

Le modèle d'export-réimport pour la présentation croisée des antigènes particuliers par les molécules de classe I du CMH dans les cellules dendritiques

par Pierre Guermonprez & Sebastian Amigorena

U365 INSERM, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75005, Paris. E-mail : sebastian.amigorena@curie.fr

Reçu le 26 janvier 2004

An export-reimport model for cross presentation of particulate antigens by MHC class I molecules in dendritic cells

Dès 1976, peu après la découverte de la restriction par les molécules de classe I du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), le groupe de Bevan découvre la présentation croisée : des cellules présentatrices sont capables de présenter par leur CMH I des antigènes exogènes présents dans d'autres cellules (en l'occurrence les cellules d'un greffon) à des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques. Jusque là on pensait que seuls les antigènes endogènes pouvaient être présentés par le CMH I. Aujourd'hui la physiologie de la présentation croisée est mieux comprise et on peut la considérer comme un mécanisme général de transfert de l'information antigénique depuis les tissus vers les lymphocytes T CD8⁺. De nombreuses expériences *in vivo* montrent que les CD sont nécessaires et suffisantes pour assurer la cross présentation. Le lien entre les antigènes tissulaires (antigènes viraux, bactériens) et les CD réside dans la phagocytose des cellules portant l'antigène.

Le développement de modèles d'étude *in vitro* a permis de mieux comprendre les mécanismes de la présentation croisée des antigènes particuliers (billes de latex portant l'antigène ou cellules exprimant l'antigène). Les modèles explicatifs de la présentation croisée diffèrent quant à la dépendance vis à vis de la dégradation protéasomale, et des transporteurs TAP (transporteurs associés avec la présentation de l'antigène), et la nature du compartiment de chargement des CMH I avec les peptides issus des antigènes exogènes. Les transporteurs TAP sont présents dans les membranes du réticulum endoplasmique et assurent le transport des peptides issus de la dégradation protéasomale des antigènes endogènes (exprimés par les cellules présentatrices) vers la lumière du réticulum endoplasmique où ils peuvent s'associer au CMH I néosynthétisé grâce à un complexe de chargement formé de chaperonnes et d'oxydoréductases (Tapasine, Calreticuline, Erp57). Deux modèles s'affrontaient et nous avons proposé un modèle alternatif :

La voie « vacuolaire » : le **phagosome** des cellules dendritiques est un compartiment de chargement du CMH I, **indépendant des transporteurs TAP**.

D'après quelques études *in vitro*, il semble que la protéolyse endolysosomale suffit à produire des peptides antigéniques qui se fixent à des molécules du CMH I dans les phagosomes, capables de recycler vers la surface cellulaire. Ce mécanisme ne dépend pas de TAP et ne met pas en jeu l'activité du protéasome.

La voie « cytosolique » : le **réticulum endoplasmique** des cellules dendritiques est un compartiment de chargement du CMH I, **dépendant des transporteurs TAP**.

Dans le modèle murin, les études de présentation croisée *in vivo* (chimères hématopoïétiques avec de la moelle osseuse WT ou TAP^{-/-}) ont bien établi fonctionnellement le rôle crucial des transporteurs TAP dans la présentation croisée des antigènes cellulaires (antigènes du soi, viraux ou tumoraux exprimés dans les tissus non hématopoïétiques). Les modèles *in vitro* ont aussi montré que la présentation croisée d'antigènes variés dépendait des transporteurs TAP et de l'activité du protéasome. Ces résultats supposaient que les antigènes exogènes puissent avoir accès au compartiment cytosolique. Des études réalisées notamment dans notre laboratoire ont formellement établi que les CD possèdent l'étonnante capacité d'exporter les antigènes exogènes capturés par endocytose depuis la lumière des endosomes vers le cytosol. Le modèle dominant au moment où nous sommes intéressés à ce domaine était le suivant : les CD phagocytent les particules, transportent l'antigène associé aux particules dans leur cytosol où il est dégradé par le protéasome. Les peptides ainsi libérés rejoignent la lumière du réticulum endoplasmique grâce aux transporteurs TAP et s'associent au CMH I.

Une nouvelle voie de présentation : le **phagosome** des cellules dendritiques est un compartiment de chargement du CMH I, **dépendant des transporteurs TAP**.

Nous avons développé un modèle *in vitro* de présentation croisée chez les CD de souris basé sur l'utilisation de billes de latex recouvertes d'ovalbumine, un antigène protéique modèle (billes-OVA). Après phagocytose des billesOVA, les CD présentent l'épitope SIINFELK

(OVA257-264) en association avec la molécule H-2Kb du CMH I. Nous avons pu montrer que ce processus nécessite l'activité catalytique du protéasome (inhibition pharmacologique avec la lactacystine, un inhibiteur irréversible du protéasome) et l'activité des transporteurs TAP (les CD issues de souris K0 pour TAP1 sont incapables de présenter l'épitope de façon croisée. Ces résultats montrent que la présentation croisée nécessite un passage de l'antigène dans le cytosol. En effet, la protéine OVA couplée à un fluorochrome diffuse efficacement dans le cytosol des CD dès les premières heures après la phagocytose.

Tous ces résultats confortaient le modèle dominant de présentation croisée sur le chargement du CMH I dans le réticulum endoplasmique, sous l'effet des transporteurs TAP.

Afin de mieux caractériser le phénomène de transport de l'antigène dans le cytosol, nous avons adapté une technique de fractionnement subcellulaire des phagosomes. L'avantage majeur des billes de latex réside dans la faible densité des phagosomes formés après leur capture par phagocytose. Cette caractéristique permet la séparation des phagosomes de toutes les autres organelles cellulaires par flottaison différentielle sur gradient de sucrose discontinu.

Grâce à cette technique, nous avons pu analyser le contenu protéique du compartiment phagocytaire par différentes techniques. Les résultats obtenus montrent que le contenu phagocytaire évolue au cours du temps : Le compartiment est d'abord caractérisé par la présence de marqueurs précoces de la voie endocytaire comme le récepteur à la transferrine. Ces marqueurs disparaissent progressivement et le phagosome s'enrichit en marqueurs tardifs de la voie endocytaire tels Lamp2 ou Rab7. De façon inattendue, nous avons observé que les premières étapes de la maturation phagosomale sont caractérisées par la présence de nombreux marqueurs du réticulum endoplasmique tels la calnexine, ou des sous-unités du complexe du translocon (sec-61, sec-62). À mesure que le phagosome mature, la plupart de ces marqueurs diminue. Ces résultats suggéraient la possibilité d'une **fusion précoce des membranes du réticulum avec le compartiment phagocytaire**. Cette hypothèse a été confirmée par les études de microscopie électronique réalisées sur des phagosomes purifiés ou des cellules entières. Des marqueurs à l'or sur cryosections (calreticuline) et un mar-

quage enzymatique (activité glucose 6-phosphatase spécifique du réticulum) attestent de la présence de membranes du réticulum dès la formation des coupes phagocytaires.

D'un point de vue fonctionnel, ces résultats suggéraient que le phagosome puisse être un site de chargement alternatif des molécules du CMH I par les peptides issus de la dégradation protéasomale des antigènes provenant de la lumière du phagosome. À l'aide de différentes techniques (Western blot, immunofluorescence sur phagosomes purifiés et sur cellules entières), nous avons montré que les transporteurs TAP et le complexe de chargement sont effectivement recrutés dans les phagosomes. En utilisant l'activité de N-glycosylation spécifique de la lumière du réticulum, nous avons pu montrer que les transporteurs TAP étaient fonctionnels. La caractérisation en Western blot et l'analyse protéomique des phagosomes purifiés révèlent qu'ils contiennent, outre les transporteurs TAP, tous les composants du complexe d'assemblage du CMH I : la tapasine, la calreticuline, Erp57 et le CMH I lui-même. **Nous avons montré que les peptides cytosoliques transloqués par le transporteur TAP pouvaient s'assembler au CMH I dans la lumière des phagosomes :** *a) in vitro*, sur des phagosomes purifiés : des phagosomes purifiés incubés avec un peptide épitopique iodé importent le peptide et forment des complexes avec le CMH I (détectés par immunoprécipitation). Les caractéristiques pharmacologiques (dépendance de l'ATP, inhibiteurs compétitifs froids) du transport démontrent que les transporteurs TAP sont bien responsables de l'import de ce peptide ; *b) in vivo*, dans des CD entières : les phagosomes portant l'antigène OVA forment efficacement et spécifiquement des complexes CMH I-peptides que nous avons détectés à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-H-2Kb/SIINFEKL en microscopie confocale et par des tests fonctionnels sur des membranes purifiées.

En conclusion, ces résultats renouvellent le modèle de présentation croisée actuel, basé sur le chargement des peptides dans la lumière du réticulum endoplasmique : **le phagosome est bien un compartiment de chargement du CMH I** pour les antigènes issus de sa lumière. Ce nouveau modèle export cytosolique-dégradation-réimport peu s'apparenter à la présentation (dépendante du protéasome et de TAP) de certains antigènes endogènes localisés dans la lumière du réticulum endoplasmique.