

Souris déficientes en chaîne invariante

La chaîne invariante (Ii) est une glycoprotéine qui s'associe de façon non covalente aux molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) lors de leur synthèse [1-4]. Elle est ensuite dégradée dans les vésicules endosomiques avant que les molécules de classe II du CMH ne rejoignent la surface cellulaire chargées d'un peptide antigénique [5, 20]. Le rôle des molécules de classes I et II est de présenter un peptide antigénique aux récepteurs des lymphocytes T (RCT) [8]. Dans la majorité des cas, les peptides provenant de la dégradation de protéines endogènes (telles que des protéines virales) s'associent dans le réticulum endoplasmique aux molécules de classe I et sont présentés aux lymphocytes T cytotoxiques. En revanche, les protéines exogènes internalisées dans la voie d'endocytose sont dégradées dans des vésicules endosomiques et fournissent des peptides pouvant s'associer aux molécules de classe II pour être présentés aux lymphocytes T auxiliaires [9, 12].

Si le rôle de la chaîne invariante dans la présentation des antigènes exogènes par les molécules de classe II du CMH n'est pas mis en doute, la question concernant sa fonction exacte reste ouverte [6, 7, 11, 13, 14].

En effet, trois fonctions ont été attribuées à la chaîne invariante [15] :

- un rôle dans le repliement et/ou dans l'assemblage des chaînes α et β des molécules de classe II du CMH [16]. La chaîne invariante faciliterait la formation de l'hétérodimère ;
- un rôle dans le transport des molécules de classe II du réticulum endoplasmique vers les vésicules endosomiques, lieu de fixation des peptides antigéniques par les molécules de classe II [12, 17, 18]. La chaîne invariante possède des signaux de routage vers les endosomes. Par l'intermédiaire de ces signaux, les molécules de classe II associées à la chaîne invariante pourraient dévier de la voie constitutive d'exocytose pour entrer dans la voie d'endocytose ;

- un rôle d'inhibition de fixation des peptides dans le réticulum endoplasmique. Un blocage stérique de la gouttière où se fixent les peptides pourrait être effectué par la chaîne invariante jusqu'aux vésicules endosomiques où sa dégradation libérerait l'accès de la gouttière aux peptides exogènes [19, 20]. Un blocage conformationnel pourrait également être établi par la chaîne invariante qui maintiendrait les sous-unités α et β dans une conformation telle que l'affinité pour les peptides soit très réduite jusqu'aux vésicules endosomiques.

La chaîne invariante aurait par ses fonctions diverses une responsabilité importante dans la dichotomie des voies de présentation par les molécules de classes I et II du CMH [5, 10, 21].

Ces différentes hypothèses sont en fait toutes conciliables et ont reçu un soutien expérimental [22]. Un obstacle majeur à l'étude de la chaîne invariante est qu'elle est presque toujours co-exprimée avec les molécules de classe II [23, 24]. De ce fait, la fonction de la chaîne invariante a été étudiée *in vitro* à partir de cellules n'appartenant pas, en général, au système immunitaire.

C'est afin de pouvoir étudier l'impact de la chaîne invariante sur le système immunitaire dans son ensemble et pour obtenir des cellules « immunocompétentes » Ii-/- que nous avons créé, par recombinaison homologue, des souris n'exprimant plus cette protéine [25-27].

Ces souris déficientes Ii-/- nous permettent d'étudier le rôle de Ii non plus *in vitro*, comme cela avait été le cas jusqu'à présent, mais dans un organisme vivant. Dans un premier temps nous nous sommes concentrés sur l'étude de son rôle dans la présentation antigénique et son importance dans la sélection négative et positive des lymphocytes T. Les travaux présentés ici ont donc été réalisés sur des souris homozygotes pour la mutation, les témoins étant, soit des souris hétérozygotes, soit des souris sauvages.

1. Contrôle de l'absence de Ii

La présence de Ii ou d'une forme tronquée pouvant exister en raison du type de vecteur recombinant choisi, l'efficacité de la mutation introduite a été démontrée par les méthodes suivantes :

- par cytométrie de flux sur des cellules perméabilisées avec la saponine afin d'obtenir un marquage intracellulaire. En effet, la chaîne invariante est peu exprimée à la surface cellulaire. Le marquage a été fait avec un anticorps monoclonal ou deux antisérums de lapin, spécifiques d'épitopes différents ;
- par marquage immunohistologique sur des coupes fines de thymus, de rate et de ganglions lymphatiques ;
- par immunoprécipitation après marquage biosynthétique, soit directement de la chaîne invariante, soit indirectement par les molécules de classe II qui lui sont associées. Ces trois méthodes ont confirmé l'absence de toute forme de chaîne invariante.

2. Conséquences sur l'expression des molécules de classe II du CMH

• *Étude de l'expression et de la conformation des molécules de classe II à la surface des cellules en absence de Ii*

L'importance de Ii pour l'expression des molécules de classe II du CMH à la surface des cellules est sujet à controverse. Nous montrons par cytométrie de flux que cette expression est très affectée lorsque la chaîne invariante est absente. En utilisant une panoplie d'anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules de classe II du CMH, nous avons constaté que leur expression de surface est réduite de 4 à 8 fois. Ce faible niveau d'expression des molécules de classe II a aussi été observé après iodination de surface et immunoprécipitation. L'étude des glycosylations des molécules de classe II montre que ces protéines ont traversé l'appareil de Golgi pendant leur transport vers la surface cellulaire.

L'étude de la stabilité en présence de détergent des complexes $\alpha\beta$ des cel-

lules *Ii*-/- indique que leur conformation ne présente pas la stabilité maximale. La conformation stable des complexes étant obtenue lorsque les peptides exogènes s'associent aux molécules de classe II dans les endosomes, il est probable que les molécules de classe II des souris mutantes ne traversent pas les compartiments d'endocytose lorsqu'elles ne sont pas liées à la chaîne invariante.

• *Localisation intracellulaire des molécules de classe II du CMH*

Certains auteurs ont montré que *Ii* dirige les molécules de classe II vers les vésicules endosomiques. En collaboration avec les Drs J. Nefjees (Amsterdam, Pays-bas) et H. Pochg (Cambridge, MA USA), nous avons étudié le transport des molécules de classe II dans des cellules provenant de souris déficientes en *Ii*. Cela a été réalisé par marquage biosynthétique, immunoprécipitation et analyse enzymatique des glycosylations qui subissent des modifications caractéristiques des compartiments intracellulaires traversés. Nos résultats montrent que la majorité des molécules de classe II reste bloquée au niveau du réticulum endoplasmique. Cette observation a été confirmée par microscopie confocale.

3. Conséquences sur la fonction des molécules de classe II du CMH

• *Présentation in vivo d'antigènes*

Différents hybridomes T ont été utilisés afin de tester l'aptitude des cellules spléniques de souris *Ii*-/- d'haplotype H-2^b ou H-2^k à présenter des antigènes. Quatre antigènes ont été utilisés sous leur forme native (protéine entière) ou peptidique : l'ovalbumine, le lysozyme d'œuf de poule, l'aparmine et la ribonucléase bovine.

Pour tester une éventuelle compétition entre peptides exogènes et endogènes et analyser la capacité des molécules de classe II à fixer et présenter des antigènes exogènes présents dans la voie d'endocytose, les antigènes sont utilisés sous leur forme native. Pour vérifier que les molécules de classe II sont aptes à présenter des peptides antigéniques lorsque la chaîne invariante n'est pas exprimée, les antigènes

sont utilisés sous leur forme peptidique.

Nous avons pu montrer que les peptides antigéniques sont aussi bien présentés par les cellules spléniques de souris *Ii*-/- que par les cellules des souris sauvages. En revanche, à l'exception de la ribonucléase bovine, les antigènes sous leur forme native ne sont pas présentés par les molécules de classe II lorsque la chaîne invariante n'est pas exprimée. Il est probable que, en l'absence de chaîne invariante, les molécules de classe II ne passent pas par la voie d'endocytose, où se trouvent les antigènes internalisés, avant d'atteindre la surface cellulaire.

• *Présentation in vivo d'antigènes*

Nous avons vacciné des souris *Ii*-/- avec deux antigènes afin de tester leur aptitude à déclencher une réponse humorale spécifique. Par titration des anticorps spécifiques pour l'antigène injecté, nous avons pu montrer que les souris mutantes n'élaboraient pas de réponse primaire mais que la réponse était pratiquement normale après une seconde injection.

• *Sélection des lymphocytes T*

Du fait de la diminution de l'expression des molécules de classe II à la surface cellulaire, nous nous sommes demandé quelle en était la conséquence sur la sélection des lymphocytes T. Une étude par cytométrie de flux des thymocytes nous a permis de mettre en évidence une réduction importante (de l'ordre de trois fois) de la population CD4 simple positive avec une augmentation proportionnelle de la population CD8 simple positive. Ce phénomène se retrouve à la périphérie.

Au moins pour les récepteurs V β II, une diminution de la sélection négative a été observée sous l'influence de superantigènes.

L'importance de la chaîne invariante dans le déclenchement de la réponse immune et l'établissement de la tolérance est donc démontrée par l'analyse des caractéristiques des souris *Ii*-/-. Celles-ci ont un déficit quantitatif et qualitatif de l'expression des molécules de classe II qui se traduit par une présentation très atté-

nuée des antigènes exogènes, une réponse humorale retardée et une anomalie de production des lymphocytes CD4 et de leur sélection. Ces souris *Ii*-/- représentent, par conséquent, un instrument permettant d'étudier dans le détail le rôle de cette molécule chaperone *in vivo* et ouvrant de nouvelles voies d'investigation du système immunitaire qui n'étaient pas accessibles.

S.V.
V.L.

1. Jones PP, Murphy DB, Hewgill, D, McDevitt HO. Detection of a common polypeptide chain in I-A and I-E sub-region immunoprecipitates. *Immunochemistry* 1979 ; 16 : 51-60.
2. Kvist S, Wiman K, Claesson L, Peterson PA, Dobberstein B. Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* 1982 ; 29 : 61-9.
3. Pieters JB, Horstmann HO, Bakke OG, Griffiths GJ, Lipp J. Intracellular transport and localization of Major Histocompatibility Complex class II molecules and associated invariant chain. *J Cell Biol* 1991 ; 115 : 1213-23.
4. Rabourdin-Combe C, Bertolino P, Calinlaurens V, Gerlier D. La présentation de l'antigène aux lymphocytes T. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 674-80.
5. Sadegh-Nasseri S, McConnell HM. A kinetic intermediate in the reaction of an antigen peptide and IE^K. *Nature* 1989 ; 337 : 274-6.
6. Stockinger B, Pessara U, Lin RH, Habicht J, Grez M, Koch N. A role of la-associated invariant chains in antigen processing and presentation. *Cell* 1989 ; 56 : 683-9.
7. Viguier M, Dornmair K, Clark BR, McConnell HM. The invariant chain forms complexes with class II major histocompatibility complex molecules and antigenic peptides *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 7170-4.
8. Braciale TJ, Brachiale V. Antigen presentation : structural themes and functional variations. *Immunol Today* 1991 ; 12 : 124-9.
9. Nefjees JJ, Stollorz V, Peters P, 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.
10. Peterson M, Miller J. Invariant chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules. *Nature* 1990 ; 345 : 172-4.
11. Teyton L, Peterson PA. Invariant chain a regulator of antigen presentation. *Trends Cell Biol* 1992 ; 2 : 52-6.

12. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschof V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the golgi complex for transport to lysosomal compartment. *Nature* 1991 ; 349 : 669-76.
13. Teyton L, Peterson PA. Assembly and transport of MHC class II molecules. *The New Biologist* 1992 ; 4 : 441-7.
14. Cresswell P. Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr Op Immunol* 1992 ; 4 : 87-92.
15. Hämmerling GJ, Moreno J. The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Today* 1990 ; 11 : 337-40.
16. Layet C, Germain RN. Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A α B β dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88 : 2346-50.
17. Bakke O, Dobberstein B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartment. *Cell* 1990 ; 63 : 707-16.
18. Guagliardi LE, Koppelman B, Blum JS, Marks MS, Cresswell P, Brodsky FM. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* 1990 ; 343 : 133-9.
19. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990 ; 345 : 615-8.
20. 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.
21. Bertolino P, Forquet F, Pont S, Koch N, Gerlier D, Rabourdin-Combe C. Correlation between invariant chain expression level and capability to present antigen to MHC class II-restricted T cells. *Int Immunol* 1991 ; 3 : 435-43.
22. Germain R, Hendrix LR. MHC class II structure occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* 1991 : 353 : 134-9.
23. Levine F, Elich HA, Mach B, Pious D. Transcriptional regulation of HLA class II and invariant chain genes. *J Immunol* 1985 ; 134 : 637-40.
24. Momburg F, Koch N, Moller P, Moldenhauer G, Butcher GW, Hämmerling G. Differential expression of Ia and Ia-associated invariant chain in mouse tissues after *in vivo* treatment with IFN- γ . *J Immunol* 1986 ; 136 : 940-8.
25. Viville S, Neefjes J, Lotteau V, *et al.* Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 1993 ; 72 : 1-20.
26. Viville S. Immunologie et recombinaison homologue : étude de l'ontogenèse des lymphocytes. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 34-40.
27. Babinet C. Les cellules souches embryonnaires de souris, une voie privilégiée de transformation génétique à l'échelle de l'animal. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 268-75.