.2). Leur longueur concorde avec la taille moyenne globale des peptides issues des molécules de CMH de classe II avec une majorité de peptides compris entre 21 et 25 résidus (Chicz et al, 93 ; Falk et al, 94 ; Kropshofer et al, 93 ; Malcherek et al, 94). Toutefois, trois peptides d'une taille inférieure à 10 résidus ont été mis en évidence, ce qui est atypique pour une molécule de classe II. Néanmoins, des peptides de taille inférieure à 9 résidus sont capables d'interagir *in vitro* sur des molécules de classe II purifiées mais leur immunogénicité est extrêmement faible.



**Figure 2** : Distribution des masses attribuées pour les peptides élués des molécules de CMH de classe II HLA-DR3/DRw52. La valeur obtenue pour la masse a été divisée par 110 afin de présenter les résultats en fonction du nombre moyen de résidus par peptide.

*c. Séquençage des mélanges de peptides issus de HLA-DR3/DRw52*

Malgré la taille hétérogène des peptides associés aux molécules de classe II, l'analyse par séquençage en mélange permet la mise en évidence, par positionnement relatif, de familles d'acides aminés présumés impliqués dans la liaison, avec une précision de + ou - 1 (Falk et al, 94 ; Malcharek et al, 93). Les résultats bruts du séquençage en mélange des peptides issus de l'haplotype HLA-DR3/DQw2 sont présentés dans le tableau I. La synthèse des résultats figurée dans le tableau II, avec les motifs d'ancrage putatifs publiés par d'autres groupes.

On observe tout d'abord, la présence de résidus proline au cycle 2 de séquençage. Cet acide aminé semble être une caractéristique majeure des peptides présentés par différentes molécules de classe II et ce de manière indépendante de l'allèle (Rammensee, 95 ; Falk et al, 94 ; Kropshofer et al, 93). La présence de ce résidu suggère deux hypothèses. D'une part, la présence de résidus proline en position N-terminale joue un rôle dans l'interaction avec la molécule de CMH de classe II. Toutefois, les amino-peptidases ont été récemment mises en évidence comme jouant un rôle essentiel dans la dégradation des extrémités des peptides associés aux molécules de CMH de classe II. L'activité de ces protéases est notamment interrompue lorsqu'elle rencontre une proline. Ainsi, la présence de proline en position N-terminale de peptide ligand pour les molécules de CMH II révèle que les premiers résidus impliqués dans l'interaction avec le site de liaison sont proches.

La présence de phénylalanine ou d'acides aminés aliphatiques (Leu, Ile) indique la présence d'une première poche hydrophobe. L'identification à ce stade de résidus impliqués dans une interaction hydrophobe, proche de l'extrémité N-terminale des peptides, laisse penser qu'il s'agit de la poche P1. L'influence d'une poche hydrophobe en position N-terminale a également été montrée dans les autres études concernant HLA-DR3 (Tableau II). Les petits résidus tels que la thréonine ou la glycine semblent également tolérés. L'acide aspartique ainsi que la glycine émergent à partir du cycle de séquençage n°8, c'est à dire distant de 4 résidus par rapport à la poche P1 présumée. Ce résultat concorde tout à fait avec les autres et correspond à la poche d'ancrage P4, comportant un résidu chargé positivement (Arg  $\beta$  74). En position +5 par rapport à la poche P1, on trouve à nouveau un groupe de résidus hydrophobes (Phe, Leu et Ile) plus un résidu lysine. Les autres études ne mentionnent pas l'existence d'une telle poche d'ancrage à ce niveau. L'arginine en position P+6

semble corrélérer avec la présence d'une poche d'ancrage chargée négativement, micro-environnement influencé par la présence de l'acide aspartique β28. Cette poche semble toutefois accepter d'autres résidus tels que les acides aminés Lys, Glu, Gln, His et Asn.

Cycle	Asp D	Asn N	Ser S	Gln Q	Thr T	Gly G	Glu E	Ala A	Tyr Y	Arg R	Pro P	Met M	Val V	Phe F	Ile I	Lys K	Leu L
1	7,54	7,97	4,61	2,97	27,3	12,7	10,2	14,7	5,52	8,92	3,98	2,07	7,77	5,5	11,1	4,68	8,83
2	8,6	6,71	3,12	4,33	18,9	10,4	8,01	8,05	2,77	5,77	<u>18</u>	-	5,49	1,9	5,6	2,11	4,7
3	10	6,11	2,6	5,33	12,5	<u>24</u>	8,48	7,2	2,69	7,3	10,6	-	7,2	<u>2,87</u>	6,75	2,96	5,96
4	9,67	6,82	2,27	5,82	<u>29</u>	10	8,39	8,16	3,46	6,01	6,63	1,89	8,96	<u>5,3</u>	<u>15</u>	4,22	<u>9,5</u>
5	6,05	3,5	0,89	2,95	13	4,96	3,6	3,98	2,76	1,85	2,67	0,9	5,06	3,8	10,5	2,06	6,89
6	6,51	3,41	0,98	2,85	10,1	4,82	3,34	3,96	3,3	2,08	2,8	-	5,06	4,11	7,62	1,29	5,08
7	6,01	2,56	0,46	1,62	9,18	2,75	2	2,23	2,07	-	1,53	-	2,9	2,1	3,11	-	5,82
8	<u>9,5</u>	1,95	0,74	1,87	12	<u>4,6</u>	2,44	2,48	2,2	1,5	1,82	-	2,87	3,6	4,07	1,34	3,16
9	7,68	2,19	0,99	1,98	9,7	4,46	2,51	3,02	2,01	1,57	2,35	-	2,51	<u>5,74</u>	<u>7,6</u>	<u>4,4</u>	<u>7,7</u>
10	5,61	2,67	0,81	1,46	9,73	3,24	1,71	2,51	1,41	<u>2,6</u>	1,69	-	2,35	0,99	3,21	2,16	0,78

**Tableau I : Séquençage global des peptides extraits de molécules de classe II HLA-DR3/DRw52.** Après extraction, le mélange de peptides est directement analysé par micro-séquençage. Les résultats, exprimés en picomoles, correspondent à la quantité de chacun des acides aminés présents à chaque cycle de séquençage. Les valeurs soulignées correspondent aux acides aminés dont la quantité augmente d'au moins 30% par rapport au cycle précédent. Les résultats obtenus sur d'autres lots donnent des résultats équivalents.

	Gly 86		Phe 13 Gln 70 Arg 71 Ala 74 78 Tyr		Leu 11 Phe 13	Trp 9 Asp 57	
P-2	P1	P3	P4	P5	P6	P9	
P	L, I, F, T, G		D, G	L, I, K, F	R		notre étude
	I, L, V, M, F, Y		D, N, Q, T				Chiez et al, 93
	I, L, V, M		D, E				Geluk et al, 92
	Hydrophobe	Hydrophobe	hydrophile		R, K, H		O'Sullivan et al, 91 Malcharek et al, 93
P	L, I, F, M, V		D		K, R, (E, Q, N)	L, Y, F	

**Tableau II : Résultats récapitulatifs du motif d'ancrage attribué à la molécule de classe II HLA-DR3.** Les résidus polymorphes présents sur la molécule de HLA-DR1 sont représentés en haut du tableau. Les poches d'ancrage correspondantes sont numérotées de P1 à P9.

*d. Alignement des ligands individuels de DR3/DRw52*

Six peptides individuels associés à DR3/DRw52 ont été séquencés de manière individuelle. Ces peptides, d'une longueur variant de 12 à 16 acides aminés, proviennent de récepteurs membranaires ou de protéines exogènes. On retrouve également la présence d'une séquence de l'apolipoprotéine B faisant partie des peptides naturels majeurs décrits en association avec DR3.

Un alignement de ces séquences avec l'ensemble des séquences de peptides déjà identifiés comme pouvant s'associer à DR3 a été réalisé (Tableau III). Etant donnée la spécificité dominante des poches P1 (résidus aliphatiques) et P4 (résidus chargés positivement, souvent l'acide aspartique) soulignée dans le paragraphe précédent, un alignement a été proposé. Un motif peut être dégagé assez aisément du fait des deux caractéristiques majeures de l'allèle HLA-DR3. L'existence d'une poche hydrophobe en position C-terminale (P9) confirme l'analyse qui avait été préalablement réalisée par l'équipe de Malcherek (Melcherek et al, 93). En position P2, les résidus chargés négativement (Arg, Lys) ainsi que les résidus hydrophobes (Val, Ile, Leu, Phe) révèlent un site alternatif potentiel. En P3, on trouve les résidus hydrophobes (Val, Ile, Leu, Phe) mais également les résidus de petites tailles (Ala, Ser) compatibles avec l'existence d'une poche d'ancrage non polaire mis en évidence dans l'étude cristallographique d'HLA-DR3 (Ghosh et al, 95).

On peut également observer que fréquemment, seul deux ou trois points d'ancrage sur les quatre identifiés sont suffisants pour une présentation par la molécule HLA-DR3. Cette observation a été démontrée notamment lors de l'étude cristallographique du complexe CLIP/HLA-DR3 dans lequel on observe une alanine au niveau de la poche polaire P4 (Ghosh et al, 95). Ainsi, les molécules de classe II matures ne nécessitent pas obligatoirement une adaptation parfaite en terme de spécificité d'interaction. En effet, le réseau de ponts hydrogènes, conférant la majeure partie de l'énergie de liaison, doit vraisemblablement jouer un rôle important dans ce mécanisme (Stern et al, 94 ; Ghosh et al, 95 ; Jardetzky et al, 96). Les résidus situés de part et d'autre de l'agrétope peuvent effectivement venir augmenter la stabilité de la molécule de manière indépendante de leur nature physico-chimique.



## *D. Discussion*

L'analyse de la spécificité de reconnaissance peptide/CMH de classe II a été réalisée avec succès par l'étude de la liaison de peptides sur différents allèles (Jardetsky et al, 90 ; Hill et al, 91 ; Hammer et al, 93 ; Sinigaglia et al, 94 ; Hill et al, 94 ; Newcomb et al, 93 ; Sette et al, 92 ; Riberdy et al, 92 ; Sette et al, 93). Toutefois, les informations obtenues ne reflètent pas les mécanismes naturels sélectifs de la présentation antigénique. En effet, des peptides d'une taille de 9 résidus voire moins peuvent interagir avec les molécules de classe II alors que les peptides naturellement présentés ont une taille comprise entre 12 et 25 résidus généralement. De plus, les processus sélectifs de chargement des peptides via par exemple la protéine chaperonne HLA-DM, ou les mécanismes de sélection des complexes stables, sont des paramètres essentiels qui ne sont pas pris en compte dans les tests de liaison sur CMH purifiés. Toutefois, les tentatives d'alignement des séquences de peptides naturels, afin de définir un motif de reconnaissance spécifique d'allèle ont initialement échoué (Rudensky et al, 91 ; Rudensky et al, 92 ; Chicz et al, 92, 93 ; Marrack et al, 93). L'importante hétérogénéité de la taille des peptides a rendu complexe les interprétations. Cependant, des motifs de reconnaissance et de sélection peuvent être déterminés par une approche de séquençage des peptides naturels en mélange. Bien que la taille des peptides soit hétérogène, des groupements caractéristiques peuvent être identifiés (Falk et al, 94 ; Malcharek et al, 93). C'est cette technique que nous avons utilisée pour l'analyse des peptides naturellement présentés par la molécule de classe II HLA-DR3.

Après purification des molécules de classe II HLA-DR3/DRw52, les peptides sont séparés puis analysés par séquençage soit en mélange soit après séparation par HPLC en phase inverse. L'ensemble de nos résultats, associés à ceux préalablement obtenus par d'autres équipes, nous a permis de préciser les règles régissant l'association des peptides avec DR3. Les résultats confirment l'existence de quatre ancrages majeurs : poche P1 hydrophobe, poche P4 polaire (+), poche P6 polaire (-), poche P9 hydrophobe. La présence d'une poche très spécifique en position P4, quasi-exclusive pour l'acide aspartique est une particularité de l'allèle HLA-DR3. Le plus souvent la spécificité des poches d'ancrage est plus large (Rammensee, 95). L'alignement des peptides sur la présence de ce résidu était donc un avantage pour la caractérisation du motif spécifique d'ancrage. La

présence de résidus spécifiques pour une poche en P9 est compatible avec l'étude cristallographique de la molécule HLA-DR3.

La présentation ne requiert pas la totalité des points d'ancrage et semble laisser la possibilité d'adaptation à différents motifs alternatifs (Geluk et al, 94 ; Ghosh et al, 95). Trois voire seulement deux résidus spécifiques permettent de préserver la liaison, ceci grâce au rôle éventuel que peuvent jouer les résidus "auxiliaires" mais surtout grâce au rôle joué par le réseau de ponts hydrogènes entre les résidus conservés de la molécule de CMH et le squelette peptidique.

Néanmoins, la présence au sein d'une séquence protéique d'un motif d'ancrage ne garantit pas absolument la possibilité d'identifier un épitope T. Afin d'affiner les règles de prédiction, différentes études restent à réaliser. Tout d'abord, l'évaluation du rôle relatif des résidus "mineurs" coopérant pour la spécificité de liaison avec la molécule de CMH ainsi que l'effet défavorable que peuvent jouer certains acides aminés à certaines positions par l'utilisation des banques combinatoires peptidiques spécifiques, à l'image d'une étude réalisée pour la molécule HLA-DR1 (Fleckenstein et al, 96).



## E. Conclusion

L'identification des motifs d'ancrage par la technique de séquençage des peptides naturels reste délicate, essentiellement en raison du nombre limité d'informations obtenues à chaque étude. Toutefois, en combinaison avec d'autres approches, notamment les données cristallographiques et les recherches des motifs quantitatifs par l'utilisation de bibliothèques peptidiques, l'analyse des peptides naturels devraient contribuer à la définition de règles spécifiques d'interaction fiable.

Initialement, cette approche a été utilisée pour identifier le ou les séquences d'un antigène présenté naturellement par des molécules de CMH de classe II. Elle consistait à incuber l'antigène (peptide 24-43 de la protéine Sm28GST de *Schistosoma mansoni* ) avec les cellules présentatrices d'antigènes exprimant HLA-DR3 pour identifier l'épitope associé à cet allèle. Après une co-culture très courte de 12 heures à très haute densité cellulaire ( $10^7$  cellules/ml), les cellules étaient collectées puis les molécules de CMH de classe II purifiées. Cependant, nous n'avons pas pu retrouver l'antigène parmi les peptides élués de la molécule HLA-DR3. Le faible nombre de séquences

obtenues par cette approche, limitée par la sensibilité encore trop faible des techniques d'analyse, nous a poussé à changer de stratégie pour la caractérisation d'épitopes T.

## **II. Comparaison de la thermostabilité de complexes solubles peptide/HLA-DR1**

### *A. Résumé*

L'interaction d'un peptide antigénique avec une molécule du CMH de classe II induit un processus dit de "stabilisation" correspondant à la transition d'un complexe peptide/CMH à demi-vie courte vers une isoforme stable pouvant atteindre des demi-vies supérieures à 100 heures (Sadegh-Nasseri et McConnell, 89 ; Beeson et McConnell, 94 ; Tampé et McConnell, 91). Cette isomérisation s'accompagne de modifications conformationnelles, avec notamment un changement de la structure quaternaire de l'hétérodimère qui devient résistant à la dénaturation par le SDS (Witt et McConnell, 92 ; Sadegh-Nasseri et al., 94). Les isoformes stables s'apparentent aux complexes peptide/CMH de classe II matures, présents à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Leur formation, essentiellement contrôlée par la nature du peptide (Wu et al., 96; Verreck et al., 96; Siklodi et al., 98; Nelson et al., 93), est un paramètre important pour l'immunogénicité (Fairchild et al., 93 ; Rabinowitz et al., 97; Nelson et al., 94). Toutefois, les mécanismes moléculaires régissant la stabilité des molécules de CMH de classe II restent mal connus.

Nous avons développé une technique permettant d'accéder au paramètre régissant la stabilité de l'isoforme mature de la molécule HLA-DR1. L'effet stabilisant de plusieurs ligands spécifiques pour l'allèle HLA-DR1 a été évalué. La sensibilité du test permet de hiérarchiser les ligands qui n'avaient pas pu être différenciés selon leur cinétique de dissociation. Ainsi, nous

disposons d'un test sensible, ne nécessitant pas de marquage du peptide, qui devrait nous permettre de préciser les règles permettant l'acquisition de la stabilité pour l'identification de ligands spécifiques du CMH II à visée immunothérapeutique.

## *B. Introduction*

La génération des complexes peptide/CMH de classe II est initiée avec l'assemblage des molécules de classe II, néo-synthétisées dans le réticulum endoplasmique, associées à une autre protéine membranaire, la chaîne invariante Ii. Ce complexe multimérique traverse l'appareil de Golgi vers les compartiments endolysosomiaux où la chaîne Ii est dégradée (Pieters et al., 97 ; Chapman et al., 98). Après protéolyse de la chaîne Ii, des peptides dérivés de la séquence 81-104 (CLIP, Class II-associated invariant chain peptide) restent associés à la molécule de classe II, au sein du site de liaison des peptides (Ghosh et al., 95; Lee et McConnell, 95; Sette et al., 95). La dissociation de CLIP est catalysée par la protéine chaperonne HLA-DM, démasquant le site de liaison pour permettre l'association des peptides antigéniques (Denzin and Cresswell, 95 ; Sherman et al. , Sloan et al. , 95). La liaison de peptide antigénique s'accompagne d'une augmentation de la stabilité des complexes peptide/CMH de classe II (Stebbins et al., 95 ; Kropshofer et al., 96) et permet l'acheminement vers la surface des cellules présentatrices d'antigènes (Thery et al. , 98, Germain et al. , 93, Agrawal et al. , 94).

L'existence de plusieurs isomères cinétiques apparaissant au cours de l'interaction peptide/CMH a été mise en évidence (Sadegh-Nasseri et McConnell, 89 ; Beeson et McConnell, 94 ; Tampé et McConnell, 91). En particulier, il a été proposé qu'un peptide s'associait rapidement aux molécules de classe II pour former un complexe de courte demi-vie, pouvant se convertir lentement en complexe à longue demi-vie, souvent supérieure à 100 heures (Scheherazade et al., 89). De plus, l'augmentation de la demi-vie est cinétiquement corrélée à la formation d'un complexe résistant à la dissociation en gel SDS-PAGE (Witt and McConnell, 92 ; Sadegh-Nasseri et al., 94).

La nature du peptide joue un rôle central dans le processus de maturation (Nelson et al. , 96; Verreck et al. , 96; Wu et al. ,96; Nelson et al. , 96; Humbert et al. , 93; Siklodi et al. , 98).

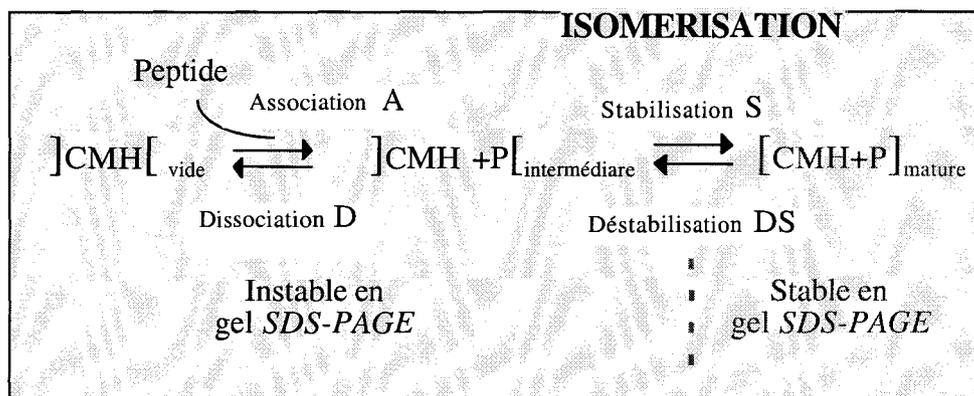
Notamment, l'élongation des résidus bordant l'agrétope et la nature des acides aminés interagissant au niveau des poches d'ancrage peuvent influencer la stabilité du complexe sans affecter l'affinité de la liaison (Siklodi et al. , 98; Nelson et al. , 96; Verreck et al. , 96). Cependant, les bases moléculaires régissant ce mécanisme restent peu connues.

Afin d'accéder aux paramètres régissant la contribution du peptide à la stabilité des complexes peptide/CMH matures, nous avons développé une technique permettant de mesurer leur thermostabilité. Cette étude, réalisée sur les molécules HLA-DR1 solubles exprimées en cellules d'insectes, permet d'établir une hiérarchie très fine des ligands selon leur capacité "stabilisatrice". Notre approche devrait nous permettre l'identification ou la conception de ligands, stabilisant pour les molécules de classe II, utilisables en immunothérapie.

## C. Résultats

### a. Principe du test de thermostabilité

L'incubation de peptides avec les molécules de CMH de classe II vides exprimées en cellules d'insectes, résulte en un mélange de plusieurs complexes dont trois ont été clairement identifiés: les molécules vides, les complexes intermédiaires instables et leur forme mature, les complexes terminaux stables (Fig. 1).



**Figure 1** : Réaction de liaison d'un peptide sur une molécule de CMH de classe II et d'isomérisation

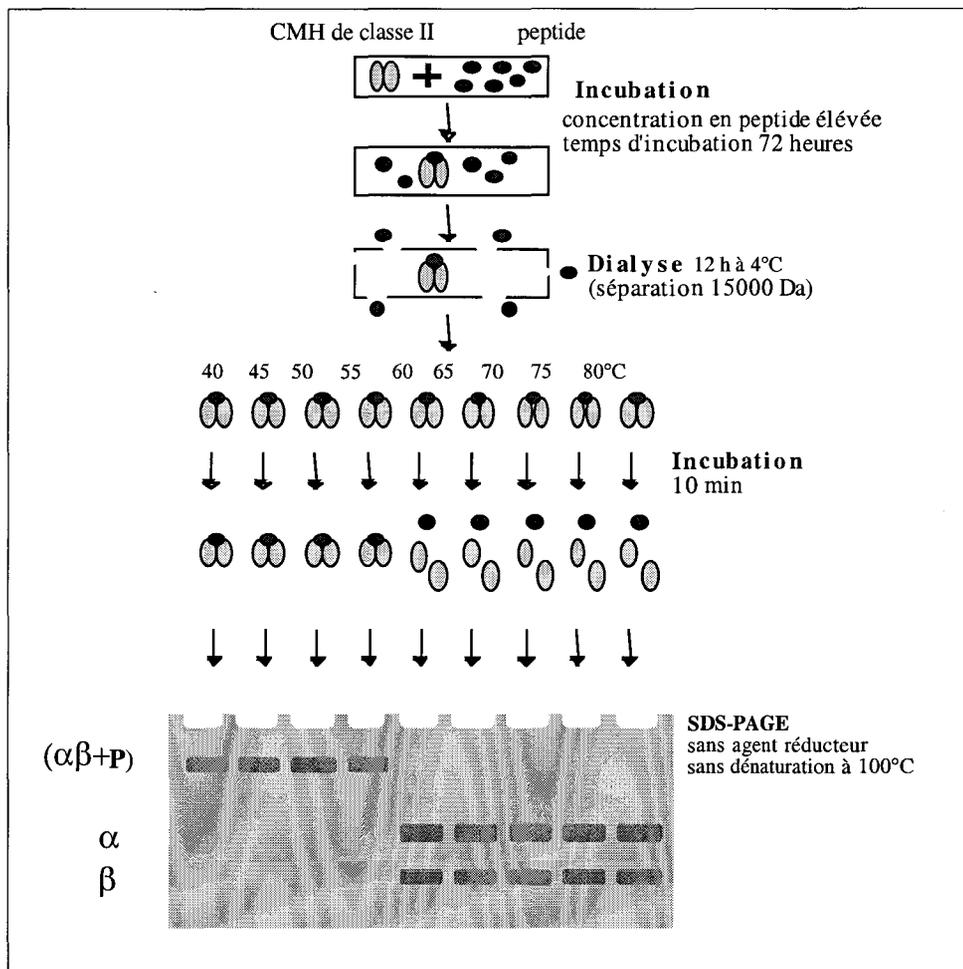
La formation du complexe terminal est cinétiquement corrélée à l'induction d'un complexe résistant à la dissociation en gel SDS-PAGE (Sadegh-Nasseri et al., 94). Ainsi, l'analyse en gel SDS-PAGE représente un moyen de discriminer les molécules de CMH vides et les intermédiaires cinétiques des formes ayant subi le processus de maturation. C'est à partir de ce principe qu'a été développé le test de thermostabilité des complexes matures.

Ce test, développé sur la molécule de classe II soluble HLA-DR1, est organisé de la manière suivante (Fig. 2) : des concentrations élevées du ligand (supérieures à 100  $\mu$ M) et des temps d'incubation prolongés (supérieurs à 48 heures) sont utilisés afin de déplacer les équilibres (Fig. 1), pour favoriser l'accumulation des formes terminales stables des molécules HLA-DR1. Après élimination du peptide en excès par dialyse, les molécules de CMH sont réparties en plusieurs échantillons puis chauffées à différentes températures durant 10 min. La quantification des formes stables résistantes à la chaleur est réalisée après une séparation en gel

SDS-PAGE (en absence d'agent réducteur, sans choc thermique à 100°C) (Fig. 2). Une lecture densitométrique permet de convertir l'intensité des bandes en densité optique. La proportion de complexes stables par rapport à la quantité totale de CMH est calculée de manière à "normaliser" les résultats numériques d'une étude à l'autre :

$$(DO \alpha\beta - bdf) / [(DO \alpha - bdf) + (DO \beta - bdf) + (DO \alpha\beta - bdf)] \quad bdf = \text{bruit de fond}$$

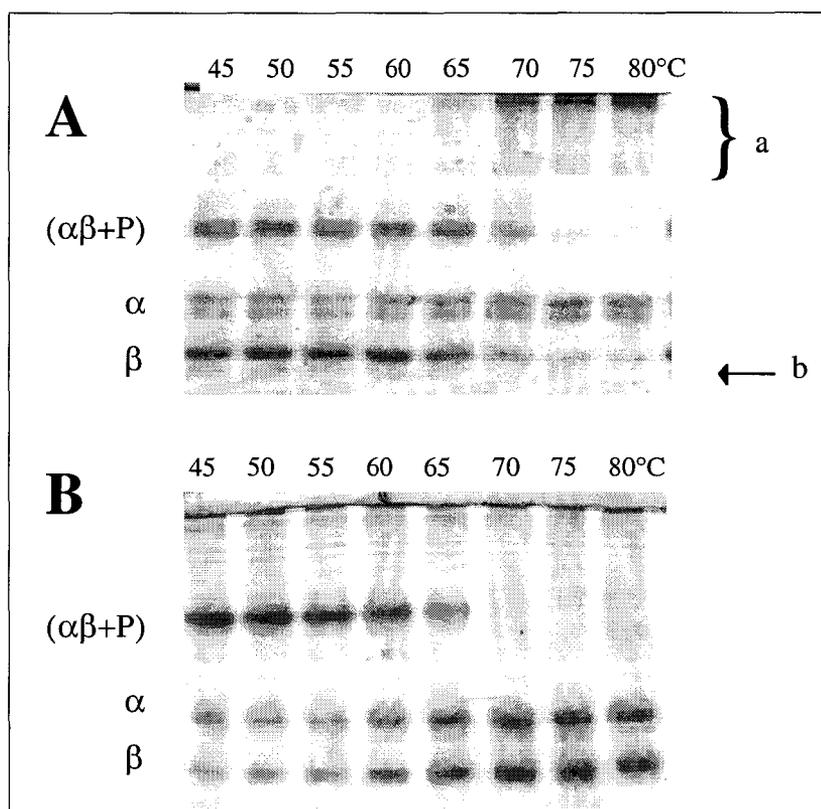
La valeur déduite, appelée Tm, correspond à la température pour laquelle 50% des complexes stables sont dénaturés.



**Figure 2 :** Méthodologie employée afin de mesurer l'influence de la température sur les complexes peptide/CMH de classe II stables

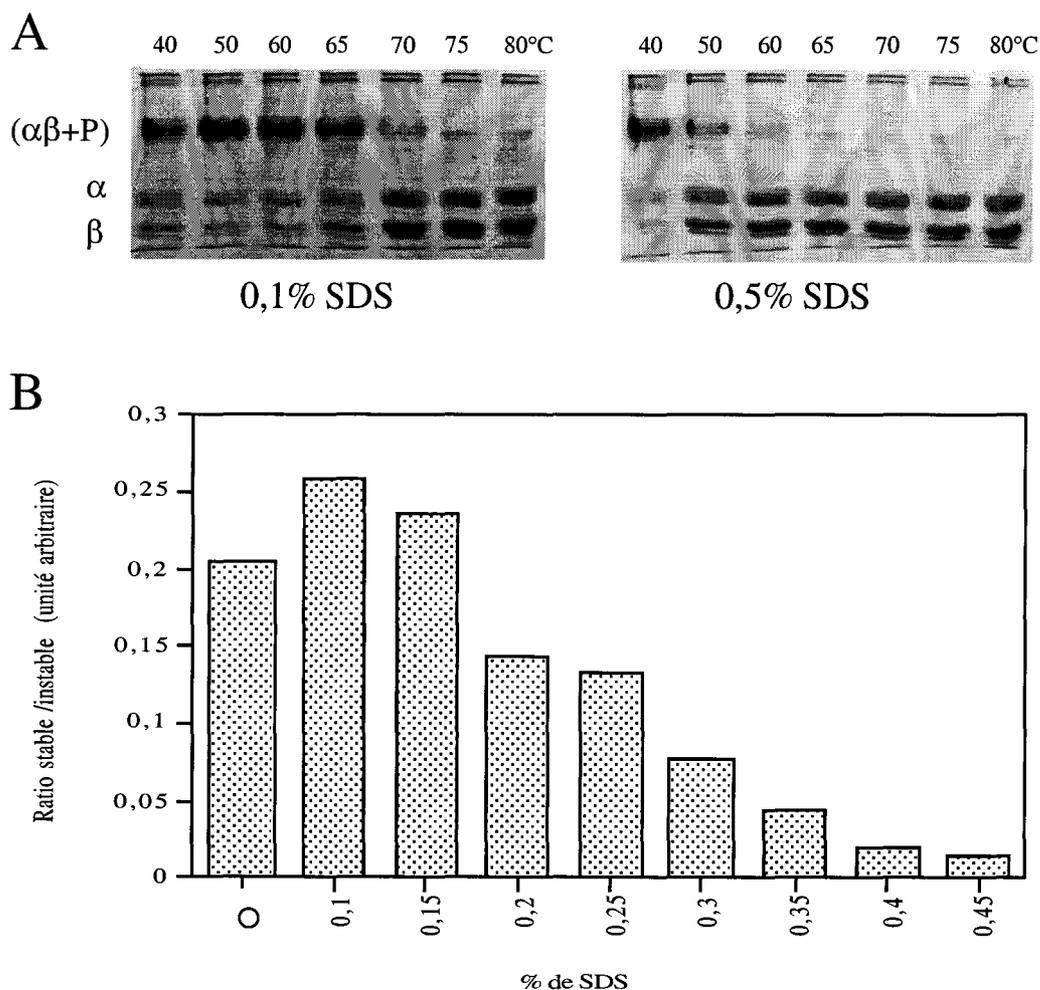
## b. Mise au point

Un résultat représentatif des premiers tests menés sur le complexe HLA-DR1/HA(307-319) est présenté figure 3. Il apparaît qu'aux températures supérieures à 65 °C, des agrégats se forment (Fig.3A-a), tandis que les bandes correspondantes aux chaînes  $\beta$  monomériques disparaissent (Fig. 3A-b), ne permettant plus une interprétation fiable des résultats. Afin de remédier à ce problème d'agrégation, nous avons choisi d'utiliser un détergent anionique, le SDS (sodium dodécylsulfate). Ce choix était suggéré par le fait que les molécules de CMH de classe II stables peuvent résister à la dénaturation jusqu'à des concentrations de 2 % de SDS (Verreck et al., 96 ; Germain et al., 91 ; Neefjes et al., 92). Dans un premier temps, nous avons réalisé le test de thermostabilité en utilisant une concentration de 0,2 % de SDS. Les résultats montrent que le phénomène d'agrégation n'est plus apparent et que la quantité de matériel soluble reste constante indépendamment de la température (Fig. 3B).



**Figure 3 :** Influence du SDS sur la résolution de l'analyse en thermostabilité du complexe HLA-DR1/HA(307-319) . (A) Analyse en absence de SDS ; (B) Analyse en présence de 0,2% de SDS. (a) présence d'agrégats ; (b) diminution de l'intensité de la bande correspondant à la chaîne  $\beta$

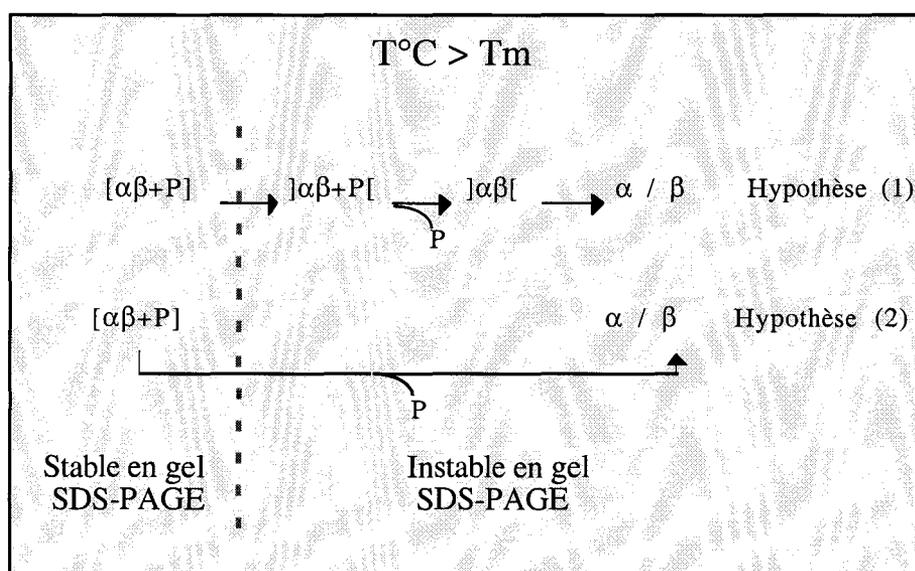
Cependant, une diminution de 5°C de la  $T_m$  est observée à cette concentration en détergent (Figure 3). Afin de limiter ce phénomène, nous avons été amenés à évaluer l'influence de différentes concentrations en SDS sur la stabilité du complexe DR1/HA(307-319) (Fig. 4). Les résultats de cette étude nous montrent que pour 0,1 % de SDS, la stabilité du complexe est peu affectée.



**Figure 4 :** Influence de la concentration en Dodécylsulfate de sodium (SDS) sur la stabilité du complexe HLA-DR1s/HA(307-319). Les complexes préformés HLA-DR1/HA (307-319) et séparés par dialyse de l'excès de peptide libre, sont incubés avec différentes concentrations de SDS. (A) Thermostabilité présentée pour les concentrations de SDS 0,1% et 0,5%. (B) Stabilité des complexes à la température significative de 65°C en fonction de la concentration en SDS.

### C. La thermostabilité est représentative de la réaction de la déstabilisation DS

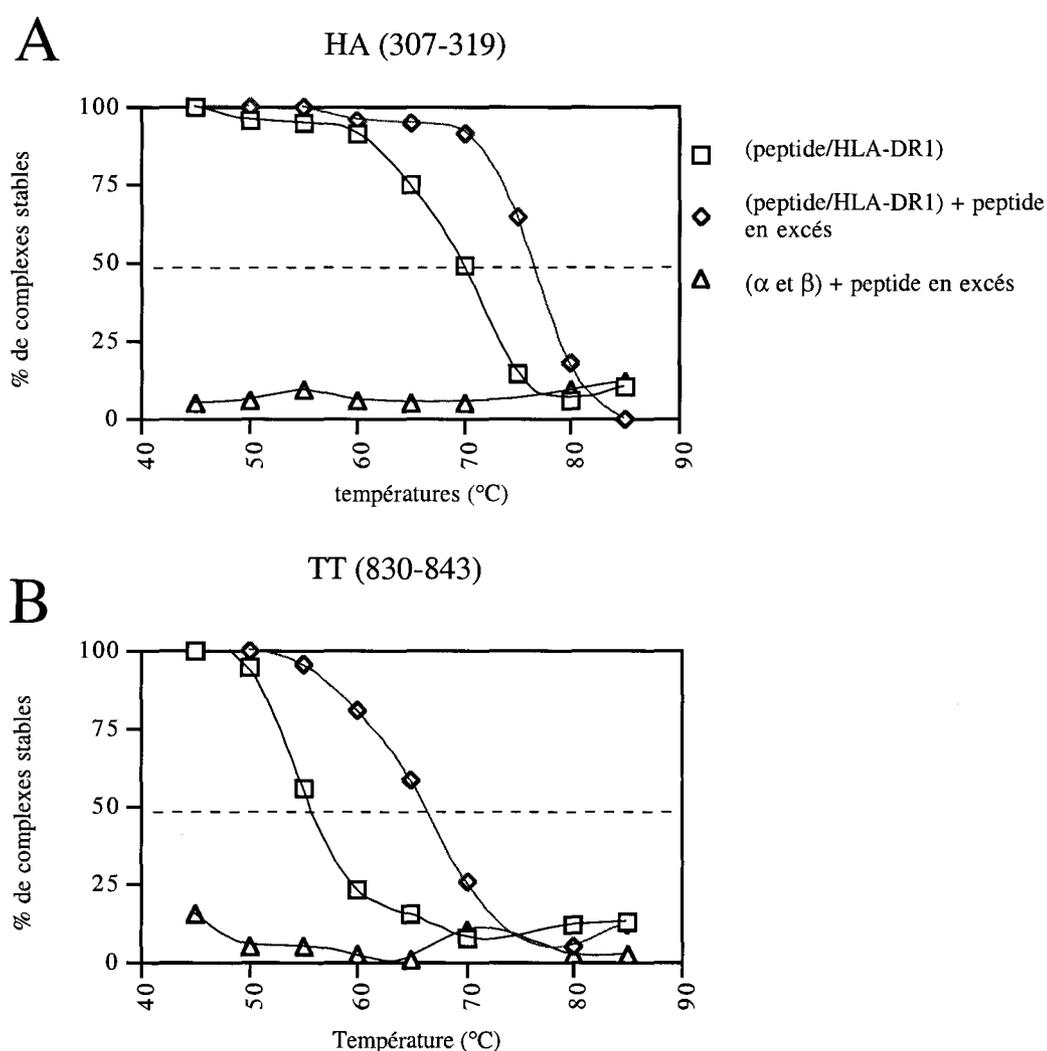
Deux hypothèses étaient envisageables pour expliquer le processus de dénaturation du complexe peptide/CMH par la chaleur (Fig. 5). D'une part, pour des températures supérieures à la  $T_m$  du complexe, la forme stable se dénature en passant par l'intermédiaire cinétique et la forme vide (hypothèse 1). Dans ce cas, la transition stable/instable des complexes observée en gel SDS-PAGE s'apparenterait à la réaction de déstabilisation DS (voir Fig.1). D'autre part, la forme stable peut directement mener aux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dissociées sans passage par les formes intermédiaires (hypothèse 2).



**Figure 5 :** Hypothèses permettant d'expliquer le processus de dénaturation thermique des molécules de CMH de classe II

Afin de vérifier l'une ou l'autre des hypothèses, nous avons réalisé une étude de thermostabilité sur les complexes HLA-DR1/TT(830-843) et HLA-DR1/HA(307-319) et sur ces mêmes complexes réincubés avec un excès de peptide (Fig. 6). Si l'hypothèse (2) se confirme, l'excès de peptide ne doit pas modifier la mesure de thermostabilité, puisque qu'il n'y a pas d'état intermédiaire réceptif à la liaison. Si l'hypothèse (1) est représentative du mécanisme, l'existence de formes intermédiaires réceptives à l'interaction avec le ligand en excès doit retarder le processus de dénaturation par dissociation en chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ .

Les résultats nous indiquent, qu'en excès de peptide, la thermostabilité est nettement augmentée par rapport à la  $T_m$  du complexe peptide/CMH seul (+7°C pour le peptide HA(307-319) et +13°C pour le peptide TT(830-843). Ainsi, l'augmentation de la température n'induit pas directement la dénaturation du complexe, mais doit permettre la formation d'un intermédiaire hautement réceptif à l'interaction avec les peptides. L'accumulation de formes stables obtenues à des températures supérieures à la  $T_m$  a pu avoir eu lieu à partir des intermédiaires intéragissant avec le peptide en excès. De plus, nous montrons que les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dissociées ne sont pas capables de reformer des complexes stables.



**Figure 6 :** Influence de la température sur les complexes (A) HLA-DR1/HA(307-319) et (B) HLA-DR1/TT(830-843) en présence ou en absence d'un excès de peptide ligand. Les complexes peptide/HLA-DR1 préformés, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dénaturées par le chaleur, ou les molécules HLA-DR1 vides sont analysés par un test de thermostabilité en présence d'un excès de peptide (100  $\mu$ M). Les complexes préformés avec le peptide TT(830-843) et HA(307-319) permettent de définir les valeurs spécifiques de leur  $T_m$ . Après incubation aux différentes températures, les échantillons sont analysés en gel SDS-PAGE pour évaluer le pourcentage de complexes stables.

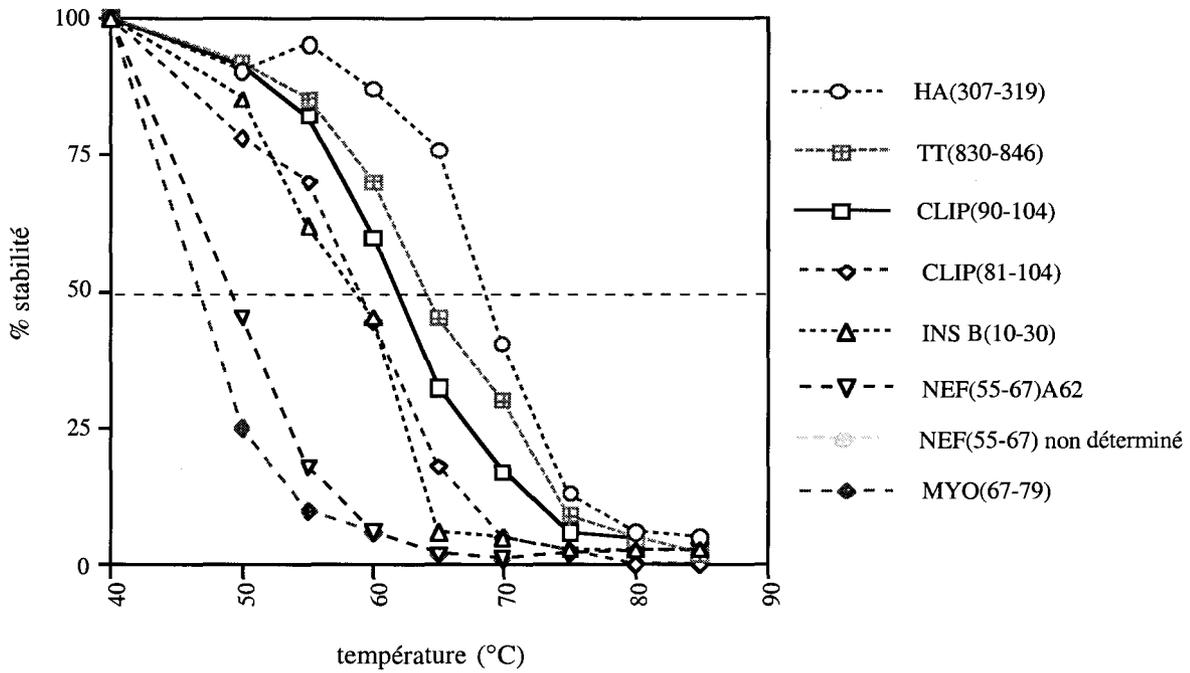
*d. La thermostabilité est liée à la nature du ligand peptidique et corrèle avec la cinétique de dissociation*

Plusieurs peptides spécifiques de l'allèle HLA-DR1 ont été sélectionnés afin de déterminer leur capacité à stabiliser la molécule HLA-DR1. Les séquences de ces peptides ainsi que leur motif d'ancrage spécifique pour HLA-DR1 sont présentés tableau I.

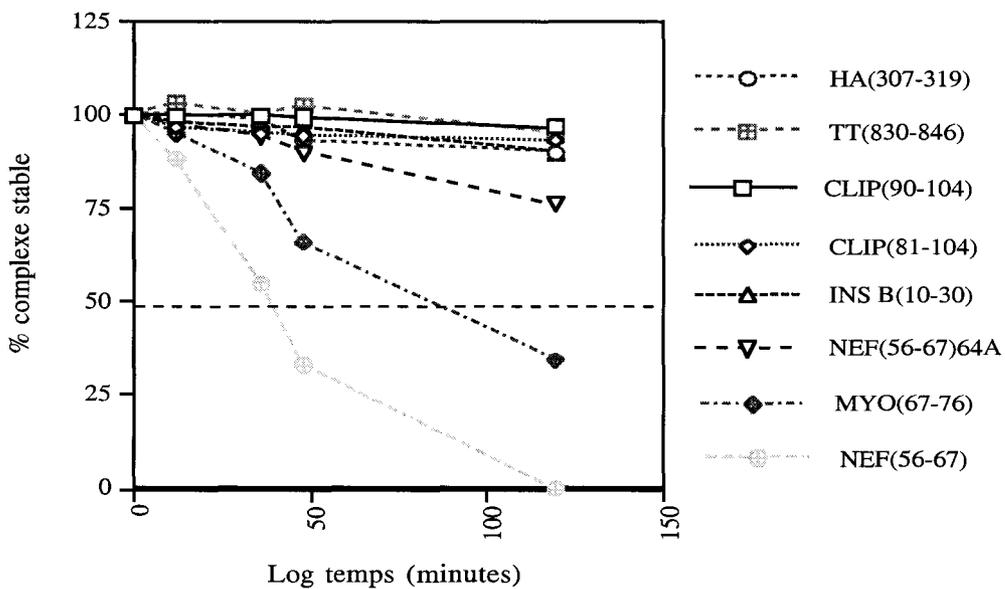
	P1	P4	P6	P7	P9									
HA(307-319)	P	K	Y	V	K	Q	N	T	L	K	L	A	T	*
	+	+											+	+
INSULINE B(10-30)	H	L	V	E	A	L	Y	L	V	C	G	E	R	G
	+	+	+	+										
	H	L	V	E	A	L	Y	L	V	C	G	E	R	G
	+	+	+	+										
TT(830-846)	Q	Y	I	K	A	N	S	K	F	I	G	I	T	E
	+	+		+				+						+
CLIP(81-104)	L	P	K	P	P	K	P	V	S	K	M	R	M	A
	+	+	+	+				-	+					+
CLIP(90-104)	K	M	R	M	A	T	P	L	L	M	Q	A	L	P
	+	+	+	+				-	+					+
NEF(55-67)	A	W	L	E	A	Q	E	E	E	E	V	G	F	*
	+	+											+	
NEF(55-67) A62	A	W	L	E	A	Q	E	A	E	E	V	G	F	*
	+	+						+					+	
MYOGLOBINE (67-79)	T	V	L	T	A	L	G	A	I	L	K	K	K	
	+	+	+		-	+	+	+						-
	T	V	L	T	A	L	G	A	I	L	K	K	K	
	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

**Tableau I :** *Alignement des séquences en fonction des points d'ancrages connus (\*) ou putatifs. Sous chaque séquence est représenté le motif d'ancrage quantitatif pour HLA-DR1 selon la matrice publiée par Fleckenstein (Fleckenstein et al. , 96). Références desquelles sont tirés les agrétopes : (1) Stern et al. , 94 cristallographie, O'Sullivan et al. , 91 substitution (2) O'Sullivan et al. , 91 substitution (3) Melcharek et al. , 95 alignement avec motif putatif (4) substitution par ala-scan, résultat non publié.*

Le test de thermostabilité a été réalisé par incubation des peptides à la concentration de 200 µM durant 96 heures, suivie de l'élimination du peptide libre. Après addition de SDS à la concentration finale de 0,1 %, chaque échantillon a été incubé à différentes températures, puis déposé sur gel SDS-PAGE. Le résultat des mesures densitométriques est présenté figure 7.



**Figure 7 :** Comparaison de la thermostabilité de différents peptides en présence de 0,1% de SDS. Les  $T_m$  pour chacun des peptides ont été déduits et les valeurs moyennes représentatives de deux analyses indépendantes (au moins) sont reportées figure 8.



**Figure 8 :** Vitesse de dissociation des peptides associés à HLA-DR1. La technique utilisée est inspirée d'une étude réalisée par le groupe de McConnel (Rabinowitz et al., 98). Chaque complexe préformé est dialysé puis le peptide HA(307-319) biotinylé est ajouté à une concentration de  $100\mu\text{M}$ . Au cours du temps, un échantillon est prélevé et congelé à  $-80^\circ\text{C}$ . L'analyse est effectuée en ELISA (révélation à la streptavidine -peroxydase).

Les résultats présentés figure 7 indiquent que les ligands peptidiques spécifiques d'HLA-DR1 peuvent être hiérarchisés, en fonction de leur effet stabilisant sur l'hétérodimère.

Parallèlement, la mesure de la dissociation de ces peptides à 37°C met en évidence une corrélation globale avec les valeurs de thermostabilité (Fig. 8). Cependant les demi-vies des complexes sont supérieures à 35 heures et pour 6 peptides sur 8, sont largement au delà de 120 heures. Ainsi cinq peptides CLIP(81-104), CLIP(90-104), HA(307-319), TT(830-843), INS B(10-30) apparaissent associés de manière quasi-irréversible à 37°C, ne pouvant pas être distingué entre eux. L'existence d'un processus d'inactivation affectant les molécules de classe II rend d'autant plus délicate toute interprétation concernant les dissociations extrêmement lentes. En moyenne, à 37°C, la constante d'inactivation est comprise entre 0,01 et 1 h<sup>-1</sup> pour des constantes de dissociations de peptides stables entre 1 à 0,001 h<sup>-1</sup>, ce qui démontre que ce processus est non négligeable (Beeson et McConnell , 95)

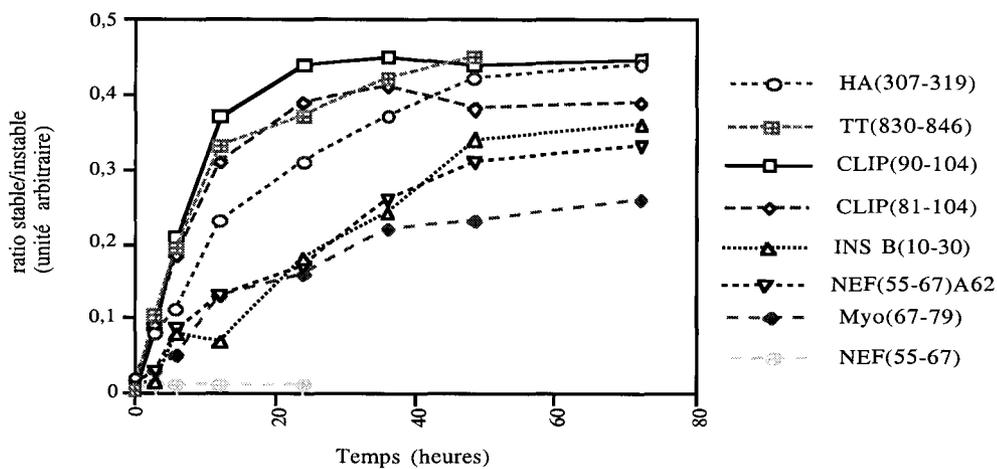
Le test de thermostabilité mené sur les formes stables représente donc un moyen d'accéder de manière sensible aux paramètres régissant la stabilité des complexes. De plus, ces résultats sont totalement indépendants des mesures d'affinité réalisées par tests de compétition hétérologue. (Les valeurs des IC<sub>50</sub> et des T<sub>m</sub> pour chaque peptide sont résumées tableau II).

*e. La thermostabilité des formes stables est indépendante de l'affinité de liaison du peptide ligand ainsi que de la vitesse de formation du complexe stable*

La liaison d'un peptide sur une molécule de CMH de classe II peut être évaluée par la mesure de l'affinité. En effet, de nombreuses équipes se basent sur ce critère pour caractériser des ligands pour les molécules de CMH. Il apparaît à la vue de nos résultats que l'affinité, mesurée par test de compétition hétérologue sur HLA-DR1 ne corrèle pas avec la thermostabilité des complexes stables (résumé des résultats des IC<sub>50</sub> tableau II). Plusieurs cas de figures sont rencontrés. Ainsi le peptide INS B(10-30) présente une mauvaise affinité de liaison mais induit une thermostabilité moyenne (59°C). Ainsi, une affinité médiocre entre un peptide et une molécule de CMH de classe II ne représente pas son incapacité à être présenté. A l'inverse, le

peptide MYO(67-79) montre une bonne affinité mais la forme stable est moins résistante à l'augmentation de température.

De plus, la vitesse de formation des complexes stables a été analysée pour les différents peptides (Fig.9). Ce paramètre est assez délicat à interpréter pour les molécules de classe II. En effet, la liaison du peptide est limitée par une réaction d'interconversion entre une molécule vide inactive et une isoforme instable réceptive à la liaison du peptide (Rabinowitz et al, 98). Cette isomérisation étant indépendante de la présence du ligand, nous considérons que son influence est identique pour l'ensemble des ligands utilisés. Nous pouvons remarquer que les phases plateaux sont atteintes pour tous les peptides en moins de 50 heures mais que la quantité de complexe stable varie d'un peptide à l'autre. Afin de tenir compte de ce phénomène, la valeur permettant de comparer les vitesses de formation des complexes stables doit correspondre au temps nécessaire pour atteindre 50% de la quantité de forme stable à 72 heures ( $t_{1/2}$ ). Les résultats sont présentés sur le tableau II. Nos observations suggèrent qu'il n'existe pas de corrélation entre la thermostabilité des complexes stables et leur vitesse de formation de ces complexes.



**Figure 9** : Evaluation de la vitesse de formation des complexes stables induits par différents peptides. Les complexes sont incubés avec une concentration élevée en peptides (200  $\mu$ M). Des échantillons sont prélevés à différents temps et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ils sont ensuite analysés en gel SDS-PAGE ; une mesure densitométrique est réalisée afin d'évaluer l'évolution du rapport complexe stable/complexe instable.

	Dissociation t1/2 (heures)	Thermostabilité Tm( °C)	Affinité relative compétition hétérologue contre HA(307-319)	formation de complexes stables à 100 µM t1/2(heures)
HA(307-319)	>120	70 (+/-2)	1	12
TT(830-846)	>120	66	4	8
CLIP(90-104)	>120	63 (+/-2)	1	6
CLIP(81-104)	>120	59.5 (+/-1)	6	7
INS B(10-30)	>120	56 (+/-2)	> 200	27
NEF (55-67)A62	>120	47	200	19
MYO(67-79)	82	42 (+/-1)	10	12
NEF (55-67)	35	-	> 200	-

**Tableau II : Récapitulatif des différents paramètres d'interaction des peptides avec la molécule HLA-DR1**

## *D. Conclusion-perspectives*

La stabilité des complexes peptide/CMH de classe II est un paramètre important dans le processus d'induction de la réponse immunitaire (Fairchild et al., 93 ; Rabinowitz et al., 97 ; Nelson et al., 94). Au niveau moléculaire, la formation de complexe stable est un processus contrôlé cinétiquement, mettant en jeu plusieurs formes intermédiaires (Witt et McConnell, 92 ; Sadegh-Nasseri et al., 94 ; Scheherazade et al., 89). En particulier, il a été proposé qu'un peptide s'associe rapidement aux molécules de classe II pour former un complexe de courte demi-vie, pouvant se convertir lentement en complexe à longue demi-vie. La forme terminale de ce processus s'apparente aux formes matures retrouvées en surface des cellules présentatrices d'antigène. La stabilité de ces formes est très élevée avec des demi-vies souvent supérieures à 100 heures voire dans certains cas plus de 250 heures (Witt et Mc Connell, 94, Sadegh-Nasseri et McConnell, 89 ; Beeson et McConnell, 94 ; Tampé et McConnell, 91). La demi-vie élevée, observée pour ces formes terminales soulève la question de l'influence de la nature du peptide dans l'interaction avec la molécule de CMH de classe II (Witt et McConnell, 92b).

Nous avons développé un test de thermostabilité permettant de mesurer les conséquences énergétiques de l'interaction du peptide sur l'isoforme mature. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que la réaction de dénaturation induite par la chaleur était liée à la réaction de transition entre la forme stable vers la forme intermédiaire.

Nous avons également montré que la nature du peptide est un facteur crucial pour le contrôle de la thermostabilité des complexes matures. La thermostabilité corrèle globalement avec la vitesse de dissociation des peptides mais est totalement indépendante de la mesure d'affinité (évaluée en test de compétition) mais également de la vitesse de formation du complexe terminal.

Notre approche nous a permis de hiérarchiser les peptides dont la présentation est restreinte par HLA-DR1. Pour certains de ces peptides, les vitesses de dissociations très lentes (supérieures à 120 heures) posent un problème pour une analyse quantitative qui permettrait de

les différencier. De plus, l'existence d'un processus d'inactivation affectant les molécules de classe II rend délicat toute interprétation. En effet, en moyenne à 37°C, la constante d'inactivation est comprise entre 0,01 et 1 h<sup>-1</sup> pour des constantes de dissociations de peptides stables comprises entre 0,001 et 1 h<sup>-1</sup>, montrant que ce processus est non négligeable (Beesson et McConnell, 95).

Nos observations mettent en évidence une absence de corrélation entre les mesures d'affinité et de thermostabilité. Deux cas de figures permettent de mieux comprendre cet aspect paradoxal de la formation d'un complexe peptide/CMH de classe II.

(1) le peptide (MYO67-79) représente le cas d'un ligand de bonne affinité révélé peu stabilisant pour HLA-DR1. Cette incapacité à former une structure stable doit vraisemblablement être due à la présence au sein de la séquence d'un élément ayant un effet négatif sur la stabilité de la molécule HLA-DR1. Certains peptides sont parfois capables de bloquer totalement cette transition de l'intermédiaire cinétique vers la forme stable, en dépit d'une affinité de liaison très élevée (Chapitre 3, peptide CLIP(81-89)-HA, Beeson et al, 96; Kropshofer et al, 95; Verreck et al, 96). Selon Beeson (Beeson et al, 96), le taux d'ajustement stérique du peptide au sein du site de liaison serait une des limites à l'incapacité des peptides affins à induire la formation de complexes stables.

(2) En revanche, le peptide INS B(10-30) d'affinité médiocre permet d'induire la formation d'un complexe avec une thermostabilité élevée. Toutefois, nous avons constaté la nécessité d'utiliser des concentrations en peptides élevées (200 µM) afin de favoriser l'accumulation de ces complexes terminaux. Ainsi, dans ce cas, le taux de formation du complexe stable semble limité par la demi-vie de l'intermédiaire cinétique.

L'étude de la thermostabilité permet d'accéder au paramètre d'énergie libre de la molécule pouvant donner des informations sur la force et/ou le nombre de contact intramoléculaire entre le peptide et la molécule de CMH de classe II. Combiné aux informations obtenues en étude cristallographique, cette approche devrait nous permettre de mieux comprendre les règles régissant l'acquisition de la stabilité. Dans notre cas, les structures

cristallines de l'allèle HLA-DR1 (Stern et al, 94; Murthy et al, 97) représentent des modèles d'interaction peptide /CMH qui peuvent s'apparenter aux formes terminales stables des complexes peptide/HLA-DR1. Pour valider cette hypothèse, nous allons comparer les thermostabilités des complexes HLA-DR1 matures induites par la liaison du peptide HA(307-319) et le peptide A2(103-117). Ces deux peptides ont fait l'objet d'un étude cristallographique, ce qui a conduit à l'identification de la totalité des interactions moléculaires entre le peptide et la molécule de classe II HLA-DR1 (Stern et al, 94; Murthy et al, 97).

D'autre part, nous avons engagé une collaboration avec l'équipe dirigée par le Docteur Burkhard Fleckenstein dans l'unité du professeur Jung à Tübingen (Allemagne) afin de définir les règles régissant l'influence du peptide sur le processus de maturation de la stabilité des molécules de CMH de classe II. Cette équipe a caractérisé un motif d'ancrage quantitatif, spécifique de l'haploype HLA-DR1 (Fleckenstein et al., 96). Leur approche est basée sur l'utilisation de bibliothèques peptidiques de 11 résidus en test de compétition contre un ligand de référence. 220 bibliothèques ont été conçues pour permettre d'analyser à chaque position du peptide l'influence d'un acide aminé, comme défini ci-dessous :

O	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	O	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	O	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	O	X	X	X	X	X	X	X
										<i>Etc...</i>

### Schéma représentatif d'une bibliothèque peptidique

O représente un acide aminé défini parmi l'ensemble des acides aminés naturels (sauf la cystéine remplacée par l'acide amino-butyrique)

X représente un mélange de l'ensemble des acides aminés naturels (sauf la cystéine remplacée par l'acide amino-butyrique)

Notre étude sera limitée à l'analyse des bibliothèques ayant données les meilleurs scores dans leurs études de compétition (environ 80 bibliothèques différentes). Notre approche consistera à mesurer la thermostabilité induite par ces bibliothèques. A terme, les informations apportées devraient nous permettre de définir des règles permettant la conception de peptides hautement stabilisants pour les molécules de CMH de classe II.

### **III. Existence de multiples conformations de molécules de CMH de classe II induites par les peptides ligands**

#### **A. RESUME**

Une seule étude mentionne le fait que les molécules de CMH de classe II ont la capacité d'adopter différentes conformations dépendantes de la nature du peptide ligand (Chervonsky et al, 98). Toutefois, les bases moléculaires de ces modifications conformationnelles ainsi que l'identification des résidus du peptide ligand responsables de ce mécanisme n'ont pas été mises en évidence. Dans cette étude, nous démontrons, de manière directe, l'influence spécifique du peptide dans la formation de multiples variants de molécules de CMH II. En effet, les molécules HLA-DR1 solubles, associées à différents peptides ligands, migrent en gel SDS-PAGE avec des mobilités variables. L'existence de ces conformères ne semble pas pouvoir être reliée à des différences en terme de thermostabilité. Néanmoins, l'analyse en dichroïsme circulaire souligne un effet de la température, préférentiellement sur la structure du complexe de mobilité réduite en gel SDS-PAGE. De manière surprenante, le segment N-terminal (81-89) du peptide CLIP ainsi que les résidus C terminaux du peptide TT (830-846) ont un effet important sur la formation de variants conformationnels, diminuant les poids moléculaires apparents des complexes stables correspondants. Nous proposons un modèle dans lequel les résidus N- et C-terminaux situés en

dehors du site de liaison classique interagiraient avec des sites de liaison secondaires, ayant une influence sur la conformation des molécules de CMH II. L'ensemble de ces résultats devrait avoir des implications importantes dans la conception de ligands peptidiques pour les molécules de CMH de classe II.

## *B. INTRODUCTION*

La fonction des molécules de CMH de classe II est de présenter aux lymphocytes T, des peptides issus de la dégradation d'antigènes exogènes (Germain et Marguillies, 93). D'un point de vue structural, les molécules de classe II présentent deux domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  juxtaposés, homologues aux immunoglobulines, supportant les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  N-terminaux qui forment le site de liaison des peptides (Brown et al, 93 ; Stern et al, 94 ; Ghosh et al, 95 ; Dessen et al, 97). Ce site de liaison comporte des micro-environnements appelés poches d'ancrage qui permettent l'interaction spécifique de chaînes latérales du ligand peptidique. Ce dernier adopte une conformation hélicoïdale de type polyproline II (PII), structuration induite par un réseau de ponts hydrogène établi entre des atomes du squelette peptidique et des résidus conservés de la molécule de classe II (Jardetzky et al, 96). La longueur des peptides naturels varie de 12 à 25 résidus, avec les extrémités N- et C- terminales situées en dehors du site de liaison (Rudensky et al, 91 ; Chicz et al, 92).

L'acquisition d'un peptide antigénique par les molécules de classe II se déroule dans les compartiments intracellulaires selon un scénario élaboré, entraînant de multiples modifications structurales et biochimiques des complexes. Au cours de leur assemblage dans le réticulum endoplasmique, la protéine chaperonne li stabilise les CMH de classe II jusqu'à leur arrivée dans le compartiment endosomal où a lieu l'interaction avec les peptides antigéniques. A ce stade, la chaîne invariante li est dégradée progressivement jusqu'à obtention du peptide CLIP associé au niveau du site de liaison des molécules de classe II (Bush et Mellins, 96). L'acidité des endosomes entraîne une modification structurale des molécules de classe II, induisant la libération de CLIP, laissant ainsi l'accessibilité du site de liaison aux peptides antigéniques (Boniface et al, 96). A ce niveau, un changement phénotypique des molécules de classe II a

lieu, caractérisé par une modification de l'hydrophobicité (Runnels et al, 96) et par la formation d'isoformes appelées "floppy" (Dornmair et al, 89 ; Sadegh-Nasseri et Germain, 91 ; Sadegh-Nasseri et Germain, 92). La dissociation du peptide CLIP est facilitée par la protéine chaperonne HLA-DM qui, stabilisant les molécules de classe II vides, favorise l'interaction avec les peptides antigéniques néoformés (Sloan et al, 95 ; Sherman et al, 95 ; Vogt et al, 96 ; Kropshofer et al, 97 ; Denzin et al, 96 ; Werber et al, 96 ; Kropshofer et al, 96). Cet échange entre le peptide CLIP et les peptides antigéniques s'accompagne d'une maturation conformationnelle de l'hétérodimère ( $\alpha\beta$ ) mesurable par l'acquisition d'une conformation stable en gel SDS-PAGE (Morris et al, 94 ; Karlson et al, 94 ; Denzin et al, 94).

Récemment, des travaux ont porté sur le rôle du peptide dans la conformation des molécules de CMH de classe II matures exprimées en surface cellulaire. Ces modifications structurales ont notamment été mises en évidence en gel SDS-PAGE (Chervonsky et al, 98 ; Srinivasan et al, 91) mais également par la réactivité différentielle d'anticorps monoclonaux (Denzin et al, 94 ; Rath et al, 92 ; Fling et al, 94 ; Chervonsky et al, 98) et de superantigènes (Thibodeau et al, 94 ; Lavoie et al, 97 ; Albert et al, 98 ; Woodland et al, 97). Néanmoins, les bases moléculaires permettant de générer ces isoformes ainsi que la nature des résidus du peptide impliqué dans ce mécanisme demeurent inconnus.

Nous montrons dans cette étude que la liaison stable des peptides peut induire la formation de multiples isoformes de la molécule HLA-DR1. Ces variants conformationnels sont visualisés en gel d'acrylamide par leur mobilité différentielle. Ces conformères se distinguent également par des différences structurales observables en dichroïsme circulaire à différentes températures. Nous démontrons également que les résidus des peptides ligands situés en dehors du site de liaison peuvent exercer une influence sur la formation de ces conformères, suggérant ainsi leur interaction potentielle avec des sites de liaison accessoires au niveau de la molécule de CMH de classe II. L'existence de ces conformères ainsi que le rôle joué par le peptide ligand laissent donc imaginer un niveau de régulation supplémentaire dans l'activation des cellules T CD4.

## C. RESULTATS

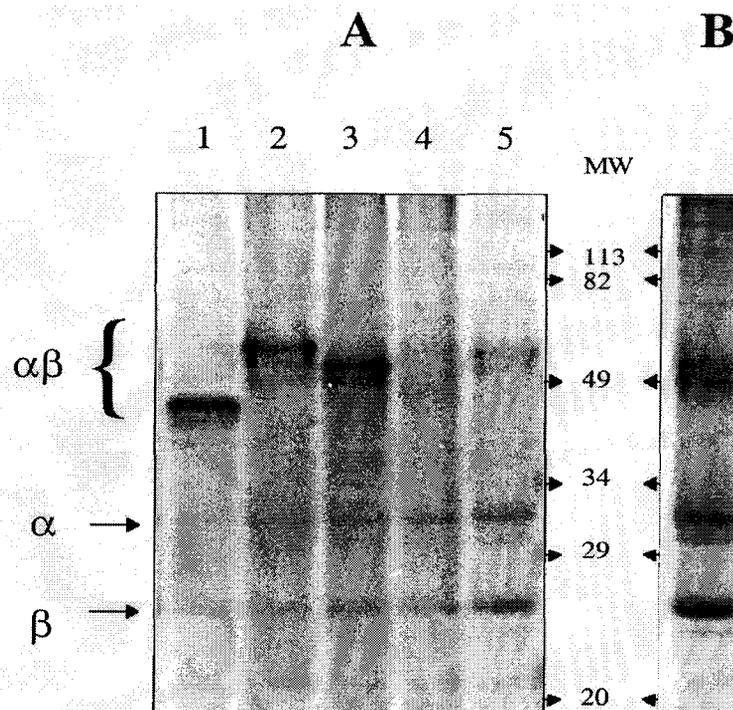
### *a. Formation d'isoformes de molécules de CMH de classe II induites par la liaison stable de peptides.*

Les études de liaison de peptides sur les molécules de CMH de classe II, réalisées dans notre laboratoire, sont basées sur l'utilisation des molécules HLA-DR1 solubles, tronquées de leurs parties trans-membranaires et intra-cellulaires et exprimées en cellules d'insectes (Stern and Wiley, 92 ; Sadegh-Nasseri et al, 94). Ces molécules dépourvues de peptide peuvent s'associer à un ligand de manière stoechiométrique. La liaison de peptides sur les molécules de classe II vides induit un changement des propriétés biochimiques observables notamment par leur résistance à la dissociation en gel SDS-PAGE.

Après incubation des molécules HLA-DR1 avec différents peptides, les complexes ont été analysés en gel SDS-PAGE (en condition non chauffé-non réduit). Ce protocole permet d'observer la migration des complexes hétéromériques stabilisés par le peptide. La figure 1 nous indique que chaque peptide testé a une influence sur la mobilité des hétérodimères en gel d'acrylamide. Le poids moléculaire apparent des complexes stables varie de 44 à 57 kDa (Fig.1A). Ces différences de poids moléculaires apparents (allant jusqu'à 10 kDa) sont trop importantes pour être attribuées aux variations de poids moléculaires entre les peptides. En considérant que le rapport charge en SDS/poids moléculaire de la protéine reste constant, l'existence de complexes avec des différences de mobilités en gel SDS-PAGE peut s'expliquer par la modification du volume globulaire de la protéine qui, toutefois, n'affecte pas la liaison du peptide au niveau des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ .

De manière intéressante, le peptide HA(307-319) induit la formation d'un complexe à haut poids moléculaire, proche de 57kDa . La construction chimère, MAP2HA (307-319), conduit quant à elle, à la formation d'un complexe stable de 44 kDa. Etant donné que ces deux peptides possèdent la même séquence d'ancrage pour HLA-DR1, les différences observées ne sont donc pas attribuables à une influence directe du peptide au niveau du site de liaison. Des résultats analogues ont pu être obtenus par une autre équipe sur le même modèle moléculaire

HLA-DR1 soluble et sur un peptide, constitué comme le MAP2HA, de deux séquences du HA(307-319) couplées par un bras de liaison (Juergen Mack, communication personnelle).

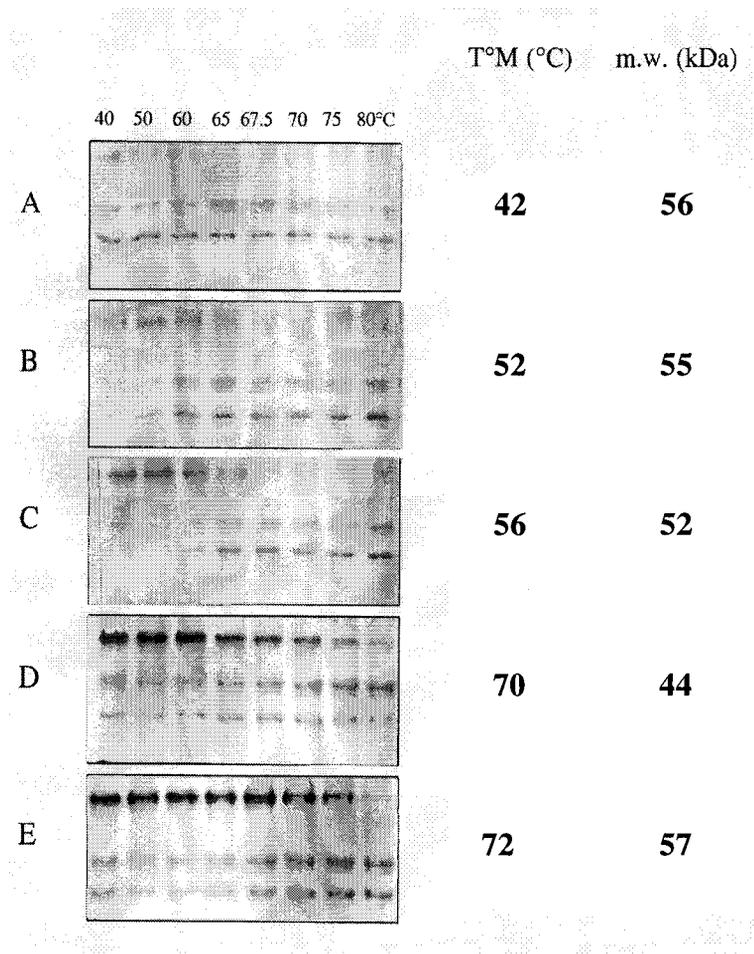


**Figure 1** : Influence du peptide sur la migration des complexes en gel SDS-PAGE. (A) incubation d'HLA-DR1 en présence de 100  $\mu$ M de peptides : (1) MAP2HA (307-319) - (2) HA (307-319) - (3) TT (830-843) - (4) INS B (10-30) - (5) MYO (67-76). (B) incubation d'HLA-DR1 avec 500  $\mu$ M d'une librairie peptidique de 11 résidus XYX9.

Parallèlement, l'utilisation d'une librairie de 11 résidus XYX9 (Fig.1B) induit la formation d'une large bande comparativement à celle observée pour les peptides individuels. Les caractéristiques de cette librairie (taille, et présence d'une tyrosine en position 2) avaient été préalablement déterminées pour permettre l'induction d'une forme stable de la molécule HLA-DR1. Cette large bande obtenue avec la mixture de peptides correspond à une famille d'isoformes. Ainsi, compte-tenu du mode de liaison de cette librairie sur HLA-DR1 (conditionné par la présence de la tyrosine spécifique de la poche P1), l'existence de cette famille de variants conformationnels peut être en relation avec les résidus du peptide interagissant directement avec le site de liaison.

*b. Absence de corrélation entre le niveau de stabilité des complexes et leur mobilité en gel SDS-PAGE.*

Une mesure de la thermostabilité des complexes a été réalisée sur les différentes isoformes obtenues précédemment, afin de mettre en évidence une éventuelle relation entre le comportement en gel SDS-PAGE et un état énergétique (Fig.2). La formation de complexes stables a été acquise par une incubation de 96 heures des molécules HLA-DR1 solubles avec une concentration importante de peptides. Après élimination du peptide en excès par dialyse, les complexes sont soumis à différentes températures de 40 à 85°C. Les résultats montrent que la présence des différents peptides associés aux molécules HLA-DR1 influence spécifiquement la thermostabilité du complexe. Toutefois, aucune relation directe n'est observée entre les valeurs de  $T^{\circ}m$  et les poids moléculaires apparents des différents variants. En particulier, les températures de dénaturation des complexes formés avec les peptide HA(307-319) et MAP2HA(307-319) sont proches (respectivement 72 et 70°C) malgré leur différence importante de mobilité en gel



**Figure 2 :** *Thermostabilité de différents complexes peptide/HLA-DR1 : (A) MAP2HA (307-319) - (B) HA (307-319) - (C) TT (830-843) - (D) INS B (10-30) - (E) MYO (67-76).*

### *c. Analyse d'isoformes de la molécule HLA-DR1 en dichroïsme circulaire*

Afin de mettre en évidence les modifications conformationnelles induites par la liaison du peptide sur les molécules de classe II, nous avons réalisé une étude en dichroïsme circulaire dans les UV lointains. L'analyse a été menée sur les molécules HLA-DR1 vides et sur les complexes formés avec les peptides HA(307-319) et MAP2HA(307-319), de T<sup>m</sup> proches mais induisant des isoformes de la molécule HLA-DR1 très différentes.

En raison de la différence de poids moléculaire entre le peptide et la molécule de CMH, la contribution du peptide à la mesure d'ellipticité est négligeable. A température ambiante, les spectres obtenus pour les trois complexes sont voisins, suggérant qu'il n'existe pas de

différences au niveau de la structure secondaire (résultat non présenté). Toutefois, après addition de SDS, on observe une différence notable entre le complexe vide pour lequel apparaît un pic avec un minimum centré sur 207 nm et les complexes stables obtenus avec le peptide HA(307-319) et MAP2HA(307-319) pour lesquels l'allure des spectres n'est quasiment pas affectée (Fig.3). Afin de différencier sur des bases structurales les deux complexes stables, l'analyse a été poursuivie à différentes températures, de 25 à 90°C.

Dans le cas du complexe HLA-DR1/HA(307-319), une transition linéaire de la courbe est observée à 217 nm, pour des températures inférieures au  $T^m$  du complexe, interprétable comme une perte de structure secondaire. Au delà de 70 °C, une transition importante est observée à 207nm, compatible avec la dissociation des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  observée lors de l'étude de thermostabilité (Reich et al, 97). A 90°C, le spectre s'apparente à celui obtenu pour le complexe vide à la même température.

Les spectres acquis avec les complexes HLA-DR1/MAP2HA(307-319) apparaissent moins influencés par l'augmentation de température, indiquant une stabilité de la structure secondaire plus importante, comparativement au complexe HLA-DR1/HA(307-319). Au delà de 70°C, la transition attendue à 207 nm est moins prononcée, suggérant que la dissociation des chaînes n'est pas complète. Cette caractéristique peut être interprétée comme un certain maintien de la structure des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  même après la dissociation vraisemblable des deux chaînes.

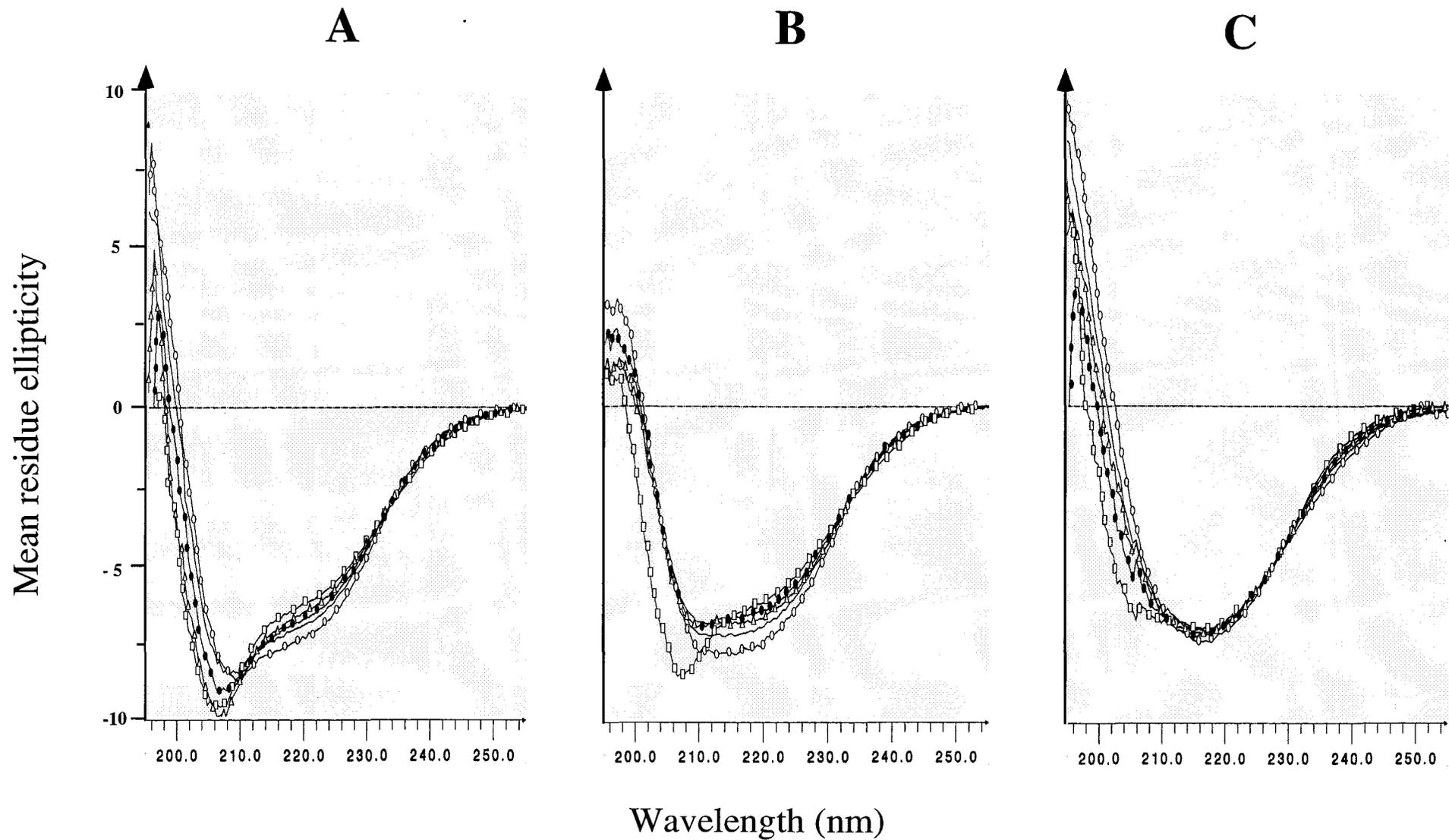
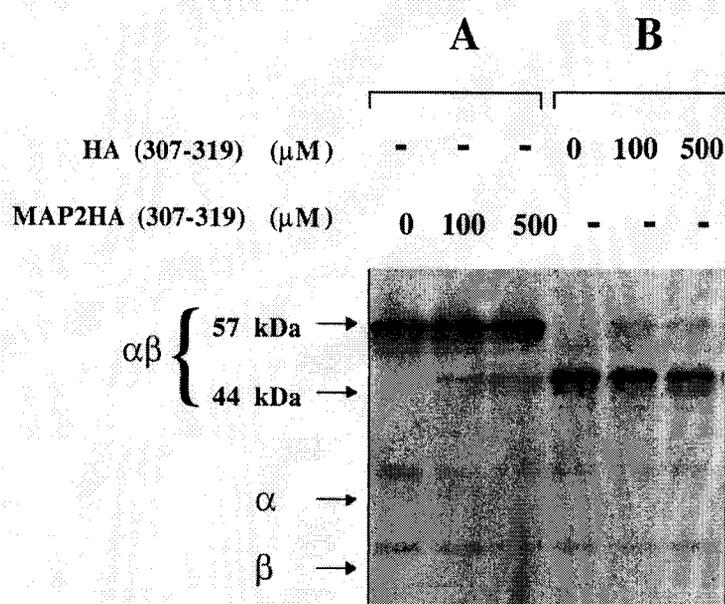


Figure 3 : Analyse en dichroïsme circulaire dans les UV lointains de la molécule HLA-DR1 vide (A), du complexes stable HLA-DR1/HA(307-319) (B) et du complexe stable HLA-DR1:MAP2HA (C) en fonction de différentes températures .

*d. La formation des variants conformationnels est réversible*

Différents complexes stables ont été formés par incubation avec, soit le peptide HA(307-319), soit le MAP2HA(307-319), purifiés par gel filtration puis ré-incubés avec un ligand différent (Fig.4). Les complexes obtenus avec les peptides HA(307-319) et MAP2HA(307-319) sont particulièrement stables, nécessitant des temps d'incubation prolongés avec le second peptide. En effet, la vitesse de dissociation du premier peptide préchargé limite l'association du second peptide. On observe toutefois la transition d'une isoforme à une autre, compatible avec la nature des peptides utilisés, mettant en évidence un phénomène de réversibilité. L'obtention d'une conformation particulière de la molécule HLA-DR1 semble donc dépendre uniquement de la nature du peptide associé au niveau du site de liaison.



**Figure 4 :** Réversibilité de la formation de variants conformationnels. (A) HLA-DR1/HA (307-319) et (B) HLA-DR1/MAP2HA (307-319) incubés à différentes concentrations de MAP2HA et HA respectivement.

*e. Influence des résidus N- et C- terminaux des ligands peptidiques sur la conformation des molécules de classe II HLA-DR1*

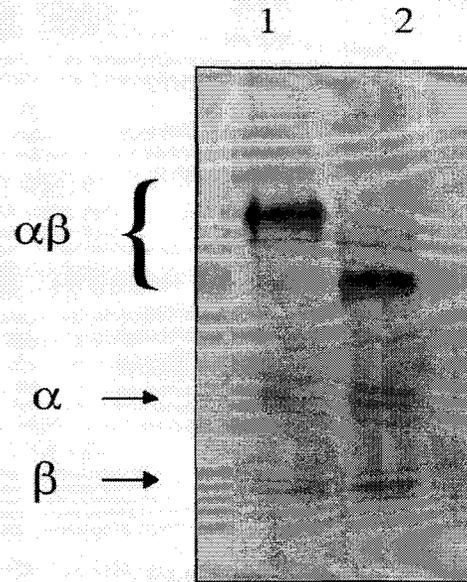
L'influence des résidus du peptide, situé en dehors du site de liaison, sur la conformation des molécules de classe II a été suggérée par l'observation des différences de poids moléculaires apparents obtenus avec les complexes HLA-DR1/HA(307-319) et HLA-DR1/MAP2HA en gel SDS-PAGE

Afin de mettre en évidence le rôle des résidus situés en dehors du site de liaison sur les changements conformationnels de la molécule HLA-DR1, deux peptides dérivés de la chaîne invariante ont été testés : CLIP(81-104) et une version plus courte, dépourvue de la partie N terminale, CLIP(90-104). Au niveau intracellulaire, le peptide CLIP est associé aux molécules de classe II de manière indépendante de l'allèle. La partie N-terminale (81-89) du peptide CLIP a été impliquée dans un mécanisme responsable de la diminution de la demi-vie du complexe HLA-DR3, suggérant son interaction possible avec un site alternatif allostérique (Kropshofer et al, 95a ; Kropshofer et al, 95b). Toutefois, contrairement aux autres allèles, la présence de la partie N- terminale permet l'obtention de complexes HLA-DR1 stables observables en gel SDS-PAGE. Les séquences des peptides ont été alignées en fonction de leur agrétope pour HLA-DR1 (Fig.5A). Au niveau de l'analyse des complexes en gel SDS-PAGE, le peptide CLIP court conduit à la formation d'un complexe de haut poids moléculaire (55 kDa) comparativement à celui obtenu dans le cas du peptide CLIP(81-104) migrant avec une mobilité accrue (45 kDa). La partie N- terminale (81-89) doit vraisemblablement interagir avec un site distant du site de liaison classique afin d'influencer la conformation du complexe stable HLA-DR1.

Les extrémités C-terminales de peptides antigéniques peuvent également influencer la mobilité du complexe. En effet, l'addition de résidus distants de l'agrétope du peptide TT(830-843) a une influence sur la conformation de la molécule HLA-DR1. Ainsi l'addition du résidu Leu<sub>844</sub> et surtout Lys<sub>845</sub> conduit à une augmentation de la mobilité en gel SDS-PAGE. Les résidus éloignés de l'agrétope du TT(830-843) peuvent influencer la conformation du complexe, résultat qui montre l'existence éventuelle d'un site effecteur localisé en dehors du site de liaison classique.

**A**

1                    KMRMATPLLMQALPM  
 2    LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPM  
                          P1    P4 P6    P9

**B**

1    QYIKANSKFIGITE  
 2    QYIKANSKFIGITEL  
 3    QYIKANSKFIGITELK  
 4    QYIKANSKFIGITELKK  
                          P1    P4 P6    P9

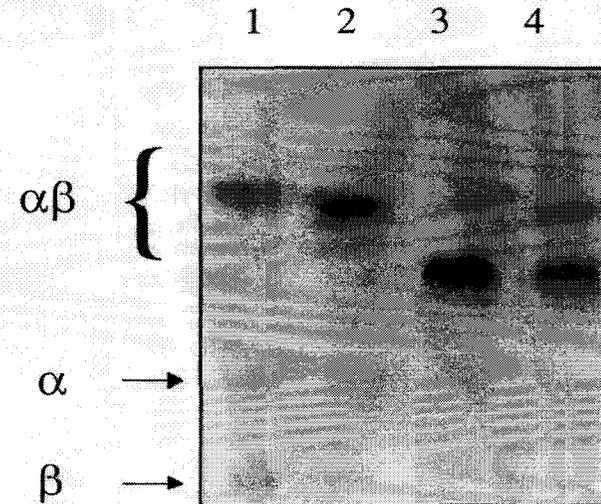


Figure 5 : Influence des extrémités N et C terminales de peptides sur la conformation de la molécule HLA-DR1. (A) analyse en gel SDS-PAGE des molécules HLA-DR1 incubées avec les peptides CLIP(90-104) et CLIP(81-104). (B) analyse en gel SDS-PAGE des molécules HLA-DR1 incubées avec différents variants du peptide TT(830-846)

## *D. DISCUSSION*

Dans cette étude, nous démontrons de manière directe l'influence des peptides antigéniques sur la formation de différentes conformations de molécules de classe II. Nous avons montré que les peptides ligands spécifiques d'une molécule de CMH de classe II, HLA-DR1, conduisent à la formation de complexes stables avec des mobilités variables en gel SDS-PAGE (non chauffé, non réduit). Chaque conformère possède un poids moléculaire apparent compris entre 44 et 57 kDa, traduisant l'existence d'une famille de molécules de CMH de classe II sous différents états conformationnels.

Récemment, Chervonsky et collaborateurs (Chervonsky et al, 98) ont remarqué que les molécules de CMH de classe II murines, exprimées à la surface de cellules présentatrices d'antigènes, pouvaient exister sous différentes conformations dépendantes de la nature du peptide. Cette observation est basée sur la réactivité différentielle d'un anticorps monoclonal (25-9-17), incapable d'inhiber la reconnaissance de certains clones T spécifiques d'un peptide antigénique. De plus, l'analyse en gel de SDS-PAGE de molécules I-A<sup>b</sup> immunoprécipitées par l'anticorps 25-9-17 conduit à l'observation de complexes stables possédant une mobilité particulière. Cette étude permettait ainsi de révéler l'existence de conformères fonctionnels en surface cellulaire et vraisemblablement induits par la nature des peptides ligands. Ainsi, en accord avec nos résultats sur HLA-DR1, les molécules de CMH de classe II peuvent exister sous de multiples conformations.

La capacité des molécules de classe II à adopter plusieurs formes est une notion rarement évoquée dans la littérature. En 1991, l'équipe de Srinivasan (Srinivasan et al, 91) met en évidence la présence de deux formes de molécules de classe II murines I-E<sup>k</sup> liées au peptide antigénique : l'une minoritaire, de mobilité réduite, liée à la présence du peptide radiomarqué, et l'autre compacte, s'apparentant aux molécules de CMH de classe II trouvées majoritairement en surface cellulaire. D'autre part, des analyses d'isoélectrophocalisation des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  révèlent l'existence d'une hétérogénéité conformationnelle, un argument pouvant être pris en compte pour l'interprétation des multiples conformères obtenus à partir des molécules de CMH de classe II (Nag et al, 94). De plus, l'équipe de Germain (Dornmair et Germain, 89) soulignait

l'existence d'une forme alternative de molécules de CMH de classe II murines, appelées "floppy" du fait de leur mobilité réduite en gel SDS-PAGE, par opposition aux formes natives plus compactes. Ces isoformes sont obtenues après passage à pH acide ou à des températures élevées. Toutefois, il semble que la nature des conformères de la molécule HLA-DR1 soit différente des structures impliquées dans le mécanisme d'isomérisation "floppy/compact". Dans notre étude, les changements conformationnels des complexes stables apparaissent uniquement liés à la nature du peptide ligand et ceci de manière indépendante des conditions du milieu comme le pH ou la température. De plus, la molécule de CMH de classe II semble avoir la capacité intrinsèque de former plusieurs variants, observation en opposition avec le mécanisme binaire conduisant aux formes "floppy/compact".

Les peptides auraient donc un rôle majeur dans la variabilité conformationnelle des molécules de CMH de classe II bien que les résidus peptidiques impliqués dans ce mécanisme ne soient pas encore décrits. Ici, nous avons démontré qu'un tel mécanisme peut dépendre d'interactions (1) entre le peptide et le site de liaison classique comme cela semble être le cas également pour les molécules de CMH de classe I, mais également (2) entre la molécule de classe II et les résidus émergeant en dehors du site de liaison.

En effet, nous montrons que la liaison de la librairie peptidique  $XYX_n$ , conçue pour permettre une interaction fixe par rapport à la poche P1 du site de liaison (Fleckenstein et al, 96), induit la formation d'une large bande en SDS-PAGE correspondant à une famille de variants conformationnels. Nous émettons l'hypothèse que l'interaction de résidus du peptide situés au sein du site de liaison influence la conformation. Dans le cas des molécules de classe I, le peptide de 9 à 11 résidus localisés de manière stricte au sein de la cavité, est capable d'influencer la conformation de la molécule, et ceci est détectable par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes proches du site de liaison (Bluestone et al, 92 ; Sherman et al, 93 ; Rohren et al, 94 ; Hlavac et al, 96).

De plus, les résidus situés en dehors du site de liaison, comme la partie N-terminale (81-89) du peptide CLIP, jouent également un rôle sur la conformation de la molécule HLA-DR1 ainsi que sur la stabilité des molécules HLA-DR2 et HLA-DR3 (Kropshofer et al, 95a ; Kropshofer et al, 95b). Les résidus Lys 83, Lys 86 et Pro 87 de la partie N-terminale du peptide

CLIP ont été impliqués dans l'interaction avec un site effecteur en dehors du site de liaison, capable d'induire un phénomène allostérique et facilitant l'auto-dissociation du peptide CLIP (Kropshofer et al, 95). D'autre part, des études menées sur la molécule HLA-DR1 produite par translation/transcription *in vitro*, ont montré la formation de complexes de 55,5 kDa et 53 kDa avec les peptides CLIP(90-105) et CLIP(81-105) respectivement (Stumpter et al, 97). L'ensemble de ces travaux suggèrent donc une interaction vraisemblable des résidus 81 à 89 avec les molécules de CMH II mais avec une région distante du site de liaison classique. Nos résultats apportent également la première description du rôle de résidus du peptide ligand sur la conformation des molécules de CMH de classe II. De manière équivalente, nous décrivons l'importance des résidus C-terminaux du peptide TT dans la conformation de HLA-DR1, confirmant ainsi l'hypothèse d'un site d'interaction distant de 5 à 6 résidus de la poche P9. C'est pourquoi, pour un même agrétope, un complexe peptide/CMH de classe II peut exister sous différentes conformations, en fonction des résidus situés en dehors du site de liaison. L'existence de ces conformations représenterait un niveau supplémentaire de régulation de la réponse cellulaire T. Toutefois, les exopeptidases participant au mécanisme de digestion des extrémités des peptides associés aux molécules de classe II (« trimming »), doivent probablement limiter la présence des résidus situés en dehors du site de liaison et donc leur interaction probable avec des sites effecteurs.

D'un point de vue structural, il semblait raisonnable de penser que les différentes conformations obtenues reflétaient des différences énergétiques mesurables par l'étude de la stabilité des complexes. Cette hypothèse n'a pu être confirmée en raison de l'existence d'isoformes de même  $T^{\circ}m$ . Néanmoins, l'analyse en dichroïsme circulaire parvient à mettre en évidence que la structure des complexes de faible mobilité est plus sensible à l'augmentation de la température. Au regard de ces résultats, nous proposons que les domaines de la molécule impliqués dans le mécanisme de stabilité en SDS-PAGE sont situés dans des aires différentes de celles responsables de la formation des variants conformationnels. Les changements structuraux sont vraisemblablement limités à la flexibilité de domaines très localisés, avec de faibles modifications des structures ternaire ou quaternaire. Ils ne sont toutefois pas visibles dans les différentes études cristallographiques. En effet, d'un complexe peptide/CMH de classe II à

l'autre, les structures sont très proches, à l'exception de différences locales au niveau d'un "pli" situé dans l'hélice  $\alpha$  de la chaîne  $\beta$  (Brown et al, 93 ; Stern et al, 94 ; Ghosh et al, 95 ; Dessen et al, 97). Cependant, nous pensons que les variations structurales observées en terme de mobilité en gel SDS-PAGE sont trop importantes pour être expliquées par des modifications au niveau de ce "pli". D'autres domaines des molécules de classe II sont également impliqués dans ces changements conformationnels, comme l'indique la réactivité de certains superantigènes principalement dirigés contre les domaines  $\alpha 1$  et/ou  $\beta 1$  (Thibodeau et al, 94 ; Lavoie et al, 97 ; Albert et al, 98 ; Woodland et al, 97). De plus, l'association étroite du peptide avec le site de liaison constitué des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ , peut également affecter les domaines sous-jacents  $\alpha 2$  et/ou  $\beta 2$ , homologues aux immunoglobulines. Cette hypothèse a été notamment proposée pour expliquer les changements conformationnels induit à pH acide sur la molécule I-E<sup>k</sup> (Boniface et al, 96).

En conclusion, l'existence de multiples conformations de molécules de classe II pourrait avoir des implications importantes pour les mécanismes de trafic intracellulaire des molécules de CMH de classe II, mais également pour la reconnaissance T. Dans un premier temps, il serait intéressant d'évaluer l'implication de ces différentes conformations avec la molécule chaperonne, HLA-DM. Dans un second temps, étant donnée la présence de ces conformères à la surface de cellules vivantes, il conviendrait de mesurer l'impact de ces changements induits par les peptides sur l'activation de cellules T et sur la diversité du répertoire généré.

## **Résultats complémentaires:**

# **Influence des extrémités N et C terminales de peptides sur la stabilité et la conformation de la molécule HLA-DR1**

### *A. Introduction*

Les résultats précédents révèlent que les extrémités N- et C- terminales des peptides, situées en dehors du site de liaison peuvent avoir une influence sur la conformation des molécules de classe II. Ces résultats suggèrent l'existence de contacts possibles entre le peptide et la molécule de classe II en dehors du site de liaison classique. Dans cette étude, nous apportons des informations complémentaires mettant en évidence que ces extrémités peuvent également jouer un rôle dans la stabilité des molécules de classe II. L'élongation de la partie C-terminale du peptide TT(830-843) augmente de manière significative la stabilité du complexe HLA-DR1 indépendamment de l'affinité relative. De plus, tandis que le peptide CLIP(81-104) stabilise la molécule HLA-DR1, nous montrons que sa partie N- terminale (81-90) peut empêcher l'acquisition d'une forme mature de la molécule HLA-DR1 si elle est associée au peptide HA(307-319) (CLIP-HA). Cette activité de la partie N-terminale du CLIP sur la liaison du peptide CLIP-HA s'effectue indépendamment de l'affinité qui reste inchangée par rapport au peptide HA(307-319). L'identification des modalités d'interaction des portions N- et C- terminales au niveau de ces "sites alternatifs" permettra d'envisager leur utilisation pour la conception de ligands synthétiques de molécules de CMH de classe II utilisables en immunothérapie.

## B. Résultats

### a. Influence des résidus C-terminaux distants du site de liaison sur l'interaction avec la molécule HLA-DR1

L'épitope immunodominant TT(830-843) utilisé dans cette étude de liaison est capable de stabiliser la structure de la molécule HLA-DR1 en gel SDS-PAGE. Les points d'ancrage de ce peptide ont été caractérisés pour HLA-DR1 (Fig. 1). Les acides aminés Tyr<sub>831</sub>, Ala<sub>834</sub>, Ser<sub>836</sub> et Ile<sub>839</sub> interagissent respectivement avec les poches d'ancrage P1, P4, P6 et P9 (Strominger et al., 91). Compte-tenu de la taille du site de liaison observée en cristallographie (Brown et al., 93), le peptide TT(830-843) doit vraisemblablement interagir dans le site de liaison de la position -1 à la position + 2, par rapport aux poches P1 et P9, respectivement. Ainsi, les deux résidus terminaux Thr<sub>842</sub> et Glu<sub>843</sub> doivent émerger hors du site de liaison et être ainsi totalement accessibles au solvant (Fig. 1).

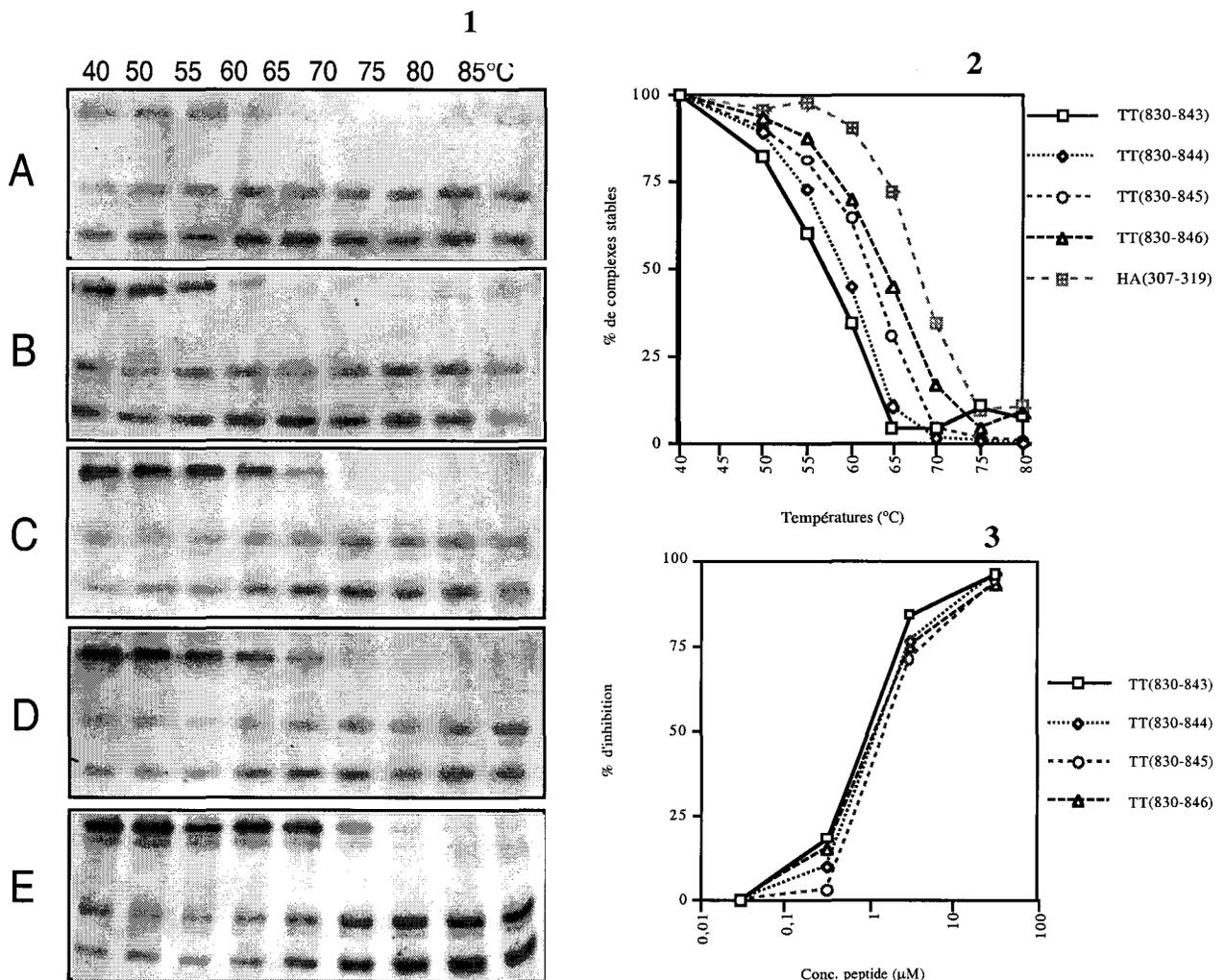
	P1	P4	P6	P9	+5	+6	+7											
TT(830-843)	Q	Y	I	K	A	N	S	K	F	I	G	I	T	E				
TT(830-844)	Q	Y	I	K	A	N	S	K	F	I	G	I	T	E	L			
TT(830-845)	Q	Y	I	K	A	N	S	K	F	I	G	I	T	E	L	K		
TT(830-846)	Q	Y	I	K	A	N	S	K	F	I	G	I	T	E	L	K	K	
HA(307-319)	P	K	Y	V	K	Q	N	T	L	K	L	A	T					
HA-TELKK	P	K	Y	V	K	Q	N	T	L	K	L	A	T	T	E	L	K	K

 Domaine impliqué dans l'interaction avec le site de liaison  
 X Résidus impliqués dans l'interaction avec une poche d'ancrage P

**Figure 1:** Alignement des séquences des différents peptides utilisés pour étudier l'influence des résidus C-terminaux sur la stabilité des complexes

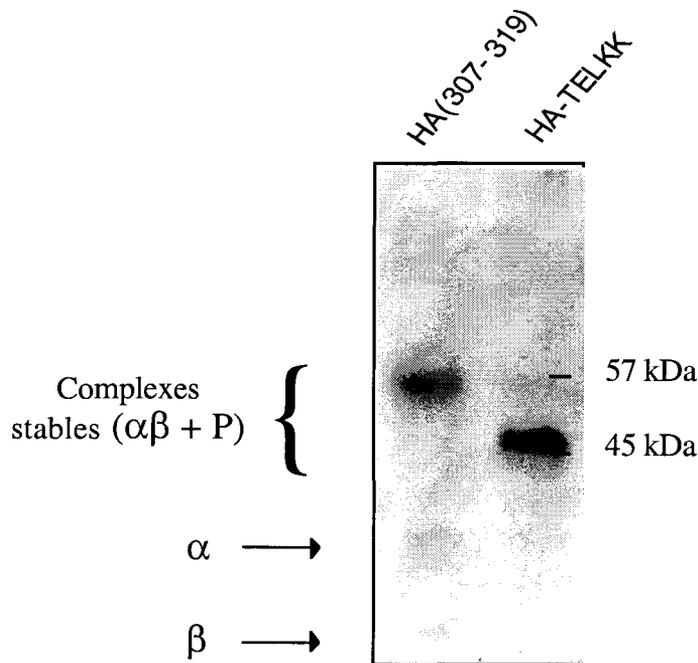
Nous avons mis en évidence que l'élongation de la partie C-terminale par les acides aminés naturels de la séquence de la toxine tétanique a une influence sur la stabilité de la molécule et ce, de manière indépendante de l'affinité (Fig 2). L'adjonction successive des résidus Leu<sub>844</sub>, Lys<sub>845</sub> et Lys<sub>846</sub> à la séquence TT (830-843) augmente la T<sub>m</sub> de la molécule respectivement de 2°C, 3°C et 2.5°C. Cette augmentation de la résistance à la dénaturation par la chaleur souligne, de manière directe,

l'influence de ces résidus sur des variations d'énergie libre du complexe et donc sur l'établissement de contacts supplémentaires avec la molécule de CMH de classe II. L'élongation du peptide en partie C-terminale ne crée pas de nouvel agrétope favorable pour la liaison avec HLA-DR1 donc l'influence de résidus C-terminaux sur la molécule de classe II n'est donc attribuable qu'à une interaction réalisée en dehors du site de liaison classique.



**Figure 2 :** Influence des résidus C- terminaux du peptide TT (830-846) sur la stabilité des complexes et l'affinité de liaison pour HLA-DR1 (1-2) : thermostabilité en gel SDS-PAGE (réalisée selon la méthode présentée dans la partie résultat 1) (A)TT(830-843) (B)TT(830-844) (C) TT(830-845) (D)TT(830-846) (E)HA(307-319) et (3) Mesure de l'IC50 en compétition hétérologue contre le peptide HA(307-319) biotinylé.

L'activité de cette partie C-terminale peut être transmise à un autre épitope T. La synthèse d'un peptide chimère, appelé HA-TELKK, a été réalisée en ajoutant du côté C-terminal de la séquence de l'épitope T HA(307-319), les acides aminés C-terminaux du peptide TT (830-846) (Fig.1). L'addition de ce motif à l'épitope HA(307-319) ne crée pas de nouvel agrétope putatif spécifique pour HLA-DR1. L'incubation de ce peptide chimère avec la molécule HLA-DR1 soluble génère un complexe stable possédant une mobilité réduite en gel SDS-PAGE par rapport au peptide HA(307-319). Ainsi, on retrouve une activité analogue à celle obtenue pour le peptide TT(830-846) par rapport au TT(830-843).



**Figure 3** : Influence des résidus C- terminaux du peptide chimère HA-TELKK sur la mobilité du complexe HLA-DR1 en gel SDS-PAGE par rapport au peptide HA(307-319). Après incubation des molécules HLA-DR1 avec 100  $\mu$ M de peptide, les échantillons sont déposés directement sur un gel d'acrylamide à 12,5% sans agent réducteur, ni dénaturation par la chaleur.

*b. La partie N-terminale (81-89) du peptide CLIP influence de manière importante la stabilité de la molécule HLA-DR1*

L'élongation de l'extrémité N-terminale du peptide peut avoir également un effet important sur la molécule de CMH de classe II. La partie N-terminale du peptide CLIP est connue pour induire sur HLA-DR2 et HLA-DR3, une réduction importante de la demi-vie du complexe liée à une réduction de la stabilité en gel SDS-PAGE (Kropshofer et al. , 95a ; Kropshofer et al., 95b). Contrairement à ces observations, les peptides CLIP(81-104) et CLIP(90-104) sont tous deux capables de stabiliser HLA-DR1 (voir étude précédente, Stumpter et Benaroch, 97; Bijlmakers et al., 1994 ; Hedley et al., 94). Les thermostabilités des complexes matures, obtenu avec les deux peptides CLIP(81-104) et CLIP(90-104), mettent en évidence une différence de T<sup>m</sup> de 2.5°C au profit du peptide CLIP court. Cet effet est toutefois relativement faible par rapport aux observations faites pour les allèles HLA-DR2 et HLA-DR3 (Kropshofer et al. , 95a ; Kropshofer et al., 95b).

		P1	P4	P6	P9	
CLIP(81-104)	L P K P P K P V	S K M R M A T P L L M Q A				L P M
CLIP(90-104)		K M R M A T P L L M Q A				L P M
CLIP-HA	L P K P P K P V	S K Y V K Q N T L K L A T				
HA(307-319)		P K Y V K Q N T L K L A T				
CLIP-HA(P1)	L P K P P K P V	S K M V K Q N T L K L A T				
CLIP-HA(ag)	L P K P P K P V	S K M V K A N P L K M A T				

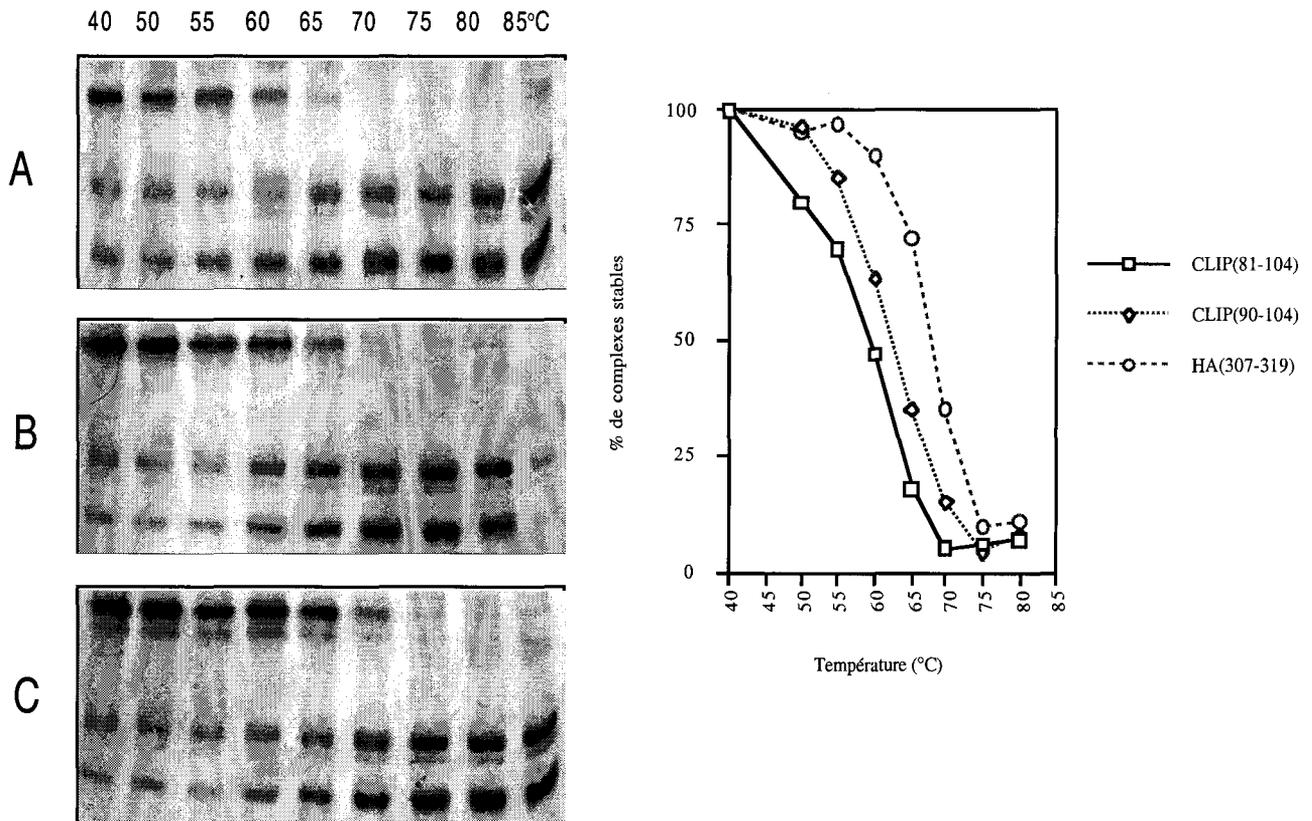


Domaine impliqué dans l'interaction avec le site de liaison de la molécule HLA-DR1

X points d'ancrage du peptide HA(307-319) sur la molécule HLA-DR1

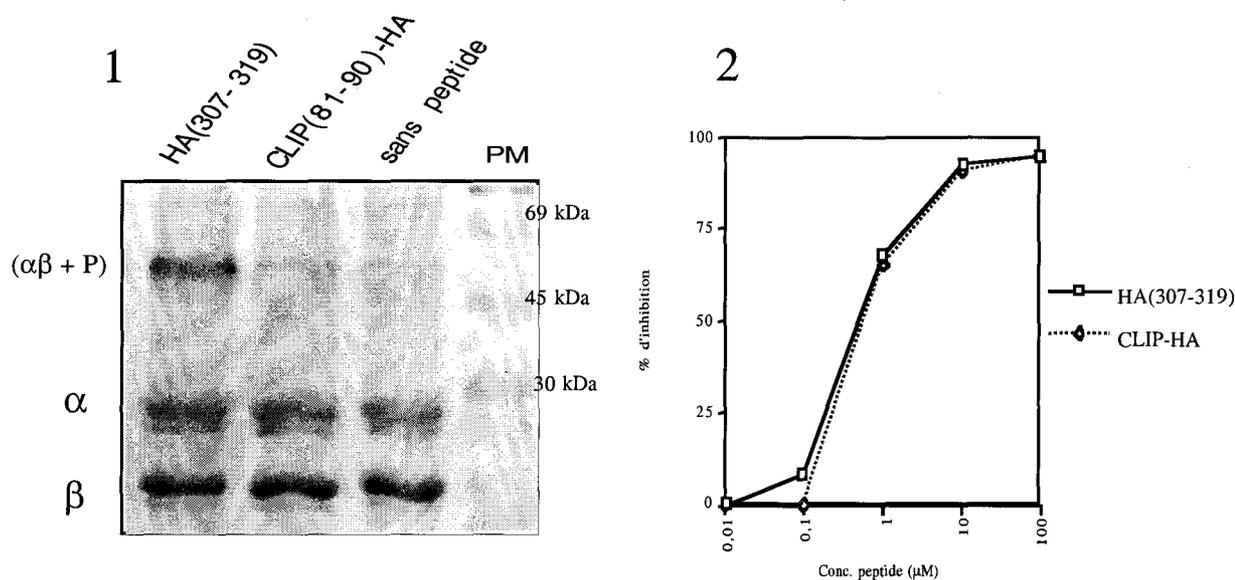
X points d'ancrage du peptide CLIP sur la molécule HLA-DR1

**Figure 4 :** Alignement des séquences dérivées du peptide CLIP(81-104) et du peptide HA(307-319).



**Figure 5 :** Influence des résidus N- terminaux du peptide CLIP (81-104) sur la thermostabilité des complexes peptide/HLA-DR1 : (A) : CLIP (81-104) - (B) CLIP (90-104) - (C) HA (307-319) Le protocole du test de thermostabilité est présenté (partie II)

Un peptide chimère comportant la partie CLIP(81-90) associée à la partie agrétopique du peptide HA(308-319) a été synthétisé (fig. 4). Cette construction, appelée CLIP-HA, possède la même affinité pour HLA-DR1 que le peptide HA(307-319) (Fig. 6). Néanmoins, contrairement au peptide HA(307-319), le peptide CLIP-HA n'est pas capable de stabiliser la molécule HLA-DR1 (Fig. 6). Cet effet drastique sur la stabilité est assez inattendu puisque le peptide HA(307-319) apparaît comme un ligand extrêmement stabilisant avec une  $T_m$  proche de 70°C (voir partie résultat II). Cette réduction importante de la stabilité montre que la partie CLIP (81-89) située en dehors du site de liaison interagit avec la molécule de classe II et induit un phénomène "allostérique".



**Figure 6 :** Influence des résidus N-Terminaux du peptide chimère CLIP-HA sur l'affinité de la liaison et la stabilité de la molécule HLA-DR1 : (1) Analyse des complexes stables en gel SDS-PAGE - (2) Evaluation de l'affinité de liaison en test de compétition contre le peptide de référence HA(307-319) biotinylé.

Nous avons pu démontrer que l'activité du fragment CLIP(81-89) dépend de la nature du peptide associé au niveau du site de liaison. Afin de mettre en évidence l'influence des points d'ancrage du peptide dans ce mécanisme, des modifications ont été apportées au niveau de l'agrégote du peptide CLIP-HA (Fig. 4).

Dans un premier temps, compte-tenu du fait que la poche P1 joue un rôle majeur dans la stabilité de l'allèle HLA-DR1 (Verreck et al, 96), nous avons substitué sur la séquence du peptide CLIP-HA l'acide aminé de la poche P1 par celui du peptide CLIP (CLIP-HA(P1)). Toutefois, aucun effet n'a été constaté (non présenté). La même approche a été réalisée mais cette fois sur l'agrégote complet (P1, P4, P6, P9) (CLIP-HA(ag)). Les résultats ne montrent à nouveau aucun gain de stabilité (non présenté). Ainsi, l'activité de la partie N-terminale du peptide CLIP ne semble avoir aucun lien avec la nature des points d'ancrage du peptide situé au niveau du site de liaison classique.

## C. Discussion

Les études menées *in vitro* sur les molécules de classe II purifiées ont montré que des peptides de 7 à 11 résidus, de taille inférieure aux peptides naturellement présentés, pouvaient interagir. Toutefois, la stabilité des molécules de CMH de classe II nécessite vraisemblablement une occupation complète de la longueur du site de liaison couvrant environ une longueur de 12 à 13 résidus (Siklodi et al., 98; Ceman et al., 98). Cette stabilité dépend à la fois de l'interaction de chaînes latérales particulières au niveau des poches d'ancrage mais également de l'établissement de ponts hydrogène conservés, responsables de la majeure partie de l'énergie de liaison. Les études cristallographiques nous montrent que les peptides qui occupent le site de la position -2 à la position +2 par rapport aux positions des poches d'ancrage P1 et P9 respectivement engagent souvent des ponts hydrogène avec la molécule de CMH. Ces ponts hydrogènes sont critiques pour la stabilité des molécules de classe II (Nelson et al., 93). Des études ont notamment révélée que l'élongation des extrémités N- et C-terminales d'un peptide minimum de 8 résidus par des résidus alanine n'a pas d'impact majeur sur l'affinité de liaison mais engendre une augmentation de la stabilité des molécules de CMH de classe II (Nelson et al., 93; Siklodi et al., 98).

Ici, nous montrons que l'élongation des peptides par des résidus situés hors du site de liaison peut tout de même avoir une influence sur l'interaction avec les molécules de CMH de classe II. Concernant l'élongation du peptide TT en position C-terminale, on observe une augmentation de la thermostabilité du complexe induit par la présence d'acides amines situés à une distance variant de 5 à 7 résidus par rapport à la position de la poche P9. A cette distance, lorsque l'on se réfère aux études cristallographiques, ces résidus C-terminaux sont en dehors du site de liaison, totalement accessibles au solvant d'où leur mauvaise résolution structurale, ne montrant aucun contact stable avec la molécule de CMH. Le fait que l'activité de la partie C-terminale du peptide TT (830-846) puisse être transférée à un autre épitope (peptide HA-TELKK) laisse envisager que l'on puisse utiliser ce type d'approche pour améliorer la capacité des peptides à former des complexes stables sans modifier la partie épitopique.

Nous montrons également que la partie N- terminale (81-89) du peptide CLIP peut empêcher la formation du complexe stable lorsqu'elle est associée à un épitope particulier. Contrairement aux études menées sur les allèles HLA-DR3 et HLA-DR2 (Kropshofer et al, 95a et 95b), la partie N-

terminale du peptide CLIP(81-104) permet d'induire la formation d'un complexe stable en gel SDS-PAGE (voir étude précédente, Stumptner et Benaroch, 97; Bijlmakers et al., 1994 ; Hedley et al., 94). L'influence de la partie 81-89 a été en effet montrée comme pouvant induire sa propre dissociation (Kropshofer et al, 95a) ce qui permet d'émettre l'hypothèse d'un mécanisme allostérique. Certains résidus de la partie 81-89 sont spécifique du mécanisme et permettent de concevoir l'existence d'un site complémentaire situé en dehors du domaine de liaison classique des peptides. La fonction biologique de ce mécanisme peut expliquer la raison pour laquelle les molécules de classe II présentant le peptide CLIP à la surface de cellules déficientes en HLA-DM, sont capables d'être chargés avec des peptides exogènes (malgré l'affinité élevée entre CLIP et les molécules de classe II). Ainsi, l'auto-relargage du peptide CLIP permet de comprendre l'existence de mécanismes de chargement des peptides indépendants des molécules HLA-DM, notamment les mécanismes de recyclage des molécules de CMH de classe II (Pinet et al, 95).

Des premiers résultats nous montrent que l'activité "allostérique" de la partie N- terminale du peptide CLIP ne dépendait pas de la nature des points d'ancrage du peptide pour la molécule HLA-DR1 puisque le transfert de l'agrétope du peptide CLIP sur le peptide CLIP-HA ne permet pas de former un complexe peptide/HLA-DR1 stable. Ce résultat suggère donc l'existence d'un mécanisme plus fin , peut être via une influence de la structure de chaîne principale du peptide de manière indépendante des chaînes latérales.

En conclusion, cette approche montre que l'on peut, par transfert de séquences non natives aux extrémités d'un épitope T, moduler les paramètres d'interaction avec la molécule de classe II et ce sans affecter la partie épitopique. Cette approche pourrait être utile pour la conception de nouveaux ligands pour les molécules de CMH de classe II.

## **IV. Etude préliminaire :**

# **Analyse en dichroïsme circulaire de l'interaction peptide/HLA-DR1**

### *A. Résumé*

La liaison du peptide avec une molécule de CMH de classe II induit une transition conformationnelle permettant la formation d'un complexe ayant une demi-vie élevée (50-100 heures), une résistance accrue à la dénaturation par le SDS et à la dégradation par les protéases. Toutefois, les données structurales concernant cette maturation sont inexistantes.

L'analyse comparative par dichroïsme circulaire des molécules de CMH vides et des complexes matures révèlent des structures secondaires similaires. Afin de mettre en évidence des différences conformationnelles entre la molécule HLA-DR1 et la forme mature, le SDS a été utilisé à des concentrations n'affectant pas la capacité de liaison du peptide aux molécules HLA-DR1. Nous montrons par une analyse en dichroïsme circulaire que le SDS induit un changement structural de la molécule de classe II vide, non observé pour le complexe mature. De plus, nous montrons que ce changement structural est indépendant de la liaison stable du peptide et qu'il ne modifie pas la réactivité des superantigènes SEA, SEB et de l'anticorps L243, ligands dirigés contre le domaine de liaison du peptide constitué des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ . Ces résultats suggèrent que la formation d'un complexe mature induit des réarrangements structuraux indépendants du site de liaison du peptide, affectant probablement les domaines sous-jacents  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  de la molécule de CMH II.

## B. Introduction

Les molécules de CMH de classe II impliquées dans la présentation des antigènes peptidiques aux cellules T sont des protéines hétérodimériques constituées de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  transmembranaires de 34 kDa et 29 kDa respectivement, associées de manière non covalentes. Les parties extracellulaires des deux chaînes sont composées de deux domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour la chaîne  $\alpha$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$  pour la chaîne  $\beta$ . Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  forment deux hélices  $\alpha$  supportées par un plateau en feuillet  $\beta$  plissé formant un réceptacle identifié comme le site de liaison pour les peptides. Les domaines proximaux  $\alpha 2$  et  $\beta 2$ , homologues aux parties Fc des immunoglobulines, sont essentiellement constitués de feuillets  $\beta$  plissés et sont impliqués dans l'interaction avec la molécule CD4.

L'acquisition d'un peptide par les molécules de CMH de classe II s'accompagne de modifications structurales de la molécule se traduisant par la réduction des formes agrégées dans les endosomes (Germain et al, 93 ; Stern and Wiley, 92), l'augmentation de la stabilité de la molécule (Nelson et al, 94 ; Stern and Wiley, 92 ; Neefjes et al, 92 ; Sadegh-Nasseri et al, 91) et de leur résistance à la dégradation par les protéases (Nelson et al, 94 ; Sadegh-Nasseri et al, 94; Théry et al, 98; Ceman et al, 98). Cette maturation conformationnelle induite par l'interaction du peptide conduit également à une augmentation de la demi-vie des complexes, paramètre corrélé à l'immunogénicité (Nelson et al, 94 ; Lanzavecchia et al, 92 ; Rabinowitz et al, 97 ; Matzui et al, 94) et semble être impliquée dans l'exportation des molécules de classe II en surface (Théry et al, 98; Germain, 93 ; Agrawal et al, 94). Toutefois, les bases moléculaires à l'origine de la transition conformationnelle du complexe vide vers une forme mature immunologiquement active, n'ont pas été décrites.

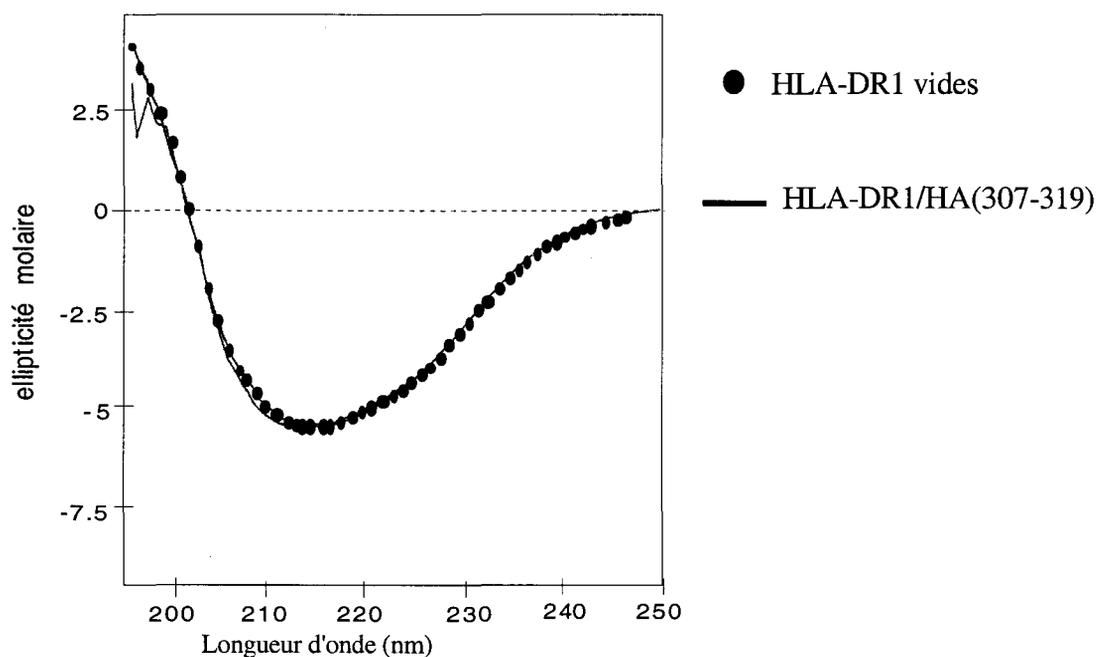
Dans cette étude, nous avons étudié les différences de conformation entre la molécule HLA-DR1 vide et la forme mature par dichroïsme circulaire, en présence de faibles concentrations de SDS. Les résultats obtenus nous permettent de conclure que la liaison du peptide sur les molécules de CMH vides entraîne un réarrangement structural d'un domaine distinct du site de liaison. Nous discuterons des impacts éventuels de ces résultats sur la compréhension de certains mécanismes de la présentation antigénique.

## C. Résultats

### a. Analyse par dichroïsme circulaire (DC) des molécules HLA-DR1

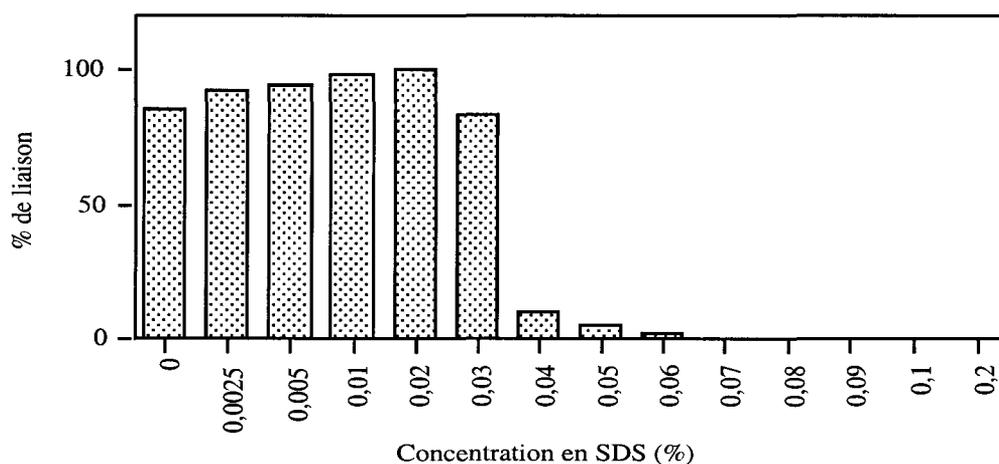
*vides et des complexes peptide/HLA-DR1 matures en présence de SDS.*

Les analyses par DC dans les U.V. lointains ont été réalisées sur les molécules HLA-DR1 solubles exprimées en système baculovirus (Stern et al, 92). Dans un premier temps, nous avons pu mettre en évidence que la liaison du peptide sur HLA-DR1 n'entraîne pas de modifications notables de la structure secondaire de la molécule de CMH II (Fig 1), résultat confirmant les observations de Reich et al, 97. On constate la présence d'un pic large avec un minima centré sur 217 nm compatible avec une molécule riche en structures secondaires comportant une quantité importante de feuillets  $\beta$  et une proportion substantielle d'hélices  $\alpha$  (Greenfield et al, 69 ; Reich et al, 97 ; Jonathan et al, 92 ; Boniface et al, 96).



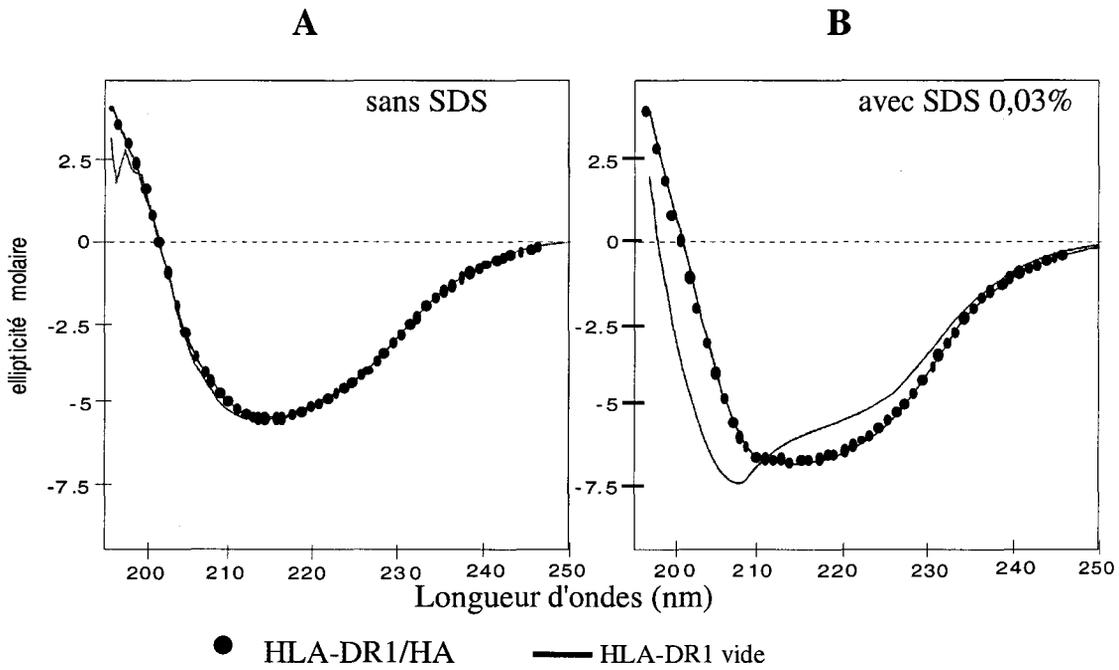
**Figure 1 :** Analyse en dichroïsme circulaire dans les U.V. lointains des molécules HLA-DR1 solubles sous leur forme vide ou préformée avec le peptide HA(307-319) : Les échantillons sont préparés à 250  $\mu\text{g/ml}$  en tampon phosphate 10 mM.

Les molécules de CMH de classe II matures sont connues pour leur capacité à résister à la dénaturation par le SDS. Ce détergent a donc été employé afin de mettre en évidence des différences conformationnelles entre la molécule HLA-DR1 vide et sa forme mature induite par la liaison du peptide HA (307-319). Dans un premier temps, il nous a fallu déterminer les concentrations en SDS pour lesquelles la fonctionnalité de la protéine était peu affectée. Nous avons évalué la capacité de la molécule HLA-DR1 à interagir avec le peptide HA (307-319) biotinylé en fonction de la concentration en SDS (Fig. 2). Les résultats nous indiquent qu'en deçà de 0,03%, la liaison du peptide HA (307-319) s'effectue avec la molécule HLA-DR1.



**Figure 2 :** Liaison du peptide HA (307-319) biotinylé sur la molécule HLA-DR1 en fonction de la concentration en SDS. Les molécules HLA-DR1 solubles sont préincubées en présence de différentes concentrations en SDS durant 30 minutes puis une concentration de 10 mM de peptide HA (307-319) biotinylé est ajoutée. Le % de liaison est évalué selon une technique ELISA avec une révélation par la streptavidine peroxydase.

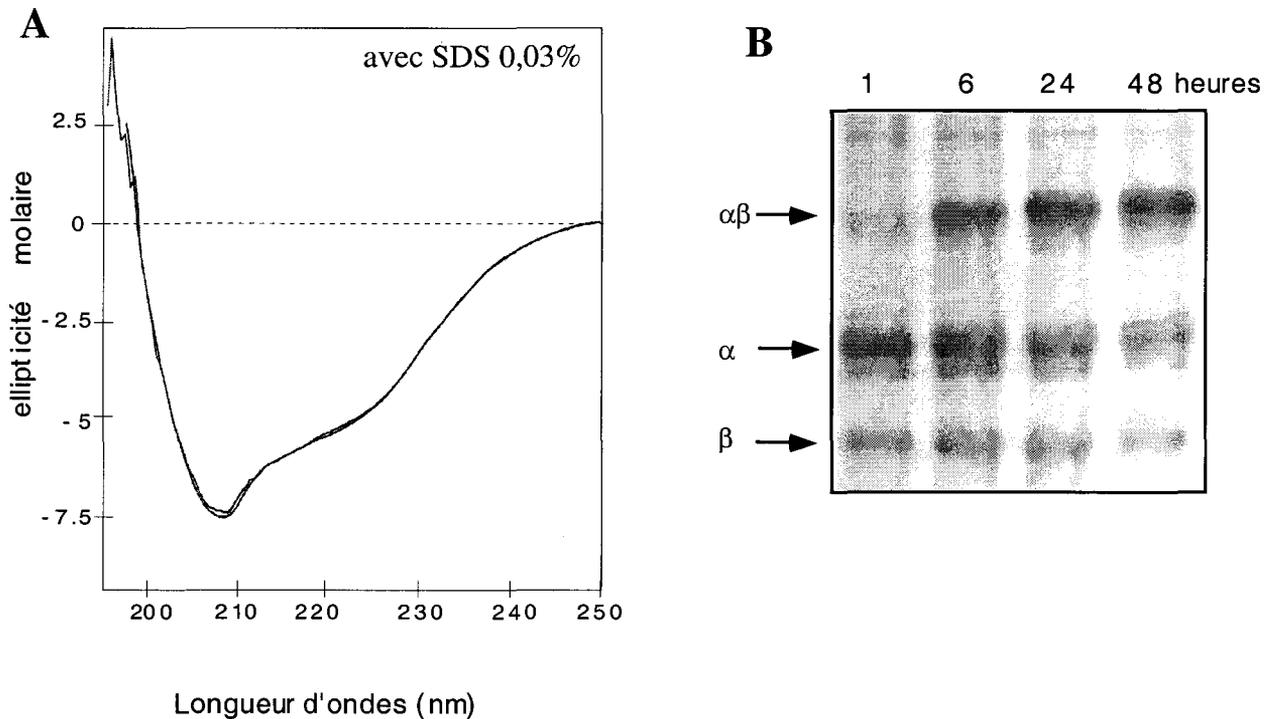
Suite à cette étude (Fig. 2), nous avons réalisé une analyse en dichroïsme circulaire en absence ou en présence de 0,03% de SDS sur les molécules HLA-DR1 vides et les complexes matures (Fig. 3). Alors que l'allure du spectre du complexe mature en présence de SDS ((HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub>) est peu affectée, celui de la molécule vide avec SDS met en évidence une modification nette par l'apparition un pic étroit avec un minima centré sur 208 nm (Fig. 3B).



**Figure 3 :** Analyse en dichroïsme circulaire des molécules HLA-DR1 vides et des complexes HA(307-319)/HLA-DR1 préformés en absence ou présence de SDS à 0,03%. Les échantillons sont analysés à 250  $\mu\text{g/ml}$  en tampon phosphate à 10 mM.

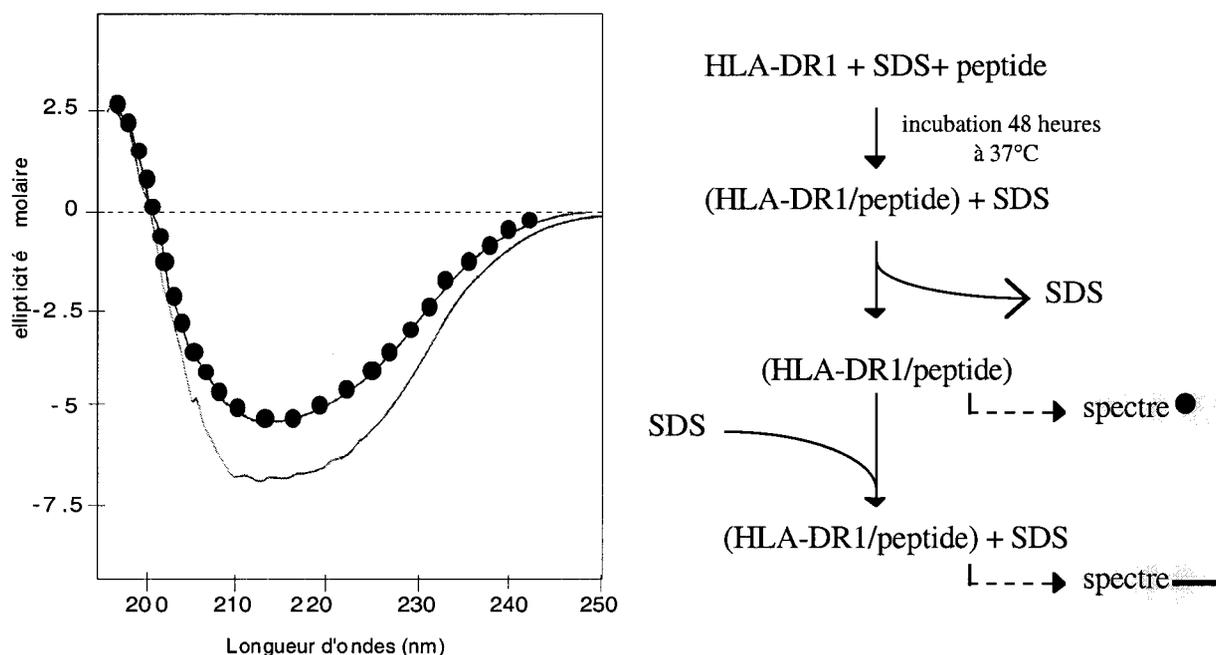
*b. Influence du peptide sur la structure secondaire et la stabilité de la molécule HLA-DR1 vide en présence de SDS*

Afin d'étudier l'influence du peptide sur la structure secondaire et la stabilité de la molécule HLA-DR1, une cinétique d'incubation a été effectuée avec le peptide HA (307-319) et la molécule HLA-DR1 vide en présence de 0,03% de SDS ((HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA)). Une analyse par DC a été réalisée à différents temps d'incubation (Fig. 4A). Les résultats montrent qu'aucune modification de l'allure du spectre n'est visible même après un temps d'incubation important (96 heures). Toutefois, la formation de complexes stables est observée au cours du temps en gel SDS-PAGE (Fig. 4B), indiquant la présence du peptide au sein du site de liaison. Ainsi, nous pouvons conclure que la différence de conformation présente sur la molécule vide avec SDS est un évènement moléculaire n'intervenant pas dans la transition vers la forme stable. De plus, le spectre correspondant à la forme stable obtenu après 48 heures d'incubation est différent du complexe (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub>. Cette différence suggère que la présence de SDS avant incubation avec le peptide empêcherait un processus de réarrangement structural.



**Figure 4 :** Analyse en dichroïsme circulaire de l'interaction du peptide HA (307-319) sur les molécules HLA-DR1 vides en présence de SDS à 0,03%. Les molécules HLA-DR1 (300  $\mu\text{g/ml}$ ) sont placées en tampon phosphate contenant 0,03% de SDS. 10  $\mu\text{M}$  du peptide HA (307-319) est ajouté à la préparation. 4 échantillons ont été prélevés à différents temps (1, 6, 24, 48 heures) pour être analysés en DC (A) (le spectre correspondant au peptide HA(307-319) à 10  $\mu\text{M}$  a été soustrait) et en gel SDS-PAGE (B) (échantillons non bouillis, non réduits).

Nous avons donc procédé à l'élimination temporaire du SDS dans l'échantillon contenant la molécule vide incubé avec le peptide HA (307-319) (Fig.5). Après dialyse du détergent, le complexe est analysé en DC. Le spectre obtenu ne présente plus de pic à 208 nm mais un pic large avec un minima centré sur 217 nm analogue à ceux de la figure 1. Après un nouvel apport de 0,03% de SDS, le spectre s'apparente à celui obtenu pour le complexe (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub> observé figure 1. Ces résultats montrent donc que l'élimination temporaire du SDS permet de retrouver une conformation mature.



**Figure 5 :** Analyse en dichroïsme circulaire des complexes peptide/HLA-DR1 formés en présence de 0,03% de SDS. Les complexes peptide/HLA-DR1 formés en présence de SDS sont dialysés une nuit contre un tampon phosphate 10  $\mu$ M avec une membrane ayant un seuil de coupure de 15000 Da permettant d'éliminer le SDS. Un spectre est réalisé puis 0,03% de SDS sont ajoutés à nouveau à la préparation pour ensuite être analysée une seconde fois en DC.

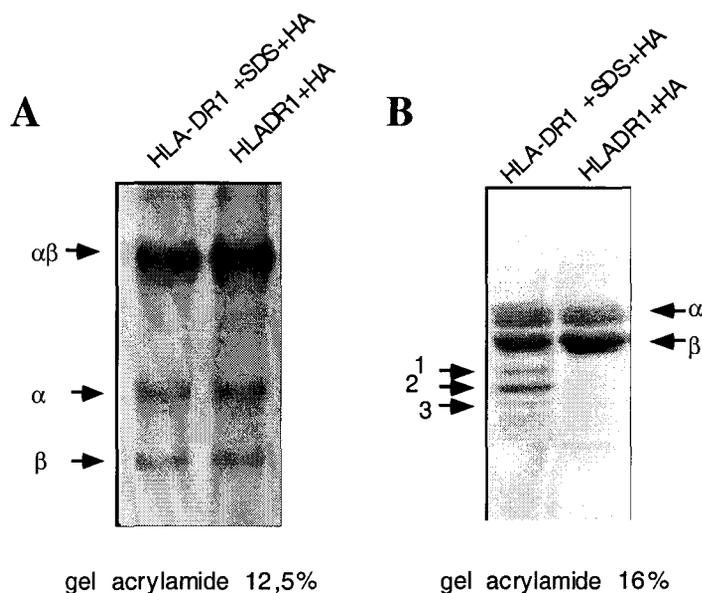
### c. Localisation du changement structural entre les complexes (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub> et les complexes (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA)

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude de digestion des complexes (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA) et (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub> par des enzymes protéolytiques permettant de déterminer la présence de régions exposées ou flexibles plus sensibles à la digestion que les structures rigides. Par cette approche, nous tentons d'identifier les différences structurales entre les complexes (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA) et (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub>.

Le niveau de stabilité des deux complexes est vérifié en gel SDS-PAGE (Fig. 6A). L'activité de la trypsine étant compatible avec les tampons pouvant contenir jusqu'à 0,1% de SDS, nous avons réalisé une incubation de 15 minutes avec une concentration finale en trypsine de 20  $\mu$ g/ml. Les échantillons sont ensuite chauffés et réduits avant d'être déposés sur gel SDS-PAGE (Fig. 6B).

On observe une dégradation plus rapide de la forme (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA) comparativement à (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub> en présence de trypsine. Ce résultat met en évidence que certains domaines ne

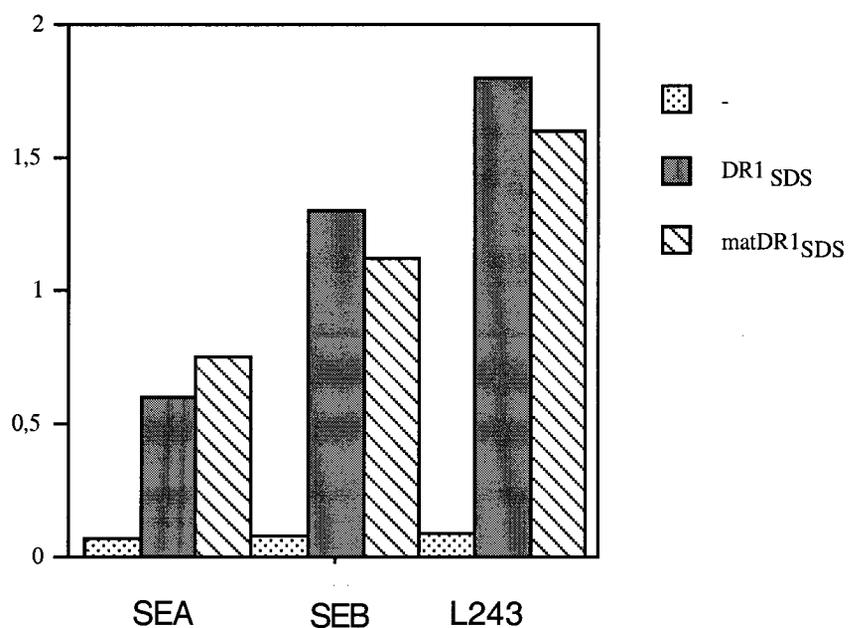
sont accessibles à la trypsine que sur le complexe (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA). Des études plus poussées devraient maintenant nous permettre d'identifier le ou les sites de clivages.



**Figure 6 :** Mise en évidence par digestion trypsique de changements structuraux entre les complexes (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA) et (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub>. (A) Les complexes (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA) et (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub> sont analysés en gel SDS-PAGE (échantillons non chauffés, non réduits). (B) Après incubation avec 20 mg /ml de trypsine, les molécules (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA) et (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub> sont séparées en gel SDS-PAGE (échantillons dénaturés à 100°C et réduits)

Afin d'étudier la réactivité de ligands connus pour interagir au niveau de différents sites proches du domaine de liaison du peptide, nous avons opté pour l'utilisation des superantigènes SEA et SEB et de l'anticorps monoclonal L243. L'interaction des complexes (HLA-DR1<sub>SDS</sub>/HA) et (HLA-DR1/HA)<sub>SDS</sub> avec les SEA, SEB et le L243 est analysée selon la technique ELISA.

Les résultats présentés figure 7 nous montrent que d'une part, la réactivité des trois ligands n'est pas affectée en présence de 0,03% de SDS, d'autre part, les deux superantigènes ainsi que l'anticorps L243 sont capables de reconnaître les deux formes de complexes. Ainsi, les différences de conformation entre les deux formes ne semblent pas affecter la structure des domaines constituant le site de liaison.



**Figure 7 :** Etude en ELISA de l'interaction des molécules  $(HLA-DR1_{SDS}/HA)$  et  $(HLA-DR1/HA)_{SDS}$  avec les superantigènes SEA, SEB et l'anticorps monoclonal L243.

## *D. Discussion*

L'acquisition d'un peptide par les CMH de classe II s'accompagne de modifications structurales de la molécule de CMH de classe II se traduisant par la réduction des formes agrégées dans les endosomes (Germain et al, 93; Stern and Wiley, 92), l'augmentation de la stabilité de la molécule (Nelson et al, 94 ; Stern and Wiley, 92 ; Neefjes et al, 92 ; Sadegh-Nasseri et al, 91) et de leur résistance à la dégradation par les protéases (Nelson et al, 94 ; Sadegh-Nasseri et al, 94; Théry et al, 98; Ceman et al, 98) . Les études en DC indiquent que les changements de structure induites par le la liaison du peptide n'affecte pas la structure secondaire des molécules de classe II mais vraisemblablement la structure ternaire ou quaternaire. Les bases moléculaires du processus de maturation des molécules de CMH de classe II demeurent cependant mal connues.

Dans cette étude, nous mettons en évidence que la liaison du peptide HA(307-319) sur la molécule HLA-DR1 vide induit au moins deux types de transitions structurales : l'une induisant une augmentation de la stabilité du complexe peptide/CMH, l'autre permettant la structuration d'un domaine distinct du site de liaison du peptide. L'acquisition de la stabilité en gel SDS-PAGE induite par le liaison du peptide HA(307-319) sur les molécules HLA-DR1 semble s'effectuer indépendamment de cette deuxième modification conformationnelle. De plus, ces deux évènements moléculaires s'effectuent de manière hiérarchique : l'induction de la stabilité permet ensuite une restructuration située au niveau d'un site distinct du domaine de liaison pour le peptide.

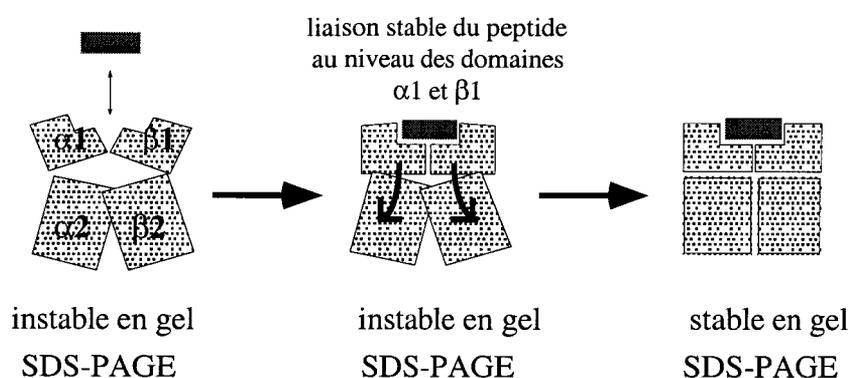
Suite à ces observations, nous proposons que le domaine impliqué dans le changement structural indépendant du processus de stabilisation affecte les domaines  $\alpha 2$  et/ou  $\beta 2$ . Il apparait en effet, dans le littérature, que les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  peuvent interagir avec le peptide et former une structure stable, indépendamment des domaines  $\alpha 2$  et/ou  $\beta 2$ . En effet, les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  exprimés sous forme d'une seule chaîne sont capables d'interagir avec le peptide et de former une structure stable et fonctionnelle (Burrows et al, 98). De plus, des travaux ont également évoqué la possibilité d'interaction de peptides avec les molécules de classe I du CMH, sans intervention des domaines sous-jacents tels que la  $\beta 2$ -microglobuline (Zügel et al, 94) et le domaine  $\alpha 3$  (Elliott et al, 92). Ainsi,

la liaison stable du peptide sur les molécules de CMH peut s'effectuer indépendamment des domaines homologues aux immunoglobulines.

D'autre part, certains arguments permettent de penser que la liaison du peptide a une influence sur la structure des domaines homologues aux immunoglobulines. En effet, sur les molécules de CMH de classe I, la liaison du peptide entraîne une augmentation de l'affinité de liaison pour la  $\beta$ 2-microglobuline (Elliot et al, 92 ; Otten et al, 92 ; Elliot et al, 91).

Concernant la structure des molécules de CMH de classe II, l'interaction entre le site de liaison des peptides  $\alpha$ 1 et  $\beta$ 1 et les domaines proximaux  $\alpha$ 2 et  $\beta$ 2 a été décrite en détail dans une étude cristallographique de la molécule de classe II HLA-DR4. Il existe deux sites de contact : le domaine  $\alpha$ 2, et le plus important, celui se trouvant sous le plateau en feuillet  $\beta$  plissé du site de liaison et le domaine  $\alpha$ 2. Cette interaction formant une poche hydrophobe, couvre une surface moléculaire de 1200 Å. Une autre poche hydrophobe de 750 Å permet l'interaction du domaine  $\beta$ 2 avec les domaines distaux. Ces sites hydrophobes pourraient être accessibles au SDS présent dans notre étude structurale, empêchant ainsi une structuration correcte de la protéine.

L'ensemble de ces éléments nous permettent de proposer pour les molécules de CMH de classe II un modèle des mécanismes conformationnels induits par la liaison du peptide.



En conclusion, nos résultats mettent en évidence un processus de maturation de la conformation induite par la liaison stable du peptide. L'identification précise du ou des domaines

impliqués dans ce mécanisme devrait permettre de mieux comprendre le processus complexe de maturation des molécules de CMH.

## Conclusion générale

La caractérisation d'épitope T est une condition essentielle à l'élaboration d'un vaccin basée sur l'utilisation de peptides de synthèse. Des approches ont été développées au niveau moléculaire pour permettre la caractérisation d'épitopes T potentiels sur la base de leur capacité de liaison avec les molécules de CMH de classe II. Toutefois, les paramètres fondamentaux régissant la formation d'un complexe peptide/CMH de classe II ne sont pas clairement définis.

Notre travail a consisté à étudier **l'influence de l'interaction de peptides avec les molécules de CMH de classe II matures** et de mettre en évidence des paramètres moléculaires qualitatifs et quantitatifs susceptibles de jouer un rôle important dans les mécanismes de présentation antigénique et dans l'induction de la réponse immunitaire.

Tout d'abord, nous avons tenté de déterminer **la nature des peptides naturellement présentés par les molécules de CMH de classe II HLA-DR3**. L'intérêt de cette approche était d'analyser les contraintes du processus de présentation des antigènes sur la nature des peptides associés aux molécules de classe II matures. Cette stratégie a toutefois été abandonnée compte-tenu du faible nombre de peptides pouvant être séquencés et de la difficulté à définir des règles générales pour la caractérisation d'épitopes T.

Dans un second temps, nous avons choisi un autre modèle permettant d'étudier les mécanismes de formation des complexes peptide/CMH de classe II matures. En 1992, Stern et Wiley ont élaboré une stratégie permettant la production de **molécules de CMH de classe II solubles exprimées en système baculovirus/cellules d'insectes**. Les molécules ainsi obtenues possèdent cette particularité d'avoir un site de liaison accessible, dépourvu de peptides endogènes. Ainsi, il devenait possible, pour la première fois, de mesurer les capacités de liaison intrinsèque des ligands peptidiques sur les molécules de CMH de classe II.

Nous avons donc réalisé les constructions plasmidiques en vue de l'obtention de plusieurs baculovirus recombinants (HLA-DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR52, DR53. Deux

d'entre eux sont actuellement exploités au laboratoire : HLA-DR1( $\beta 1^*0101$ ) et HLA-DR4( $\beta 1^*0101$ ).

Par la suite, Notre étude s'est plus particulièrement focalisée sur l'allèle HLA-DR1.

La formation des molécules de CMH de classe II matures est un processus ayant lieu en plusieurs étapes, aboutissant au final à la formation d'un complexe possédant une stabilité élevée. Afin d'accéder directement à la stabilité des complexes peptide/CMH II matures, nous avons développé **un test de thermostabilité**. Ce test a permis de mettre en évidence, de manière sensible, une hiérarchie des ligands peptidiques pour leur capacité à stabiliser la molécule HLA-DR1. Il apparaît donc que les molécules de classe II matures n'existent pas dans un seul état énergétique indépendamment de la nature du peptide comme on pouvait le supposer par l'observation de leur demi-vie élevée (supérieure à 100 heures). En combinaison avec les données cristallographiques, nous pensons pouvoir accéder avec cette technique à la caractérisation globale des forces et nombres de contact intramoléculaire entre le ligand peptidique et une molécule de CMH classe II mature.

Par cette approche de thermostabilité, nous avons montré que l'élongation de peptides en dehors du site de liaison peut avoir un impact important sur la stabilité des molécules HLA-DR1. L'élongation de la partie C-terminale du peptide TT(830-843), située en dehors du site de liaison de la molécule HLA-DR1, augmente la stabilité des molécules de classe II HLA-DR1 ( $T_m +10^\circ\text{C}$ ). A l'inverse, l'adjonction de la partie (81-89) du peptide CLIP sur l'épitope T HA(307-319) (CLIP-HA) empêche totalement la formation d'un complexe peptide/HLA-DR1 stable alors que la liaison a bien lieu ( $IC_{50} = 500\text{nM}$ ). Le peptide CLIP-HA est cependant capable de restimuler in vitro les cellules T spécifiques du peptide HA(307-319) indiquant que les résidus impliqués dans la reconnaissance par le TCR ne sont pas affectés. Ces modifications en dehors du site de liaison pour les variants du peptide TT et du peptide CLIP n'ont quasiment aucune influence sur l'affinité de la liaison pour la molécule de classe II HLA-DR1. Ainsi, il semble envisageable de construire des peptides chimères, par addition de séquences non-natives aux extrémités d'épitopes T connus, de manière à moduler leur capacité à former des molécules de CMH de classe II stables, sans pour autant modifier la partie épitopique impliquée dans la

reconnaissance avec le récepteur T. L'évaluation fonctionnelle des impacts de ces deux types de modification d'épitopes T est actuellement en cours d'étude : *in vivo* par immunisation des souris transgéniques pour HLA-DR1 pour l'évaluation de leur immunogénicité, et *in vitro* par utilisation de cellules T spécifiques pour l'évaluation de paramètres fins tels que la perte d'expression membranaire du récepteur T et l'expression du CD69 (collaboration avec Valérie Pinet, Montpellier).

Au cours de ce travail, nous avons pu également montrer que la thermostabilité des complexes peptide/CMH de classe II mature est un paramètre indépendant de l'affinité des peptides. Deux cas de figure paradoxaux ont été mis en évidence. En effet, un peptide ayant une forte affinité peut être incapable de former un complexe stable (peptide MYO 67-79, peptide chimère CLIP-HA). Dans ce cas, la transition du complexe intermédiaire vers la forme stable peut être "bloquée" spécifiquement par la présence au sein de la séquence de l'antigène peptidique, d'acides aminés ou de structurations particulières de la chaîne principale du peptide ayant une influence négative sur le processus de maturation (Beeson et al, 96). A l'inverse, un peptide de faible affinité peut induire la formation d'un complexe stable (INS B 10-30). La majeure partie de l'énergie de liaison peptide /CMH II s'effectue par le biais d'un réseau de ponts hydrogène entre certains résidus conservés de la molécule de classe II et la chaîne principale du peptide. Ce mode de liaison n'est pas spécifique de la séquence du ligand et apparaît comme un élément déterminant pour la formation de complexes stables. Ainsi, bien que certains peptides ne soient pas de bons compétiteurs pour le site de liaison (souvent lié à un manque de spécificité pour le motif spécifique d'ancrage), la formation des ponts hydrogènes peut toutefois avoir lieu permettant d'induire la maturation du complexe.

D'autre part, nous avons mis en évidence **l'influence directe du peptide sur la modulation de la conformation de la molécule HLA-DR1**. En effet, il apparaît que chaque peptide ligand, indépendamment de ces capacités cinétiques de liaison et de la stabilité du complexe, peut créer une diversité antigénique sur la molécule de CMH de classe II. Des études

très récentes (Chervonsky et al., 98) ont décrit un phénomène analogue sur les molécules de CMH de classe II mutines IE-k. Cette équipe a notamment pu mettre en évidence l'influence du peptide dans des changements conformationnels de la molécule de CMH de classe II (observable en gel SDS-PAGE) et ses répercussions sur l'activation de cellules T alloréactives. Des "altérations" structurales de molécules de CMH de classe II (mais également de classe I) avaient également été observées par l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Denzin et al., 94 ; Rath et al., 92 ; Fling et al., 94) et de superantigènes (Thibodeau et al., 94 ; Lavoie et al., 97 ; Albert et al., 98 ; Woodland et al., 97). D'après notre étude, la partie agrétopique interagissant strictement avec le site de liaison mais surtout les parties terminales émergeant en dehors du site de liaison seraient impliquées dans une modulation de la conformation des molécules de CMH.

Nos travaux mettent également en évidence un élément essentiel pour la compréhension de la réponse cellulaire T. Il apparaît qu'un même épitope peut générer la formation de plusieurs isoformes de molécules de classe II en fonction de la longueur des extrémités N et C terminales. Du peptide. Schmitt et collaborateurs ont également montré qu'un même peptide pouvait être présenté par le complexe intermédiaire instable et l'isoforme mature. De plus, ces isomères ont apparemment une antigénicité différentes basées sur l'absence de crossréactivité entre les cellules T spécifiquement induites par l'une ou l'autre des deux isoformes. De plus la différence d'antigénicité a été confirmée au niveau structural par RMN (Schmitt et al, 99). Notre étude demeure néanmoins la première démonstration qu'un complexe mature associé à un même épitope peut exister sous plusieurs conformations.

Des études récentes ont également montré que les résidus N- et C- terminaux de peptide antigéniques pouvait avoir une influence sur la reconnaissance T sans que les auteurs aient attribué cette influence aux modifications conformationnelles des molécules de CMH II (Wilkinson et al., 97 ; Naujokas et al. ; 98).

Ainsi, la modulation de la structure de la molécule de CMH de classe II induit par un épitope aurait pour effet de créer une diversité permettant de recruter un panel élargi de répertoires T spécifiques et d'augmenter ainsi les chances d'induire une réponse cellulaire T.

Ces changements de structures sur la molécule de classe II suggèrent une hypothèse alternative. En effet, si ces modifications structurales impliquent  $\alpha 2$  et  $\beta 2$ , l'interaction avec la

molécule CD4 sera affecté et influencera de manière quantitative l'activité de la cellule T spécifique. Cette hypothèse est actuellement évaluée en collaboration avec avec Thierry Idziorek (Lille).

Finalement, dans une étude préliminaire, nous avons mis en évidence de manière directe l'un des processus conformationnels impliqué dans le **formation du complexe mature par analyse en dichroïsme circulaire**. Nous montrons que le processus de maturation entraîne au moins deux changements conformationnels hiérarchiques : l'un lié à la formation d'un complexe stable après liaison du peptide puis successivement l'autre induisant une restructuration d'un domaine distant du site de liaison pour les peptides . L'une de ces modifications s'effectue par variations des structures tertiaires ou quaternaires impliquant vraisemblablement les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$ . Cet évènement secondaire pourrait expliquer certaines des étapes du trafic intracellulaire des molécules de classe II. En effet, la protéine chaperonne HLA-DM interagit au niveau intracellulaire avec les molécules de classe II associé au peptide CLIP. Cette interaction HLA-DM/CMH vide va être affectée par la liaison stable d'un peptide avec la molécule de classe II, induisant la dissociation des deux partenaires. Par conséquent, la dissociation d'HLA-DM pourrait être influencer par le processus repliement de la structure des domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  consécutif à la liaison stable du peptide. La localisation précise du domaine impliqué dans ce changement structural devrait nous permettre de mieux comprendre cette étape de maturation.

L'ensemble de ce travail montre que l'interaction d'un peptide avec un molécule de CMH de classe II agit aussi bien d'un point de vue qualitatif, sur la conformation, que quantitatif sur la stabilité. L'importance des ces paramètres dans l'induction de la réponse immunitaire reste toutefois à démontrer.

- Abrahmsen, L., Dohlsten, M., Segren, S., Bjork, P., Jonsson, E. and Kalland, T.** Characterization of two distinct MHC class II binding sites in the superantigen staphylococcal enterotoxin A. *Embo J* , 1995, 14, (13):2978-86
- Adams, S. and Humphreys, R. E.** Invariant chain peptides enhancing or inhibiting the presentation of antigenic peptides by major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol* , 1995, 25, (6):1693-702
- Adorini, L. and Nagy, Z. A.** Peptide competition for antigen presentation. *Immunol Today* , 1990, 11, (1):21-4
- Agrawal, B., Fraga, E., Kane, K. and Singh, B.** Up-regulation of the MHC class II molecules on B cells by peptide ligands. *J Immunol* , 1994, 152, (3):965-75
- Ahlers, J. D., Takeshita, T., Pendleton, C. D. and Berzofsky, J. A.** Enhanced immunogenicity of HIV-1 vaccine construct by modification of the native peptide sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1997, 94, (20):10856-61
- Albert, L. J., Ghumman, B. and Watts, T. H.** Effect of HLA-DM transfection on hen egg lysozyme presentation by T2.Ak cells. *J Immunol* , 1996, 157, (6):2247-55
- Albert, L. J., Denzin, L. K., Ghumman, B., Bangia, N., Cresswell, P. and Watts, T. H.** Quantitative defect in staphylococcal enterotoxin A binding and presentation by HLA-DM-deficient T2.Ak cells corrected by transfection of HLA-DM genes. *Cell Immunol* , 1998, 183, (1):42-51
- Anderson, K. S. and Cresswell, P.** A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *Embo J* , 1994, 13, (3):675-82
- Arimilli, S., Mumm, J. B. and Nag, B.** Antigen-specific apoptosis in immortalized T cells by soluble MHC class II-peptide complexes. *Immunol Cell Biol* , 1996, 74, (1):96-104
- Arndt, S. O., Vogt, A. B., Hammerling, G. J. and Kropshofer, H.** Selection of the MHC class II-associated peptide repertoire by HLA-DM. *Immunol Res* , 1997, 16, (3):261-72
- Avice, M. N., Sarfati, M., Triebel, F., Delespesse, G. and Demeure, C. E.** Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells. *J Immunol* , 1999, 162, (5):2748-53
- Babbitt, B. P., Allen, P. M., Matsueda, G., Haber, E. and Unanue, E. R.** Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* , 1985, 317, (6035):359-61
- Babbitt, B. P., Matsueda, G., Haber, E., Unanue, E. R. and Allen, P. M.** Antigenic competition at the level of peptide-Ia binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1986, 83, (12):4509-13
- Bangia, N. and Watts, T. H.** Evidence for invariant chain 85-101 (CLIP) binding in the antigen binding site of MHC class II molecules. *Int Immunol* , 1995, 7, (10):1585-91
- Bartnes, K., Leon, F., Briand, J. P., Travers, P. J. and Hannestad, K.** A novel first primary anchor extends the MHC class II I-Ad binding motif to encompass nine amino acids. *Int Immunol* , 1997, 9, (8):1185-93

- Bartnes, K., Leon, F., Briand, J. P., Travers, P. J. and Hannestad, K. N.** N-terminal elongation of a peptide determinant beyond the first primary anchor improves binding to H-2 I-Ad and HLA-DR1 by backbone-dependent and aromatic side chain-dependent interactions, respectively. *Eur J Immunol* , 1999, 29, (1):189-95
- Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H. J. and Ploegh, H. L.** How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *Embo J* , 1995, 14, (1):37-49
- Berezhkovskiy, L. M.** On the kinetics of peptide binding to MHC proteins. *Biophys Chem* , 1998, 71, (1):1-8
- Bijlmakers, M. J., Benaroch, P. and Ploegh, H. L.** Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J Exp Med* , 1994, 180, (2):623-9
- Bijlmakers, M. J., Benaroch, P. and Ploegh, H. L.** Assembly of HLA DR1 molecules translated in vitro: binding of peptide in the endoplasmic reticulum precludes association with invariant chain. *Embo J* , 1994, 13, (11):2699-707
- Bikoff, E. K., Kenty, G. and Van, K. L.** Distinct peptide loading pathways for MHC class II molecules associated with alternative Ii chain isoforms. *J Immunol* , 1998, 160, (7):3101-10
- Billing, R. J., Safani, M. and Peterson, P.** Isolation and characterization of human B cell alloantigens. *J Immunol* , 1976, 1589-93
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* , 1987, 329, (6139):506-12
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* , 1987, 329, (6139):512-8
- Bluestone, J. A., Jameson, S., Miller, S. and Dick, R. d.** Peptide-induced conformational changes in class I heavy chains alter major histocompatibility complex recognition. *J Exp Med* , 1992, 176, (6):1757-61
- Bodey, B., Bodey, B. J. and Kaiser, H. E.** Dendritic type, accessory cells within the mammalian thymic microenvironment. Antigen presentation in the dendritic neuro-endocrine-immune cellular network. *In Vivo* , 1997, 11, (4):351-70
- Boehncke, W. H., Takeshita, T., Pendleton, C. D., Houghten, R. A., Sadegh, N. S., Racioppi, L., Berzofsky, J. A. and Germain, R. N.** The importance of dominant negative effects of amino acid side chain substitution in peptide-MHC molecule interactions and T cell recognition. *J Immunol* , 1993, 150, (2):331-41
- Boniface, J. J., Lyons, D. S., Wettstein, D. A., Allbritton, N. L. and Davis, M. M.** Evidence for a conformational change in a class II major histocompatibility complex molecule occurring in the same pH range where antigen binding is enhanced. *J Exp Med* , 1996, 183, (1):119-26
- Breloer, M., Ehrlich, S., Fleischer, B. and von, B. A.** A biological function for the XP motif within the N terminus of major histocompatibility complex class II-associated peptides. *Eur J Immunol* , 1996, 26, (8):1825-9

- Brogdon, J., Eckels, D. D., Davies, C., White, S. and Doyle, C.** A site for CD4 binding in the beta 1 domain of the MHC class II protein HLA-DR1. *J Immunol* , 1998, 161, (10):5472-80
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [see comments]. *Nature* , 1993, 364, (6432):33-9
- Burgen, A. S., Roberts, G. C. and Feeney, J.** Binding of flexible ligands to macromolecules. *Nature* , 1975, 253, (5494):753-5
- Burrows, G. G., Bebo, B. J., Adlard, K. L., Vandenbark, A. A. and Offner, H.** Two-domain MHC class II molecules form stable complexes with myelin basic protein 69-89 peptide that detect and inhibit rat encephalitogenic T cells and treat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* , 1998, 161, (11):5987-96
- Busch, R., Strang, G., Howland, K. and Rothbard, J. B.** Degenerate binding of immunogenic peptides to HLA-DR proteins on B cell surfaces. *Int Immunol* , 1990, 2, (5):443-51
- Busch, R., Vturina, I. Y., Drexler, J., Momburg, F. and Hammerling, G. J.** Poor loading of major histocompatibility complex class II molecules with endogenously synthesized short peptides in the absence of invariant chain. *Eur J Immunol* , 1995, 25, (1):48-53
- Busch, R. and Mellins, E. D.** Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Curr Opin Immunol* , 1996, 8, (1):51-8
- Busch, D. H. and Pamer, E. G.** MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J Immunol* , 1998, 160, (9):4441-8
- Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Jenis, D. M. and Grey, H. M.** Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* , 1986, 47, (6):1071-7
- Buus, S., Colon, S., Smith, C., Freed, J. H., Miles, C. and Grey, H. M.** Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1986, 83, (11):3968-71
- Buus, S., Sette, A. and Grey, H. M.** The interaction between protein-derived immunogenic peptides and Ia. *Immunol Rev* , 1987, 98, (115):115-41
- Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Miles, C. and Grey, H. M.** The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* , 1987, 235, (4794):1353-8
- Buus, S., Sette, A., Colon, S. M. and Grey, H. M.** Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site on Ia. *Science* , 1988, 242, (4881):1045-7
- Carson, R. T., Vignali, K. M., Woodland, D. L. and Vignali, D. A.** T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity* , 1997, 7, (3):387-99

- Castellino, F., Zappacosta, F., Coligan, J. E. and Germain, R. N.** Large protein fragments as substrates for endocytic antigen capture by MHC class II molecules. *J Immunol* , 1998, 161, (8):4048-57
- Ceman, S., Wu, S., Jardetzky, T. S. and Sant, A. J.** Alteration of a single hydrogen bond between class II molecules and peptide results in rapid degradation of class II molecules after invariant chain removal. *J Exp Med* , 1998, 188, (11):2139-49
- Chervonsky, A. V., Medzhitov, R. M., Denzin, L. K., Barlow, A. K., Rudensky, A. Y. and Janeway, C. J.** Subtle conformational changes induced in major histocompatibility complex class II molecules by binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1998, 95, (17):10094-9
- Chicz, R. M., Urban, R. G., Lane, W. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Vignali, D. A. and Strominger, J. L.** Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* , 1992, 358, (6389):764-8
- Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A., Lane, W. S. and Strominger, J. L.** Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* , 1993, 178, (1):27-47
- Chicz, R. M., Lane, W. S., Robinson, R. A., Trucco, M., Strominger, J. L. and Gorga, J. C.** Self-peptides bound to the type I diabetes associated class II MHC molecules HLA-DQ1 and HLA-DQ8. *Int Immunol* , 1994, 6, (11):1639-49
- Collins, E. J., Garboczi, D. N., Karpusas, M. N. and Wiley, D. C.** The three-dimensional structure of a class I major histocompatibility complex molecule missing the alpha 3 domain of the heavy chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1995, 92, (4):1218-21
- Cresswell, P.** Human B cells alloantigens; separation from other membrane molecules by affinity chromatography. *Eur J Immunol* , 1977, 7, (9):636-9
- Cresswell, P.** Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* , 1994, 12, (259):259-93
- Cuervo, A. M. and Dice, J. F.** A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* , 1996, 273, (5274):501-3
- de, K. A. and McConnell, H. M.** Enhancement of peptide antigen presentation by a second peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1993, 90, (19):8797-801
- de, K. A. and McConnell, H. M.** Kinetics and specificity of peptide-MHC class II complex displacement reactions. *J Immunol* , 1994, 152, (2):609-19
- Dellabona, P., Peccoud, J., Kappler, J., Marrack, P., Benoist, C. and Mathis, D.** Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* , 1990, 62, (6):1115-21
- Demotz, S., Grey, H. M., Appella, E. and Sette, A.** Characterization of a naturally processed MHC class II-restricted T-cell determinant of hen egg lysozyme. *Nature* , 1989, 342, (6250):682-4
- Denzin, L. K., Robbins, N. F., Carboy, N. C. and Cresswell, P.** Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* , 1994, 1, (7):595-606

- Denzin, L. K. and Cresswell, P.** HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* , 1995, 82, (1):155-65
- Denzin, L. K., Hammond, C. and Cresswell, P.** HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J Exp Med* , 1996, 184, (6):2153-65
- Dessen, A., Lawrence, C. M., Cupo, S., Zaller, D. M. and Wiley, D. C.** X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA\*0101, DRB1\*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity* , 1997, 7, (4):473-81
- Devaux, B., Wilson, K. J., Aguilar, B., Jorgensen, B. and Rothbard, J. B.** Differential stability of HLA-DR alleles independent of endogenous peptides. *J Immunol* , 1995, 155, (4):1921-9
- Doherty, P. C., Zinkernagel, R. M. and Ramshaw, I. A.** Specificity and development of cytotoxic thymus-derived lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *J Immunol* , 1974, 112, (4):1548-52
- Doherty, P. C. and Zinkernagel, R. M.** Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* , 1975, 256, (5512):50-2
- Doherty, P. C. and Zinkernagel, R. M.** A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* , 1975, 1, (7922):1406-9
- Doherty, P. C. and Zinkernagel, R. M.** H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* , 1975, 141, (2):502-7
- Dornmair, K., Rothenhausler, B. and McConnell, H. M.** Structural intermediates in the reactions of antigenic peptides with MHC molecules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* , 1989, 1, (409):409-16
- Dornmair, K., Clark, B. R. and McConnell, H. M.** Binding of truncated peptides to the MHC molecule IA (d). *Febs Lett* , 1991, 294, (3):244-6
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O. and Geuze, H. J.** Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B- lymphocytes. *J Biol Chem* , 1998, 273, (32):20121-7
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G.** Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* , 1991, 351, (6324):290-6
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G.** Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* , 1994, 39, (4):230-42
- Fleckenstein, B., Kalbacher, H., Muller, C. P., Stoll, D., Halder, T., Jung, G. and Wiesmuller, K. H.** New ligands binding to the human leukocyte antigen class II molecule DRB1\*0101 based on the activity pattern of an undecapeptide library. *Eur J Biochem* , 1996, 240, (1):71-7

- Fleury, S., Thibodeau, J., Croteau, G., Labrecque, N., Aronson, H. E., Cantin, C., Long, E. O. and Sekaly, R. P.** HLA-DR polymorphism affects the interaction with CD4. *J Exp Med* , 1995, 182, (3):733-41
- Fling, S. P., Arp, B. and Pious, D.** HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* , 1994, 368, (6471):554-8
- Fling, S. P., Rak, J., Muczynski, K. A., Arp, B. and Pious, D.** Novel mutants define genes required for the expression of human histocompatibility leukocyte antigen DM: evidence for loci on human chromosome 6p. *J Exp Med* , 1997, 186, (9):1469-80
- Fournier, P., Ammerlaan, W., Ziegler, D., Gimenez, C., Rabourdin, C. C., Fleckenstein, B. T., Wiesmuller, K. H., Jung, G., Schneider, F. and Muller, C. P.** Differential activation of T cells by antibody-modulated processing of the flanking sequences of class II-restricted peptides. *Int Immunol* , 1996, 8, (9):1441-51
- Fraser, J. D.** High-affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR. *Nature* , 1989, 339, (6221):221-3
- Fremont, D. H., Hendrickson, W. A., Marrack, P. and Kappler, J.** Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides [see comments]. *Science* , 1996, 272, (5264):1001-4
- Fremont, D. H., Crawford, F., Marrack, P., Hendrickson, W. A. and Kappler, J.** Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* , 1998, 9, (3):385-93
- Fremont, D. H., Monnaie, D., Nelson, C. A., Hendrickson, W. A. and Unanue, E. R.** Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity* , 1998, 8, (3):305-17
- Friede, T., Gnau, V., Jung, G., Keilholz, W., Stevanovic, S. and Rammensee, H. G.** Natural ligand motifs of closely related HLA-DR4 molecules predict features of rheumatoid arthritis associated peptides. *Biochim Biophys Acta* , 1996, 1316, (2):85-101
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E. and Wiley, D. C.** Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2 [comment]. *Nature* , 1996, 384, (6605):134-41
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L. and Wilson, I. A.** An alpha beta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex [see comments]. *Science* , 1996, 274, (5285):209-19
- Geluk, A., Bloemhoff, W., De, V. R. and Ottenhoff, T. H.** Binding of a major T cell epitope of mycobacteria to a specific pocket within HLA-DRw17(DR3) molecules. *Eur J Immunol* , 1992, 22, (1):107-13
- Geluk, A., van, M. K., Southwood, S., Oseroff, C., Drijfhout, J. W., de, V. R., Ottenhoff, T. H. and Sette, A.** HLA-DR3 molecules can bind peptides carrying two alternative specific submotifs. *J Immunol* , 1994, 152, (12):5742-8
- Georges, B., Gras, M. H., Maes, P., Capron, A., Tartar, A. and Auriault, C.** [Analysis of peptides associated with class II MHC molecules, HLA-DR3: implication for the prediction of peptides useful for vaccines]. *C R Acad Sci Iii* , 1996, 319, (12):1119-25

**Gerlier, D., Trescol, B. M., Ettouati, L., Paris, J. and Rabourdin, C. C.** An accessory peptide binding site with allosteric effect on the formation of peptide-MHC-II complexes? *C R Acad Sci Iii* , 1998, 321, (1):19-24

**Germain, R. N. and Hendrix, L. R.** MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* , 1991, 353, (6340):134-9

**Germain, R. N. and Rinker, A. J.** Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature* , 1993, 363, (6431):725-8

**Germain, R. N. and Margulies, D. H.** The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* , 1993, 11, (403):403-50

**Germain, R. N.** Binding domain regulation of MHC class II molecule assembly, trafficking, fate, and function. *Semin Immunol* , 1995, 7, (6):361-72

**Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E. and Wiley, D. C.** The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* , 1995, 378, (6556):457-62

**Goldberg, J. M. and Baldwin, R. L.** Kinetic mechanism of a partial folding reaction. 1. Properties Of the reaction and effects of denaturants. *Biochemistry* , 1998, 37, (8):2546-55

**Gorga, J. C., Horejsi, V., Johnson, D. R., Raghupathy, R. and Strominger, J. L.** Purification and characterization of class II histocompatibility antigens from a homozygous human B cell line. *J Biol Chem* , 1987, 262, (33):16087-94

**Greenfield, N. and Fasman, G. D.** Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* , 1969, 8, (10):4108-16

**Guillet, J. G., Lai, M. Z., Briner, T. J., Smith, J. A. and Geftter, M. L.** Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature* , 1986, 324, (6094):260-2

**Gyotoku, T., Fukui, Y. and Sasazuki, T.** An endogenously processed self peptide and the corresponding exogenous peptide bound to the same MHC class II molecule could be distinct ligands for TCR with different kinetic stability. *Eur J Immunol* , 1998, 28, (12):4050-61

**Hammer, J., Takacs, B. and Sinigaglia, F.** Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J Exp Med* , 1992, 176, (4):1007-13

**Hammer, J., Valsasnini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B. and Sinigaglia, F.** Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* , 1993, 74, (1):197-203

**Hammer, J., Bono, E., Gallazzi, F., Belunis, C., Nagy, Z. and Sinigaglia, F.** Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J Exp Med* , 1994, 180, (6):2353-8

**Hammer, J., Nagy, Z. A. and Sinigaglia, F.** Rules governing peptide-class II MHC molecule interactions. *Behring Inst Mitt* , 1994, 124-32

- Hammer, J., Belunis, C., Bolin, D., Papadopoulos, J., Walsky, R., Higelin, J., Danho, W., Sinigaglia, F. and Nagy, Z. A.** High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1994, 91, (10):4456-60
- Harding, C. V.** Intracellular organelles involved in antigen processing and the binding of peptides to class II MHC molecules. *Semin Immunol* , 1995, 7, (6):355-60
- Hayden, J. B., McCormack, A. L., Yates, J. r. and Davey, M. P.** Analysis of naturally processed peptides eluted from HLA DRB1\*0402 and \*0404. *J Neurosci Res* , 1996, 45, (6):795-802
- Hedley, M. L., Urban, R. G. and Strominger, J. L.** Assembly and peptide binding of major histocompatibility complex class II heterodimers in an in vitro translation system. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1994, 91, (22):10479-83
- Hill, C. M., Liu, A., Marshall, K. W., Mayer, J., Jorgensen, B., Yuan, B., Cubbon, R. M., Nichols, E. A., Wicker, L. S. and Rothbard, J. B.** Exploration of requirements for peptide binding to HLA DRB1\*0101 and DRB1\*0401. *J Immunol* , 1994, 152, (6):2890-8
- Hlavac, F., Connan, F., Hoebeke, J., Guillet, J. G. and Choppin, J.** Direct detection of peptide-dependent HLA variability by surface plasmon resonance. *Mol Immunol* , 1996, 33, (6):573-82
- Huard, B., Mastrangeli, R., Prigent, P., Bruniquel, D., Donini, S., El, T. N., Maignet, B., Dreano, M. and Triebel, F.** Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1997, 94, (11):5744-9
- Huard, B., Tournier, M. and Triebel, F.** LAG-3 does not define a specific mode of natural killing in human. *Immunol Lett* , 1998, 61, (2-3):109-12
- Hudson, K. R., Tiedemann, R. E., Urban, R. G., Lowe, S. C., Strominger, J. L. and Fraser, J. D.** Staphylococcal enterotoxin A has two cooperative binding sites on major histocompatibility complex class II. *J Exp Med* , 1995, 182, (3):711-20
- Humbert, M., Raposo, G., Cosson, P., Reggio, H., Davoust, J. and Salamero, J.** The invariant chain induces compact forms of class II molecules localized in late endosomal compartments. *Eur J Immunol* , 1993, 23, (12):3158-66
- Hunt, D. F., Michel, H., Dickinson, T. A., Shabanowitz, J., Cox, A. L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H. M. and Sette, A.** Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* , 1992, 256, (5065):1817-20
- Ingulli, E., Mondino, A., Khoruts, A. and Jenkins, M. K.** In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med* , 1997, 185, (12):2133-41
- Ito, K., Bian, H. J., Molina, M., Han, J., Magram, J., Saar, E., Belunis, C., Bolin, D. R., Arceo, R., Campbell, R., Falcioni, F., Vidovic, D., Hammer, J. and Nagy, Z. A.** HLA-DR4-IE chimeric class II transgenic, murine class II-deficient mice are susceptible to experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* , 1996, 183, (6):2635-44
- Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Chi, Y. I., Stauffacher, C., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** Three-

dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* , 1994, 368, (6473):711-8

**Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA- DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1996, 93, (2):734-8

**Jurcevic, S., Travers, P. J., Hills, A., Agrewala, J. N., Moreno, C. and Ivanyi, J.** Distinct conformations of a peptide bound to HLA-DR1 or DRB5\*0101 suggested by molecular modelling. *Int Immunol* , 1996, 8, (11):1807-14

**Karlsson, L., Peleraux, A., Lindstedt, R., Liljedahl, M. and Peterson, P. A.** Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen- presenting cells. *Science* , 1994, 266, (5190):1569-73

**Karp, D. R. and Long, E. O.** Identification of HLA-DR1 beta chain residues critical for binding staphylococcal enterotoxins A and E. *J Exp Med* , 1992, 175, (2):415-24

**Khandekar, S. S., Brauer, P. P., Naylor, J. W., Chang, H. C., Kern, P., Newcomb, J. R., Leclair, K. P., Stump, H. S., Bettencourt, B. M., Kawasaki, E., Banerji, J., Profy, A. T. and Jones, B.** Affinity and kinetics of the interactions between an alphabeta T-cell receptor and its superantigen and class II-MHC/peptide ligands. *Mol Immunol* , 1997, 34, (6):493-503

**Kim, J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** Toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science* , 1994, 266, (5192):1870-4

**Kimachi, K., Croft, M. and Grey, H. M.** The minimal number of antigen-major histocompatibility complex class II complexes required for activation of naive and primed T cells. *Eur J Immunol* , 1997, 27, (12):3310-7

**Kleijmeer, M. J., Ossevoort, M. A., van, V. C., van, H. J., Neefjes, J. J., Kast, W. M., Melief, C. J. and Geuze, H. J.** MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* , 1995, 154, (11):5715-24

**Konig, R., Huang, L. Y. and Germain, R. N.** MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* , 1992, 356, (6372):796-8

**Konig, R., Shen, X. and Germain, R. N.** Involvement of both major histocompatibility complex class II alpha and beta chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerization in T cell activation. *J Exp Med* , 1995, 182, (3):779-87

**Kropshofer, H., Bohlinger, I., Max, H. and Kalbacher, H.** Self and foreign peptides interact with intact and disassembled MHC class II antigen HLA-DR via tryptophan pockets. *Biochemistry* , 1991, 30, (38):9177-87

**Kropshofer, H., Max, H., Halder, T., Kalbus, M., Muller, C. A. and Kalbacher, H.** Self-peptides from four HLA-DR alleles share hydrophobic anchor residues near the NH2-terminal including proline as a stop signal for trimming. *J Immunol* , 1993, 151, (9):4732-42

- Kropshofer, H., Vogt, A. B. and Hammerling, G. J.** Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-DR molecules and inhibition of peptide binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1995, 92, (18):8313-7
- Kropshofer, H., Vogt, A. B., Stern, L. J. and Hammerling, G. J.** Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules. *Science* , 1995, 270, (5240):1357-9
- Kropshofer, H., Vogt, A. B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J. S. and Hammerling, G. J.** Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *Embo J* , 1996, 15, (22):6144-54
- Kropshofer, H., Arndt, S. O., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J. and Vogt, A. B.** HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* , 1997, 6, (3):293-302
- Kropshofer, H., Vogt, A. B., They, C., Armandola, E. A., Li, B. C., Moldenhauer, G., Amigorena, S. and Hammerling, G. J.** A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *Embo J* , 1998, 17, (11):2971-81
- Landry, S. J.** Local protein instability predictive of helper T-cell epitopes. *Immunol Today* , 1997, 18, (11):527-32
- Lang, Y., Forquet, F., Speck, E., Blum, J. and Delovitch, T. L.** Major histocompatibility complex class II molecules function as a template for the processing of a partially processed insulin peptide into a T-cell epitope. *Diabetes* , 1996, 45, (12):1711-9
- Lange, G., Lewis, S. J., Murshudov, G. N., Dodson, G. G., Moody, P. C., Turkenburg, J. P., Barclay, A. N. and Brady, R. L.** Crystal structure of an extracellular fragment of the rat CD4 receptor containing domains 3 and 4. *Structure* , 1994, 2, (6):469-81
- Larsen, S. L., Pedersen, L. O., Buus, S. and Stryhn, A.** T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides [published erratum appears in *J Exp Med* 1996 Nov 1;184(5):2073]. *J Exp Med* , 1996, 184, (1):183-9
- Lavoie, P. M., Thibodeau, J., Cloutier, I., Busch, R. and Sekaly, R. P.** Selective binding of bacterial toxins to major histocompatibility complex class II-expressing cells is controlled by invariant chain and HLA-DM. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1997, 94, (13):6892-7
- Lee, J. M., Kay, C. M. and Watts, T. H.** Conformational changes in mouse MHC class II proteins at acidic pH. *Int Immunol* , 1992, 4, (8):889-97
- Lee, C. and McConnell, H. M.** A general model of invariant chain association with class II major histocompatibility complex proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1995, 92, (18):8269-73
- Lee, C., Liang, M. N., Tate, K. M., Rabinowitz, J. D., Beeson, C., Jones, P. P. and McConnell, H. M.** Evidence that the autoimmune antigen myelin basic protein (MBP) Ac1-9 binds towards one end of the major histocompatibility complex (MHC) cleft. *J Exp Med* , 1998, 187, (9):1505-16
- Li, H., Llera, A. and Mariuzza, R. A.** Structure-function studies of T-cell receptor-superantigen interactions. *Immunol Rev* , 1998, 163, (177):177-86

- Liang, M. N., Beeson, C., Mason, K. and McConnell, H. M.** Kinetics of the reactions between the invariant chain (85-99) peptide and proteins of the murine class II MHC. *Int Immunol* , 1995, 7, (9):1397-404
- Liang, M. N., Lee, C., Xia, Y. and McConnell, H. M.** Molecular modeling and design of invariant chain peptides with altered dissociation kinetics from class II MHC. *Biochemistry* , 1996, 35, (47):14734-42
- Lindner, R. and Unanue, E. R.** Distinct antigen MHC class II complexes generated by separate processing pathways. *Embo J* , 1996, 15, (24):6910-20
- Liou, W., Geuze, H. J., Geelen, M. J. and Slot, J. W.** The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* , 1997, 136, (1):61-70
- Lo, M. R., Langeveld, J. P., Martineau, P., Hofnung, M., Meloen, R. H. and Leclerc, C.** Immunodominance does not result from peptide competition for MHC class II presentation. *J Immunol* , 1998, 160, (4):1759-66
- Lord, G. M., Lechler, R. I. and George, A. J.** A kinetic differentiation model for the action of altered TCR ligands [In Process Citation]. *Immunol Today* , 1999, 20, (1):33-9
- Luescher, I. F., Crimmins, D. L., Schwartz, B. D. and Unanue, E. R.** The sites in the I-Ak histocompatibility molecule photoaffinity labeled by an immunogenic lysozyme peptide. *J Biol Chem* , 1990, 265, (19):11177-84
- Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* , 1991, 353, (6342):321-5
- Malcherek, G., Falk, K., Rotzschke, O., Rammensee, H. G., Stevanovic, S., Gnau, V., Jung, G. and Melms, A.** Natural peptide ligand motifs of two HLA molecules associated with myasthenia gravis. *Int Immunol* , 1993, 5, (10):1229-37
- Malcherek, G., Gnau, V., Jung, G., Rammensee, H. G. and Melms, A.** Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules. *J Exp Med* , 1995, 181, (2):527-36
- Marks, M. S., Roche, P. A., van, D. E., Woodruff, L., Peters, P. J. and Bonifacino, J. S.** A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol* , 1995, 131, (2):351-69
- Mason, K., Denney, D. J. and McConnell, H. M.** Myelin basic protein peptide complexes with the class II MHC molecules I-Au and I-Ak form and dissociate rapidly at neutral pH. *J Immunol* , 1995, 154, (10):5216-27
- Mauri, D., Wyss, C. T., Brander, C. and Pichler, W. J.** Improved sensitization of antigen-presenting cells with transferrin- bound peptides: advantages in competition for antigen presentation. *Cell Immunol* , 1994, 158, (1):59-70
- Mazerolles, F., Barbat, C. and Fischer, A.** A synthetic peptide mimicking the HLA-DR beta 2-binding site for CD4 inhibits antigen-independent CD4+ T cell adhesion to B cells and CD4+ T cell activation. *Int Immunol* , 1996, 8, (2):267-74
- McConnell, H. M., Wada, H. G., Arimilli, S., Fok, K. S. and Nag, B.** Stimulation of T cells by antigen-presenting cells is kinetically controlled by antigenic peptide

binding to major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1995, 92, (7):2750-4

**McDonald, J. C. and Adamashvili, I.** Soluble HLA: a review of the literature. *Hum Immunol* , 1998, 59, (7):387-403

**Mellins, E., Arp, B., Singh, D., Carreno, B., Smith, L., Johnson, A. H. and Pious, D.** Point mutations define positions in HLA-DR3 molecules that affect antigen presentation [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Sep;87(17):6928]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1990, 87, (12):4785-9

**Mellins, E., Smith, L., Arp, B., Cotner, T., Celis, E. and Pious, D.** Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* , 1990, 343, (6253):71-4

**Meng, W. S., von, G. H. and Haworth, I. S.** A model of water structure inside the HLA-A2 peptide binding groove. *Int Immunol* , 1997, 9, (9):1339-46

**Miller, J.** Endosomal localization of MHC class II-invariant chain complexes. *Immunol Res* , 1994, 13, (4):244-52

**Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J. J. and Mellins, E.** An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* , 1994, 368, (6471):551-4

**Mosyak, L., Zaller, D. M. and Wiley, D. C.** The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* , 1998, 9, (3):377-83

**Mouritsen, S., Hansen, A. S., Petersen, B. L. and Buus, S.** pH dependence of the interaction between immunogenic peptides and MHC class II molecules. Evidence for an acidic intracellular compartment being the organelle of interaction. *J Immunol* , 1992, 148, (5):1438-44

**Murthy, V. L. and Stern, L. J.** 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* , 1997, 5, (10):1385-96

**Nag, B., Wada, H. G., Passmore, D., Clark, B. R., Sharma, S. D. and McConnell, H. M.** Purified beta-chain of MHC class II binds to CD4 molecules on transfected HeLa cells. *J Immunol* , 1993, 150, (4):1358-64

**Nag, B., Mukku, P. V., Arimilli, S., Phan, D., Deshpande, S. V. and Winkelhake, J. L.** Antigenic peptide binding to MHC class II molecules at increased peptide concentrations. *Mol Immunol* , 1994, 31, (15):1161-8

**Natarajan, S. K., Assadi, M. and Sadegh, N. S.** Stable Peptide Binding to MHC Class II Molecule Is Rapid and Is Determined by a Receptive Conformation Shaped by Prior Association with Low Affinity Peptides. *J Immunol* , 1999, 162, (7):4030-4036

**Naujokas, M. F., Southwood, S., Mathies, S. J., Appella, E., Sette, A. and Miller, J.** T cell recognition of flanking residues of murine invariant chain- derived CLIP peptide bound to MHC class II. *Cell Immunol* , 1998, 188, (1):49-54

**Neefjes, J. J. and Ploegh, H. L.** Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol Today* , 1992, 13, (5):179-84

**Neefjes, J. J. and Ploegh, H. L.** Inhibition of endosomal proteolytic activity by leupeptin blocks surface expression of MHC class II molecules and their conversion to SDS resistance alpha beta heterodimers in endosomes. *Embo J* , 1992, 11, (2):411-6

**Nelson, C. A., Roof, R. W., McCourt, D. W. and Unanue, E. R.** Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1992, 89, (16):7380-3

**Nelson, C. A., Petzold, S. J. and Unanue, E. R.** Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell [see comments]. *Nature* , 1994, 371, (6494):250-2

**Nelson, C. A., Viner, N. J. and Unanue, E. R.** Appreciating the complexity of MHC class II peptide binding: lysozyme peptide and I-Ak. *Immunol Rev* , 1996, 151, (81):81-105

**Nelson, C. A., Viner, N. J., Young, S. P., Petzold, S. J. and Unanue, E. R.** A negatively charged anchor residue promotes high affinity binding to the MHC class II molecule I-Ak. *J Immunol* , 1996, 157, (2):755-62

**Nelson, C. A., Vidavsky, I., Viner, N. J., Gross, M. L. and Unanue, E. R.** Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1997, 94, (2):628-33

**Newcomb, J. R. and Cresswell, P.** Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J Immunol* , 1993, 151, (8):4153-63

**Nicolle, M. W., Nag, B., Sharma, S. D., Willcox, N., Vincent, A., Ferguson, D. J. and Newsom, D. J.** Specific tolerance to an acetylcholine receptor epitope induced in vitro in myasthenia gravis CD4+ lymphocytes by soluble major histocompatibility complex class II-peptide complexes. *J Clin Invest* , 1994, 93, (4):1361-9

**O'Sullivan, D., Arrhenius, T., Sidney, J., Del, G. M., Albertson, M., Wall, M., Oseroff, C., Southwood, S., Colon, S. M., Gaeta, F. C. and et, a. I.** On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs. *J Immunol* , 1991, 147, (8):2663-9

**Odorizzi, C. G., Trowbridge, I. S., Xue, L., Hopkins, C. R., Davis, C. D. and Collawn, J. F.** Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J Cell Biol* , 1994, 126, (2):317-30

**Panina, B. P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G. and Lanzavecchia, A.** Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* , 1989, 19, (12):2237-42

**Papageorgiou, A. C., Tranter, H. S. and Acharya, K. R.** Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors. *J Mol Biol* , 1998, 277, (1):61-79

**Parker, K. C., Biddison, W. E. and Coligan, J. E.** Pocket mutations of HLA-B27 show that anchor residues act cumulatively to stabilize peptide binding. *Biochemistry* , 1994, 33, (24):7736-43

- Parker, K. C., Bednarek, M. A. and Coligan, J. E.** Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* , 1994, 152, (1):163-75
- Pedrazzini, T., Sette, A., Albertson, M. and Grey, H. M.** Free ligand-induced dissociation of MHC-antigen complexes. *J Immunol* , 1991, 146, (10):3496-501
- Peters, P. J., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Ploegh, H. L. and Geuze, H. J.** Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments [see comments]. *Nature* , 1991, 349, (6311):669-76
- Peters, P. J., Raposo, G., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Leijendekker, R. L., Geuze, H. J. and Ploegh, H. L.** Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J Exp Med* , 1995, 182, (2):325-34
- Pieters, J., Bakke, O. and Dobberstein, B.** The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* , 1993, 831-46
- Pinet, V. M. and Long, E. O.** Peptide loading onto recycling HLA-DR molecules occurs in early endosomes. *Eur J Immunol* , 1998, 28, (3):799-804
- Ploegh, H. and Benaroch, P.** Immunology. MHC class II dimer of dimers [news; comment]. *Nature* , 1993, 364, (6432):16-7
- Pond, L. and Watts, C.** Characterization of transport of newly assembled, T cell-stimulatory MHC class II-peptide complexes from MHC class II compartments to the cell surface. *J Immunol* , 1997, 159, (2):543-53
- Puppo, F., Indiveri, F., Scudeletti, M. and Ferrone, S.** Soluble HLA antigens: new roles and uses. *Immunol Today* , 1997, 18, (4):154-5
- Puppo, F., Ghio, M., Contini, P., Brenci, S., Bignardi, D., Filaci, G., Scudeletti, M. and Indiveri, F.** Immunoregulatory role of soluble HLA molecules: a new skin for an old subject? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* , 1998, 46, (3):157-60
- Pure, E., Inaba, K., Crowley, M. T., Tardelli, L., Witmer, P. M., Ruberti, G., Fathman, G. and Steinman, R. M.** Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med* , 1990, 172, (5):1459-69
- Rabinowitz, J. D., Vrljic, M., Kasson, P. M., Liang, M. N., Busch, R., Boniface, J. J., Davis, M. M. and McConnell, H. M.** Formation of a highly peptide-receptive state of class II MHC. *Immunity* , 1998, 9, (5):699-709
- Ramachandra, L., Kovats, S., Eastman, S. and Rudensky, A. Y.** Variation in HLA-DM expression influences conversion of MHC class II alpha beta: class II-associated invariant chain peptide complexes to mature peptide-bound class II alpha beta dimers in a normal B cell line. *J Immunol* , 1996, 156, (6):2196 - 2204
- Rammensee, H. G.** Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* , 1995, 7, (1):85-96

- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. and Geuze, H. J.** B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* , 1996, 183, (3):1161-72
- Rath, S., Lin, R. H., Rudensky, A. and Janeway, C. J. T and B cell receptors discriminate major histocompatibility complex class II conformations influenced by the invariant chain.** *Eur J Immunol* , 1992, 22, (8):2121-7
- Reay, P. A., Kantor, R. M. and Davis, M. M.** Use of global amino acid replacements to define the requirements for MHC binding and T cell recognition of moth cytochrome c (93-103). *J Immunol* , 1994, 152, (8):3946-57
- Reich, Z., Altman, J. D., Boniface, J. J., Lyons, D. S., Kozono, H., Ogg, G., Morgan, C. and Davis, M. M.** Stability of empty and peptide-loaded class II major histocompatibility complex molecules at neutral and endosomal pH: comparison to class I proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1997, 94, (6):2495-500
- Rhode, P. R., Burkhardt, M., Jiao, J., Siddiqui, A. H., Huang, G. P. and Wong, H. C.** Single-chain MHC class II molecules induce T cell activation and apoptosis. *J Immunol* , 1996, 157, (11):4885-91
- Riberdy, J. M., Newcomb, J. R., Surman, M. J., Barbosa, J. A. and Cresswell, P.** HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* , 1992, 360, (6403):474-7
- Roche, P. A. and Cresswell, P.** High-affinity binding of an influenza hemagglutinin-derived peptide to purified HLA-DR. *J Immunol* , 1990, 144, (5):1849-56
- Rohren, E. M., McCormick, D. J. and Pease, L. R.** Peptide-induced conformational changes in class I molecules. Direct detection by flow cytometry. *J Immunol* , 1994, 152, (11):5337-43
- Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O. and Germain, R. N.** Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J Exp Med* , 1993, 177, (3):583-96
- Romagnoli, P. and Germain, R. N.** The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J Exp Med* , 1994, 180, (3):1107-13
- Romani, N., Koide, S., Crowley, M., Witmer, P. M., Livingstone, A. M., Fathman, C. G., Inaba, K. and Steinman, R. M.** Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* , 1989, 169, (3):1169-78
- Rosenthal, A. S. and Shevach, E. M.** Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med* , 1973, 138, (5):1194-212
- Rothbard, J. B., Busch, R., Howland, K., Bal, V., Fenton, C., Taylor, W. R. and Lamb, J. R.** Structural analysis of a peptide--HLA class II complex: identification of critical interactions for its formation and recognition by T cell receptor. *Int Immunol* , 1989, 1, (5):479-86
- Rothbard, J. B. and Geftter, M. L.** Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annu Rev Immunol* , 1991, 9, (527):527-65

- Rudensky, A., Rath, S., Preston, H. P., Murphy, D. B. and Janeway, C. J.** On the complexity of self [see comments]. *Nature* , 1991, 353, (6345):660-2
- Rudensky, A., Preston, H. P., Hong, S. C., Barlow, A. and Janeway, C. J.** Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules [see comments]. *Nature* , 1991, 353, (6345):622-7
- Rudensky, A., Preston, H. P., al, R. B., Rothbard, J. and Janeway, C. J.** Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* , 1992, 359, (6394):429-31
- Sadegh, N. S. and McConnell, H. M.** A kinetic intermediate in the reaction of an antigenic peptide and I-Ek. *Nature* , 1989, 337, (6204):274-6
- Sadegh, N. S. and Germain, R. N.** A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* , 1991, 353, (6340):167-70
- Sadegh, N. S. and Germain, R. N.** How MHC class II molecules work: peptide-dependent completion of protein folding. *Immunol Today* , 1992, 13, (2):43-6
- Sadegh, N. S., Stern, L. J., Wiley, D. C. and Germain, R. N.** MHC class II function preserved by low-affinity peptide interactions preceding stable binding. *Nature* , 1994, 370, (6491):647-50
- Salamero, J., Humbert, M., Cosson, P. and Davoust, J.** Mouse B lymphocyte specific endocytosis and recycling of MHC class II molecules. *Embo J* , 1990, 9, (11):3489-96
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* , 1994, 179, (4):1109-18
- Saper, M. A., Bjorkman, P. J. and Wiley, D. C.** Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* , 1991, 219, (2):277-319
- Schad, E. M., Zaitseva, I., Zaitsev, V. N., Dohlsten, M., Kalland, T., Schlievert, P. M., Ohlendorf, D. H. and Svensson, L. A.** Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. *Embo J* , 1995, 14, (14):3292-301
- Schafer, P. H., Pierce, S. K. and Jardetzky, T. S.** The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers. *Semin Immunol* , 1995, 7, (6):389-98
- Schafer, P. H., Malapati, S., Hanfelt, K. K. and Pierce, S. K.** The assembly and stability of MHC class II-(alpha beta)<sub>2</sub> superdimers. *J Immunol* , 1998, 161, (5):2307-16
- Schmitt, L., Boniface, J. J., Davis, M. M. and McConnell, H. M.** Kinetic isomers of a class II MHC-peptide complex. *Biochemistry* , 1998, 37, (50):17371-80
- Schmitt, L., Boniface, J. J., Davis, M. M. and McConnell, H. M.** Conformational isomers of a class II MHC-peptide complex in solution. *J Mol Biol* , 1999, 286, (1):207-18
- Scott, C. A., Peterson, P. A., Teyton, L. and Wilson, I. A.** Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor

- residues [published erratum appears in *Immunity* 1998 Apr;8(4):531]. *Immunity* , 1998, 8, (3):319-29
- Seth, A., Stern, L. J., Ottenhoff, T. H., Engel, I., Owen, M. J., Lamb, J. R., Klausner, R. D. and Wiley, D. C.** Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen in vitro. *Nature* , 1994, 369, (6478):324-7
- Sette, A., Buus, S., Colon, S., Smith, J. A., Miles, C. and Grey, H. M.** Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature* , 1987, 328, (6129):395-9
- Sette, A., Adorini, L., Colon, S. M., Buus, S. and Grey, H. M.** Capacity of intact proteins to bind to MHC class II molecules. *J Immunol* , 1989, 143, (4):1265-7
- Sette, A., Buus, S., Appella, E., Smith, J. A., Chesnut, R., Miles, C., Colon, S. M. and Grey, H. M.** Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1989, 86, (9):3296-300
- Sette, A., Ceman, S., Kubo, R. T., Sakaguchi, K., Appella, E., Hunt, D. F., Davis, T. A., Michel, H., Shabanowitz, J., Rudersdorf, R. and et, a. l.** Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science* , 1992, 258, (5089):1801-4
- Sette, A., Southwood, S., O'Sullivan, D., Gaeta, F. C., Sidney, J. and Grey, H. M.** Effect of pH on MHC class II-peptide interactions. *J Immunol* , 1992, 148, (3):844-51
- Sette, A., Sidney, J., Oseroff, C., del, G. M., Southwood, S., Arrhenius, T., Powell, M. F., Colon, S. M., Gaeta, F. C. and Grey, H. M.** HLA DR4w4-binding motifs illustrate the biochemical basis of degeneracy and specificity in peptide-DR interactions. *J Immunol* , 1993, 151, (6):3163-70
- Sherman, W., Liu, Z., Inghirami, G., Reed, E. F., Harris, P. E. and Suci, F. N.** Major histocompatibility complex-restricted recognition of autologous chronic lymphocytic leukemia by tumor-specific T cells. *Immunol Res* , 1993, 12, (4):338-48
- Sherman, M. A., Weber, D. A. and Jensen, P. E.** DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* , 1995, 3, (2):197-205
- Shevach, E. M. and Rosenthal, A. S.** Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med* , 1973, 138, (5):1213-29
- Siklodi, B., Vogt, A. B., Kropshofer, H., Falcioni, F., Molina, M., Bolin, D. R., Campbell, R., Hammerling, G. J. and Nagy, Z. A.** Binding affinity independent contribution of peptide length to the stability of peptide-HLA-DR complexes in live antigen presenting cells. *Hum Immunol* , 1998, 59, (8):463-71
- Siligardi, G. and Drake, A. F.** The importance of extended conformations and, in particular, the PII conformation for the molecular recognition of peptides. *Biopolymers* , 1995, 37, (4):281-92
- Sinigaglia, F. and Hammer, J.** Motifs and supermotifs for MHC class II binding peptides. *J Exp Med* , 1995, 181, (2):449-51

**Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E. and Zaller, D. M.** Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* , 1995, 375, (6534):802-6

**Smith, K. J., Reid, S. W., Harlos, K., McMichael, A. J., Stuart, D. I., Bell, J. I. and Jones, E. Y.** Bound water structure and polymorphic amino acids act together to allow the binding of different peptides to MHC class I HLA-B53. *Immunity* , 1996, 4, (3):215-28

**Springer, T. A., Kaufman, J. F., Siddoway, L. A., Mann, D. L. and Strominger, J. L.** Purification of HLA-linked B lymphocyte alloantigens in immunologically active form by preparative sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and studies on their subunit association. *J Biol Chem* , 1977, 252, (17):6201-7

**Springer, T. A., Kaufman, J. F., Terhorst, C. and Strominger, J. L.** Purification and structural characterisation of human HLA-linked B-cell antigens. *Nature* , 1977, 268, (5617):213-8

**Springer, T. A., Mann, D. L., DeFranco, A. L. and Strominger, J. L.** Detergent solubilization, purification, and separation of specificities of HLA antigens from a cultured human lymphoblastoid line, RPMI 4265. *J Biol Chem* , 1977, 252, (13):4682-93

**Springer, S., Doring, K., Skipper, J. C., Townsend, A. R. and Cerundolo, V.** Fast association rates suggest a conformational change in the MHC class I molecule H-2Db upon peptide binding. *Biochemistry* , 1998, 37, (9):3001-12

**Srinivasan, M., Marsh, E. W. and Pierce, S. K.** Characterization of naturally processed antigen bound to major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1991, 88, (18):7928-32

**Srinivasan, M., Domanico, S. Z., Kaumaya, P. T. and Pierce, S. K.** Peptides of 23 residues or greater are required to stimulate a high affinity class II-restricted T cell response. *Eur J Immunol* , 1993, 23, (5):1011-6

**Stang, E., Guerra, C. B., Amaya, M., Paterson, Y., Bakke, O. and Mellins, E. D.** DR/CLIP (class II-associated invariant chain peptides) and DR/peptide complexes colocalize in prelysosomes in human B lymphoblastoid cells. *J Immunol* , 1998, 160, (10):4696-707

**Stauss, H. J., Linsk, R., Fischer, A., Watts, S., Banasiak, D., Haberman, A., Clark, I., Forman, J., McMillan, M., Schreiber, H. and et, a. I.** Isolation of the MHC genes encoding the tumour-specific class I antigens expressed on a murine fibrosarcoma. *J Immunogenet* , 1986, 13, (2-3):101-11

**Stebbins, C. C., Loss, G. J., Elias, C. G., Chervonsky, A. and Sant, A. J.** The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J Exp Med* , 1995, 181, (1):223-34

**Stern, L. J. and Wiley, D. C.** The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty alpha beta heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* , 1992, 68, (3):465-77

**Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C.** Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* , 1994, 368, (6468):215-21

- Stumptner, P. and Benaroch, P.** Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *Embo J* , 1997, 16, (19):5807-18
- Tampe, R., Clark, B. R. and McConnell, H. M.** Energy transfer between two peptides bound to one MHC class II molecule. *Science* , 1991, 254, (5028):87-9
- Tampe, R. and McConnell, H. M.** Kinetics of antigenic peptide binding to the class II major histocompatibility molecule I-Ad. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1991, 88, (11):4661-5
- Tampe, R., Tyvoll, D. and McConnell, H. M.** Reactions of the subunits of the class II major histocompatibility complex molecule IAd. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1991, 88, (23):10667-70
- Teng, M. K., Smolyar, A., Tse, A. G., Liu, J. H., Liu, J., Hussey, R. E., Nathenson, S. G., Chang, H. C., Reinherz, E. L. and Wang, J. H.** Identification of a common docking topology with substantial variation among different TCR-peptide-MHC complexes. *Curr Biol* , 1998, 8, (7):409-12
- Thery, C., Brachet, V., Regnault, A., Rescigno, M., Ricciardi, C. P., Bonnerot, C. and Amigorena, S.** MHC class II transport from lysosomal compartments to the cell surface is determined by stable peptide binding, but not by the cytosolic domains of the alpha- and beta-chains. *J Immunol* , 1998, 161, (5):2106-13
- Thibodeau, J., Cloutier, I., Lavoie, P. M., Labrecque, N., Mourad, W., Jardetzky, T. and Sekaly, R. P.** Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding. *Science* , 1994, 266, (5192):1874-8
- Tobes, R., Pareja, E., Nieto, A. and Martin, J.** Two classes of MHC class II interactions with the TCR [letter; comment] [see comments]. *Immunol Today* , 1998, 19, (4):192-3
- Toh, H., Kamikawaji, N., Tana, T., Sasazuki, T. and Kuhara, S.** Molecular dynamics simulations of HLA-DR4 (DRB1\*0405) complexed with analogue peptide: conformational changes in the putative T-cell receptor binding regions. *Protein Eng* , 1998, 11, (11):1027-32
- Triebel, F., Jitsukawa, S., Baixeras, E., Roman, R. S., Genevee, C., Viegas, P. E. and Hercend, T.** LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* , 1990, 171, (5):1393-405
- van, der, Burg, Sh, Visseren, M. J., Brandt, R. M., Kast, W. M. and Melief, C. J.** Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability. *J Immunol* , 1996, 156, (9):3308-14
- van, H. S., Tjin, E., Lillemeier, B. F., Gruneberg, U., van, M. K., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T. H., Pappin, D. J., Trowsdale, J. and Neefjes, J.** HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* , 1997, 7, (12):950-7
- Verreck, F. A., van, de, Poel, A., Termijtelen, A., Amons, R., Drijfhout, J. W. and Koning, F.** Identification of an HLA-DQ2 peptide binding motif and HLA-DPw3-bound self-peptide by pool sequencing. *Eur J Immunol* , 1994, 24, (2):375-9
- Verreck, F. A., Vermeulen, C., Poel, A. V., Jorritsma, P., Amons, R., Coligan, J. E., Drijfhout, J. W. and Koning, F.** The generation of SDS-stable HLA DR dimers is independent of efficient peptide binding. *Int Immunol* , 1996, 8, (3):397-404

- Vignali, D. A., Moreno, J., Schiller, D. and Hammerling, G. J.** Species-specific binding of CD4 to the beta 2 domain of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* , 1992, 175, (4):925-32
- Vignali, D. A., Carson, R. T., Chang, B., Mittler, R. S. and Strominger, J. L.** The two membrane proximal domains of CD4 interact with the T cell receptor. *J Exp Med* , 1996, 183, (5):2097-107
- Viville, S., Neefjes, J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C. and Mathis, D.** Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* , 1993, 72, (4):635-48
- Vogt, A. B., Kropshofer, H., Kalbacher, H., Kalbus, M., Rammensee, H. G., Coligan, J. E. and Martin, R.** Ligand motifs of HLA-DRB5\*0101 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol* , 1994, 153, (4):1665-73
- Vogt, A. B., Stern, L. J., Amshoff, C., Dobberstein, B., Hammerling, G. J. and Kropshofer, H.** Interference of distinct invariant chain regions with superantigen contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR. *J Immunol* , 1995, 155, (10):4757-65
- Vogt, A. B., Kropshofer, H. and Hammerling, G. J.** How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules. *Hum Immunol* , 1997, 54, (2):170-9
- vogt, A. B., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J. and Kropshofer, H.** HLA-DM stabilizes empty HLA-DR molecules in a chaperone-like fashion. *Immunol Lett* , 1997, 57, (1-3):209-11
- von, B. A., Ehrlich, S., Malcherek, G. and Fleischer, B.** Major histocompatibility complex class II-associated peptides determine the binding of the superantigen toxic shock syndrome toxin-1. *Eur J Immunol* , 1995, 25, (10):2894-8
- Watts, C. and Howard, J. C.** Membrane recycling and antigen presentation. *Bioessays* , 1986, 4, (6):265-7
- Watts, T. H., Gaub, H. E. and McConnell, H. M.** T-cell-mediated association of peptide antigen and major histocompatibility complex protein detected by energy transfer in an evanescent wave-field. *Nature* , 1986, 320, (6058):179-81
- Weber, P., Raynaud, I., Ettouati, L., Trescol, B. M., Carrupt, P. A., Paris, J., Roubourdin, C. C., Gerlier, D. and Testa, B.** Molecular modeling of hen egg lysozyme HEL[52-61] peptide binding to I- Ak MHC class II molecule. *Int Immunol* , 1998, 10, (12):1753-64
- Weenink, S. M., Milburn, P. J. and Gautam, A. M.** A continuous central motif of invariant chain peptides, CLIP, is essential for binding to various I-A MHC class II molecules. *Int Immunol* , 1997, 9, (2):317-25
- Wen, R., Broussard, D. R., Surman, S., Hogg, T. L., Blackman, M. A. and Woodland, D. L.** Carboxy-terminal residues of major histocompatibility complex class II-associated peptides control the presentation of the bacterial superantigen toxic shock syndrome toxin-1 to T cells. *Eur J Immunol* , 1997, 27, (3):772-81
- Wettstein, D. A., Boniface, J. J., Reay, P. A., Schild, H. and Davis, M. M.** Expression of a class II major histocompatibility complex (MHC) heterodimer in a lipid-linked

form with enhanced peptide/soluble MHC complex formation at low pH. *J Exp Med* , 1991, 174, (1):219-28

**Witt, S. N. and McConnell, H. M.** Formation and dissociation of short-lived class II MHC-peptide complexes. *Biochemistry* , 1994, 33, (7):1861-8

**Woodland, D. L., Wen, R. and Blackman, M. A.** Why do superantigens care about peptides? *Immunol Today* , 1997, 18, (1):18-22

**Wu, S., Gorski, J., Eckels, D. D. and Newton, N. D.** T cell recognition of MHC class II-associated peptides is independent of peptide affinity for MHC and sodium dodecyl sulfate stability of the peptide/MHC complex. Effects of conservative amino acid substitutions at anchor position 1 of influenza matrix protein19-31. *J Immunol* , 1996, 156, (10):3815-20

**Wu, S. and Gorski, J.** The MHC class II-associated invariant chain-derived peptide clip binds to the peptide-binding groove of class II molecules. *Mol Immunol* , 1996, 33, (4-5):371-7

**Wu, S. and Gorski, J.** Polymorphism at beta 85 and not beta 86 of HLA-DR1 is predominantly responsible for restricting the nature of the anchor side chain: implication for concerted effects of class II MHC polymorphism. *Int Immunol* , 1997, 9, (10):1495-502

**Xu, X., Song, W., Cho, H., Qiu, Y. and Pierce, S. K.** Intracellular transport of invariant chain-MHC class II complexes to the peptide-loading compartment. *J Immunol* , 1995, 155, (6):2984-92

**Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C.** Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* , 1974, 251, (5475):547-8

**Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C.** Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* , 1974, 248, (450):701-2

**Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C.** H-2 compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D;. *J Exp Med* , 1975, 141, (6):1427-36

