

maine distal et un domaine proximal est composée de 191 acides aminés pour la chaîne HLA-DM α et 189 acides aminés pour la chaîne HLA-DM β . La partie intra-cytoplasmique N-terminale est beaucoup plus courte avec 9 acides aminés pour la chaîne HLA-DM α et 22 acides aminés pour la chaîne HLA-DM β . Ces deux parties sont séparées par une portion transmembranaire riche en acides aminés hydrophobes. HLA-DM α possède deux sites potentiels de N-glycosylation, alors que HLA-DM β n'en possède qu'un. Sans aucune glycosylation post-traductionnelle, la chaîne HLA-DM α aurait un poids moléculaire relatif de 26,2 et un pI de 4,1, alors que la chaîne HLA-DM β aurait un poids moléculaire de 27,1 et un pI de 7,2. Les premières modélisations du dimère HLA-DM permettent de prédire l'existence d'un site de liaison peptidique similaire à celui décrit pour les molécules HLA-DR. Néanmoins, la présence de nombreuses cystéines susceptibles de former des ponts disulfure rendrait la molécule HLA-DM β plus rigide et permet de prévoir une capacité de liaison peptidique plus restreinte.

Les gènes du CMH de classe II sont caractérisés par un polymorphisme plus ou moins important suivant le locus et les gènes *HLA-DMA* et *HLA-DMB* ne dérogent pas à cette règle. A l'heure actuelle, les gènes *HLA-DMA* et *HLA-DMB* présentent quatre allèles chacun, officiellement répertoriés dans la dernière mise à jour de la nomenclature des facteurs du système HLA. Cette nomenclature ne prend en compte que le polymorphisme de l'exon 3 qui code pour le domaine le plus proximal par rapport à la membrane [5-7]. Il est donc peu probable que ce polymorphisme ait quelque influence sur la structure de l'éventuel site de liaison peptidique des molécules HLA-DM. Un polymorphisme de l'exon 2 du gène *HLA-DMB* a également été décrit dans la population hispanique, mais étant donné la faible représentation du variant (seulement 1 %), ce polymorphisme n'a pas été pris en compte pour l'instant dans la nouvelle nomenclature.

Étant donné le profil d'expression des produits des gènes *HLA-DMA* et *HLA-DMB*, superposable à celui des molécules du CMH de classe II, leur similarité structurale avec la molécule HLA-DR, et la grande analogie de séquence entre les gènes *HLA-DM* et leurs homologues murins (> 70 %), la fonction des molécules HLA-DM semble être au tout premier plan.

Rôle des molécules HLA-DM

La structure tridimensionnelle hypothétique des molécules HLA-DM, à la fois proche de celle des molécules HLA-DR par leur organisation en domaines $\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$ et $\beta 2$, et foncièrement différente du fait de sa rigidité, semble indiquer que le rôle de ces molécules dans la capture et/ou la fixation de peptides antigéniques est plutôt restreint. Ainsi, les toutes premières études proposaient un rôle dans la présentation de peptides particuliers. Cette hypothèse était fondée sur l'exemple de l'antigène murin Mta, très proche des molécules du CMH de classe I, et spécialisé dans la présentation de peptides mitochondriaux [8].

Ce sont en fait les travaux de E. Mellins et de D. Pious qui ont permis de cerner d'un peu plus près le rôle des molécules HLA-DM. En effet, le criblage de mutants, dérivés de la lignée B lymphoblastoïde 8.1.6 par mutagenèse chimique et sélectionnés négativement par un anticorps monoclonal 16.23 capable de reconnaître un épitope conformationnel sur le domaine $\beta 1$ des molécules HLA-DR3, a permis d'isoler le clone 9.5.3. Ainsi, le clone 9.5.3 présente une densité membranaire de molécules HLA de classe II normale puisqu'il exprime l'épitope reconnu par l'anticorps anti-HLA-DR total, L243, mais il n'exprime pas l'épitope conformationnel reconnu par 16.23. De plus, ce mutant est déficient dans la présentation d'antigènes natifs exogènes, malgré une présence quantitativement normale de ces molécules HLA de classe II à la surface [9]. Cette étude pilote a, pour la première fois, émis l'hypothèse de l'existence de molécules différentes

des molécules HLA de classe II, ayant un rôle important dans la présentation et l'apprêtement des antigènes exogènes. Très vite, par l'analyse de la cartographie génomique de différents mutants de même phénotype et présentant des délétions dans la région HLA de classe II, les gènes codant pour ces molécules ont été localisés entre les gènes *DNA* et *DOB* [10]. Les molécules HLA-DR exprimées par ces mutants ne présentaient pas les caractéristiques des molécules HLA-DR des cellules parentales normales dont ils étaient issus. Ainsi, les molécules HLA-DR ne contenaient-elles pas l'épitope conformationnel reconnu par l'anticorps 16.23 et avaient-elles perdu leur stabilité dans des solutions de détergents. L'analyse des complexes HLA-DR/peptide de ces mutants a révélé que 60 % à 70 % des molécules DR étaient associées à un groupe de peptides dont la séquence est centrée sur les résidus 80-103 de la chaîne invariante: cette séquence a été appelée CLIP (pour *class II associated invariant chain peptide*) [11, 12]. Le fait que des complexes HLA-DR/CLIP aient également été retrouvés dans des cellules normales, mais dans une proportion plus faible, indique que ces complexes peuvent représenter un intermédiaire physiologique qui se serait accumulé dans les mutants.

En fait, le lien entre cette fonction indispensable à la présentation des antigènes exogènes par les molécules HLA-DR, appelée CIIP (pour *class II presentation locus*) et les gènes *HLA-DM* n'a été fait que récemment [13, 14]. Il s'est avéré que le mutant 9.5.3 présentait une substitution nucléotidique unique qui introduisait un codon stop dans le deuxième exon de *HLA-DMB* [13]. Ainsi, les transfections des gènes *HLA-DMA* et *HLA-DMB* dans les mutants 2.2.93 [13] et 9.5.3 [14] respectivement ont permis de restaurer le phénotype caractéristique des cellules souches normales, à savoir la capacité de présentation des antigènes exogènes natifs par les molécules HLA-DR.

L'étude d'un mutant *HLA-DRA* exprimant le même phénotype que les mutants *HLA-DM* a permis d'apporter plus de précision sur la relation

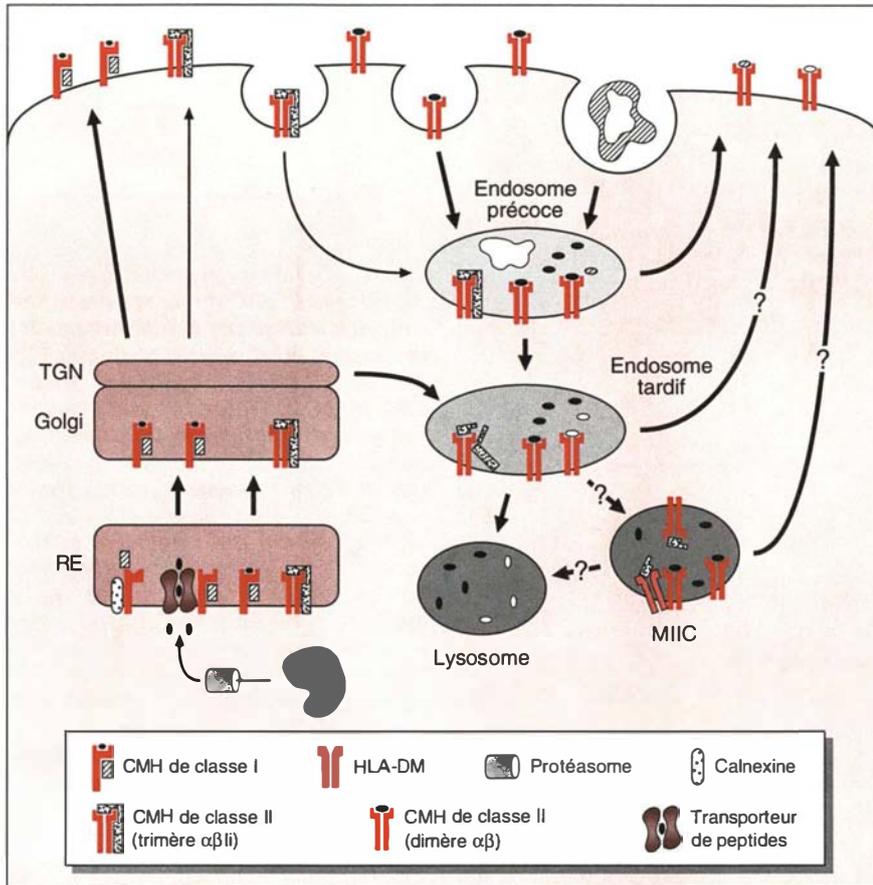


Figure 2. Voies de présentation des antigènes par les molécules HLA de classe II. Très tôt lors de leur synthèse, dans le réticulum endoplasmique, les molécules HLA de classe I sont associées à la calnexine. La calnexine lie toute molécule qui n'a pas atteint la conformation nécessaire à sa sortie du réticulum endoplasmique [16]. Une fois correctement assemblé, le complexe trimoléculaire HLA de classe I/β2-microglobuline/peptide transite par l'appareil de Golgi avant de s'exprimer à la surface cellulaire. Dans le réticulum endoplasmique, le complexe HLA de classe II (αβ)/chaîne invariante (Ii) s'associe également à la calnexine (non schématisé) jusqu'au moment où trois trimères αβIi se lient, le nonamère résultant pouvant alors sortir du réticulum endoplasmique [17]. Une fraction des trimères αβIi (≈ 3%) est directement transportée vers la surface cellulaire, où les complexes αβIi sont rapidement internalisés [18] (voie accessoire représentée par des flèches fines). La majorité des trimères αβIi est dirigée grâce à la Ii vers un (des) compartiment(s) endosomiques acides (voie principale représentée par des flèches épaisses). C'est au sein de ces compartiments que la chaîne invariante est dégradée, permettant ainsi aux dimères αβ de fixer les peptides antigéniques issus de la dégradation de protéines exogènes endocytées dans la cellule. Il existe une voie alternative de présentation faisant intervenir des molécules αβ mûres d'abord exprimées à la surface cellulaire puis internalisées dans les endosomes précoces et enfin recyclées et exprimées à nouveau à la surface cellulaire. Les molécules HLA-DM ont été mises en évidence dans le compartiment appelé MIIC (pour MHC class II compartment), très riche en complexes αβ/peptide (voir figure 3, pour détail). (RE: réticulum endoplasmique; TGN: réseau trans-golgien.)

éventuelle entre *HLA-DR* et *HLA-DM* [11]. En effet, une mutation ponctuelle en position 96 de la chaîne DRα introduit une N-glycosylation supplémentaire qui altère la conformation des molécules HLA-DR ainsi que leur résistance à des détergents et cela sans modifier leur expression membranaire. En outre, ce mutant est déficient dans la présentation d'antigènes natifs internalisés par endocytose, fonction restaurée après transfection du gène *HLA-DRA* intact. Étant donné les caractéristiques similaires des mutants *DM* et de ce mutant *DRA*, il est tentant de penser qu'une association directe, *via* la chaîne DRα, entre les molécules HLA de classe II et les molécules DM est indispensable à la fonction DM. Cette association physique serait en tout point comparable à celle des molécules TAP et HLA de classe I dans le réticulum endoplasmique avant la formation du complexe HLA de classe I/peptide [15].

La voie classique de présentation des antigènes natifs exogènes par les molécules HLA de classe II dépend de l'expression de molécules nouvellement synthétisées (et plus particulièrement des molécules HLA-DR), de la chaîne invariante et de HLA-DM. Parallèlement, deux autres voies de présentation par les molécules HLA de classe II ont été décrites (figure 2). La première est une voie alterne de présentation des antigènes exogènes, indépendante de toute synthèse protéique, de même que de l'expression de la chaîne invariante et de HLA-DM, qui met en jeu des molécules HLA de classe II mûres recyclant à la surface cellulaire [19]. La deuxième est une voie de présentation d'antigènes endogènes cytosoliques, synthétisés dans la cellule, qui serait physiquement séparée de la voie classique de présentation par les molécules HLA de classe I. Cette voie endogène des molécules HLA de classe II est indépendante des gènes *TAP*, mais nécessite l'expression des gènes *HLA-DMA* et *-DMB* [20].

Fonction intrinsèque des molécules HLA-DM

L'incapacité des mutants HLA-DM de présenter un répertoire normal de

complexes CMH de classe II/peptide ainsi que la nécessité des molécules DM pour les voies de présentation faisant intervenir des molécules HLA de classe II néosynthétisées ont permis de proposer plusieurs hypothèses sur la fonction intrinsèque des molécules HLA-DM (figure 3). (1) HLA-DM pourrait agir telle une molécule chaperonne des molécules HLA de classe II et interviendrait, soit dans le transport, soit dans le repliement conformationnel nécessaire à la bonne fixation du peptide dans le site peptidique. (2) Étant donné la structure des molécules HLA-DM, celles-ci pourraient assurer une fonction de fixation non spécifique de peptides. Dans ce cas, elles serviraient de navette pour la livraison des peptides dans le compartiment acide où ils s'associent aux molécules HLA de classe II avant l'expression des dimères $\alpha\beta$ à la membrane. (3) HLA-DM pourrait également être requise pour une élimination efficace des produits de la dégradation de la chaîne invariante. Dans ce modèle, le site de fixation peptidique de HLA-DM aurait évolué pour une fixation spécifique et exclusive de CLIP. La présence de HLA-DM comme un réceptacle de CLIP permettrait l'élimination de CLIP en l'absence de protéases dans un compartiment qui contient probablement des peptides immunogènes, sensibles à toute activité protéasique. Les arguments apportés par deux études récentes sur les conséquences d'un déficit HLA-DM sur les propriétés et les fonctions des molécules murines I-A^d [21] et I-A^k [22] sont en faveur de cette dernière hypothèse.

Quel que soit le modèle considéré, les molécules DM auraient donc un rôle fondamentalement différent de celui des molécules HLA-DR, c'est-à-dire que le complexe peptide/DM ne serait pas un ligand du récepteur des lymphocytes T et sa fonction serait essentiellement intracellulaire. L'analyse des séquences de DMB et de Mb permet de suggérer ces deux aspects. En effet, d'une part, elles ne présentent aucune analogie avec les autres chaînes β des molécules du CMH de classe II dans le domaine $\beta 2$ responsable de l'interaction avec le corécepteur CD4 [23]. D'autre part, elles divergent des chaînes β des mo-

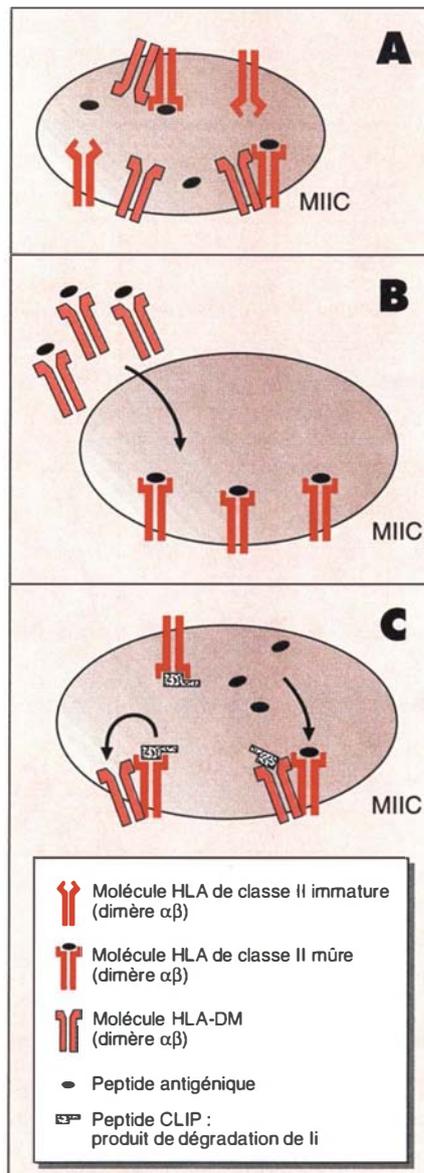


Figure 3. Rôles hypothétiques des molécules HLA-DM dans la présentation des antigènes exogènes par les molécules HLA de classe II. Les molécules HLA-DM, exprimées essentiellement à l'intérieur des cellules présentant l'antigène, pourraient intervenir dans la présentation antigénique. Trois modèles ont été proposés. A. L'hétérodimère DMA-DMB agirait comme une molécule chaperonne permettant le repliement conformationnel adéquat des molécules HLA de classe II indispensables à la fixation des peptides antigéniques. B. L'hétérodimère DMA-DMB se comporterait comme une « navette à peptides », convoyant ainsi jusqu'au compartiment MIIC (pour MHC class II compartment, très riche en complexes $\alpha\beta$ /peptide) les peptides antigéniques qui s'associeraient alors aux molécules HLA de classe II. C. L'hétérodimère DMA-DMB constituerait un réceptacle pour les peptides CLIP issus de la dégradation de la chaîne invariante, qui seraient ainsi éliminés, libérant alors le site de fixation des molécules HLA de classe II pour les peptides antigéniques.

lécules du CMH de classe II en trois ou quatre positions très conservées (80-83) qui sont impliquées dans le transport et le ciblage des molécules HLA-DR vers la surface cellulaire [24]. Enfin, l'utilisation d'anticorps a permis de localiser les molécules HLA-DM exclusivement dans la cellule et plus précisément dans le compartiment MIIC (pour MHC class II compartment) très riche en complexes $\alpha\beta$ /peptide.

HLA-DM et auto-immunité

Au moment de la découverte des gènes *TAP* et *LMP*, certaines équipes s'étaient intéressées à l'association éventuelle de ces gènes avec certaines maladies auto-immunes associées au composant HLA de classe II, sans que des résultats nets et unanimes aient été obtenus [25]. Jusqu'à présent, aucune étude comparable concernant les gènes *HLA-DM*

n'a été publiée, vraisemblablement en partie à cause d'un polymorphisme restreint. Il serait néanmoins intéressant de réaliser une telle étude en tenant compte des déséquilibres de liaison qui ont été décrits entre les gènes *DM* et les autres gènes du système HLA de classe II [26].

Du fait de la grande analogie de structure de leurs régions promotrices, l'expression des gènes *HLA-DM* et des autres gènes *HLA* de classe II est vraisemblablement coordonnée et inductible par l'interféron γ . Dans les lymphocytes B, les premiers résultats semblent indiquer que la fixation du peptide antigénique à l'hétérodimère HLA de classe II dépendrait du niveau d'expression des molécules *HLA-DM* [14]. Au vu de ces résultats, les auteurs suggèrent qu'en cas de diminution de l'expression des gènes *HLA-DM* le répertoire des peptides antigéniques présentés par les molécules HLA de classe II soit modifié, privilégiant la présentation de peptides normalement non présentés [14] et pouvant constituer un des mécanismes d'auto-immunisation ■

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Laurent Degos pour la lecture de cet article ainsi que pour ses conseils avisés.

Valérie Pinet
Jean-François Éliaou

Laboratoire d'Immunologie, Inserm U. 291, hôpital Saint-Éloi, 34295 Montpellier Cedex 5, France.

TIRÉS À PART

J.F. Éliaou.

RÉFÉRENCES

1. Kelly AP, Monaco JJ, Cho S, Trowsdale J. A new human HLA class II-related locus, *DM*. *Nature* 1991; 353: 571-3.
2. Cho S, Attaya M, Monaco JJ. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* 1991; 353: 573-6.
3. Kelly A, Powis SH, Kerr LA, Mockridge I, Elliott T, Bastin J, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Trowsdale J, Townsend A. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 1992; 355: 641-4.
4. Radley E, Alderton RP, Kelly A, Trowsdale J, Beck S. Genomic organization of *HLA-DMA* and *HLA-DMB*. Comparison of the gene organization of the all six class II families in the human major histocompatibility complex. *J Biol Chem* 1994; 269: 18834-8.
5. Carrington M, Yeager M, Mann D. Characterization of *HLA-DMB* polymorphism. *Immunogenetics* 1993; 38: 446-9.
6. Carrington M, Harding A. Sequence analysis of two novel *HLA-DMA* alleles. *Immunogenetics* 1994; 40: 165.
7. Sanderson F, Powis SH, Kelly AP, Trowsdale J. Limited polymorphism in *HLA-DM* does not involve the peptide binding groove. *Immunogenetics* 1994; 39: 56-8.
8. Shawar SM, Cook RG, Rodgers JR, Rich RR. Specialized functions of MHC class I molecules. I. An N-formyl peptide receptor is required for construction of the class I antigen Mta. *J Exp Med* 1990; 171: 897-912.
9. Mellins E, Smith L, Arp B, Cotner T, Celis E, Pious D. Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* 1990; 343: 71-4.
10. Mellins E, Kempin S, Smith L, Monji T. A gene required for class II-restricted antigen presentation maps to the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 1991; 174: 1607-15.
11. Mellins E, Cameron P, Amaya M, Goodman S, Pious D, Smith L, Arp B. A mutant human histocompatibility leucocyte antigen DR molecule associated with invariant chain peptides. *J Exp Med* 1994; 179: 541-9.
12. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 1992; 360: 474-7.
13. Fling SP, Arp B, Pious D. *HLA-DMA* and *-DMB* are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 1994; 368: 554-8.
14. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, Monaco JJ, Mellins E. An essential role for *HLA-DM* in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 1994; 368: 551-4.
15. Ortmann B, Androlewicz MJ. MHC class I/ β 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 1994; 368: 864-7.
16. Ou WJ, Cameron PH, Thomas DY, Bergeron JJM. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* 1993; 364: 771-6.
17. Anderson KS, Cresswell P. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J* 1994; 13: 675-82.
18. Roche PA, Teletski CT, Stang E, Bakke O, Long EO. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8581-5.
19. Pinet V, Malnati MS, Long EO. Two processing pathways for the MHC class II-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen. *J Immunol* 1994; 152: 4852-60.
20. Malnati MS, Ceman S, Weston M, DeMars R, Long EO. Presentation of cytosolic antigen by HLA-DR requires a function encoded in the class II region of the MHC. *J Immunol* 1993; 151: 1-6.
21. Stebbins CC, Loss GE, Elias CG, Chervonsky A, Sant AJ. The requirement for *DM* in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependant. *J Exp Med* 1995; 181: 223-34.
22. Brooks AG, Campbell PL, Reynolds P, Gautam AM, McCluskey J. Antigen presentation and assembly by mouse *I-A^b* class II molecules in human APC containing deleted or mutated HLA *DM* genes. *J Immunol* 1994; 153: 5382-92.
23. Cammarota G, Scheirle A, Takacs B, Doran DM, Knorr R, Bannwarth W, Guardiola J, Siningaglia F. Identification of a CD4 binding site on the β 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* 1992; 356: 799-801.
24. Sant AJ, Chervonsky A. MHC class II molecules express a targeting signal that directs localization to the endocytic compartments of antigen presenting cells. *Hum Immunol* 1993; 37s: 3.
25. Colonna M, Bresnahan M, Bahram S, Strominger JL, Spies T. Allelic variants of the human putative peptide transporters involved in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3932-6.
26. Carrington M, Stephens JC, Klitz W, Begovich AB, Erlich HA, Mann D. Major histocompatibility complex class II haplotypes and disequilibrium values observed in the CEPH families. *Hum Immunol* 1994; 41: 234-40.