

Transport intracellulaire des molécules de classe II du CMH

Les récepteurs des lymphocytes T reconnaissent les antigènes dégradés en peptides, associés aux molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les molécules de classe II sont formées dans le réticulum endoplasmique, associant trois dimères $\alpha\beta$ à un trimère de chaînes invariantes, et sont exportées dans l'appareil de Golgi puis vers les endosomes où les chaînes invariantes sont dégradées progressivement. Cette dégradation doit être totale pour que le peptide puisse se lier à la molécule CMH-II. La dégradation aurait lieu dans les endosomes et la liaison peptidique dans un compartiment endocytique spécialisé, les vésicules de classe II, isolées tout récemment par électrophorèse en phase fluide et qui pourraient se former par bourgeonnement à partir des endosomes.

Sebastian Amigorena

Pour être reconnus par les récepteurs des lymphocytes T, les antigènes doivent être dégradés en peptides qui s'associent aux molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [1]. Les complexes CMH-peptides sont exprimés à la surface des cellules où ils permettent l'interaction avec les lymphocytes T cytotoxiques (peptides associés aux molécules de classe I) ou auxiliaires (peptides associés aux molécules de classe II). La distribution et le transport intracellulaire des molécules du CMH déterminent leur association avec des peptides d'origine différente [2]. Les molécules de classe I s'associent dans le réticulum endoplasmique à des peptides transférés depuis le cytoplasme par des transporteurs spécifiques. Les molécules de classe II sont transportées

vers la voie endocytique où elles s'associent à des peptides provenant de protéines présentes dans les endosomes. Quatre articles récents [3-6] suggèrent que les molécules de classe II rencontrent les peptides antigéniques dans un compartiment endocytique spécialisé, différent des endosomes et des lysosomes.

Biosynthèse et transport intracellulaire des molécules de classe II du CMH

La biosynthèse des molécules de classe II du CMH a été étudiée en détail. Dans le réticulum endoplasmique, trois dimères $\alpha\beta$ s'associent à un trimère de chaînes invariantes (Ii), formant ainsi les nonamères qui sont exportés vers l'appareil de Golgi [7, 8]. La chaîne Ii est impliquée dans le

ADRESSE

S. Amigorena: docteur ès sciences, chargé de recherche au Cnrs. Department of cell biology, Yale university school of medicine, 333 Cedar Street, PO Box 208002, New Haven, Connecticut 06520-8002, États-Unis. Adresse actuelle : Institut Curie, section de biologie, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

RÉFÉRENCES

1. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. [Review]. *Cell* 1994; 76 (2): 287-99.
2. Germain RN, Margoulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 403-50.
3. Tulp A, Verwoerd D, Dobberstein B, Ploegh HL, Pieters J. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 1994; 369: 120-6.
4. West MA, Lucocq JM, Watts C. Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* 1994; 369: 147-51.
5. Qiu Y, Xu X, Wandinger-Ness A, Dalke DP, Pierce SK. Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II. *J Cell Biol* 1994; 125: 595-605.
6. Amigorena S, Drake JR, Webster P, Mellman I. Transient accumulation of new class II molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 1994; 369: 113-20.
7. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 1991; 354: 392-4.
8. Cresswell P. Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr Op Immunol* 1992; (1): 87-92.
9. Viville S, Neeffes J, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 1993; 72: 635-48.
10. Bikoff EK, Huang LY, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4⁺ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med* 1993; 177: 1699-712.
11. Elliott EA, Drake JR, Amigorena S, Elsemore J, Webster P, Mellman I, Flavell RA. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* 1994; 179: 681-94.
12. Bonnerot C, Marcks MS, Cosson P, Robertson EJ, Bikoff EK, Germain RN, Bonifacio JS. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J* 1994; 13: 934-44.
13. Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW, Lotteau V, Sette A, Fink P, Peterson PA. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 1990; 348: 39-44.
14. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990; 345: 615-8.

processus de repliement des molécules de classe II, puisque en l'absence de chaîne Ii la majorité des molécules de classe II s'agrège dans le réticulum endoplasmique et n'est pas transportée vers l'appareil de Golgi [9-12]. Par ailleurs, la chaîne Ii empêche l'association des molécules de classe II à des peptides endogènes présents dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [13-15]. Lors de leur apparition à la surface cellulaire, les molécules de classe II du CMH n'ont plus cette structure nonamérique; elles sont composées de dimères $\alpha\beta$, dénués de chaîne Ii et associés à des peptides antigéniques [2]. Le temps écoulé entre le moment où les molécules de classe II quittent l'appareil de Golgi (au niveau du réseau *trans*-golgien, ou TGN) et celui où elles apparaissent à la surface cellulaire, est de deux à quatre heures [6, 16]. Pour la plupart des autres molécules membranaires, ce temps est de 30 minutes environ [17]. Cette rétention intracellulaire correspond au passage des molécules de classe II par la voie endocytique [6, 18, 19]. Des signaux localisés dans la région cytoplasmique de la chaîne Ii excluent les molécules de classe II de la voie biosynthétique et provoquent le transport du TGN vers les endosomes [20, 21]. Une fois dans les endosomes, la chaîne Ii est progressivement dégradée à partir de son extrémité C-terminale [22, 23], qui correspond au domaine luminal (figure 1). Des fragments de chaîne Ii restent transitoirement associés aux dimères $\alpha\beta$. Dans les cellules humaines, un fragment de 21 kDa, appelé LIP (*leupeptine inducible peptide*) [24], ainsi qu'un fragment de 10-12 kDa [23] ont été décrits. Un fragment de 21 acides aminés de la chaîne Ii (*class II associated Ii chain peptide* ou CLIP, figure 1), initialement trouvé associé aux molécules de classe II dans des cellules de lymphome B [25], semble jouer un rôle central dans la régulation des différentes fonctions de la chaîne Ii. La région de la chaîne Ii correspondant à CLIP est au même temps impliquée dans l'association aux dimères $\alpha\beta$ et dans l'inhibition de leur association aux peptides antigéniques [26-30]. De plus, CLIP est le seul peptide associé aux dimères $\alpha\beta$ dans différentes lignées de cellules incapables de présenter des antigènes

aux lymphocytes T [26, 27]. L'incapacité de ces cellules de dissocier CLIP des dimères $\alpha\beta$ est probablement à l'origine du défaut de présentation antigénique, puisque CLIP (sous forme de peptide) bloque l'association des molécules de classe II à d'autres peptides antigéniques [26]. Ainsi, les dimères $\alpha\beta$ ne peuvent pas lier des peptides antigéniques tant qu'ils sont associés à un fragment de la chaîne Ii comprenant CLIP [28, 29]. Le blocage par CLIP (sous forme de peptide) de la liaison d'autres peptides antigéniques aux dimères $\alpha\beta$ suggère que la région de la chaîne Ii correspondant à CLIP bloque directement le site de liaison aux peptides dans les complexes $\alpha\beta Ii$. La structure tridimensionnelle des dimères $\alpha\beta$, ainsi que le placement de CLIP dans la chaîne Ii, sont compatibles avec cette interprétation.

Ce mécanisme de dégradation ménagée de la chaîne Ii contrôle donc en même temps le transport intracellulaire et l'association des molécules de classe II aux peptides antigéniques. Les dimères $\alpha\beta$ sont résistants à la dégradation protéolytique, alors que la région luminaire de la chaîne Ii y est sensible. Après transport dans la voie endocytique, différentes protéases clivent progressivement le domaine luminaire de la chaîne Ii. Tant que la région luminaire de la chaîne Ii permet le maintien de l'association aux dimères $\alpha\beta$, les complexes sont retenus dans la voie endocytique grâce aux signaux présents dans la région cytoplasmique de la chaîne Ii. Lorsque la région correspondant à CLIP est éliminée, le fragment restant de la chaîne Ii se dissocie, démasquant ainsi le site de liaison aux peptides et libérant les dimères $\alpha\beta$ du signal de rétention endosomique. Après leur association aux peptides antigéniques, les complexes CMH-II/peptide sont transportés vers la membrane plasmique.

Malgré une bonne caractérisation biochimique de ces phénomènes, plusieurs questions cruciales restent sans réponse du point de vue de la biologie cellulaire. Dans quel(s) compartiment(s) endocytique(s) a lieu la dégradation de la chaîne Ii? Où sont dégradés les antigènes et engendrés les peptides antigéniques? Où se fait l'association entre ceux-ci et les molécules de classe II? Comment les com-

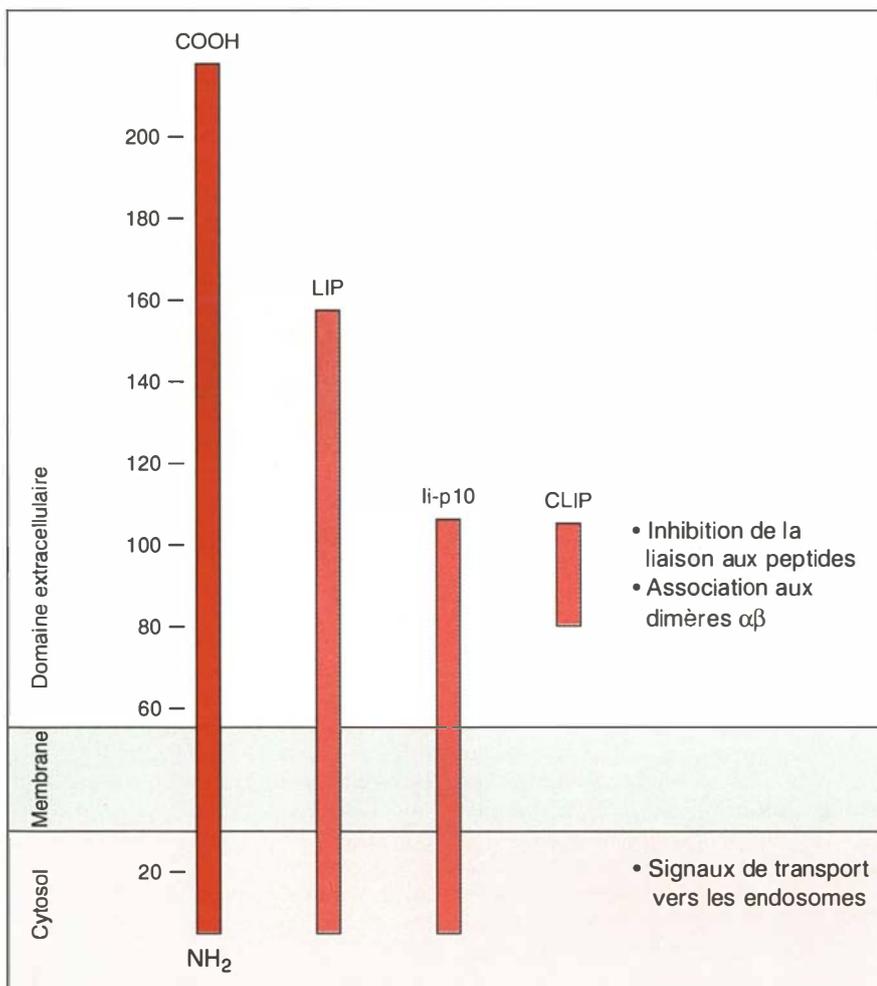


Figure 1. **Fragments et domaines fonctionnels de la chaîne li.** La chaîne li est une protéine du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. La région C-terminale est luminale, la région N-terminale intracellulaire. En présence de leupeptine, un fragment de 22 kDa chez l'homme (LIP, pour leupeptine inducible peptide) et de 10 kDa chez la souris (li-p10) (Amigorena et al., soumis), s'accumule, associé aux chaînes α et β . CLIP est un fragment de 21 acides aminés de la chaîne li (class II associated li chain peptide) que l'on trouve associé aux dimères $\alpha\beta$ dans différentes lignées de cellules incapables de présenter des antigènes associés aux molécules de classe II du CMH. CLIP inhibe l'association d'autres peptides aux molécules de classe II. CLIP est aussi inclus dans la région de la chaîne li impliquée dans l'association aux dimères $\alpha\beta$ [30]. Les signaux de transport vers la voie endocytique se trouvent dans la région cytoplasmique de la chaîne li [18, 19, 41].

plexes CMH-II/peptide sont-ils transportés vers la surface cellulaire ?

Organisation fonctionnelle de la voie endocytique

Pour répondre à ces questions, il est nécessaire d'analyser la voie endocytique dans les cellules qui sont impli-

quées physiologiquement dans la présentation d'antigènes (lymphocytes B, macrophages, cellules dendritiques...). La plus grande partie de ce que l'on sait aujourd'hui sur l'organisation fonctionnelle de la voie endocytique provient de l'étude de cellules qui n'expriment pas normalement des molécules de classe II du CMH. Il est important de garder à l'esprit que les concepts définis dans

ces types cellulaires ne seront pas forcément applicables à la voie endocytique des cellules différenciées du système immunitaire.

Les molécules internalisées par endocytose sont tout d'abord concentrées dans des puits recouverts de clathrine, qui forment ensuite des vésicules [31]. Après dissociation de la clathrine, ces vésicules fusionnent avec une population vésiculo-tubulaire d'endosomes, appelés endosomes précoces (figure 2). Les endosomes précoces ont un pH légèrement acide (autour de 6,5), ce qui permet la dissociation de certains ligands de leur récepteur. En règle générale, les récepteurs sont transportés vers une population de vésicules de pH neutre et recyclés vers la surface cellulaire [32], alors que les ligands sont transportés vers les endosomes tardifs et les lysosomes où ils sont dégradés [31]. Les endosomes précoces représentent un compartiment de tri moléculaire où, par des mécanismes encore mal définis, les molécules qui sont recyclées vers la surface des cellules sont séparées de celles qui sont transportées vers les compartiments tardifs (figure 2).

En terme de biologie cellulaire, la présentation d'antigènes par les molécules de classe II présente certains paradoxes. *A priori*, le compartiment dans lequel a lieu l'association des peptides aux molécules de classe II devrait avoir une activité protéolytique élevée (afin de dégrader les antigènes) et la capacité de recyclage vers la membrane plasmique (pour que les complexes $\alpha\beta$ -peptide puissent être réexprimés à la surface cellulaire). Or, l'organisation de la voie endocytique est telle que les compartiments à forte activité protéolytique sont peu efficaces pour le recyclage [33]. Il est donc vraisemblable que, dans certaines cellules du système immunitaire, se soient développées des spécialisations de la voie endocytique mieux adaptées à la présentation antigénique.

Des spécialisations de la voie endocytique adaptées à des fonctions particulières ont été décrites, par exemple, dans les neurones, les cellules épithéliales ou les adipocytes. Dans les neurones, les vésicules synaptiques représentent une voie de recyclage des endosomes précoces vers la membrane plasmique, différente de la voie constitutive, impliquée dans le

RÉFÉRENCES

15. Long EO, LaVaute T, Pinet V, Jaraquemada D. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J Immunol* 1994; 153: 1487-93.
16. Neefjes JJ, Stollorz V, Peters PJ, Geuze HJ, Ploegh HL. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 1990; 61: 171-83.
17. Mellman I, Simons K. The Golgi complex: *in vitro* veritas? *Cell* 1992; 68: 829-40.
18. Bakke O, Dobberstein B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 1990; 63: 707-16.
19. Lotteau V, Teyton L, Peleraux A, Nilsson T, Karlsson I, Schmitt SL, Quaranta V, Peterson PA. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 1990; 348: 600-5.
20. Odorizzi CG, Trowbridge IS, Xue L, Hopkins CR, Davis CD, Collawn JF. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J Cell Biol* 1994; 126: 317-30.
21. Pieters J, Bakke O, Dobberstein B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 1993; 106: 831-46.
22. Roche PA, Cresswell P. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3150-4.
23. Maric MA, Taylor MD, Blum JS. Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2171-5.
24. Blum JS, Cresswell P. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3975-9.
25. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991; 353: 326-9.
26. 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.
27. Mellins E, Cameron P, Amaya M, Goodman S, Pious D, Smith L, Arp B. A mutant human histocompatibility leukocyte antigen DR molecule associated with invariant chain peptides. *J Exp Med* 1994; 179: 541-9.
28. Bijlmakers MJE, Benaroch P, Ploegh HL. Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J Exp Med* 1994; 180: 623-9.

recyclage des récepteurs de la transferrine (RTf) [34]. Dans les adipocytes, des vésicules contenant un des transporteurs du glucose (GLUT 4) constituent aussi un compartiment post-endocytaire de recyclage vers la surface cellulaire [35]. Enfin, dans les cellules polarisées, des vésicules issues des endosomes sont responsables du transport transcytotique, entre les membranes basolatérale et apicale [36]. Une spécialisation analogue pourrait donc exister dans la voie endocytaire des lymphocytes B.

Un compartiment endocytaire spécialisé dans la présentation antigénique

L'idée que les molécules de classe II sont transportées vers un compartiment endocytaire spécialisé a tout d'abord été suggérée par Peters *et al.* [37]. Dans une étude morphologique et immunocytochimique détaillée, ces auteurs ont analysé l'expression des molécules de classe II dans une lignée lymphoblastoïde B humaine. Ils ont montré que les molécules de classe II étaient concentrées dans une population de vésicules endocytiques (qu'ils ont nommée MIIC, *MHC class II compartment*) comportant des marqueurs communs aux endosomes tardifs et aux lysosomes, mais ne correspondant exactement à aucun de ces deux compartiments. Ces auteurs concluaient que les MIIC représentent une sous-population de lysosomes.

Récemment, la mise au point de techniques de fractionnement subcellulaire de la voie endocytaire des lymphocytes B a permis une analyse directe des compartiments intracellulaires impliqués dans le transport des molécules de classe II du CMH. La conclusion commune des équipes ayant abordé la question est qu'il existe un compartiment endocytaire spécialisé où s'accumulent les molécules de classe II [3-6]. Cette conclusion est fondée sur le fait que la distribution intracellulaire des molécules de classe II ne correspond à la distribution d'aucun autre marqueur de la voie endocytaire décrit précédemment. Les vésicules contenant les molécules de classe II peuvent être séparées des compartiments endocytiques conventionnels par des techniques de frac-

tionnement subcellulaire fondées sur la densité [4, 5] ou sur la charge de surface des vésicules [3, 6]. Cependant, seule l'électrophorèse en phase fluide (*free flow electrophoresis* ou FFE) permet d'isoler cette population de vésicules endocytiques séparément des endosomes, des lysosomes et des autres compartiments intracellulaires (réticulum endoplasmique, Golgi, membrane plasmique...) [6].

L'étude morphologique des vésicules contenant la majorité des molécules de classe II (vésicules de classe II, ou CIIV) a montré qu'elles ont un diamètre de 200 à 300 nm et comportent de multiples membranes internes [4, 6]. Ces membranes internes pourraient constituer des invaginations d'une membrane unique ou correspondre à de multiples microvésicules. Morphologiquement, les CIIV ressemblent aux MIIC [37] ainsi qu'aux corps multivésiculaires (*multivesicular bodies*), qui représentent des vésicules tardives d'endocytose, décrites dans différents types cellulaires [31].

Des études d'immunocytochimie sur des vésicules isolées par FFE ont montré que les vésicules de classe II contiennent certains marqueurs des endosomes (comme les RTf, ou le récepteur du mannose-6-phosphate, MPR), mais pas des lysosomes (comme les Igp, *lysosomal glycoproteins* [31, 6] et P. Webster, résultats non publiés). Certaines des protéines trouvées dans les CIIV sont différentes de celles présentes dans les endosomes et les lysosomes ([3] et J. Drake, résultats non publiés). Cette composition protéique suggère que les CIIV représentent un compartiment endocytaire distinct, différent des endosomes et des lysosomes.

Les CIIV sont accessibles aux antigènes internalisés par des récepteurs impliqués dans la présentation antigénique (comme les immunoglobulines de surface, sIg, ou les récepteurs Fc, RFc) [4, 6]. En revanche, ces vésicules ne constituent pas un site majeur d'accumulation de marqueurs d'internalisation (Tf ou complexes immuns internalisés par les RFc) [6]. Il ne s'agit donc pas d'endosomes au sens conventionnel du terme, ni de vésicules de recyclage constitutif impliquées dans le transport des RTf [4, 6]. Les CIIV pourraient donc représenter une voie alternative de transport entre les

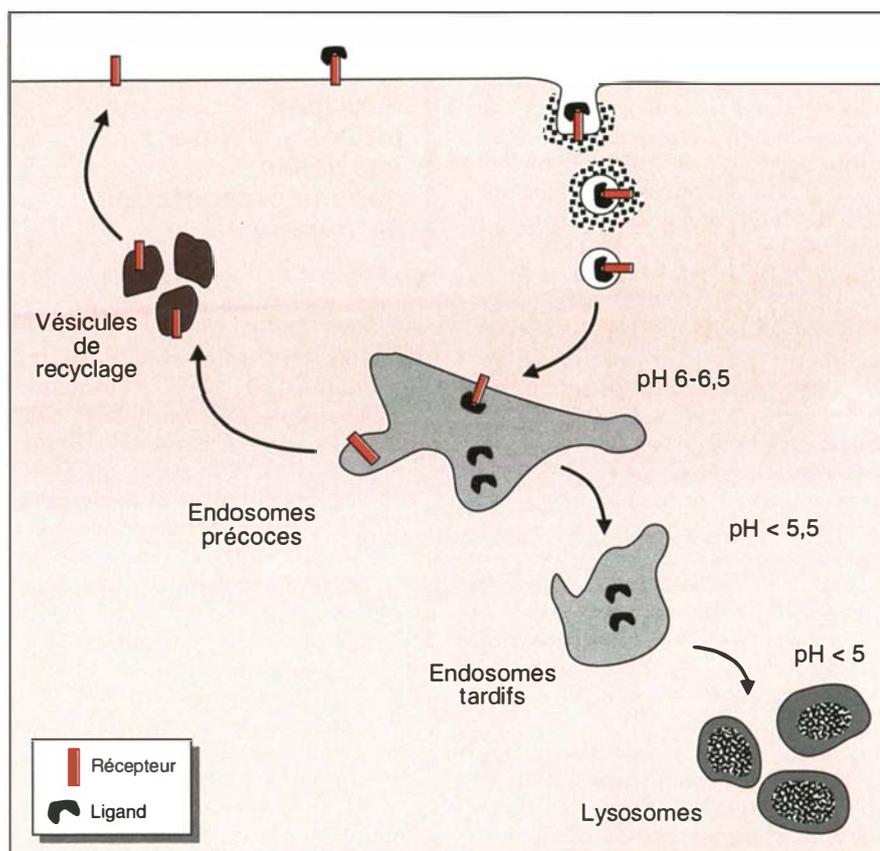


Figure 2. **Organisation fonctionnelle de la voie endocytaire.** Les récepteurs sont concentrés dans les puits recouverts de clathrine, qui forment ensuite des vésicules [32]. Après dissociation de la clathrine, ces vésicules fusionnent avec des endosomes précoces. Le pH légèrement acide des endosomes précoces provoque la dissociation des récepteurs de leur ligand. Les récepteurs sont recyclés vers la membrane plasmique et les ligands transportés vers les endosomes tardifs et les lysosomes, compartiments de pH plus acide et d'activité protéolytique plus forte, pour être dégradés.

endosomes et la membrane plasmique.

CIIV et transport intracellulaire des molécules de classe II

Que sait-on du rôle de ces vésicules dans le transport intracellulaire des molécules de classe II? Des expériences de marquage métabolique ont montré que, pendant la période de rétention intracellulaire caractéristique des molécules de classe II (entre le réseau *trans*-golgien [TGN] et la surface cellulaire), les molécules de classe II résident dans les CIIV [3,

6]. Les molécules de classe II trouvées dans les CIIV ne sont pas associées à la chaîne Ii, mais contiennent des peptides antigéniques [3, 6]. Ces résultats posent dans des termes nouveaux un certain nombre de questions concernant le transport intracellulaire des molécules de classe II et la formation des complexes CMH-II/peptides. Quelle est la place précise de ces vésicules dans la voie endocytaire des lymphocytes B? Ces vésicules sont-elles un site d'association des peptides aux molécules de classe II ou bien servent-elles uniquement au transport des molécules de classe II associées à des peptides vers la surface cellulaire?

Nous commençons à pouvoir répondre à certaines de ces questions. Les chaînes $\alpha\beta$ trouvées dans les CIIV sont complètement glycosylées, ce qui indique que ces molécules de classe II sont déjà passées par l'appareil de Golgi. Bien qu'il soit clair que ces vésicules font partie de la voie endocytaire, leur relation avec les compartiments endocytiques «conventionnels» (endosomes précoces, endosomes tardifs et lysosomes) reste à définir avec plus de précision. Le compartiment de la voie endocytaire dans lequel sont délivrées les molécules de classe II au sortir du TGN n'est pas connu. Les molécules de classe II ne semblent pas emprunter la voie employée par le récepteur du mannose-6-phosphate (TGN-endosomes tardifs, [38]). Les complexes $\alpha\beta I_i$ pourraient donc être transportés du TGN vers les endosomes précoces, puisqu'il a été montré que les molécules de classe II transitent par un compartiment accessible à la Tf avant d'apparaître à la surface cellulaire [39]. De plus, les endosomes précoces représentent un site de recyclage intense vers la membrane plasmique, ce qui pourrait expliquer que, dans certaines lignées de cellules (qui dégradent moins efficacement la chaîne Ii), une fraction des molécules de classe II associées à la chaîne Ii apparaisse de façon transitoire à la surface cellulaire [40]. Il est donc possible que, tant que la chaîne Ii reste associée aux dimères $\alpha\beta$, ceux-ci recyclent entre les endosomes précoces et la membrane plasmique (la chaîne Ii contient un signal d'internalisation [40]). Si tel est le cas, l'inhibition de l'activité protéolytique des endosomes devrait induire l'apparition de complexes $\alpha\beta I_i$ à la surface cellulaire.

Le fait que les molécules de classe II trouvées dans les CIIV ne soient plus associées à la chaîne Ii suggère que ces molécules de classe II sont déjà passées par les endosomes. Bien qu'il soit possible que la chaîne Ii soit dégradée dans les CIIV, il semble établi que des signaux présents dans la région cytoplasmique de la chaîne Ii déterminent le transport des complexes $\alpha\beta I_i$ vers les endosomes [18, 19, 41]. Les CIIV pourraient donc recevoir les molécules de classe II provenant des endosomes (figure 3). Des résultats récents utilisant la leu-

RÉFÉRENCES

29. Romagnoli P, Germain RN. 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: 1107-13.
30. Freiswinkel IM, Scenck K, Koch N. The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9703-6.
31. Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 1989; 5: 483-525.
32. Trowbridge IS, Collawn J, Hopkins CR. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 129-62.
33. Schmid SL, Fuchs R, Male P, Mellman I. Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* 1988; 52: 73-83.
34. Kelly RB. Storage and release of neurotransmitters. *Cell* 1993; 72 (suppl): 43-53.
35. Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, Lienhard GE, James DE. Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* 1991; 113: 123-35.
36. Mellman I, Yamamoto E, Whitney JA, Kim M, Hunziker W, Matter K. Molecular sorting in polarized and non polarized cells: common problems, common solutions. *J Cell Sci* 1993; 17 (suppl): 1-7.
37. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991; 349: 669-76.
38. Sandoval IV, Bakke O. Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 292-7.
39. Cresswell P. Intracellular class II HLA antigens are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalized by receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8188-92.
40. Roche PA, Teletski CL, Karp DR, Pinet V, 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.
41. Lamb CA, Yewdell JW, Bennink JR, Cresswell P. Invariant chain targets HLA class II molecules to acidic endosomes containing internalized influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5998-6002.
42. Griffith IJ, Nabari N, Ghogawala Z, Chase CG, Rodriguez M, McKean DJ, Glimcher LH. Structural mutation affecting intracellular transport and cell surface expression of murine class II molecules. *J Exp Med* 1988; 167: 541-55.

peptine (un inhibiteur de sérine protéases) abondent dans ce sens. En présence de leupeptine, des molécules de classe II associées à la chaîne Ii s'accumulent dans les endosomes, ce qui suggère que les molécules de classe II sont effectivement transportées du TGN vers les endosomes avant d'être délivrées dans les CIIV (figure 3). Les CIIV pourraient bourgeonner à partir des endosomes, d'une façon analogue à d'autres compartiments post-endosomiques dans des types cellulaires différenciés, comme les vésicules synaptiques, les vésicules GLUT 4 ou les vésicules transcytotiques [34-36]. La leupeptine provoque aussi une forte accumulation de dimères $\alpha\beta$ associés à un fragment de 10 kDa de la chaîne Ii, Ii-p10 (figure 1). Ces complexes $\alpha\beta$ Ii-p10 se trouvent majoritairement dans les CIIV. La distribution intracellulaire différentielle des dimères $\alpha\beta$ associés à la chaîne Ii intacte (qui se trouvent dans les endosomes) et ceux associés au fragment Ii-p10 (qui sont trouvés dans les CIIV) renforce l'idée que les molécules de classe II présentes dans le CIIV proviennent des endosomes (figure 3). Puisque l'on ne trouve pas de chaîne Ii intacte dans les CIIV, même en présence de leupeptine, il est probable que la dégradation de la chaîne Ii ait lieu dans les endosomes. Puisque seuls les complexes $\alpha\beta$ Ii-p10 sont transportés vers les CIIV, un signal de transport vers les CIIV présent dans les complexes $\alpha\beta$ Ii-p10 doit être absent ou caché dans les complexes $\alpha\beta$ Ii. La dégradation de la chaîne Ii en Ii-p10 pourrait démasquer un signal de transport vers les CIIV, peut-être présent dans les régions extracellulaires des dimères $\alpha\beta$ [42, 43]. Dans lequel de ces compartiments endocytiques se fait alors l'association aux peptides antigéniques? Nous savons que les complexes $\alpha\beta$ Ii-p10 ne sont pas associés à des peptides; ils représentent des précurseurs des complexes $\alpha\beta$ -peptide. La présence des complexes $\alpha\beta$ Ii-p10 dans les CIIV suggère que l'association aux peptides se fait après que les molécules de classe II sont arrivées dans les CIIV. Le fait que des complexes $\alpha\beta$ -peptide soient aussi présents dans les CIIV indique que l'association des molécules de classe II aux peptides a

lieu dans ces vésicules (S. Amigorena *et al.*, soumis pour publication).

Pourquoi un compartiment spécialisé dans la présentation antigénique?

L'existence de compartiments endocytiques spécialisés dans les lymphocytes B semble aujourd'hui bien établie. Par analogie avec d'autres spécialisations de la voie endocytique dans des types cellulaires différenciés, nous avons proposé le modèle illustré dans la figure 3. A la sortie du TGN, les molécules de classe II associées à la chaîne Ii seraient transportées vers les endosomes. La chaîne Ii serait alors dégradée en Ii-p10. Les complexes $\alpha\beta$ Ii-p10 ne sont pas capables de lier des peptides [29], mais expriment un signal de transport vers les CIIV absent des complexes $\alpha\beta$ Ii. Les CIIV pourraient se former par bourgeonnement à partir des endosomes. Ces bourgeons incluraient sélectivement les molécules de classe II (sous forme $\alpha\beta$ Ii-p10) et, peut-être d'autres molécules impliquées dans la présentation d'antigènes. C'est dans les CIIV qu'aurait lieu la dissociation entre $\alpha\beta$ et Ii-p10, démasquant ainsi le site de liaison aux peptides. Les complexes $\alpha\beta$ -peptide seraient ensuite délivrés à la surface cellulaire, peut-être par fusion directe des CIIV avec la membrane plasmique. Les compartiments endocytiques spécialisés présents dans les lymphocytes B ne sont probablement pas indispensables, puisque des types cellulaires n'exprimant pas physiologiquement des molécules de classe II (comme les fibroblastes) sont capables de présenter des antigènes [44]. En l'absence de CIIV, les endosomes conventionnels pourraient, peut-être de façon moins efficace (*voir plus bas*), remplir les mêmes fonctions. Cependant, l'existence de compartiments endocytiques analogues aux CIIV dans des lignées de fibroblastes a été suggérée ([45] et W. Gareth, résultats non publiés). Il est possible que les CIIV (ainsi que d'autres types de vésicules post-endosomiques, vésicules synaptiques, GLUT 4 ou transcytotiques) correspondent à des voies de recyclage, à partir des endosomes, différentes des voies de recyclage du

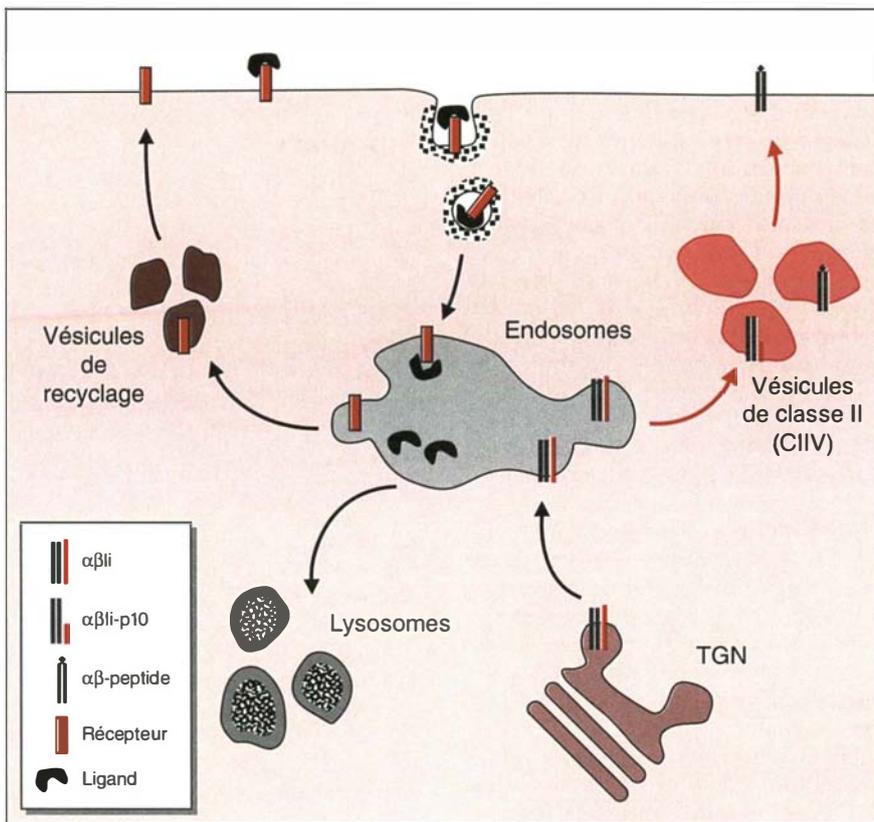


Figure 3. Transport intracellulaire des molécules de classe II du CMH dans les lymphocytes B. Les complexes $\alpha\beta li$ sont exclus de la voie biosynthétique à la sortie de l'appareil de Golgi pour être transportés vers la voie endocytaire. Une fois dans les endosomes, la chaîne li est dégradée en un fragment de N-terminal de 10 kDa ($li-p10$) (Amigorena et al., soumis). Les complexes $\alpha\beta li-p10$ ne sont pas capables de lier des peptides mais expriment un signal de transport vers les vésicules de classe II (CIIV), absent des complexes $\alpha\beta li$. Dans les CIIV se fait la dissociation de $li-p10$ et des dimères $\alpha\beta$, permettant ainsi la liaison des molécules de classe II aux peptides antigéniques. Les complexes $\alpha\beta$ -peptide sont ensuite délivrés à la surface cellulaire, peut-être par fusion directe des CIIV avec la membrane plasmique.

RTf, mais présentes dans tous les types de cellules [46]. La morphologie et les fonctions spécifiques de ces vésicules pourraient être modifiées par l'expression de protéines particulières dans des types cellulaires différenciés. Les molécules de classe II pourraient être sélectivement transportées vers cette population de vésicules, même lorsqu'elles sont exprimées dans des types cellulaires hétérologues, comme les fibroblastes.

Que les CIIV soient ou non indispensables, leur présence dans les lymphocytes B pose la question de l'influence des CIIV sur le processus de présentation antigénique. Tout d'abord, l'association des molécules de classe II aux peptides est un phé-

nomène lent [47]; le transport dans les CIIV provoque une rétention intracellulaire qui favorise vraisemblablement la formation des complexes CMH-II/peptides. De plus, il est probable que des vésicules spécifiques fournissent un environnement mieux adapté, difficile à réaliser dans les endosomes conventionnels, sites de passage continuels de quantités importantes de protéines extracellulaires.

Par ailleurs, l'existence de vésicules spécialisées permettrait d'expliquer comment certains peptides (de taille et séquence particulières) sont protégés de la dégradation lysosomiale et sélectionnés pour être associés aux molécules de classe II du CMH. Dans

le cas des molécules de classe I du CMH, la solution à un problème similaire semble résider dans la séparation physique des lieux de production des peptides et de leur association aux molécules de classe I du CMH: les peptides sont produits dans le cytoplasme et s'associent aux molécules de classe I dans le réticulum endoplasmique [2]. Le transport des peptides, entre le cytoplasme et le réticulum endoplasmique, fournit un premier niveau de sélection des peptides de taille et séquence adaptées, facilitant ainsi l'association aux molécules de classe I [48, 49].

L'existence de compartiments post-endosomiques spécialisés, plus difficilement accessibles aux marqueurs d'internalisation que les endosomes conventionnels, pourrait fournir un système de sélection analogue pour les peptides présentés par les molécules de classe II. Qu'ils soient entrés dans les cellules grâce à des récepteurs membranaires spécifiques ou par pinocytose, la dégradation des antigènes commence probablement dans les endosomes conventionnels. Il faut alors que certains des peptides produits dans les endosomes soient protégés de la dégradation totale, sélectionnés en fonction de leur taille et séquence, puis inclus spécifiquement dans les CIIV.

Dans le cas des antigènes internalisés grâce à des récepteurs spécifiques (Ig de surface dans les lymphocytes B ou certains récepteurs Fc (RfC) dans les macrophages), il est vraisemblable que les récepteurs eux-mêmes contiennent des signaux de transport vers les CIIV. En accord avec cette hypothèse, les molécules de classe II intracellulaires sont plus facilement accessibles à des marqueurs internalisés par les Ig de surface que par le RTf [4]. De plus, des IgG de surface (P. Webster, résultats non publiés) ainsi que des antigènes internalisés grâce aux Ig de surface [4] sont trouvés dans les CIIV par microscopie électronique. Le transport sélectif des Ig de surface vers les CIIV pourrait expliquer l'augmentation importante de l'efficacité de la présentation antigénique observée lorsque les antigènes sont internalisés par les récepteurs de l'antigène [50] ou par les RfC [51, 52]. De plus, il a été montré que la dégradation des antigènes commence avant leur dissociation des Ig de surface

RÉFÉRENCES

43. Chernovsky AV, Sant AJ. A segment of the MHC class II β chain plays a critical role in targeting class II molecules to the endocytic pathway. *Int Immunol* 1993; 6: 973-82.
44. Peterson M, Miller J. Antigen presentation enhanced by the alternatively spliced invariant chain product p41. *Nature* 1992; 357: 596-8.
45. Humbert M, Raposo G, Cosson P, Reggio H, Davoust J, Salamero J. The invariant chain induces compact forms of class II molecules localized in late endosomal compartments. *Eur J Immunol* 1993; 23: 3158-66.
46. Kelly RB. A question of endosomes. *Nature* 1993; 364: 487-8.
47. Jensen PE. Enhanced binding of peptide antigen to purified class II major histocompatibility glycoproteins at acidic pH. *J Exp Med* 1991; 174: 1111-20.
48. Shepherd JC, Schumacher TNM, Ashton-Rickardt PG, Imaeda S, Ploegh HL, Janeway Jr CA, Tonegawa S. TAP1-dependent peptide translocation *in vitro* is ATP dependent and peptide selective [published erratum appears in *Cell* 1993; 75: 613]. *Cell* 1993; 74: 577-84.
49. Androlewicz MJ, Cresswell P. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1994; 1: 7-14.
50. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 1985; 314: 537-9.
51. Amigorena S, Bonnerot C, Drake JR, Choquet D, Hunziker W, Guillet JG, Webster P, Sautes C, Mellman I, Fridman WH. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 1992; 256: 1808-12.
52. Amigorena S, Salamero J, Davoust J, Fridman WH, Bonnerot C. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature* 1992; 358: 337-41.
53. Davidson HW, West MA, Watts C. Endocytosis, intracellular trafficking, and processing of membrane IgG and monovalent antigen/membrane IgG complexes in B lymphocytes. *J Immunol* 1990; 144: 4101-9.
54. Sette A, Adorini L, Colon SM, Buus S, Grey HM. Capacity of intact proteins to bind to MHC class II molecules. *J Immunol* 1989; 143: 1265-7.
55. 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.
56. Fling SP, Arp B, Pious D. HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 1994; 368: 554-8.

[53]. Les mécanismes par lesquels les peptides pourraient être transférés des récepteurs de l'antigène vers les molécules de classe II restent obscurs. Dans le cas des antigènes internalisés par pinocytose, la sélection de certains peptides pourrait être effectuée par les molécules de classe II elles-mêmes, qui sont capables de lier certains antigènes avant leur dégradation [54]. Récemment, plusieurs groupes ont montré que l'un des membres de la famille des molécules de classe II (appelé DM) est indispensable à la présentation d'antigènes par les autres molécules de classe II [27, 55, 56]. En absence de DM, les molécules de classe II sont uniquement associées à CLIP, un peptide dérivé de la chaîne Ii (*voir plus haut*). DM pourrait sélectionner, protéger et/ou transporter certains peptides engendrés dans les endosomes vers des compartiments post-endosomiques comme les CIIV. Qu'ils soient ou non reliés à DM, la caractérisation des systèmes de génération, de sélection et de transport des peptides antigéniques dans la voie endocytique sera un des enjeux majeurs des années à venir. Le développement récent de techniques de fractionnement subcellulaire des lymphocytes B permettra d'aborder directement de telles questions ■

Remerciements

Je voudrais remercier I. Mellman, J. Drake et P. Webster pour les nombreuses discussions qui ont nourri les idées développées dans cette revue. Merci aussi à C. Bonnerot et à P. Pierre pour avoir relu et critiqué ce texte.

TIRÉS À PART

S. Amigorena.

Summary

MHC class II intracellular transport

Immune responses to protein antigens require the recognition by T lymphocytes of major histocompatibility complex (MHC) molecules associated to peptides derived from that protein. The MHC molecules can be of class I and/or II, depending on the type of immune response developed. The peptides that associate to MHC class I and II are different in structure and origin. Class I molecules generally bind 8-10 amino acid-long peptides derived from endogenous antigens. Class II molecules bind to longer peptides (14 to 20 amino acids) derived from either endogenous or exogenous antigens. The intracellular sites of generation and binding of these peptides to MHC class I and class II molecules are distinct. MHC class I-binding peptides are generated in the cytosol, translocated through the ER membrane by specific TAP transporters; the binding to MHC class I occurs in the lumen of the ER. MHC class II-binding peptides are generated and bind class II molecules in the endocytic pathway. Recently, several groups identified and characterized a specialized endocytic compartment, where MHC class II encounters and binds antigenic peptides.

Le 20^e symposium européen

« Hormones et régulation cellulaire »

aura lieu du 22 au 25 septembre 1995

au Mont-Sainte-Odile (Alsace) avec le soutien de l'INSERM

Comité scientifique : E.M. Chambaz (France), B.A. Cooke (Royaume-Uni), J.E. Dumont (Belgique), B. Gronet (Suisse), J. Hanoune (France), F. Hofmann (Allemagne), R. Irvine (Royaume-Uni), L.A. Pinna (Italie).

Comité d'organisation : L.A. Pinna (Président), E.M. Chambaz, J.E. Dumont, F. Hofmann.

Organisateurs locaux : M.-F. Bader, B. Pettmann (France).

Le programme prévoit des conférences ainsi que des communications orales et affichées sur les thèmes suivants :

- protéine kinases
- protéine phosphatases
- phosphorylation des protéines dans les régulations et la prolifération cellulaires
- pathologies moléculaires de la transduction de signal

Conférenciers invités : H.G. Brunner (Pays-Bas), E. Catafoli (Suisse), C. Cochet (France), P.T.W. Cohen (Royaume-Uni), J. Dixon (États-Unis), M. Dorée (France), A. Fasco (Italie), D.G. Hardie (Royaume-Uni), B.A. Hemmings (Suisse), O.G. Issinger (Allemagne), T.J. Jentsch (Allemagne), B.E. Kemp (Australie), S. Klumpp (Allemagne), F. Lamy (Belgique), F. Lechmann-Horn (Allemagne), L. Meijer (France), W. Merlevede (Belgique), C. Ponzetto (Italie), C. Proud (Royaume-Uni), G. Ramponi (Italie), P. Ruth (Allemagne), S.S. Taylor (États-Unis), G. Thomas (Suisse), N.R. Tonks (États-Unis), M. Veron (France).

Date limite de soumission des résumés et d'inscription : 15 juin 1995

Pour tous renseignements et inscriptions, s'adresser à : L.A. Pinna, 20th European Symposium of Mont-Sainte-Odile,

Dipartimento di Chimica Biologica, via Trieste 75, 33121 Padova, Italie

Tél. : (39) 49.8286430/8286410 - Télécopie : (39) 49.8073310