

Université de Montréal

Études du ciblage intracellulaire des molécules non classiques du complexe  
majeur d'histocompatibilité de classe II

Par  
Alexandre Brunet

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
En microbiologie et immunologie

Juillet 2005  
©Alexandre Brunet, 2005



W)

4

U58

2006

V. 013

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
«Études du ciblage intracellulaire des molécules du complexe majeur  
d'histocompatibilité de classe II»

Présenté par  
Alexandre Brunet

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur :	: Dr.Guy Lemay
Directeur de recherche	: Dr.Jacques Thibodeau
Membre du jury	: Dr.Eric Cohen
Examineur externe	: Dr.Viktor Steimle
Représentant du doyen de la FES	: Dr.Marc Drolet

Thèse acceptée le : \_\_\_\_\_



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
«Études du ciblage intracellulaire des molécules du complexe majeur  
d'histocompatibilité de classe II»

Présenté par  
Alexandre Brunet

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur :	: Dr. Guy Lemay
Directeur de recherche	: Dr. Jacques Thibodeau
Membre du jury	: Dr. Eric Cohen
Examineur externe	: Dr. Viktor Steimle
Représentant du doyen de la FES	: Dr. Marc Drolet

Thèse acceptée le : 28 novembre 2005

## RÉSUMÉ

Molécules non classiques du CMH-II, HLA-DM et HLA-DO dirigent le chargement de peptides antigéniques sur les molécules classiques du CMH-II, telle que HLA-DR. Plus précisément, HLA-DM catalyse l'échange peptidique, alors que HLA-DO influence plutôt le répertoire peptidique en inhibant l'activité de HLA-DM. Le chargement peptidique a lieu dans les compartiments endosomiques multivésiculaires où ils sont tous deux localisés. L'interaction entre HLA-DM et HLA-DR se réalise au niveau des membranes internes vésiculaires de ceux-ci. Bien qu'on attribue le ciblage de HLA-DO au motif d'adressage intracellulaire encodé dans le domaine cytoplasmique de DM $\beta$ , nous avons évalué la présence de signaux de transport sur la queue cytoplasmique de HLA-DO $\beta$ . À cette fin, nous avons conçu et transfecté (dans les cellules HeLa), des molécules rapporteuses DR/DO et des mutants dérivés de celles-ci. Nos résultats démontrent la présence d'un motif de ciblage dileucine fonctionnel dans la queue cytoplasmique de DO $\beta$ . Ils suggèrent également que DO peut modifier le transport de DM dans les compartiments endosomiques. Cette dernière hypothèse fut confirmée par une autre équipe de recherche, ce qui nous a amenés à étudier la régulation du ciblage des molécules du CMH-II dans les vésicules internes des compartiments multivésiculaires ou des exosomes.

La production exosomale est ubiquiste et se produit dans une variété de cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Ces vésicules membranaires sont relâchées dans le milieu cellulaire ambiant lors de la fusion du compartiment multivésiculaire et de la membrane cellulaire. Ils sont extraits des milieux de culture par une centrifugation à grande vitesse. La fonction physiologique de ces vésicules demeure toutefois l'objet de nombreuses investigations, tout comme les mécanismes qui gèrent leur formation et la sélection de cargo. Les molécules HLA-DR matures atteignent la surface cellulaire, tout en

s'accumulant également dans les membranes exosomales. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous tentons de déterminer les mécanismes qui règlent l'incorporation des molécules du CMH-II dans ces membranes vésiculaires. Nos résultats démontrent que DM est présent dans les fractions exosomales de la lignée cellulaire lymphoblastoïde 721.45, tout comme dans les cellules HeLa transfectées avec CIITA. Afin de comprendre les mécanismes qui dirigent l'entrée et la rétention de cargos dans les exosomes, HLA-DM a été transfecté seul dans les cellules HeLa. Dans ces conditions, DM est exclue des membranes exosomales à moins d'avoir préalablement inactivé son signal tyrosine (YXXL) par mutagenèse dirigée. Ces résultats suggèrent que ce signal est sans doute inactivé dans les lymphocytes B et les cellules HeLa CIITA. Étonnamment, une molécule chimérique DR fusionnée au domaine cytoplasmique de DMB, demeure efficacement incorporée dans les membranes exosomales des cellules HeLa transfectées. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que le destin des protéines transmembranaires dans les compartiments multivésiculaires est dicté par les signaux cytoplasmiques et d'autres facteurs cellulaires, probablement liés à la capacité de formation de complexes multimoléculaires.

## **LISTE DES MOTS CLÉS**

Présentation Antigénique

Complexe Majeur d'histocompatibilité de classe II

HLA-DO

HLA-DM

Ciblage endosomique

Motif di-leucine

MIIC

Chaîne Invariante

Exosomes

## SUMMARY

HLA-DM and HLA-DO are non-classical MHC class II molecules that modulate the loading of antigenic peptides on molecules such as HLA-DR in B-cells. HLA-DM catalyzes the peptide exchange and HLA-DO influences the peptide repertoire by negatively modulating the activity of HLA-DM. Peptide exchange occurs in class II-rich compartments of the endocytic pathway where they both accumulate. These compartments include multivesicular bodies in which HLA-DR and -DM interact at the level of the internal membranes. Although the targeting of HLA-DO to endosomal compartments is attributed to sorting information within DM cytoplasmic tail, we have investigated the presence of consensus sorting signals within the cytoplasmic domains of HLA-DO. HLA-DR/DO chimeric and mutagenic molecules were transfected into HeLa cells. Our results show the presence of a functional sorting motif within the beta chain. Interestingly, these results suggested that DO can modify DM sorting within endosomal compartments. This hypothesis was later demonstrated by others and prompted us to study the regulation of MVB/exosomal sorting of MHC molecules.

Mature peptide-loaded HLA-DR molecules end-up at the cell surface but also accumulate in exosomal vesicles. These small structures are shed presumably through the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane and are obtained by high speed centrifugation of the culture medium. Despite their colocalization with HLA-DR in MHC II-rich compartments, the presence of HLA-DM in exosomes remains to be demonstrated. In the second part of this work, we show by immunoblot that DM is present in exosomal fractions of the 721.45 B lymphoblastoid cell line. A similar conclusion was reached when looking at exosomes from HeLa cells transfected with CIITA. To gain insight into the intracellular mechanisms regulating exosome entry and cargo retention, HLA-DM was transfected into HeLa cells. Interestingly, in these conditions,

DM was excluded from exosomes. However, it was found in exosomes when its YXXL sorting motif was inactivated by site-directed mutagenesis or following co-expression of HLA-DR. Altogether, these results demonstrate that sorting signals in the cytoplasmic domains of transmembrane proteins can regulate exosome entry and raise the intriguing possibility that protein-protein interactions can modulate the activity of such signals.

## KEYWORDS LISTING

Antigen Presentation  
Class II major histocompatibility complex  
HLA-DO  
HLA-DM  
Endosomal sorting  
Dileucine Motif  
MIIC  
Invariant chain  
Exosomes

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES MOTS CLÉS .....</b>	<b>v</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>vi</b>
<b>KEYWORDS LISTING .....</b>	<b>viii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xix</b>
<b>CHAPITRE 1- REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Introduction .....</b>	<b>21</b>
1.1.1 Transplantation tumorale et découverte du complexe majeur d'histocompatibilité .....	21
1.1.2 Le complexe HLA .....	22
<b>1.2 Les molécules du CMH-I .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Les molécules du CMH-II.....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Expression cellulaire.....	25
1.3.2 CIITA, le transactivateur des molécules du CMH-II .....	26
1.3.3 Les molécules classiques et non classiques du CMH-II.....	26
1.3.4 Structure de la molécule du CMH-II classique .....	27
1.3.5 Fonction des molécules du CMH-II .....	28
1.3.5.1 Présentation antigénique.....	28
1.3.5.2 Sélection thymique .....	29
<b>1.4 La Chaîne Invariante (Ii).....</b>	<b>32</b>



1.4.1	Biosynthèse et ciblage endosomique du complexe CMH-II/Ii.....	32
1.4.2	Structure protéique de la Chaîne Invariante .....	32
1.4.2.1	Domaine cytoplasmique de Ii .....	33
1.4.2.2	Domaine extracellulaire de Ii .....	35
1.4.3	Régulation génique .....	36
<b>1.5</b>	<b>HLA-DM.....</b>	<b>37</b>
1.5.1	Structure de HLA-DM.....	37
1.5.2	Fonction de HLA-DM .....	38
1.5.3	Adressage intracellulaire endosomique .....	38
<b>1.6</b>	<b>HLA-DO .....</b>	<b>39</b>
1.6.1	DO $\alpha$ et DO $\beta$ : les partenaires inattendus .....	39
1.6.2	Expression Tissulaire de HLA-DO.....	40
1.6.3	Localisation cellulaire.....	41
1.6.4	Fonction de HLA-DO .....	41
1.6.4.1	Fonction physiologique de HLA-DO .....	42
1.6.4.2	HLA-DO : Senseur d'acidité du complexe DM/DO .....	44
1.6.5	Régulation de l'expression de HLA-DO .....	45
1.6.6	Structure de la protéine HLA-DO .....	46
1.6.7	Transport intracellulaire de HLA-DO. ....	47
1.6.8	Ciblage intracellulaire de HLA-DO. ....	48
<b>1.7</b>	<b>Les tétraspanes et la présentation antigénique .....</b>	<b>48</b>
<b>1.8</b>	<b>Le réseau endosomique .....</b>	<b>51</b>
1.8.1	Caractérisation et identification des compartiments endosomiques	53
1.8.2	Les MIIC: compartiments endosomiques de présentation antigénique.....	55
1.8.2.1	Morphologie des MIIC .....	56
<b>1.9</b>	<b>Les exosomes .....</b>	<b>57</b>
1.9.1	Fonction des exosomes.....	59
1.9.1.1	Les réticulocytes .....	59
1.9.1.2	La fonction des exosomes dans les cellules immunes .....	60

1.9.2 La biogenèse et le ciblage exosomal .....	61
1.9.2.1 Les complexes ESCRT .....	62
1.9.2.2 Monoubiquitination .....	66
1.9.3 La régulation de l'exocytose exosomale .....	66
1.9.4 Composition protéique et lipidique des exosomes .....	67
1.9.5 "Trojan exosome hypothesis" .....	69
<b>1.10 Transport intracellulaire .....</b>	<b>70</b>
1.10.1 Transport vésiculaire .....	71
<b>1.11 Endocytose.....</b>	<b>72</b>
1.11.1 Phagocytose .....	72
1.11.2 Pinocytose (endocytose de phase fluide).....	72
1.11.3 Endocytose dépendante (EDC) et indépendante de la clathrine (EIC) .....	73
<b>1.12 Manteaux cytoplasmiques.....</b>	<b>76</b>
1.12.1 Manteaux cytoplasmiques de clathrines .....	76
1.12.1.1 Protéines adaptatrices (AP) .....	77
1.12.1.2 les adaptateurs GGA .....	80
1.12.2 Manteaux cytoplasmiques COP I et COP II .....	81
<b>1.13 Motif de ciblage intracellulaire endosomique .....</b>	<b>82</b>
1.13.1 Le motif endosomique de type «tyrosine» .....	82
1.13.2 Le motif endosomique de type «dileucine» .....	83
<b>1.14 Objectifs et hypothèses et de travail .....</b>	<b>85</b>
 <b>CHAPITRE 2-ARTICLE.....</b>	 <b>87</b>
Functional Characterization of a Lysosomal Sorting Motif in the Cytoplasmic Tail of HLA-DO $\beta$ . .....	88
<b>2.1 RÉSUMÉ .....</b>	<b>89</b>
<b>2.2 ABSTRACT .....</b>	<b>90</b>
<b>2.3 INTRODUCTION .....</b>	<b>91</b>
<b>2.4 MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>94</b>

<b>2.5 RESULTS</b> .....	<b>103</b>
<b>2.6 DISCUSSION</b> .....	<b>112</b>
<b>2.7 ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>116</b>
<b>2.8 REFERENCES</b> .....	<b>117</b>
<b>2.9 ABBREVIATIONS</b> .....	<b>125</b>
<b>2.10 FIGURES</b> .....	<b>126</b>
<b>CHAPITRE 3 – ARTICLE</b> .....	<b>141</b>
The YXXL cytoplamic motif of HLA-DM regulates sorting into exosomes	<b>142</b>
<b>3.1 RÉSUMÉ</b> .....	<b>143</b>
<b>3.2 ABSTRACT</b> .....	<b>144</b>
<b>3.3 INTRODUCTION</b> .....	<b>145</b>
<b>3.4 EXPERIMENTAL PROCEDURES</b> .....	<b>147</b>
<b>3.5 RESULTS &amp; DISCUSSION</b> .....	<b>150</b>
<b>3.6 REFERENCES</b> .....	<b>157</b>
<b>3.7 ABBREVIATIONS</b> .....	<b>163</b>
<b>3.8 ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>163</b>
<b>3.9 FIGURES</b> .....	<b>165</b>
<b>CHAPITRE 4 – DISCUSSION</b> .....	<b>170</b>
<b>4.1 Caractérisation du motif dileucine de la chaîne DO<math>\beta</math></b> .....	<b>170</b>
4.1.1 La queue cytoplasmique de DO $\beta$ encode un motif dileucine fonctionnel. ....	171
4.1.2 Site de reconnaissance du motif dileucine de HLA-DO $\beta$ .....	173
4.1.3 Expression membranaire de la molécule rapporteuse DR/DO $\beta$ cyto .....	174
4.1.4 Le motif dileucine est non conservé .....	175
4.1.5 Quelle est la fonction du motif dileucine de HLA-DO $\beta$ ?.....	176
4.1.6 Ciblage de la molécule HLA-DO $\alpha$ P11V/DO $\beta$ .....	177

4.1.7 Ciblage du complexe DM-DO à la membrane limitante des MVBs	178
4.1.7.1 Voie de transport du complexe DM/DO	178
4.1.7.2 Les motifs de ciblage de DO $\beta$	178
4.1.7.3 Transport endosomique spécialisé	179
4.1.7.4 Rôle de HLA-DO dans le ciblage exosomale	180
<b>4.2 Gestion du ciblage de HLA-DM aux exosomes par HLA-DR</b>	<b>180</b>
4.2.1 Présence de HLA-DM aux fractions exosomales	181
4.2.2 Absence de HLA-DM dans les exosomes des cellules HeLa DM.5	182
4.2.3 Cyclage de HLA-DM aux exosomes par HLA-DR	182
4.2.4 Rétention de HLA-DM à la membrane limitante du MVB et proscription de son entrée dans les membranes exosomales	183
4.2.5 Masquage du motif YXXL de HLA-DM	184
4.2.6 Intégration au radeau lipidique	184
4.2.6 Voie de ciblage indépendante de l'ubiquitine	185
4.2.7 Exosomes et dissémination de l'information antigénique	186
4.2.8 Fonction de HLA-DO dans les membranes exosomales	188
 <b>CHAPITRE 5 – CONCLUSION</b>	 <b>191</b>
 <b>Contribution et participation de l'auteur aux publications</b>	 <b>193</b>
 <b>CHAPITRE 6- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	 <b>195</b>
 <b>CHAPITRE 7- ANNEXES</b>	 <b>225</b>
Article supplémentaire #1	226

<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>227</b>
7.1 Sortie solitaire du RE de la molécule HLA-DO .....	227
<b>Article supplémentaire #2 .....</b>	<b>229</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>230</b>
7.2 Dissimulation du motif de rétention de la chaîne invariante Iip35 par la queue cytoplasmique de HLA-DR $\beta$ .....	230

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 1

Figure 1.1 Le complexe HLA humain.....	23
Figure 1.3 Les compartiments endosomiques et la voie de synthèse des molécules du CMH-II.....	31
Figure 1.4 Représentation schématique des isoformes de la chaîne invariante humaine.....	35
Figure 1.5 Complexe nonamérique CMH-II / Ii.....	36
Figure 1.6 Modèle de la fonction de HLA-DO dans les lymphocytes B.....	44
Figure 1.7 Structure schématique d'une tétraspane « typique ».....	50
Figure 1.8 Fusion d'un compartiment multivésiculaire avec la membrane plasmique et relâche des exosomes.....	58
Figure 1.9 Formation d'un exosome.....	58
Figure 1.10 Représentation schématique de la biogenèse et de la relâche des exosomes dans une cellule présentatrice d'antigènes.....	62
Figure 1.11 Modèle du ciblage dans les endosomes multivésiculaires par les complexes ESCRTs.....	65
Figure 1.12 Composition protéique des exosomes.....	68
Figure 1.13 Structure de la clathrine.....	74
Figure 1.14 Voies cellulaires desservies par les manteaux cytoplasmiques et les complexes adaptateurs.....	75
Figure 1.15 Structure du complexe AP-2.....	79

### Chapitre 2

Figure 1. Chimeric molecules and mutants.....	126
Figure 2. Cell surface expression of the class II chimeric molecules in transfected HeLa cells.....	128

Figure 3. The cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$ is responsible for the lysosomal localization of reporter molecules. ....	129
Figure 4. Cell surface expression of the mutated reporter molecules in transfected HeLa cells. ....	131
Figure 5. The di-leucine motif in DO $\beta$ mediates lysosomal targeting. ....	132
Figure 6. Redistribution of the DR/DM $\beta$ cytoY230A molecule to the cell surface.....	134
Figure 7. Cell surface redistribution of the DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA. ....	135
Figure 8. Characterization of the putative tyrosine motif in HLA-DO $\beta$ . ....	136
Figure 9. Reduced surface expression of reporter molecules containing a consensus tyrosine motif. ....	137
Figure 10. Mutation of the LL motif in DO $\beta$ does not prevent lysosomal accumulation of the DO/DM complex. ....	138

### Chapitre 3

Figure 1. HLA-DM is present in exosomes secreted from the B-lymphoblastoid cell line 721.45. ....	165
Figure 2. HeLa CIITA exosomes accumulate HLA-DM. ....	166
Figure 3. HLA-DM's tyrosine motif prevents entry into exosomes.....	167
Figure 4. DR/DM cyto chimera is sorted to exosomal membranes.....	169

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN : Acides désoxyribonucléiques  
ADNc : ADN complémentaire  
AP : « assembly polypeptides »  
AP : Protéine adaptatrices  
ARF : facteur d'ADP-ribosylation  
BCR : Récepteur des lymphocytes B  
CI-MPR : récepteur mannose 6-phosphate cation-indépendant  
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes  
CLIP : «*Class II invariant chain peptide*»  
CCP : «*clathrin coated pits*»  
CIITA : «class II-transactivator»  
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité  
CMH-I : CMH de classe I  
CMH-II: CMH de classe II  
EBV : «*Epstein-Barr virus* »  
EE : «early endosome»  
EE: endosome précoce  
ESCRT : «*endosomal-associated complex required for transport*»  
FRET: «*Fluorescence Resonance Energy Transfer*»  
GGA : «*golgi-localized  $\gamma$ -ear ARF binding proteins*»  
GAE : « *$\gamma$ -adaptin ear*»  
HLA : «*Human Leukocyte antigen*»  
HPLC : « *High Performance Liquid Chromatography*»  
Ii: Chaîne Invariante  
IFN- $\gamma$  : Interféron gamma  
kDa : Kilodalton  
Lamp-1: «*lysosome-associated membrane protein-1*»  
Lamp-3: «*lysosome-associated membrane protein-3*»



LE : «late endosome»

LE: endosome tardif

LDL : «*low-density lipoprotein*»

MALDI: «*matrix-assisted laser desorption/ionization*»

MIIC: «*Major histocompatibility complex class II compartment*»

MHC: «*Major histocompatibility complex*»

ORF : «*open reading frame*»

pBS: plamide Bluescript

PCR: Réaction de polymérase en chaîne

RE : Réticulum endoplasmique

TCR : Récepteur des lymphocytes T

TM : Transmembrane

VPS : « *vacuolar protein sorting* »

## REMERCIEMENTS

Au cours de mes études doctorales, j'ai rapidement réalisé que la réussite en laboratoire est non seulement liée à un énorme investissement en temps et en travail, mais à un travail d'équipe constant. Je tiens donc à remercier tous ceux et celles qui ont directement ou indirectement contribué à la réussite de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Dr Jacques Thibodeau, pour son implication constante dans tous mes projets, sa motivation -pour le moins- extrême, son soutien quotidien et sa grande disponibilité. Jacques possède la grande habileté à reconnaître le potentiel de ses étudiants et à en faire ressortir le maximum.

Un merci spécial au Dr Pierre Belhumeur pour m'avoir offert, malgré un manque d'expérience flagrant, mon premier emploi comme technicien de laboratoire. Grâce à lui, j'ai eu la possibilité de poursuivre mes études post-graduées avec Dr Thibodeau.

Évidemment, je remercie tous mes coéquipiers de laboratoire. Georges, je vais m'ennuyer énormément de toutes nos discussions socio-politiques. Francesco, ton amitié, ta gentillesse et ton aide ont beaucoup été appréciés pendant ces dernières années. Merci à Angélique et Nathalie pour leur gentillesse et leur amitié, ☺. Je remercie également les autres membres du laboratoire : Amélie, Jessy, Sam, Ingrid, Catherine et Julie. Un grand merci à Marie-Élaine pour son soutien et sa contribution énorme sur le projet exosome.

Je tiens à remercier l'équipe du Dr Cohen, spécialement Yong et André, pour le beau travail d'équipe sur le projet HIV-DR.

Je dois finalement remercier ma grande amie Karinne, « ex-partner » d'escalade, et mes grands chums Yannick et Jean-Pascal pour leur amitié et leur encouragement. Un p'tit merci aux têtes brûlées (Dom, Alex O, Maud, Daniel, Charles Fortin, Anne-Marie Jacques-Fortin ou devrais-je dire, Fortin-Jacques) pour m'avoir empêché de devenir complètement fou au cours des deux dernières années.

Je dois finalement remercier mon père, Violaine et Étienne pour leur soutien, et pour leur encouragement pendant toutes ces années. Je remercie également ma mère et Jean-Paul pour leur soutien et leur prière. Évidemment, je remercie mon frère Charles, dont je suis extrêmement fier.

# CHAPITRE 1- REVUE DE LITTÉRATURE

## 1.1 Introduction

### 1.1.1 Transplantation tumorale et découverte du complexe majeur d'histocompatibilité

La découverte des molécules du CMH a été réalisée lors d'études portant sur la transplantation de tumeurs chez des souris (1). Les biologistes tentaient de trouver un moyen de préserver les tumeurs en les transplantant vers des souris saines. Ils constatèrent rapidement que les transplantations et la propagation des tumeurs n'étaient efficaces qu'entre souris génétiquement identiques (2). De plus, la greffe de tissus normaux suivait cette règle de transplantation.

Plusieurs expériences de croisements génétiques entre différentes lignées de souris ont permis d'établir les facteurs génétiques qui contribuent au rejet de tissus. Ils identifient alors un locus principal et plusieurs locus secondaires. Ce groupe de locus génétiques est appelé le locus d'histocompatibilité (3;4). Le locus majeur qui semblait être responsable de cette compatibilité tissulaire entre le greffon et le tissu récepteur fut nommé le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)(5). Les locus secondaires, quant à eux, sont connus sous l'appellation complexe mineur d'histocompatibilité.

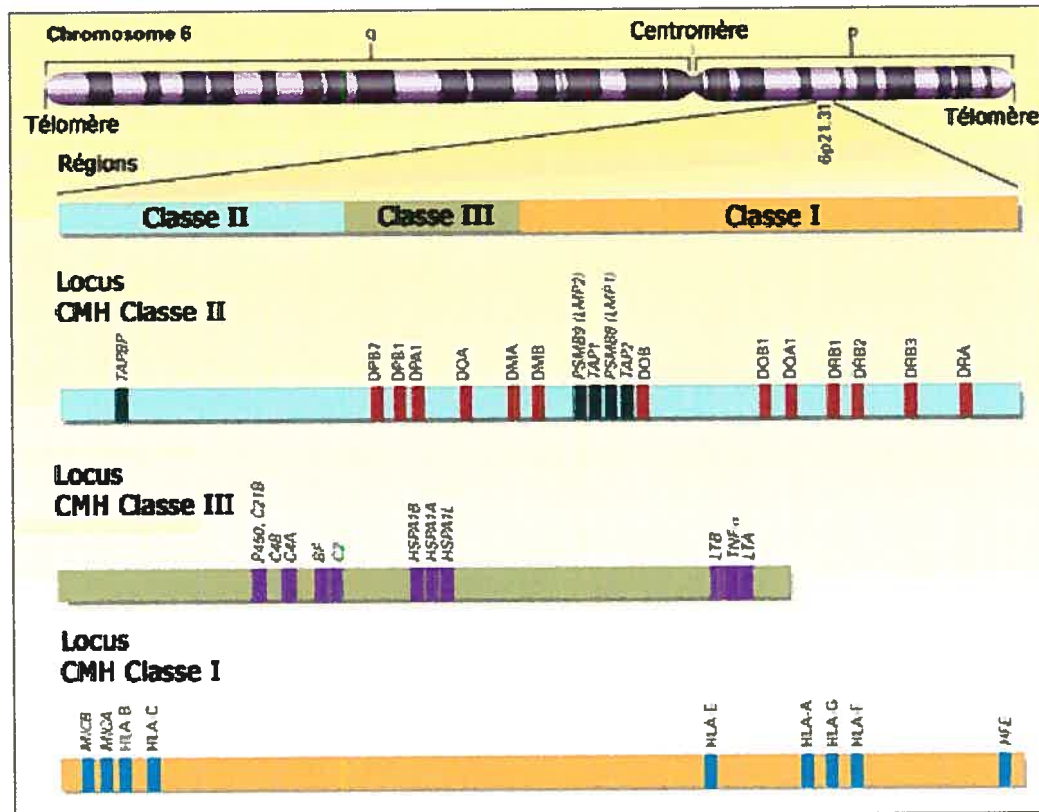
Les différents gènes du CMH détiennent l'information nécessaire pour synthétiser des glycoprotéines membranaires hautement polymorphiques, que l'on retrouve exprimées à la surface cellulaire. Les études sérologiques ont révélé que les souris greffées génèrent des alloanticorps contre ces glycoprotéines provenant du tissu greffé (6;7). Ces déterminants antigéniques de la souris ont été nommé antigène d'histocompatibilité.

Deux classes d'antigènes d'histocompatibilité ont été définies à partir des études effectuées chez l'homme et la souris : les antigènes du CMH-I et les antigènes du CMH-II. Les antigènes du CMH-I se retrouvent de façon ubiquiste dans les cellules de mammifères. Les antigènes du CMH-II sont majoritairement restreints à trois types cellulaires : les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages.

Les études portant sur l'histocompatibilité ont surtout été effectuées à partir de cellules sanguines. L'appellation HLA, «**H**uman **L**eukocyte **A**ntigen», tient au fait que les molécules du CMH I sont exprimées de façon ubiquiste dans les leucocytes humains. Cette terminologie a été utilisée car chez l'humain, contrairement à la souris, les CHM-I ne se retrouvent pas à la surface des érythrocytes. La terminologie HLA s'applique maintenant tant aux antigènes du CMH-I qu'à ceux du CMH-II.

### **1.1.2 Le complexe HLA**

Le complexe HLA regroupe plusieurs gènes directement impliqués dans la réponse immunitaire. Plus de 40 gènes sont impliqués dans l'apprêtement et la présentation antigénique. Par contre, la majorité des gènes retrouvés dans cette région n'appartiennent guère au système immunitaire. Le complexe HLA se localise sur le chromosome 6 chez l'homme et 17 chez la souris (8). Chez l'homme, le complexe HLA se divise en trois principales sous régions: la classe I, la classe II et la classe III (Figure 1.1).



**Figure 1.1 Le complexe HLA humain.**

Le complexe HLA s'étend sur environ 3600kb et 86 gènes y sont répertoriés sur trois locus. Les locus du CMH sont positionnés sur le chromosome 6 chez l'humain. (Traduit de Klein *et al.*, 2000 (9;10).

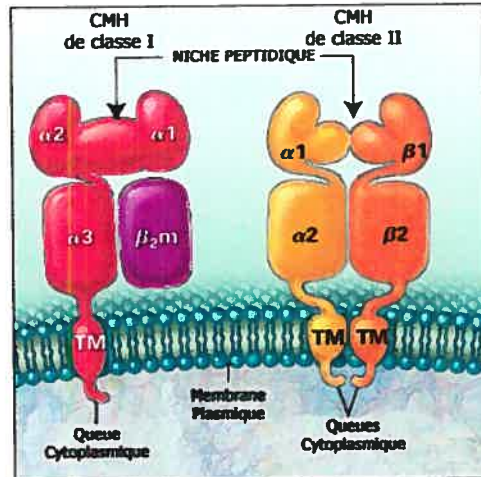
La région de la classe I occupe une position chromosomique télomérique et regroupe les gènes nécessaires à la synthèse des molécules du CMH-I. Elle détient l'information génétique pour synthétiser les chaînes alpha des molécules du CMH-I, impliquées plutôt dans l'apprêtement et la présentation des peptides endogènes. Les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C sont localisés dans cette région.

La région de la classe II occupe une position plus centromérique et permet la synthèse des protéines impliquées dans l'apprêtement et la présentation des peptides exogènes. Les gènes de cette région encodent les chaînes alpha et bêta des hétérodimères classiques, HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ, ainsi que les hétérodimères non classiques, HLA-DM et HLA-DO. On retrouve également quelques gènes essentiels pour l'apprêtement de l'antigène dans le contexte des molécules du CMH-I (TAP1, TAP2, LMP1, LMP2) (9).

Finalement, la région de la classe III regroupe quelques gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire. Toutefois, cette région n'apporte aucune contribution vitale à la présentation antigénique par les molécules du CMH. Succinctement, on y trouve certains gènes impliqués dans le système du complément (C4B, C4A, C2, BF), et certains autres ayant des fonctions cellulaires diverses (9). Cette région ne sera pas traitée ici.

## **1.2 Les molécules du CMH-I**

Les molécules du CMH-I (HLA-A,-B,-C) sont formées par l'association non covalente d'une chaîne alpha, encodée par les gènes des locus A, B et C, et par la chaîne  $\beta$ 2-microglobuline, que l'on retrouve encodée par un gène sur le chromosome 15 (Figure 1.2). L'hétérodimère formé consiste en une protéine membranaire exprimée de façon ubiquiste à la surface de la majorité des cellules nucléées (11). Le complexe stable se forme initialement dans le réticulum endoplasmique (RE), où un peptide antigénique cytosolique se fixe à la niche peptidique de l'hétérodimère. L'entrée des peptides cytosoliques dans le RE est catalysée par les transporteurs TAP («Transporter associated with Antigen Processing»). Le complexe trimoléculaire rejoint ensuite la surface membranaire cellulaire pour activer les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+).



**Figure 1.2 Structure des molécules du CMH-I et CMH-II.**

Traduit de Klein *et al.*, 2000(9).

### 1.3 Les molécules du CMH-II

Les molécules du CMH-II sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques hautement polymorphiques formées par l'association non covalente d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . La chaîne  $\alpha$  possède une masse moléculaire qui varie entre 32 à 34 kDa alors que celle de la chaîne  $\beta$  varie entre 29 à 32 kDa. Ces variations de masse moléculaire sont attribuables à des différences de glycosylation. La chaîne  $\alpha$  de HLA-DR contient deux séquences consensus Asn-X-Ser/Thr de glycosylation, alors que la chaîne  $\beta$  en possède une seule (12).

#### 1.3.1 Expression cellulaire

On retrouve trois isotypes de molécules du CMH-II chez l'humain (HLA-DP, -DQ, -DR) et deux chez la souris (IA [gène H2-A] et IE [gène H2-E]). Ces complexes sont exprimés par un sous-groupe de cellules immunes : les lymphocytes B, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T



activés et les cellules épithéliales thymiques (9). Toutefois, l'interféron- $\gamma$  peut induire l'expression de ces molécules dans plusieurs autres types cellulaires (13). L'interféron- $\gamma$  induit l'expression du facteur de transactivation des molécules du CMH-II, CIITA («class II-transactivator»).

### **1.3.2 CIITA, le transactivateur des molécules du CMH-II**

Le transactivateur des molécules du CMH-II, CIITA, agit en tant que principal facteur de transcription responsable de la régulation de l'expression inductible et constitutive des gènes du CMH-II (14). La protéine CIITA se lie indirectement avec les régions promotrices des gènes de classe II. Elle interagit avec plusieurs facteurs de transcription (NF-Y, RFX5, RFXANK, CREB-1) dont une des fonctions consiste à lier spécifiquement certaines régions du promoteur (15). Les promoteurs des gènes du CMH-II sont caractérisés par quatre régions régulatrices: la boîte W, X1, X2, et Y. L'interaction de la machinerie transcriptionnelle avec ces régions est requise pour l'expression des molécules du CMH-II.

### **1.3.3 Les molécules classiques et non classiques du CMH-II**

Les molécules du CMH-II sont divisées en deux catégories: les molécules classiques et non classiques. Chez l'homme, les molécules classiques regroupent les protéines HLA-DP, HLA-DQ, et HLA-DR. Ces protéines ont la capacité de présenter différents peptides antigéniques à la surface des APC. Les gènes correspondant à ces protéines sont caractérisés par un niveau extrêmement élevé de polymorphisme.

Les hétérodimères HLA-DM et HLA-DO (H2-M et H2-O chez la souris), quant à elles, représentent les molécules du CMH-II dites «non classiques». Ces complexes ne peuvent accommoder un peptide dans leurs niches peptidiques. En effet, la niche peptidique de la molécule HLA-DM possède une structure

fermée et ceci fait obstacle à la liaison peptidique. D'autre part, la structure tridimensionnelle de DO demeure toujours inconnue. Toutefois, aucune donnée ne suggère qu'il puisse lier des peptides antigéniques. Contrairement aux gènes classiques, ceux qui codent pour les protéines non classiques sont beaucoup moins polymorphiques (16-18). De plus, leur expression subcellulaire se limite principalement au niveau des compartiments endosomiques. En effet, l'expression de ces molécules à la surface cellulaire est éphémère et transitoire (19).

#### **1.3.4 Structure de la molécule du CMH-II classique**

L'hétérodimère classique se subdivise en quatre domaines distincts: la niche peptidique, un domaine de type immunoglobuline (Ig), la région transmembranaire et la queue cytoplasmique (Figure 1.2) (20). Les régions N-terminales de la chaîne  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  interagissent pour former la niche peptidique. Cette niche est constituée d'un plancher de huit feuillets  $\beta$  antiparallèles bordés par deux hélices  $\alpha$ . Chaque chaîne ( $\alpha$  et  $\beta$ ) contribue la moitié de cette structure (une hélice  $\alpha$  et quatre feuillets  $\beta$ ). Cette cavité permet d'accommoder une portion de 9 à 12 acides aminés des peptides antigéniques (21;22). Les résidus polymorphiques du CMH se concentrent au niveau des acides aminés qui forment la niche peptidique. Les régions hypervariables se retrouvent aux niveaux du plancher et des bordures de la niche peptidiques. Les peptides antigéniques sont maintenus dans la niche grâce à une série de ponts hydrogènes entre le squelette du peptide et les chaînes latérales d'acides aminés qui forment cette niche (20;23). Ceci permet à la niche d'accommoder plusieurs peptides indépendamment de leurs séquences. L'association des deux chaînes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) est maintenue par les interactions au niveau des régions N-terminales. Ce sont ces interactions entre les résidus du premier feuillet  $\beta$  de chaque chaîne qui stabilisent l'hétérodimère (24).

Le domaine suivant comprend la région  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  de chaque chaîne. Cette région est peu polymorphique et possède une structure analogue aux repliements des immunoglobulines. Le site d'interaction avec le co-récepteur CD4 est situé sur une boucle du domaine  $\beta 2$  (25;26).

Le domaine transmembranaire possède une taille approximative de 25 acides aminés. Ce domaine, enrichi en acides aminés hydrophobes, traverse la bicouche lipidique et ancre la molécule aux membranes cellulaires. Il a été démontré que le domaine transmembranaire de la chaîne  $\beta$  de I-A<sup>b</sup> semble être impliqué au niveau de la signalisation intracellulaire dans les lymphocytes B de souris (27).

Le domaine cytoplasmique est composé de résidus hydrophiles C-terminaux. Cette région comporte des motifs d'adressages intracellulaires endosomiques, généralement encodés sur la chaîne  $\beta$  (28-30). Le domaine cytoplasmique de HLA-DR contient également des résidus critiques pour son interaction avec le cytosquelette (31). Finalement, plusieurs études fonctionnelles démontrent la contribution des domaines cytoplasmiques à la signalisation intracellulaire lors de l'activation des lymphocytes B (27;32-37).

### **1.3.5 Fonction des molécules du CMH-II**

#### **1.3.5.1 Présentation antigénique**

Les molécules du CMH sont impliquées dans le développement des réponses immunes contre les différentes formes de pathogènes. Elles activent directement les lymphocytes T en interagissant spécifiquement avec leurs TCRs. Au lieu de présenter les protéines sous leurs formes natives, les molécules du CMH ont la caractéristique de lier et de présenter les antigènes sous forme de fragments peptidiques. Chacune des molécules du CMH lie un éventail limité de peptides dérivés de protéines endogènes et exogènes (38;39).

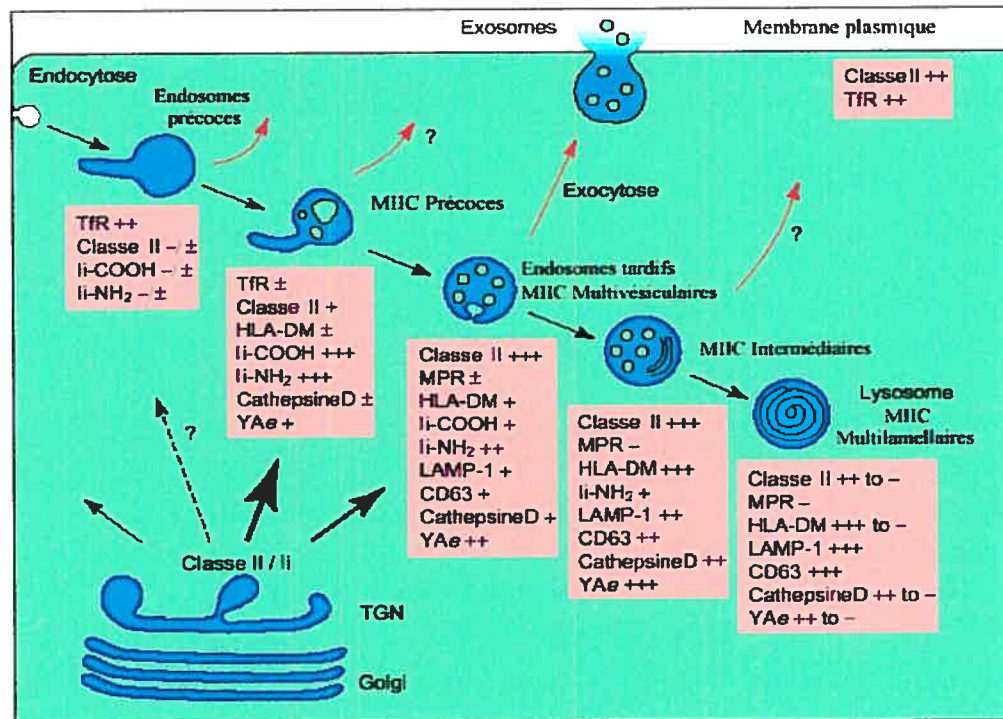
Classiquement, les molécules du CMH-I présentent des antigènes peptidiques provenant de l'environnement cytosolique aux lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). Les molécules du CMH-II, quant à elles, sont responsables de présenter les peptides dérivés des pathogènes extracellulaires aux lymphocytes T accessoires (CD4+).

Toutefois, il existe un phénomène immunitaire qui permet aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, comme les macrophages et les cellules dendritiques, d'induire une réponse CMH-I-restreinte contre des antigènes extracellulaires. Ces événements se nomment «présentation croisée» ou «cross-presentation» (40;41). En effet, les APC professionnelles ont développées la capacité de transporter le matériel antigénique endocytosé vers le cytosol et ainsi permettre leur présentation par la machinerie conventionnelle du CMH-I (42-44). Dans le même ordre d'idée, plusieurs protéines endogènes sont dégradées à l'intérieur des compartiments endosomiques de présentation antigénique. En effet, il existe un processus cellulaire qui permet de réarranger les membranes subcellulaires afin de séquestrer des organelles ou du cytoplasme, nommé l'autophagie (45). La vacuole membranaire formée fusionne avec les lysosomes afin de dégrader ces éléments cellulaires. Finalement, les peptides générés peuvent être présentés dans le contexte des molécules du CMH-II (22;46).

### **1.3.5.2 Sélection thymique**

Une des fonctions fondamentales des molécules du CMH se manifeste à la sélection thymique lors de la formation du répertoire des lymphocytes T (47). En effet, la maturation et la différenciation des thymocytes au niveau du thymus nécessitent un enchaînement séquentiel d'interactions avec les complexes CMH-peptides endogènes présents à la surface des cellules épithéliales thymiques (48). À cet égard, les molécules du CMH agissent en tant que jury

moléculaire et arbitre la destinée des thymocytes. Tout d'abord, la sélection positive permet de discriminer les thymocytes ayant la capacité de reconnaître les molécules du CMH. Ensuite, la sélection négative permet d'éliminer les thymocytes ayant une trop forte affinité pour le complexe CMH-peptide endogène et limite ainsi la possibilité de générer des clones autoréactifs potentiellement dangereux pour l'hôte (49).



**Figure 1.3 Les compartiments endosomiques et la voie de synthèse des molécules du CMH-II.**

Le système endosomique consiste en un vaste réseau de compartiments hétérogènes. La composition protéique, la morphologie et les propriétés biochimiques varient d'un compartiment à l'autre. L'intégrité du réseau endosomique est essentielle pour l'apprêtement de l'antigène et le chargement peptidique restreint par les molécules du CMH-II. Suite à leur biosynthèse, les complexes CMH-II/Ii cheminent dans cette voie à partir du TGN (voie principale) ou bien à partir de la membrane plasmique (voie secondaire). La liste des marqueurs est indiquée pour chaque compartiment. *Abréviations: Ii = chaîne invariante, LAMP-1 = lysosome-associated membrane protein, MIIC = MHC class II compartment, MPR = mannose 6-phosphate receptor, TfR = transferrin receptor. YAc = anticorps qui reconnaît le complexe CMH-II/ peptide de la souris (molécule I-Ab avec peptide de 17 acides aminés).* Traduit de Geuze, 1998 (50).

## **1.4 La Chaîne Invariante (Ii)**

### **1.4.1 Biosynthèse et ciblage endosomique du complexe CMH-II/Ii**

Suite à sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, les molécules du CMH-II s'associent à une protéine nommée la chaîne invariante (Figure 1.3). Cette association génère un complexe moléculaire nonamérique formé d'un trimère de chaînes invariantes associées individuellement à des hétérodimères  $\alpha\beta$  de classe II (51). La chaîne invariante détient trois fonctions principales: assurer un bon repliement de la molécule du CMH-II, empêcher la liaison de peptides endogènes et adresser le complexe Ii-CMH aux compartiments endosomiques grâce aux motifs de ciblage intracellulaire (51-54). Mis à part un peptide résiduel occupant la niche peptidique de la molécule du CMH-II, le fragment CLIP («class II-associated invariant chain peptide»), la chaîne invariante se trouve progressivement dégradée par diverses protéases et cathepsines (55;56). La relâche du CLIP et son échange pour un peptide antigénique de haute affinité se fait grâce à l'activité catalytique de HLA-DM (voir section 1.5). Finalement, le complexe CMH-II-peptide gagne la surface cellulaire où il interagit de façon spécifique avec les récepteurs T spécifiques des lymphocytes T accessoires (CD4+) (57).

### **1.4.2 Structure protéique de la Chaîne Invariante**

La chaîne invariante (Ii) a été découverte originalement lors d'études portant sur le polymorphisme des molécules du CMH-II (58). Cette protéine est particulièrement intrigante puisque son expression suit celle des molécules du CMH-II (59). De plus, elle possède plusieurs masses moléculaires et différentes charges. Depuis sa découverte en 1979, elle a fait objet de plus de 1000 projets de recherches scientifiques (58).

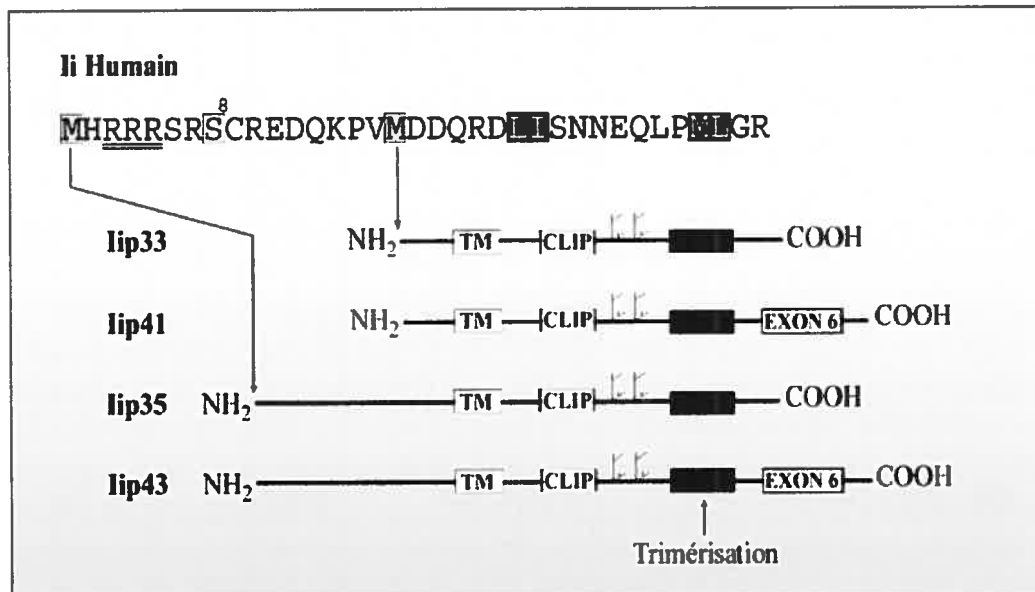
La chaîne invariante est une protéine transmembranaire de type II dont le nom témoigne de son faible niveau de polymorphisme et de sa mobilité conservée sur gel SDS-page bidimensionnel (60). La chaîne invariante est composée de trois régions principales. Il y a le domaine cytoplasmique N-terminale d'une taille de 30 acides aminés, le domaine transmembranaire entre les résidus 30 à 56, et finalement un domaine extracellulaire C-terminal d'une taille de 160 acides aminés (61-64). Chez l'homme, il existe une forme alternative de la chaîne invariante qui contient un segment additionnel de 16 acides aminés du côté N-terminal (65;66). Ce produit est le résultat de l'utilisation d'un site d'initiation alternatif par le ribosome lors de la traduction (67). De plus, deux formes additionnelles de Ii peuvent être synthétisées suite à un épissage alternatif de l'ARNm. L'exon 6 additionnel encode une section supplémentaire luminale de 64 acides aminés (64). En résumé, la chaîne invariante possède quatre isoformes protéiques distincts: la forme p33, p35, p41 et p43 (68)(Figure 1.4). La forme prédominante, p33, est retrouvée chez l'homme et la souris. Les formes p35 et p43 présentes chez l'homme, demeurent toutefois inexistantes chez le rat et la souris (60;69).

#### **1.4.2.1 Domaine cytoplasmique de Ii**

La queue cytoplasmique de la chaîne invariante détient plusieurs fonctions importantes au niveau du complexe Ii-CMH-II. Le domaine cytoplasmique possède deux motifs d'adressage intracellulaire de type dileucine permettant de cibler le complexe Ii-CMH-II aux compartiments endosomiques (voir section 1.13.2)(52;53;70). Ces motifs agissent au niveau du ciblage protéique à partir du TGN vers les lysosomes et lors de l'endocytose. La mutation de ces motifs résulte en une expression de surface de la chaîne invariante et engendre une augmentation de la demi-vie de la molécule (71). L'extension cytoplasmique de 16 acides aminés encode quant à elle un motif diarginine impliqué au niveau de la rétention au réticulum endoplasmique (voir section 1.12.2)(72). De plus,



deux sites de phosphorylation, essentiels à la sortie du complexe CMH-II-IiP35 du RE, s'y logent (73;74).



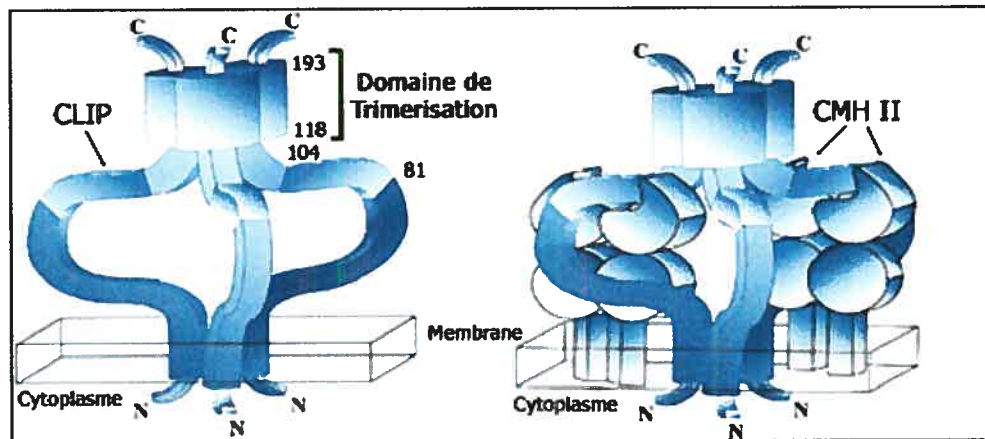
**Figure 1.4 Représentation schématique des isoformes de la chaîne invariante humaine.**

Le gène de la chaîne invariante produit deux ARN messager qui diffèrent suite à un épissage différentiel. De plus, l'utilisation de deux codons d'initiation pour chacun de ces ARNs produit les formes prédominantes p33 et p35, ou p41 et p43. La séquence primaire en acide aminé représente le domaine cytoplasmique de la chaîne invariante. On y retrouve plusieurs déterminants importants pour les fonctions de la chaîne invariante. Tout d'abord, les deux motifs dileucines de ciblage intracellulaire se retrouvent dans tous les isoformes (boîte noire). Ensuite, le motif de rétention diarginine (souligné) et le site de phosphorylation (boîte vide: sérine en position 8) sont seulement présents dans la chaîne p35 et p43. Finalement, les deux méthionines initient la séquence des différents isoformes. Inspiré de (75;76).

#### 1.4.2.2 Domaine extracellulaire de Ii

Le domaine extracellulaire constitue un élément critique de l'interaction avec les molécules du CMH-II et de la structure de la chaîne invariante. Les résidus 81 à 109, qui correspondent à la région CLIP, sont responsables de l'association entre la chaîne invariante et la niche peptidique du CMH-II (77). De plus, le

domaine de trimérisation, résidu 162-183, permet de former les complexes nonamériques constitués de trois chaînes invariantes associées à trois hétérodimères  $\alpha\beta$  du CMH-II (51;64) (Figure 1.5). Finalement, un domaine supplémentaire de 64 acides aminés présent dans la forme p41 et p43 est pourvu d'une région riche en cystéines, dont la fonction consiste à inhiber certaines cystéines protéases lysosomiques (78-80).



**Figure 1.5 Complexe nonamérique CMH-II / Ii**

Le complexe nonamérique consiste en un trimère de chaînes invariantes associées individuellement à des hétérodimères alpha-beta du CMH-II. Le domaine de trimérisation se trouve dans la portion c-terminale de la chaîne invariante (résidus 118-193). La région CLIP voisine est formée par les résidus 81 à 104. Celle-ci occupe la niche peptidique de la molécule du CMH-II. (Traduit de Cresswell, P., 1996 (81)). Veuillez noter que le troisième hétérodimère n'apparaît pas à droite pour faciliter l'observation de la structure.

### 1.4.3 Régulation génique

Le gène de la chaîne invariante n'est pas localisé dans le locus du CMH mais bien sur le chromosome cinq (61). Néanmoins, le partage de régions régulatrices transcriptionnelles permet une expression coordonnée entre les gènes du CMH-II et celui de la chaîne invariante. En effet, une séquence

activatrice en amont contient des séquences homologues aux boîtes W, X1, X2 et Y, éléments essentiels de tous promoteurs du CMH-II(82).

## 1.5 HLA-DM

La découverte de HLA-DM s'est faite presque simultanément par trois groupes indépendants à l'aide de différentes lignées B lymphoblastoïdes mutantes. Ces cellules exposent des phénotypes semblables. En effet, elles dévoilent des défauts de présentation antigénique malgré une expression normale de molécules du CMH-II (83-86). Tout d'abord, les molécules du CMH-II sont instables et sont associées en majorité avec le fragment CLIP de la chaîne invariante(84). Finalement, la présentation antigénique est efficace seulement lors de la présentation d'antigènes nécessitant aucun apprêtement : les peptides dérivés de protéines natives ne sont pas présentés efficacement (83). C'est seulement quelques années plus tard que ces groupes attribuent ces défauts de présentations antigéniques à l'inactivation ou à l'absence des gènes DM $\alpha$  ou DM $\beta$  (87;88).

### 1.5.1 Structure de HLA-DM

Par opposition aux molécules classiques du CMH-II, HLA-DM possède un polymorphisme très limité. Les variations sont dispersées à travers la séquence codante au lieu d'être concentrées uniquement au niveau de la niche peptidique (89;90). De plus, la structure de HLA-DM se distingue de celles des autres hétérodimères du CMH-II (91;92). Tout d'abord, l'homologie de séquence entre les chaînes respectives de DM et celles des autres molécules du CMH-II est de seulement de 30% (90;93;94). Ensuite, la structure cristalline de DM révèle une niche peptidique fermée dont l'ouverture n'accueille aucun peptide antigénique (91;92).

### 1.5.2 Fonction de HLA-DM

Le chargement des peptides antigéniques sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II s'effectue grâce à l'activité d'édition de la molécule HLA-DM (95). Cette protéine libère la niche du peptide de la chaîne invariante (CLIP) et catalyse la formation du complexe CMH-II-peptide de haute affinité dans les compartiments endosomiques tardifs (95-97). De plus, elle agit en tant qu'éditeur de la présentation antigénique, puisqu'elle favorise la liaison des peptides de haute affinité au détriment de ceux de faible affinité (96). Dans les lymphocytes B, l'activité de HLA-DM est régulée par une molécule du CMH classe II non classique nommée HLA-DO (98).

### 1.5.3 Adressage intracellulaire endosomique

Dans les cellules présentatrices d'antigènes humaines et murines, HLA-DM est localisée principalement dans les compartiments endosomiques tardifs spécialisés dans la présentation antigénique soit, les MIIC (voir section 1.8.2)(29;99). La localisation précise de HLA-DM à l'intérieur de ces compartiments endosomiques multivésiculaires est inconstante. Initialement, on retrouve DM au niveau de la membrane limitante des MVB et également aux membranes vésiculaires internes (29;100;101). Par contre, des études récentes suggèrent une localisation enrichie au niveau des membranes limitantes des compartiments multivésiculaires (102-104). À ce jour, ces divergences semblent être attribuables aux variations de types cellulaires.

HLA-DM possède un motif tyrosine typique d'adressage endosomique (YTPL) sur la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$ . Ce motif est conservé et on le trouve tant chez l'homme que chez la souris (29;100;101;105). Ce motif de type tyrosine est localisée à 10 résidus du domaine TM et une étude rapporte l'importance de la proximité entre le motif et la membrane plasmique (106). On retrouve ce type de motif sur un grand nombre de protéines

transmembranaires endosomiques, par exemple le récepteur de la transferrine, le récepteur mannose 6-phosphate et la protéine lysosomique, Lamp-1 (107-110). Le motif YTPL cible HLA-DM directement aux endosomes tardifs sans transit à la surface membranaire. La mutation de la tyrosine ou de la leucine conservée engendre une relocalisation en surface du complexe HLA-DM (29;101). Bien que DM possède des motifs de ciblage intracellulaire, l'absence de DM n'a aucun impact sur l'adressage de HLA-DR (111).

Lors de la présentation antigénique, les complexes HLA-DM circulent entre les compartiments endosomiques et la surface cellulaire, ce qui explique sa présence transitoire en surface(112). Toutefois, le motif puissant d'internalisation leurs assure un passage éphémère. Par ailleurs, l'expression de HLA-DM à la surface cellulaire peut être observée à de très faible niveau dans les cellules dendritiques immatures et les lymphocytes B. Aussi, on estime qu'entre 10 et 15% de la quantité totale de DM se retrouve à la surface cellulaire de certaines lignées B(19). Il semble que DM à la surface de ces cellules puisse interagir avec HLA-DR et faciliter le chargement de peptides exogènes.

## 1.6 HLA-DO

### 1.6.1 DO $\alpha$ et DO $\beta$ : les partenaires inattendus

Les gènes codant pour l'hétérodimère non classique HLA-DO soit, DOA (DZA ou DNA) et DOB sont localisés dans le locus du CMH-II. Étrangement, ces deux gènes occupent des positions chromosomiques éloignées l'une de l'autre, étant séparés physiquement par plusieurs gènes: DMA, DMB, TAP1, TAP2, LMP1 et LMP2. Cette organisation inattendue surprend, compte tenu que tous les gènes associés chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH-II sont habituellement regroupés par paires. De plus, l'expression non coordonnée des ARNm de DO $\alpha$  et DO $\beta$

semble à l'encontre d'un partenariat entre le produit de ces deux gènes. En effet, la stimulation d'une lignée cellulaire fibroblastique par un traitement à l'INF $\gamma$  induit une forte augmentation des transcrits de DO $\alpha$ , alors qu'elle ne semble pas augmenter ceux de HLA-DO $\beta$  (17). Ces observations expliquent le scepticisme des spécialistes face à la capacité de ces gènes à former un hétérodimère HLA-DO fonctionnel. De plus, certains proposent même que le gène HLA-DO $\beta$  murin (A $\beta$ 2) serait un pseudogène (113). Finalement, il a été démontré que les produits des gènes HLA-DNA et HLA-DOB s'associent pour former l'hétérodimère HLA-DO(114).

### 1.6.2 Expression Tissulaire de HLA-DO

Bien que la distribution tissulaire des molécules du CMH II murin se limite habituellement aux cellules présentatrices d'antigènes spécialisés et à certaines cellules épithéliales thymiques, l'expression de H2-O (l'homologue de HLA-DO chez la souris) paraît encore plus restreinte. En effet, H2-O s'exprime uniquement au niveau des cellules épithéliales thymiques de la médulla et à l'intérieur des zones B-dépendantes de la rate et des ganglions (lymphocytes B) (113). D'une part, la découverte d'H2-O $\beta$  à l'intérieur des cellules épithéliales thymiques suggèrent que DO puisse potentiellement avoir un rôle au niveau de la sélection négative. D'autre part, l'absence d'HLA-DO à l'intérieur des macrophages et des cellules dendritiques laisse entrevoir une fonction bien distincte des molécules du CMH II classiques et non classiques. Toutefois, il faut souligner les résultats d'une étude qui montre la présence de DO dans les cellules dendritiques (114). À ce jour, la présence de HLA-DO dans ces cellules n'a toutefois pas été confirmée par d'autres études. De plus, une étude récente effectuée dans notre laboratoire conclue que les cellules dendritiques dérivés de monocytes humains n'expriment pas le gène DOB(115).

Chez l'homme, la distribution thymique de HLA-DO est légèrement différente de son homologue murin, s'exprimant davantage au niveau du cortex qu'au niveau des cellules épithéliales médullaire(114). De plus, HLA-DO semble s'enrichir en périphérie des corpuscules de Hassall, pourtant eux-mêmes étant négatifs pour les CMH-II. Mis à part la distribution tissulaire légèrement distincte, la différence majeure de l'expression cellulaire de HLA-DO entre ces deux espèces réside dans sa présence à la surface cellulaire. En effet, les splénocytes des souris expriment H-2O en surface, alors que chez l'humain, HLA-DO est clairement restreint aux compartiments intracellulaire (113;114). Ces dernières observations suggèrent que l'hétérodimère HLA-DO possède une fonction qui diffère de la présentation directe de peptides exogènes aux TCR (114).

### **1.6.3 Localisation cellulaire**

À l'encontre des autres molécules du CMH-II, l'hétérodimère HLA-DO ne semble pas être présent à la surface cellulaire chez l'homme(114). Initialement, la localisation intracellulaire de HLA-DO fut observée uniquement au niveau du RE et de l'appareil de Golgi, et ne s'étend pas aux compartiments endosomiques(114). Par contre, plusieurs études subséquentes établirent clairement la présence de l'hétérodimère DO dans les compartiments endosomiques MIICs(98;116). De plus, elles mettent en évidence la capacité de HLA-DO de former des complexes stables avec HLA-DM(116).

### **1.6.4 Fonction de HLA-DO**

La fonction de HLA-DO consiste à inhiber l'activité de HLA-DM dans les compartiments endosomiques des lymphocytes B(117). Ce rôle de régulateur négatif lui a été attribué suite aux études démontrant l'incapacité des complexes DM-DO purifiés de catalyser l'échange de peptides sur les complexes DR3:CLIP *in vitro* (117). De plus, la formation du complexe DM-DO réduit la



quantité de la molécule DR3 SDS-stable. Ces résultats indiquent une structure imparfaite et l'absence d'un peptide stable dans la niche peptidique.

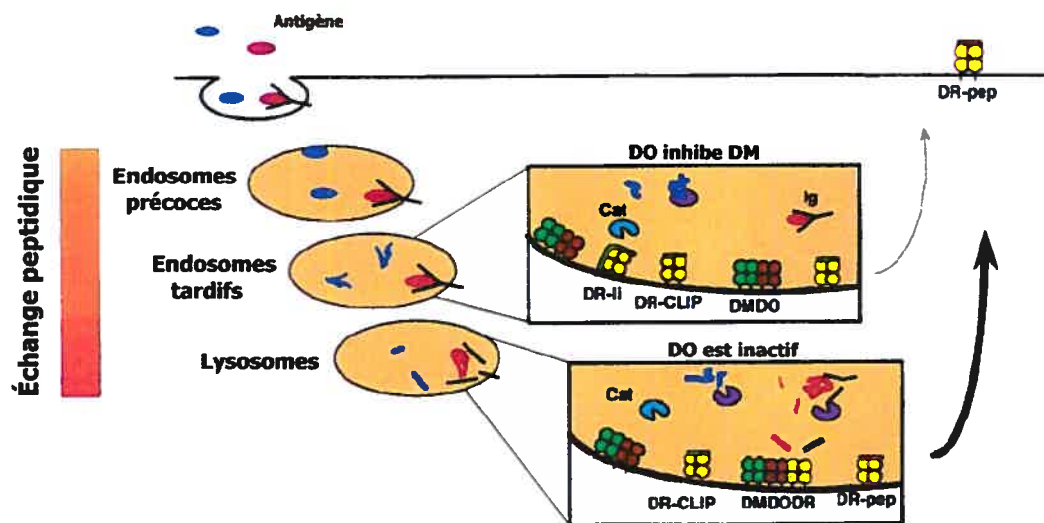
Le rôle de HLA-DO a été revu à la lumière d'études plus récentes qui lui attribuent plutôt un rôle de modulateur du répertoire peptidique associé aux molécules du CMH-II (118). En effet, la présence de DO abolit la liaison de peptides dont la masse moléculaire est inférieure à 18 kDa. L'analyse du répertoire peptidique par HPLC et par spectrométrie MALDI révèle des faits intéressants: la présence de DO inhibe la présentation de certains peptides et favorise la présentation de certains autres. Également, HLA-DO réduit la quantité de complexe DR3-peptide antigénique à la surface membranaire, comme l'indique la réduction des liaisons réalisées par l'anticorps 16.23, un anticorps spécifique aux complexes DR3-peptide. En conclusion, ces études démontrent que HLA-DO modifie le répertoire peptidique à la fois de façon quantitative et qualitative.

#### **1.6.4.1 Fonction physiologique de HLA-DO**

La fonction physiologique de HLA-DO fait encore l'objet de controverse. Malgré un phénotype faible, le premier *knock-out* de HLA-DO chez la souris (KO DO $\alpha$ ) éclaire sa fonction au niveau de l'apprêtement et de la présentation antigénique (119). Ces études exposent le rôle de DO sur le chargement des peptides à la surface des molécules du CMH-II (H2-Ab) dans les lymphocytes B. Aucune variation n'a été observée quant à la densité des molécules CMH-II à la surface cellulaire. Par ailleurs, une présentation accrue des antigènes internalisés par pinocytose dans les lymphocytes B dérivés de la souris DO $\alpha$  KO a été démontrée. Par contre, ces mêmes antigènes sont présentés de façon équivalente ou supérieure par la souris sauvage lorsqu'ils sont internalisés par les immunoglobulines de surface des souris transgéniques. Conséquemment, HLA-DO permet aux lymphocytes B de discriminer entre les différentes voies

d'entrée d'un même antigène. Ces études ont permis d'établir un modèle de la fonction physiologique de la molécule HLA-DO dans les lymphocytes B (Figure 1.6). HLA-DO favorise la présentation d'antigènes internalisés par les immunoglobulines à la surface membranaire.

Quelques années plus tard, le groupe de Karlsson révisé leurs résultats et complète l'analyse de la souris DO $\alpha$  KO (120). Plusieurs de leurs résultats sont contradictoires et contredisent leurs travaux antérieurs. Tout d'abord, la présentation des peptides dérivés de protéines antigéniques n'a pas été modifiée par la présence ou l'absence de HLA-DO lors de l'entrée de l'antigène par pinocytose. De plus, l'effet de DO sur la présentation d'antigènes internalisés par les immunoglobulines spécifiques varie selon l'épitope et le récepteur responsable de l'internalisation. En conclusion, il est proposé que le modèle original ne s'applique pas de façon générale puisqu'il est valide uniquement pour quelques combinaisons d'antigènes-récepteurs.



**Figure 1.6** Modèle de la fonction de HLA-DO dans les lymphocytes B.

Dans les lymphocytes B, les antigènes sont internalisés non spécifiquement par pinocytose (bleu) ou bien spécifiquement par les Ig de surface (bourgogne). D'une part, les peptides antigéniques générés dans les endosomes ne sont pas présentés à cause de l'inhibition de DM par DO dans ces conditions de pH. D'autre part, les antigènes liés aux anticorps à la surface membranaire sont protégés de la dégradation jusqu'aux lysosomes. À cet endroit, HLA-DO est inactif à cause du pH et la formation des complexes CMH-II/peptides survient efficacement. Ceci favorise la présentation des peptides dans ces compartiments et le transport à la surface cellulaire (Adapté de Alfonso et Karlsson, 2000 (121)).

#### 1.6.4.2 HLA-DO : Senseur d'acidité du complexe DM/DO

Le complexe DM-DO réside principalement à l'intérieur des compartiments endosomiques et lysosomiques des lymphocytes B (116). Ces compartiments sont caractérisés par un environnement riche en enzymes protéolytiques et par un milieu acide. Vu le spectre d'acidité des compartiments endosomiques, chacun de ces compartiments possède un environnement spécifique et génèrent potentiellement un répertoire différent de complexes CMH-II-

peptides. Si l'activité de DO est sensible au pH, alors elle sera alors bien différente d'un compartiment endosomique à l'autre (précoce vs tardif). Par conséquent, l'activité modulatrice de HLA-DO sur DM se traduirait par un changement du répertoire peptidique associé aux molécules du CMH-II à la surface de la cellule.

Afin de comparer l'activité de DO sur ces différents compartiments, des expériences *in vitro* de chargement peptidique ont été effectuées. Celles-ci permettent de conclure que l'inhibition de DM par DO est maximale à des pHs caractéristiques des endosomes précoces (pH 6.0) (118;119). En résumé, HLA-DO favorise la présentation des peptides antigéniques produits à l'intérieur des compartiments endosomiques tardifs (pH 5.0) dans les lymphocytes B. Pour tester cette hypothèse dans un système physiologique, ils tirent avantage de la bafilomycin A, inhibiteur de l'acidification des compartiments endosomiques spécifiques aux ATPases vacuolaires. Ces essais de présentation antigénique permettent de mesurer la contribution respective des compartiments endosomiques tardifs et précoces. Ces expériences mettent en évidence que l'expression de DO ne permet pas la présentation des peptides antigéniques dans le contexte d'une acidification endosomique incomplète. En d'autres mots, DO inhibe la présentation des peptides générés au niveau des endosomes précoces et favorise le chargement de ceux présents dans les compartiments endosomiques tardifs.

### **1.6.5 Régulation de l'expression de HLA-DO**

Plusieurs études suggèrent qu'HLA-DO serait une composante dynamique dans la voie de présentation antigénique des lymphocytes B. La régulation de l'expression de HLA-DO est en effet évidente lors du développement et de l'activation des lymphocytes B. Tout d'abord, l'expression de DO s'initie tardivement lors du développement des lymphocytes B chez l'homme. Bien

que l'expression de DM et de DR apparaissent précocement lors de la phase pro-B au niveau de la moelle osseuse, celle de DO se manifeste seulement chez les lymphocytes B matures(122;123).

L'initiation de la réponse immune humorale dans les organes lymphoïdes secondaires est orchestrée de façon à permettre l'interaction sélective entre les lymphocytes B et les lymphocytes T. La génération des centres germinatifs, où a lieu la différenciation des lymphocytes B, permet au évènement de maturation de l'affinité et de la commutation de classe de l'isotype. L'apprêtement et la présentation antigénique par le complexe CMH-II de la cellule B revêtent une importance centrale pour cette différenciation. Des études récentes suggèrent que malgré un niveau relativement stable des molécules HLA-DM et HLA-DR dans les lymphocytes B des centres germinatifs, l'expression de DO apparaît réduite de façon significative (122;124;125). Dans ce contexte, la diminution de l'activité de DO favoriserait l'efficacité de DM au niveau du chargement peptidique, permettant ainsi une présentation antigénique plus efficace de la part des molécules du CMH-II. De là, découle conséquemment une diversification du répertoire des complexes CMH-II-peptides présentés au TCR des lymphocytes T. Cette diversification peut potentiellement occasionner une augmentation du répertoire d'anticorps générés lors de la réponse immune (123).

Finalement, l'activation des lymphocytes B agit également sur le niveau d'expression d'HLA-DO. En effet, une réduction de l'expression de DO est observée suite à l'activation par la PMA ou via les récepteurs de surface (BCR) (122;124-126).

#### **1.6.6 Structure de la protéine HLA-DO**

Les séquences protéiques de HLA-DO exposent de remarquables similarités avec celles de HLA-DQ et de HLA-DR (16;17;127). Cette grande homologie

laisse sous-entendre une structure similaire. Effectivement, bien que la structure tridimensionnelles de HLA-DO demeure inconnue, elle semble adopter une conformation comparable aux molécules du CMH-II classique. En effet, des études de modélisation moléculaire suggèrent que la chaîne  $\beta$  de HLA-DO est compatible pour la formation d'un hétérodimère classique  $\alpha/\beta$  (128). Cette étude structurale de HLA-DO est basée sur la génération d'une molécule chimérique dans laquelle les 18 premiers acides aminés de  $DO\beta$  sont remplacés par ceux de  $DR\beta$ . Cette molécule chimérique s'associe avec la chaîne  $\alpha$  et l'hétérodimère ainsi formé possède une conformation adéquate. C'est la reconnaissance du complexe par L243, un anticorps conformère anti- $DR\alpha$ , qui permet cette observation. Ensuite, les tests de présentation des superantigènes SEA et TSST-1 aux cellules T confirment cette structure quaternaire adéquate. Finalement, des études d'alloréponse démontrent que la structure de  $DO\beta$  accommode l'interaction avec le co-récepteur CD4 (128), contrairement à ce que certains anticipent (25). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que HLA-DO adopte une conformation similaire aux molécules classiques du CMH-II. De plus, notre laboratoire vient tout juste de démontrer la formation de paires mixtes isotypiques entre les chaînes  $DO\alpha$  et  $DQ\beta$  (résultats non publiés, Diallo et Thibodeau). Finalement, les études de cristallisation amorcées dans le laboratoire, avec la molécule  $DO\alpha P11V/DO\beta$ , permettront de résoudre incessamment la structure de HLA-DO (129).

### **1.6.7 Transport intracellulaire de HLA-DO.**

Dans les lymphocytes B, HLA-DO demeure majoritairement associée à HLA-DM (117;130). Cette association permet à DO d'acquérir une conformation adéquate pour sortir du réticulum endoplasmique et atteindre les compartiments endosomiques (116). En effet, HLA-DO, par lui même, est incapable de quitter le RE en absence de HLA-DM (116). Bien que ces mécanismes de rétention demeurent inconnus, notre équipe s'est intéressée à les élucider. Nos résultats suggèrent que la rétention résulte d'une mauvaise association entre les chaînes

DO $\alpha$  et DO $\beta$  dans la région N-terminale de l'hétérodimère (Annexe 2)(129). En effet, les études de mutagenèse révèlent qu'une proline dans le domaine  $\alpha 1$  de DO $\alpha$  est responsable de la mauvaise association entre les chaînes DO $\alpha$  et DO $\beta$ . En effet, sa mutation restaure la conformation et la sortie de l'hétérodimère indépendamment de la molécule HLA-DM.

#### **1.6.8 Ciblage intracellulaire de HLA-DO.**

Le motif tyrosine de HLA-DM $\beta$  détermine principalement le ciblage du complexe HLA-DM/HLA-DO aux compartiments endosomiques. Toutefois, la queue cytoplasmique de HLA-DO $\beta$  comporte deux signaux potentiels d'adressage intracellulaire : un motif dileucine et un motif tyrosine imparfait (114;131). Typiquement, ces deux types de motifs garantissent le ciblage endosomique à partir du TGN (voir section 1.13). La contribution de ces deux motifs dans la localisation et la fonction du complexe DM/DO demeurent spéculatives. La première publication figurant dans cette thèse s'attarde à l'étude des motifs d'adressage intracellulaire endosomique encodés dans la queue cytoplasmique de DO $\beta$  (28). En résumé, nos expériences démontrent la présence d'un motif dileucine fonctionnel sur la queue cytoplasmique de DO $\beta$ .

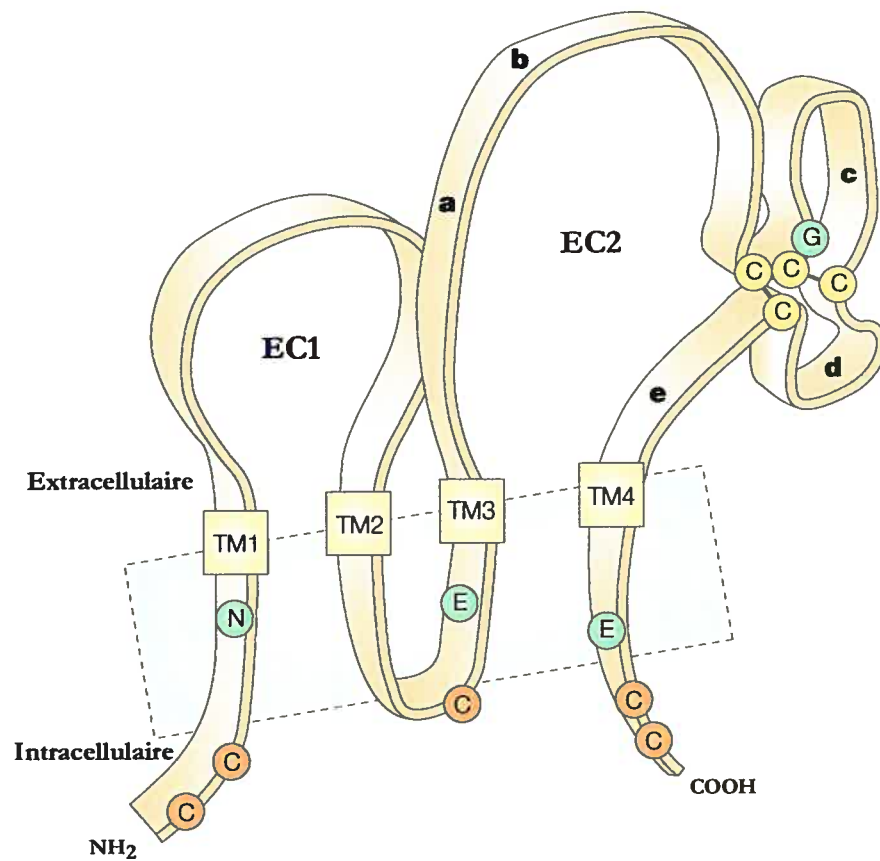
### **1.7 Les tétraspanes et la présentation antigénique**

Les tétraspanes sont des protéines transmembranaires caractérisées par la propriété singulière de former des complexes multimoléculaires entre elles et avec d'autres protéines membranaires (132). Elles s'expriment dans toutes les cellules, à l'exception des érythrocytes (132), et possèdent quatre domaines transmembranaires répartis entre deux domaines extracellulaires inégaux (EC1 et EC2) et deux courts domaines cytoplasmiques (133) (Figure 1.7). Les tétraspanines possèdent en outre la capacité de former des complexes multimériques avec certaines intégrines et le CMH-II à la surface des

lymphocytes B (134). L'association des CMH-II à l'intérieur des complexes tétraspanines persiste à l'intérieur des compartiments multivésiculaires de ces dernières. Certaines études suggèrent que les tétraspanines jouent un rôle dans les étapes dernières étapes de maturation des molécules du CMH-II (103). À titre d'exemple, CD63 interagit avec la forme stable du CMH-II, le complexe CMH-peptide. Il est ainsi proposé que CD63 sépare le complexe CMH-peptide de la fonction éditrice de HLA-DM (135;136). Les molécules non classiques HLA-DO et HLA-DM s'associent également à ces complexes multimoléculaires, mais la fonction de cette association demeure inconnue (103).

Bien que la fonction précise des tétraspanines ne soit pas encore connue, il apparaît clair qu'elles jouent un rôle crucial dans la biologie membranaire, possiblement en structurant les complexes multimoléculaires. En effet, il a été suggéré que les tétraspanines peuvent avoir un rôle de facilitateur moléculaire (133). Les fonctions précises des tétraspanines lors des différentes étapes de l'apprêtement et de la présentation antigénique sont encore méconnues.





**Figure 1.7 Structure schématique d'une tétraspanine « typique »**

Structure de la tétraspanine CD81 (137). Les tétraspanines sont caractérisées par deux domaines extracellulaires inégaux, EC1 et EC2. Le domaine EC2 est composé de trois hélices alpha (a, b et e) et contient le motif CCG, formé de cystéines conservées (cercle jaune). Le domaine CCG prend la forme d'un champignon grâce à des ponts disulfures (ligne noire) et à deux hélices alpha (c et d). Les quatre domaines transmembranaires (TM) possèdent des résidus polaires conservés (cercle vert). Les domaines cytoplasmiques détiennent plusieurs sites potentiels de palmytoylation (cercle orange). Traduit de Levy, 2005 (138).

Bien que la famille des tétraspanines compte 26 membres, seulement quelques-uns ont retenu l'attention des immunologistes, soit ceux des étapes tardives de la présentation antigénique. La protéine lamp-3 (CD63) est un membre de la famille des tétraspanines exprimée principalement à l'intérieur des compartiments endosomiques multivésiculaires. Elle est l'une des rares tétraspanines associées aux compartiments MIIC à l'intérieur des cellules dendritiques immatures (135). De façon pratique, les biologistes cellulaires l'utilisent à titre de marqueur pour identifier les compartiments endosomiques tardifs (101;139). D'autre part, les tétraspanines CD81 et CD82 semblent aussi participer à la composition des complexes multimoléculaires dont fait partie HLA-DM et HLA-DO. Finalement, les tétraspanines CD9, CD63, CD81 et CD82 sont enrichies au niveau des exosomes sécrétés par les lymphocytes B humain (140). On ignore toujours la fonction de ces tétraspanines à l'intérieur de ces microvésicules.

## 1.8 Le réseau endosomique

Le système endosomique/lysosomique est un réseau dynamique d'organelles acides impliquées dans l'internalisation, le ciblage et la dégradation des macromolécules. Ce réseau de compartiments se compose de vésicules membranaires en maturation constante et progressive (Figure 1.3). La distinction précise des sous-compartiments endosomiques représente toujours un défi de taille pour les biologistes cellulaires. Leur complexité, leur élasticité fonctionnelle, leur similarité morphologique, leur distribution intracellulaire éparses ainsi que le manque de marqueurs moléculaires discriminatoires gênent la caractérisation et l'identification des différents compartiments. Malgré ces obstacles, le réseau endosomique peut être disséqué en compartiments fonctionnellement distincts. On distingue quatre types principaux de compartiments endosomiques : les vésicules endosomiques primaires, les endosomes précoces (EE : « early endosome »), les endosomes tardifs (LE :

« late endosome ») et finalement les lysosomes (141)(Figure 1.3). Les protéines transmembranaires internalisées par l'intermédiaire des vésicules endosomiques primaires, peuvent être recyclées à la surface membranaire ou bien ciblées vers la lumière des endosomes pour y être dégradées. Les endosomes précoces agissent à titre de porte d'entrée principale pour le matériel internalisé par endocytose (142). Les endosomes tardifs représentent le site primordial d'entrée des hydrolases lysosomiques nouvellement synthétisées (143). Les endosomes tardifs et les lysosomes, riches en enzymes protéolytiques, sont responsables de la dégradation des protéines et des lipides dérivés du milieu extracellulaire et intracellulaire.

Curieusement, des lysosomes dont la fonction ne se limite pas aux catabolismes des macromolécules ont été identifiés dans certaines cellules. En plus de leurs fonctions conventionnelles, certains lysosomes accumulent des protéines nouvellement biosynthétisées à l'intérieur de granules ou corps vésiculaires, et agissent aux niveaux de la sécrétion du matériel accumulé. Ces lysosomes sont communément nommés lysosomes sécrétoires (144). Ces vésicules partagent plusieurs propriétés avec les exosomes (voir section 1.9). Les compartiments endosomiques détiennent également un rôle crucial dans la présentation antigénique. Il est maintenant bien établi que les étapes du chargement peptidique, dans le contexte des molécules du CMH-II, ont lieu à l'intérieur des compartiments endosomiques. En effet, les molécules du CMH-II se retrouvent localisées tout au long du réseau endosomique. L'environnement acide de ces compartiments est essentiel pour la dégradation des protéines antigéniques et pour un fonctionnement optimal de la machinerie de présentation antigénique (145).

### 1.8.1 Caractérisation et identification des compartiments endosomiques

Les techniques expérimentales utilisées pour faire la distinction et l'identification des différents compartiments endosomiques, bien que révélatrices, sont dans la plupart des cas incomplètes. La combinaison de ces différentes approches permet cependant d'identifier de façon relativement précise la nature des compartiments endosomiques. Classiquement, on utilise séquentiellement trois approches expérimentales (146). Tout d'abord, l'analyse morphologique utilise la microscopie électronique à haute résolution pour définir les structures cellulaires. Ensuite, les techniques de fractionnements cellulaires permettent d'entreprendre la caractérisation biochimique des compartiments isolés. Finalement, pour confirmer les analyses initiales de microscopie électronique, les compartiments purifiés sont de nouveau analysés par cette méthode. Il est possible d'obtenir de l'information supplémentaire sur la nature des compartiments endosomiques en étudiant les cinétiques d'endocytose de certains marqueurs de phases fluides, par exemple la transferrine ou le dextran (147). Ces marqueurs possèdent des cinétiques d'internalisation spécifiques et permettent d'identifier grossièrement la nature des compartiments endosomiques. Toutefois, la méthode la plus commune pour identifier un compartiment cellulaire demeure l'utilisation de marqueurs protéiques. En effet, l'enrichissement sélectif de certaines protéines à l'intérieur des différents types de compartiments cellulaires permet de les discriminer. Dans le même ordre d'idée, la communauté scientifique a même établi une nomenclature des protéines membranaires qui permet de distinguer les différentes populations lymphocytaires, le répertoire CD («cluster of differentiation»)(148).

Parmi les marqueurs utilisés pour identifier les différents compartiments endosomiques, on retrouve une famille de protéines, les rab GTPases, qui appartiennent à la superfamille des protéines ras (149). Les protéines de la

La famille des rabs possède des localisations distinctes à l'intérieur des compartiments endosomiques, correspondant à leurs rôles dans la régulation du trafic membranaire. La première protéine de cette famille utilisée pour décrire les compartiments endosomiques précoces est la protéine rab5. Celle-ci se retrouve au niveau des compartiments précoces où elle régule leur fusion homotypique et le transport au niveau de ces compartiments (150). La protéine rab4 est également exprimée dans les compartiments précoces où elle contrôle le ciblage de la voie de recyclage et de celle de la dégradation (151). La protéine rab7, quant à elle, est localisée à l'intérieur des compartiments endosomiques tardifs et lysosomiques (152). Elle régule les étapes tardives de la voie de transport endosomique (153).

Les endosomes précoces ont initialement été distingués grâce à la transferrine internalisée dans les cellules CHO (154). Cette internalisation provoque une accumulation transitoire du récepteur de la transferrine dans les endosomes précoces et les vésicules primaires. Il est donc possible de l'utiliser en tant que marqueur endosomique. Dans le même ordre d'idée, la protéine EEA1 (« Early endosome antigen 1 ») est une protéine membranaire hydrophile de 180 kDa présente dans les membranes des compartiments endosomiques précoces. Des études en microscopie démontrent une co-localisation avec le récepteur de la transferrine ainsi qu'avec la protéine rab5, mais aucune co-localisation avec le marqueur tardif rab-7 n'a été trouvée (155). EEA1 semble jouer un rôle dans la régulation du transport vésiculaire des endosomes précoces.

Les marqueurs des compartiments endosomiques tardifs et lysosomiques sont nombreux. Parmi ces marqueurs, l'un des mieux documentés est le récepteur mannose 6-phosphate (cation dépendant- et cation indépendant-). Les récepteurs mannose 6-phosphate ciblent les enzymes lysosomiques solubles du TGN vers les lysosomes où ils demeurent enrichis (143). D'autre part, le marqueur lamp-1 est également une protéine utilisée régulièrement pour

identifier les compartiments lysosomiques (156). Finalement, on utilise aussi les tétraspanines (CD63, CD81 et CD82) à titre de marqueur des compartiments endosomiques tardifs.

### **1.8.2 Les MIIC: compartiments endosomiques de présentation antigénique**

Initialement, les immunologistes favorisent le modèle selon lequel les cellules présentatrices d'antigènes développent des compartiments endosomiques spécialisés pour la présentation antigénique. En effet, dans les APC humaines et murines, la majorité des molécules du CMH-II semble résider à l'intérieur des compartiments endosomiques tardifs, site privilégié de l'apprêtement et du chargement de l'antigène(141). Dans les lymphocytes B, ces compartiments riches en molécules du CMH II se nomment compartiments de présentation antigénique du CMH II ou MIIC (MIIC : «MHC class II compartment»). Ces compartiments se caractérisent par une morphologie unique multivésiculaire ou multilaminaire (157;158). Plusieurs scientifiques partagent la conviction que l'expression des molécules du CMH-II induit la formation de ces compartiments à la morphologie singulière (159). Aujourd'hui, la terminologie MIIC regroupe l'ensemble des compartiments endosomiques tardifs, enrichis en molécules du CMH-II. Par contre, plusieurs études établissent sans équivoque l'existence de ces compartiments en l'absence d'expression des molécules du CMH-II. Ces travaux, dans l'ensemble, démontrent que les MIIC sont plutôt des compartiments endosomiques conventionnels simplement enrichis en molécules du CMH-II (50;141;160;161).

La notion d'un compartiment spécifique spécialisé dans la présentation antigénique a toujours été une idée plutôt controversée. En effet, plusieurs études décrivent des compartiments riches en molécules du CMH-II dont les caractéristiques biochimiques, morphologiques et phénotypiques présentent une grande hétérogénéité. En effet, les MIIC se caractérisent tout d'abord par

l'expression de la protéine membranaire LAMP-1, la tétraspanine CD63 et l'enzyme lysosomique hexosaminidase. Ce compartiment se caractérise également par l'absence des récepteurs de la transferrine. Collectivement, ces caractéristiques confirment la nature tardive de ce compartiment endosomique (162). Par contre, certains chercheurs ont rapporté l'accumulation d'une forte proportion des molécules du CMH-II à l'intérieur d'endosomes précoces des cellules B murine A20 (99;163;164). Ces compartiments participent également à la formation du complexe CMH-peptide. Sachant la nature dynamique de ces compartiments cellulaires, l'identification d'un compartiment unique complètement distinct où le chargement peptidique s'effectue devient futile. À cet égard, le modèle présentement préconisé dans la littérature stipule que le chargement peptidique peut être effectué de façon efficace autant dans les endosomes précoces que tardifs (165).

### **1.8.2.1 Morphologie des MIIC**

Les compartiments endosomiques tardifs possèdent une morphologie unique. Ils disposent d'un système complexe de vésicules internes enfermées dans une membrane limitante ou un réseau de membranes concentriques. Ces compartiments obtiennent respectivement l'appellation corps multivésiculaires (MVB : «multivesicular bodies») et compartiments multilamellaires (laminaires)(158). La fonction et la composition de ces sous-domaines membranaires demeurent indéfinies (166). À cet égard, les vésicules internes sont enrichies en un lipide non conventionnel, le LBPA. Celui-ci forme des domaines spécialisés à l'intérieur des endosomes (167). Il a été proposé que ce lipide régule le ciblage et le transport de la protéine MPR à l'intérieur de ces compartiments. Certaines protéines sont enrichies au niveau des membranes internes alors que d'autres sont exclusivement retrouvées à la membrane limitante (104). La régulation des échanges membranaires et le ciblage des

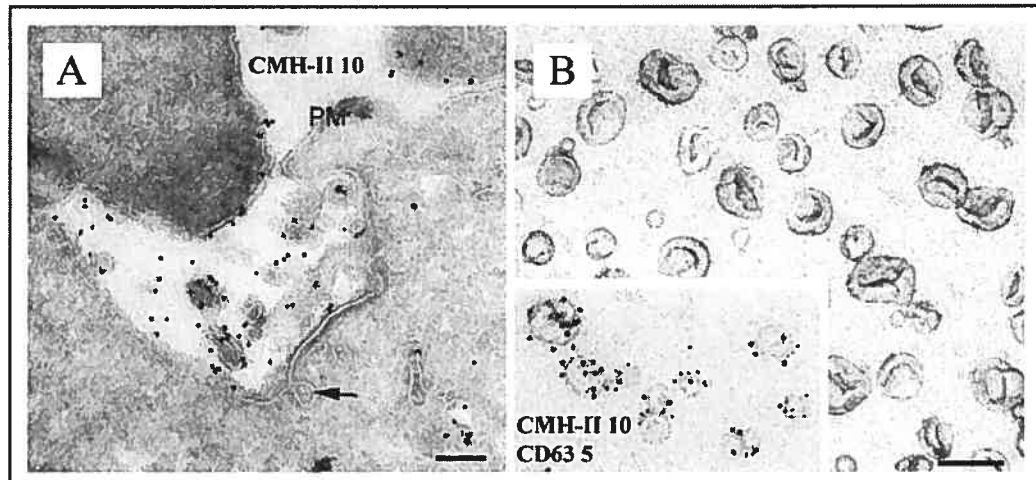
protéines à l'intérieur de ces compartiments semblent être réalisées en partie par la machinerie complexe des ESCRT et par le réseau des tétraspanes (132;168).

## **1.9 Les exosomes**

Jusqu'en 1983, l'observation de vésicules membranaires dans les milieux de culture cellulaire était considérée comme un artéfact produit par la fragmentation de la membrane plasmique. Une étude portant sur la maturation des érythrocytes a toutefois révélé l'existence et la fonction physiologique de ces microvésicules membranaires (169).

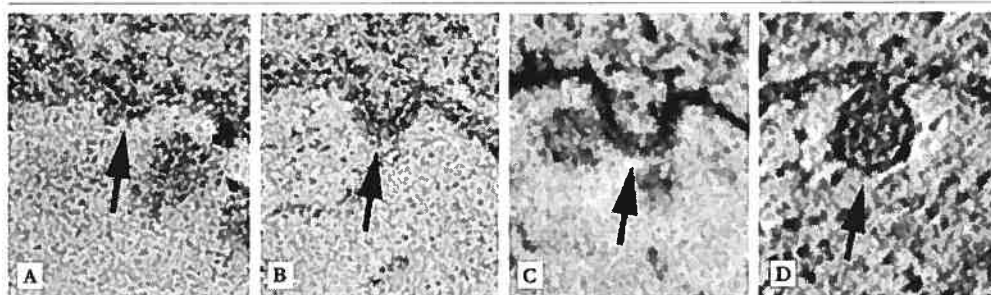
Les vésicules membranaires relâchées dans le milieu extracellulaire portent le nom d'exosome. Elles sont produites lors de la fusion du compartiment multivésiculaire avec la membrane plasmique (Figure 1.8 (A)). Elles sont également connues sous les appellations microvésicules, nanovésicules ou lysosomes sécrétoires (144). Les exosomes ont une taille approximative de 50 à 100nm. La formation des exosomes est produite par le bourgeonnement interne de la membrane limitante endosomique, suivi de son étranglement, et de la relâche, à l'intérieur du compartiment, de la vésicule ainsi formée (170)(Figure 1.9).





**Figure 1.8 Fusion d'un compartiment multivésiculaire avec la membrane plasmique et relâche des exosomes.**

A, Cryosection ultramince illustrant la fusion d'un compartiment MVB avec la membrane plasmique dans un lymphocyte B. Les exosomes relâchés dans le milieu extracellulaire sont positifs pour les molécules du CMH-II. La flèche indique un puits recouvert de clathrine. PM, membrane plasmique. (Barre:100nm). B, Analyse d'exosomes purifiés sur grille de microscopie électronique traitées au formvar-carbone. Les exosomes ont une taille variant entre 50-90 nm de diamètre. Ils expriment les molécules CMH-II (bille 10nm) et CD63 (bille 5 nm). Barre=100nm. Tiré de (171).



**Figure 1.9 Formation d'un exosome.**

Différentes étapes de la formation d'une vésicule interne dans un endosome multivésiculaire de la lignée cellulaire RN par reconstruction tomographique. La flèche indique le site de l'invagination et de la formation progressive de la vésicule membranaire. Tiré de (170).

La production cellulaire de ces vésicules semble être ubiquiste. En effet, plusieurs types cellulaires hématopoïétiques et non hématopoïétiques sécrètent les exosomes : les réticulocytes, les lymphocytes B et T, les plaquettes, les mastocytes, les mélanocytes, les cellules épithéliales intestinales, les cellules dendritiques et plusieurs lignées cellulaires tumorales(172).

### **1.9.1 Fonction des exosomes**

À ce jour, les recherches effectuées démontrent l'implication de la voie exosomale dans plusieurs processus cellulaires, notamment dans les cellules hématopoïétiques. Les exosomes détiennent des propriétés effectrices spécialisées variant selon le type cellulaire, et qui dépendent habituellement des protéines cellulaires incorporées spécifiquement dans la lumière ou la membrane de l'exosome.

#### **1.9.1.1 Les réticulocytes**

Les exosomes ont initialement été découverts dans les réticulocytes (173). Ces dernières constituent un type cellulaire unique pour étudier les échanges membranaires. En effet, ces cellules sont presque dénudées de système golgien et de réticulum endoplasmique. Le trafic membranaire y est limité à l'internalisation de certains récepteurs, comme le récepteur de la transferrine, et à l'expulsion de vésicules membranaires, les « carrier vesicles ». Lors de sa maturation en érythrocyte, le réticulocyte doit éliminer plusieurs protéines transmembranaires. Il perd ainsi sa capacité à lier la transferrine et à transporter le glucose par la perte de protéines membranaires spécifiques. Les réticulocytes en maturation utilisent la voie exosomale pour éliminer ces récepteurs obsolètes (173-175). En résumé, ces recherches supportent l'hypothèse que la fonction principale des exosomes consiste à l'élimination de protéines membranaires superflus.

### 1.9.1.2 La fonction des exosomes dans les cellules immunes

Plusieurs travaux récents confirment la production des exosomes dans une variété de cellules immunes et illustrent l'importance de ces vésicules pour les fonctions effectrices de ces cellules. Initialement, le groupe de Hans J. Geuze a démontré la fusion des compartiments multivésiculaires avec la membrane plasmique dans les lymphocytes B humains transformés avec le virus EBV. Ceci permet la relâche de microvésicules dans le milieu extracellulaire. Ces exosomes sont caractérisés par un enrichissement en molécules du CMH-II qui peuvent stimuler les lymphocytes T CD4+ *in vitro* (176) (Figure 1.8 (B)). Ces auteurs suggèrent que les exosomes peuvent avoir une fonction physiologique importante *in vivo* lors de la présentation antigénique. D'autres chercheurs ont en outre émis l'hypothèse que les exosomes utilisent une voie indirecte pour stimuler le système immunitaire. En effet, les cellules dendritiques transfèrent les complexes CMH-II/peptide spécifiques, via les exosomes, vers les différentes cellules dendritiques du système immunitaire. Ce transfert permet de potentialiser la réponse spécifique envers un antigène donné (177). De façon similaire, certains groupes ont émis l'hypothèse que les cellules dendritiques folliculaires accaparent les complexes CMH-II-peptide en provenance des lymphocytes B. Le mécanisme demeure toutefois inconnu (178).

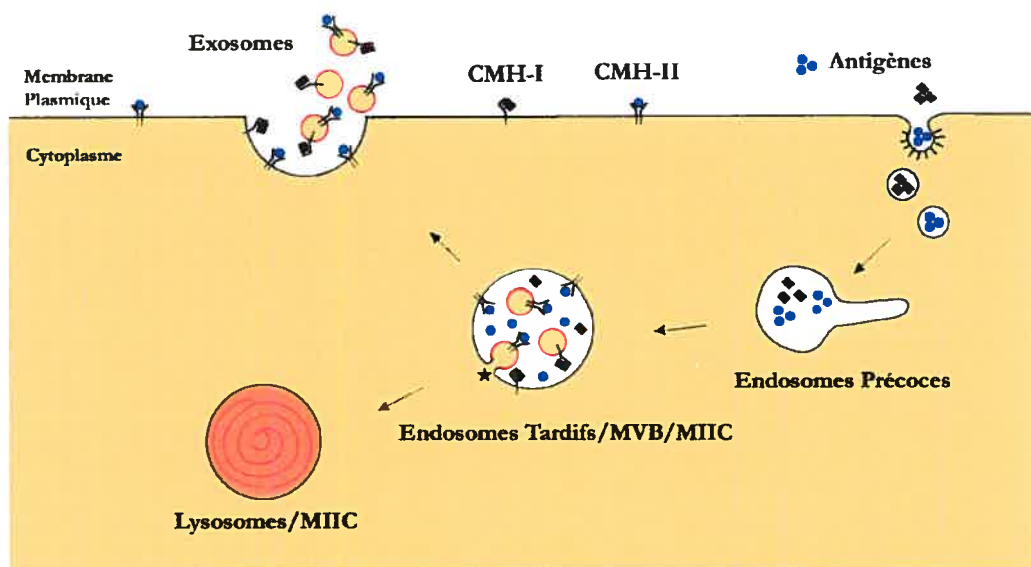
Il est facile de faire le lien entre la sécrétion exosomale observée dans les lymphocytes B et celle bien décrite au niveau des lymphocytes T et des cellules NK. En effet, ces cellules ont la capacité de détruire les cellules tumorales et infectées via des granules cytolytiques ou lysosomes sécrétoires (179;180). Ces granules se caractérisent morphologiquement par une structure très dense et par une région riche en membranes et vésicules internes (181). De plus, ces vésicules membranaires contiennent des protéines cytotoxiques : les perforines et les granzymes (180;182;183). D'autre part, les plaquettes sanguines utilisent aussi des granules, les granules alpha, pour sécréter des agents coagulants,

comme par exemple la sérotonine et la p-sélectine(184). Les plaquettes activées relâchent également à l'intérieur de ces vésicules des glycoprotéines adhésives, le facteur von Willebrand (VWF) et le fibrinogène (185).

Finalement, les travaux du groupe d'Amigorena mettent en évidence l'importance des exosomes sécrétés par les cellules dendritiques (186). En effet, les exosomes sécrétés par les cellules dendritiques sont enrichis en molécules du CMH-I et en molécules co-stimulatrices des lymphocytes T, CD86 (B7-2) (187-189). Ceci leur permet d'activer une forte réponse cytotoxique (CD8). De plus, ces exosomes ont également la capacité d'induire l'activation de lymphocytes T CD4+ naïves *in vivo* grâce à la présence des complexes CMH-II-peptides à leur surface (190)(Figure 1.10). Le développement de nouvelles techniques d'immunothérapie, qui mettent à profit ces propriétés immunostimulatrices des exosomes dérivés des cellules dendritiques humaines, est présentement en cours. En effet, les dexosomes («dendritic cell derived exosomes») chargés avec certains peptides tumoraux peuvent engendrer une forte réponse anti-tumorale *in vivo* (186). En conclusion, la versatilité des mécanismes menant à la sécrétion exosomale explique la variété de fonctions effectrices que peuvent accommoder ces vésicules membranaires (191).

### 1.9.2 La biogenèse et le ciblage exosomal

Il est impossible d'entreprendre la description de la biogenèse des exosomes sans adresser les différentes étapes de la formation des compartiments endosomiques multivésiculaires. Le lien entre ces deux processus est indéniable (192). De plus, il est difficile de séparer les étapes qui mènent à la formation des MVB de celles qui mènent au ciblage protéique exosomal: ces deux processus agissent de concert.



**Figure 1.10 Représentation schématique de la biogenèse et de la relâche des exosomes dans une cellule présentatrice d'antigènes.**

Les compartiments multivésiculaires font partie des endosomes tardifs. Les vésicules internes sont formées par un bourgeonnement interne dans la lumière du compartiment. Elles possèdent deux domaines membranaires distincts : la membrane limitante (noir) et les membranes internes (rouge). Ces vésicules internes seront soit dégradées lors de la maturation du compartiment ou soit sécrétées dans le milieu extracellulaire sous la forme d'exosomes. Les molécules du CMH-I et CMH-II s'expriment à la surface membranaire et cheminent tout au long de la voie endosomale. Elles s'accumulent également dans les membranes des vésicules internes des compartiments MVB. Les complexes CMH-peptides formés dans ces compartiments sont finalement exprimés à la surface cellulaire ou aux membranes exosomales. Traduit de (76;193).

### 1.9.2.1 Les complexes ESCRT

Les connaissances actuelles sur les mécanismes concernant le ciblage moléculaire vers les membranes exosomales sont incomplètes. Les principales études s'adressant au ciblage protéique à l'intérieur des compartiments multivésiculaires (les vacuoles) ont été effectuées dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il a été démontré que les produits protéiques de la

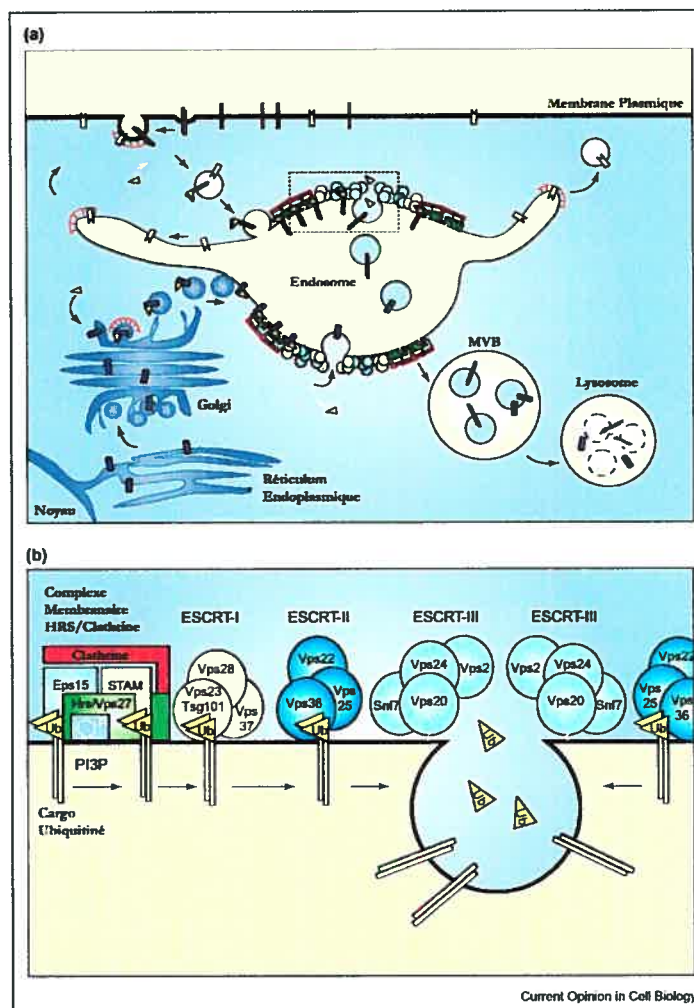
sous-famille des gènes VPS de classe E sont impliqués dans le ciblage aux compartiments multivésiculaires (194). Les mutations de ces gènes affectent le ciblage protéiques et génèrent des compartiments endosomiques difformes, nommés compartiments de classe E (195). Les gènes VPS possèdent des orthologues dans les autres organismes, ce qui suggère une conservation des mécanismes moléculaires de ciblage vers les compartiments MVB.

Les principaux complexes protéiques impliqués dans le ciblage vers les compartiments multivésiculaires font partis de la famille des ESCRT, «Endosomal Sorting Complexes Required for Transport». Il existe trois complexes ESCRT : ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III (Figure 1.11). Le complexe ESCRT-I est formé de trois sous unités : vps23 (Tsg101 chez l'homme), vps28 et vps37. Les complexes ESCRT-II et ESCRT-III sont également composés de plusieurs sous unités (196). Ces complexes fonctionnent de façon séquentielle pour le ciblage protéique et pour la formation des compartiments multivésiculaires (194;197).

Chez l'homme, la première étape du ciblage au niveau des MVB consiste à la formation d'un complexe protéique composé de HRS (Vps37), Eps15, STAM et de la clathrine (196)(Figure 1.11 (B)). Ces protéines sont maintenues à la membrane endosomique grâce au lipide endosomique phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P). Ce dernier interagit avec le domaine FYVE de la protéine Hrs (198;199). De plus, la protéine Hrs interagit avec les protéines membranaires monoubiquitinées (200). Ce complexe transfère le cargo ubiquitiné au complexe ESCRT-I. L'interaction entre Hrs et le domaine PTAP de la protéine Tsg101 favorise l'interaction entre ces deux supercomplexes et le recrutement initial de ESCRT-I à la membrane endosomique (201). La sous-unité Tsg101 du complexe ESCRT-1 interagit également avec les protéines membranaires ubiquitinées (202;203). Finalement, le récepteur ubiquitiné est ensuite relayé au complexe ESCRT-II, qui s'associe à la membrane de façon

transitoire, pour l'incorporation dans la membrane vésiculaire. La formation de la vésicule est rendue possible en partie par la déformation membranaire grâce à la polymérisation du complexe ESCRT-III. Chez la levure, l'entrée du cargo à l'intérieur de la vésicule interne est suivie d'une déubiquitination par la protéine Doa4 (204;205).

La voie métabolique des compartiments multivésiculaires est essentielle pour cibler les protéines membranaires vers la lumière vacuolaire (194). Certains récepteurs sont ciblés à la vacuole pour réduire leur expression membranaire (194). Le ciblage à l'intérieur des vésicules permet aussi à certaines protéines transmembranaires d'atteindre une maturité fonctionnelle grâce à une hydrolyse qui génère une forme soluble et fonctionnelle de la protéine (206). Finalement, le ciblage vers les vésicules internes permet aux protéines d'atteindre la voie exosomale de sécrétion (193).



**Figure 1.11** Modèle du ciblage dans les endosomes multivésiculaires par les complexes ESCRTs.

A) Représentation schématique générale du ciblage du cargo ubiquitiné aux endosomes multivésiculaires. Les protéines membranaires provenant du réticulum endoplasmique (violet) ou de la membrane plasmique (blanc), sont ubiquitinées au niveau des domaines cytoplasmiques (drapeau jaune). L'ubiquitination des protéines donne accès aux vésicules internes des endosomes. Ces vésicules sont finalement détruites lors de la maturation des endosomes ou bien sécrétées sous la forme d'exosomes. B) Le recrutement des protéines ubiquitinées dans les microdomaines membranaires endosomaux se fait par le complexe HRS-clathrine. Les protéines sont ensuite relayées séquentiellement entre les trois complexes ESCRT. La déubiquitination des protéines est effectuée avant la relâche de la vésicule. Traduit de Raiborg (196).



### **1.9.2.2 Monoubiquitination**

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés exprimée dans toutes les cellules eucaryotes. Cette protéine est hautement conservée depuis la levure jusqu'à l'homme (207-209). Le domaine C-terminal de l'ubiquitine peut être conjugué de façon covalente aux résidus lysine de certaines protéines cibles. Cette modification post-traductionnelle se nomme ubiquitination. On retrouve deux types d'ubiquitination protéique: la polyubiquitination et la monoubiquitination. La polyubiquitination joue un rôle fondamental au plan de la maintenance de l'homéostasie cellulaire en ciblant les protéines vers la dégradation protéosomale (210). Cette réaction crée un lien isopeptidique entre une chaîne d'ubiquitine et une protéine accepteuse, et permet leur reconnaissance par la sous unité S5a du protéasome 26s humain (211). Ce phénomène cellulaire est extrêmement bien caractérisé dans la littérature scientifique (212). La monoubiquitination quant à elle est davantage impliquée au niveau de l'adressage intracellulaire endosomique (Figure 1.11 (A)). En effet, la monoubiquitination agit en tant que signal d'endocytose pour les récepteurs à la surface membranaire (213).

### **1.9.3 La régulation de l'exocytose exosomale**

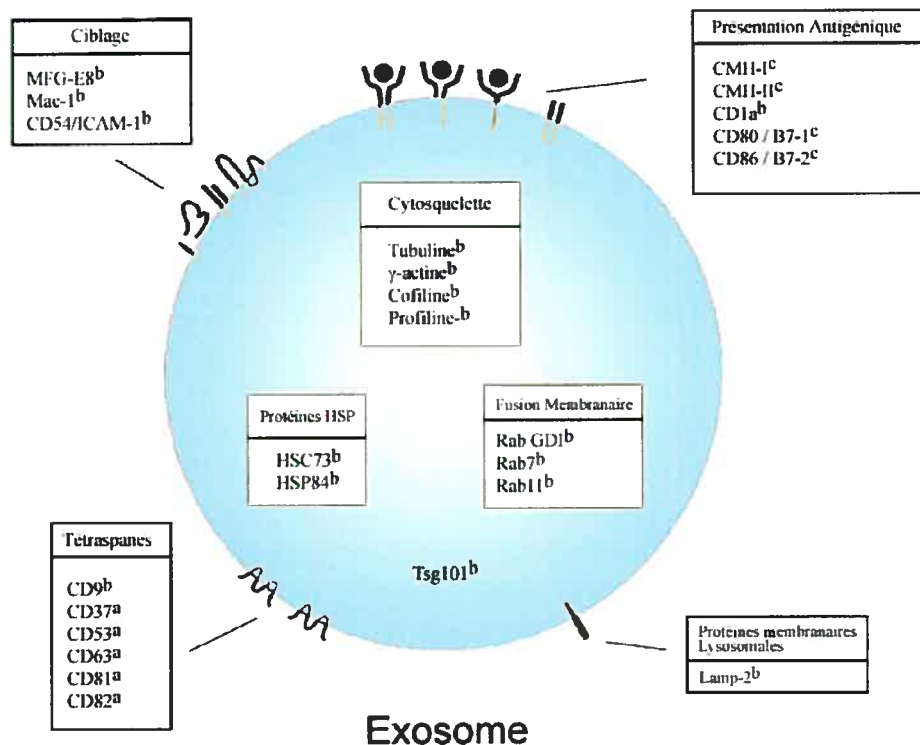
Les mécanismes qui régularisent la voie de sécrétion exosomale demeurent indéfinis. Par contre, il est possible d'établir des analogies entre la régulation de la sécrétion exosomale et celle des lysosomes sécrétoires. En effet, dans les lymphocytes T cytotoxiques, la liaison du récepteur T membranaire est nécessaire pour activer l'exocytose des granules lytiques. Cette liaison du récepteur engendre une mobilisation du calcium intracellulaire et une relâche subséquente des granules dans le milieu extracellulaire (214). De plus, cette mobilisation de calcium est aussi impliquée dans l'exocytose des lysosomes pour la réparation de la membrane plasmique (215). Ces deux phénomènes

dépendent complètement des protéines synaptotagmines. Ces protéines lient les membranes cellulaires de façon calcium-dépendante et régulent l'exocytose des granules sécrétoires (216). Dans le même ordre d'idée, il a été montré que le « cross-link » de protéines membranaires par des anticorps spécifiques favorise l'entrée de récepteurs à l'intérieur des exosomes (TfR et AChE)(217).

D'autre part, certaines études suggèrent l'importance des protéines Rab dans la régulation de la voie exosomale (voir la section sur la caractérisation et l'identification des compartiments endosomiques). L'utilisation de la protéine Rab-11 dominant négative bloque significativement la relâche exosomale dans les cellules K562 (218). En terminant, soulignons que l'utilisation de cellules de patients atteints du syndrome Chediak-Higashi (CHS) permettra d'éclaircir les mécanismes de régulation de l'exocytose dans les cellules hématopoïétiques. Le syndrome CHS est le résultat de défauts génétiques et se retrouve naturellement tant chez l'homme que la souris (219). Toutes les cellules CHS observées sont caractérisées par l'apparition de gigantesques lysosomes (220). Ceci résulte de l'incapacité de la cellule mutante à sécréter son contenu lysosomique (221). Curieusement, ce défaut semble uniquement nuire à la fonction des cellules hématopoïétiques, qui ont la capacité de sécréter leurs lysosomes sécrétoires ou exosomes. Il sera donc fort intéressant d'étudier la sécrétion exosomale dans les lymphocytes B et les cellules dendritiques de patients atteints du CHS.

#### **1.9.4 Composition protéique et lipidique des exosomes**

Les approches protéomiques ont permis d'établir la composition protéique de certaines populations cellulaires, notamment dans les cellules dendritiques murines et les lymphocytes B humains (222;223). Ces travaux confirment plusieurs études biochimiques entreprises antérieurement par différents groupes.



**Figure 1.12 Composition protéique des exosomes**

Fonctions associées aux protéines cellulaires retrouvées à la membrane ou à l'intérieur des exosomes des lymphocytes B (a), des cellules dendritiques (b) ou de ces deux cellules (c). Traduit de Geuze, 2002 (224).

Conjointement, ces études démontrent que la majorité des protéines incorporées dans l'exosome sont impliquées dans le fonctionnement ou la composition des compartiments endosomiques (Figure 1.12). On y retrouve des protéines impliquées dans le transport membranaire (Rab7, Rab11, clathrine) et dans la signalisation intracellulaire (annexine, Rap1b, syntenine). Les tétraspanines (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82) semblent également être enrichies dans la membrane exosomales de façon ubiquiste (140;222). On y retrouve

également plusieurs protéines associées aux cytosquelettes (cofilin1, profiline-1, EF-1, actine, tubuline). Finalement, plusieurs études confirment l'enrichissement des molécules du CMH-I et du CMH-II, ainsi que des molécules co-stimulatrices CD86, dans les exosomes des provenant CPA (140;190;222).

Les membranes des exosomes possèdent une composition protéique bien distincte de la membrane limitante du compartiment multivésiculaire. En effet, bien que les exosomes des lymphocytes B humain soit enrichis en molécules du CMH-II, on n'y retrouve jusqu'à maintenant aucune trace de HLA-DM. De plus, les mêmes études démontrent que les protéines Lamp-1 et Lamp-2, de façon similaire à HLA-DM, sont surtout présentes à la membrane limitante des MVB (140).

Curieusement, plusieurs protéines et lipides, traditionnellement associés aux radeaux lipidiques, sont retrouvés dans les membranes exosomales (225). Les radeaux lipidiques sont des domaines membranaires riches en cholestérol et en glycosphingolipides, et contiennent plusieurs protéines à ancrage GPI. Ces études démontrent la présence de ces microdomaines à l'intérieur des membranes exosomales et suggèrent leur implication comme plate-forme régulatrice des échanges membranaires exosomales (225).

### **1.9.5 "Trojan exosome hypothesis"**

Une hypothèse récente suggère que les rétrovirus exploitent le système exosomal de communication intercellulaire afin d'assurer leur assemblage ainsi que leur propagation (226). Cette idée pris naissance à la suite d'observations où le virion d'HIV-1 incorporait des protéines lysosomiques de l'hôte lors de sa biogenèse. De plus, cette idée est supportée par la découverte du bourgeonnement intracellulaire au niveau des compartiments endosomiques

tardifs dans les macrophages (227;228). Cette théorie présuppose que le virion du VIH a la capacité d'incorporer des protéines de l'hôte, dont la fonction consiste à cibler les exosomes vers certaines cellules cibles. De plus, l'incorporation de certaines protéines pourrait protéger d'une lyse par le complément (229). L'exosome devient un vecteur de dissémination idéal pour le virus. Cette hypothèse explique l'infection inattendue de cellules qui n'expriment pas les récepteurs membranaires de la gp120. La voie exosomale d'entrée serait une voie alternative, mais sans doute moins efficace, pour l'entrée du virus.

### **1.10 Transport intracellulaire**

La cellule constitue un environnement extrêmement dynamique où les échanges entre les différents compartiments intracellulaires se font de manière continues. L'homéostasie intracellulaire est essentielle à l'intégrité et au fonctionnement des divers compartiments. Il n'est donc pas surprenant de constater que l'échange et le transport des différentes macromolécules sont des processus hautement régulés. Le transport de protéines entre les différents compartiments cellulaires des organismes eucaryotes se nomme transport vésiculaire.

Le ciblage des protéines dans la voie de sécrétion débute dès leur synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux, où les protéines cargos sont sélectionnées afin d'être transportées vers leurs multiples destinations intracellulaires ou extracellulaires. Ces protéines doivent ensuite progresser à travers les saccules du réseau golgien, où plusieurs d'entre elles acquièrent des modifications post-traductionnelles, pour finalement aboutir au TGN. Cette organelle constitue l'une des principales stations de triage lors de l'adressage intracellulaire des protéines transmembranaires et solubles. D'une part, la sélection implique la reconnaissance de signaux intracytoplasmiques, encodés sur les queues

cytoplasmiques des protéines transmembranaires par des protéines cytosoliques spécialisées. Ces protéines cytosoliques participent à la formation d'un manteau au site de formation de la vésicule de transport. D'autre part, les hydrolases destinées aux compartiments lysosomiques sont reconnues par un étiquetage moléculaire qui consiste en un résidu mannose-6 phosphate. Ce signal, reconnu par les récepteurs des M-6P, permet l'accès direct aux lysosomes. Finalement, les protéines solubles destinées à la voie de sécrétion atteignent des compartiments spécialisés et, suite à un stimuli approprié, sont relâchées dans le milieu extracellulaire.

### **1.10.1 Transport vésiculaire**

Le transport des protéines entre les différents compartiments intracellulaires lors de la biosynthèse se caractérise par une série d'événements nommés transport vésiculaire. Il se compose essentiellement de trois étapes. La première concerne l'enrichissement sélectif d'un cargo moléculaire à une membrane donnée, puis le recrutement et l'assemblage d'un complexe de protéines structurales et d'adaptateurs cytosoliques, qui dirigeront la sélection du cargo et la déformation de la membrane. La seconde étape est celle du bourgeonnement. La déformation et la constriction de la membrane donnent naissance à une vésicule de transport. L'étape finale du transport se réalise lorsque la vésicule s'accoste et se fusionne à une membrane accepteuse appropriée. Cette dernière séquence d'événements est dirigée par une superfamille de protéines nommée SNARE, récepteur de SNAP («SNAP receptor»)(230). Les protéines SNARE, responsables de la fusion membranaire entre la vésicule de transport et la membrane cible, forment un complexe qui crée un lien physique entre les deux membranes. Cette fusion requiert la présence de protéines SNARE correspondantes à la surface des deux membranes, la V-SNARE (Synaptobrevin) sur la membrane vésiculaire et la T-SNARE (Snap-25) sur la membrane cible (231). L'assemblage des SNARE

crée un pont entre les deux membranes et facilite le mélange des bicouches lipidiques (232;233).

## **1.11 Endocytose**

L'endocytose est le mécanisme cellulaire qui permet d'internaliser diverses macromolécules vers l'intérieur de la cellule. Elle se manifeste par une invagination interne de la membrane, suivie de sa constriction, et finalement de la formation d'un compartiment nommé endosome. Ce phénomène, présent chez toutes les cellules eucaryotes, leur permet d'interagir continuellement avec le milieu ambiant et d'internaliser des protéines membranaires. On retrouve quatre différents types d'endocytoses : la phagocytose, la pinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine (EDC), et l'endocytose indépendante de la clathrine (EIC).

### **1.11.1 Phagocytose**

Comme son nom l'indique, la phagocytose signifie « manger » un corps cellulaire. La phagocytose consiste en un type d'endocytose qui se trouve surtout dans certains types de cellules spécialisées (234). Les macrophages et les neutrophiles utilisent ce mode d'internalisation pour engouffrer de grosses particules extracellulaires ( $>0.5 \mu\text{m}$  en diamètre), comme des corps apoptotiques ou des bactéries. L'engouffrement du corps se fait à la fois par la membrane cellulaire et le cytoplasme qui l'entoure. La vacuole ainsi formée se nomme phagosome. Enfin, celle-ci fusionne avec les lysosomes afin de permettre la dégradation enzymatique du corps étranger (234).

### **1.11.2 Pinocytose (endocytose de phase fluide)**

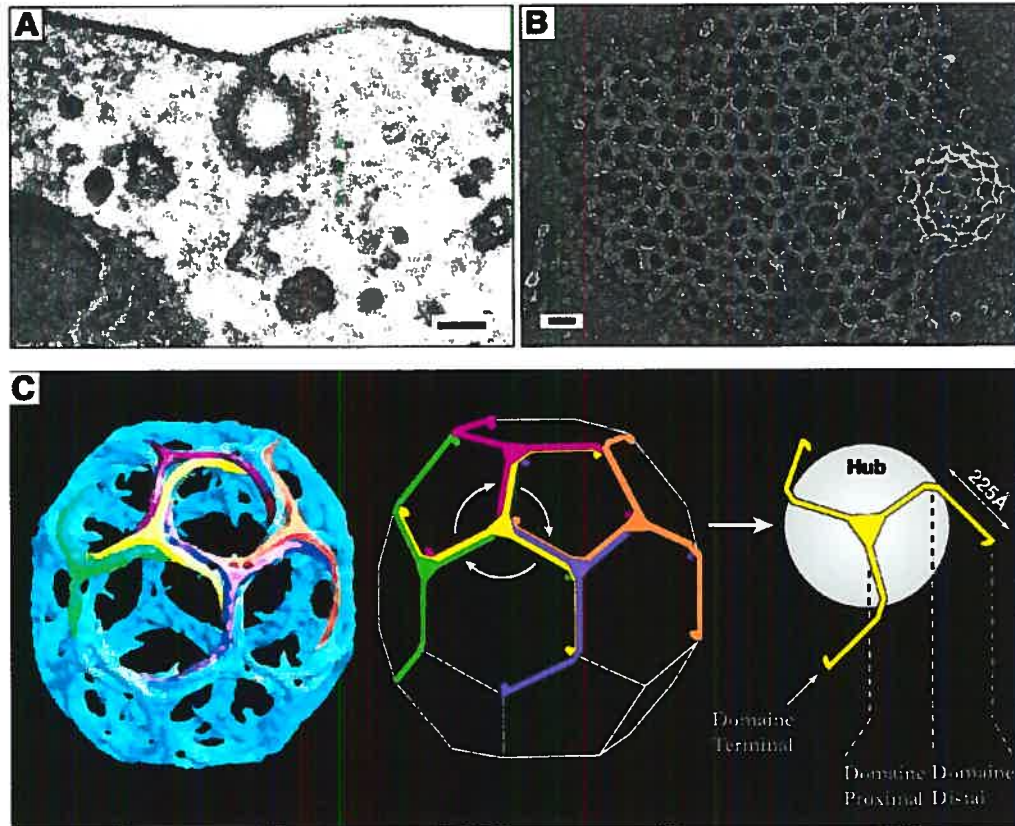
La pinocytose est l'action de boire pour une cellule. Ce type d'endocytose se trouve dans toutes les cellules eucaryotes et se manifeste continuellement. Les

cellules utilisent la pinocytose pour chercher les nutriments dans le milieu extracellulaire. Elle leur permet également de faire un échantillonnage du milieu ambiant. Contrairement à la phagocytose, la vésicule formée par l'étranglement de la membrane cellulaire est de taille très réduite (235).

### **1.11.3 Endocytose dépendante (EDC) et indépendante de la clathrine (EIC)**

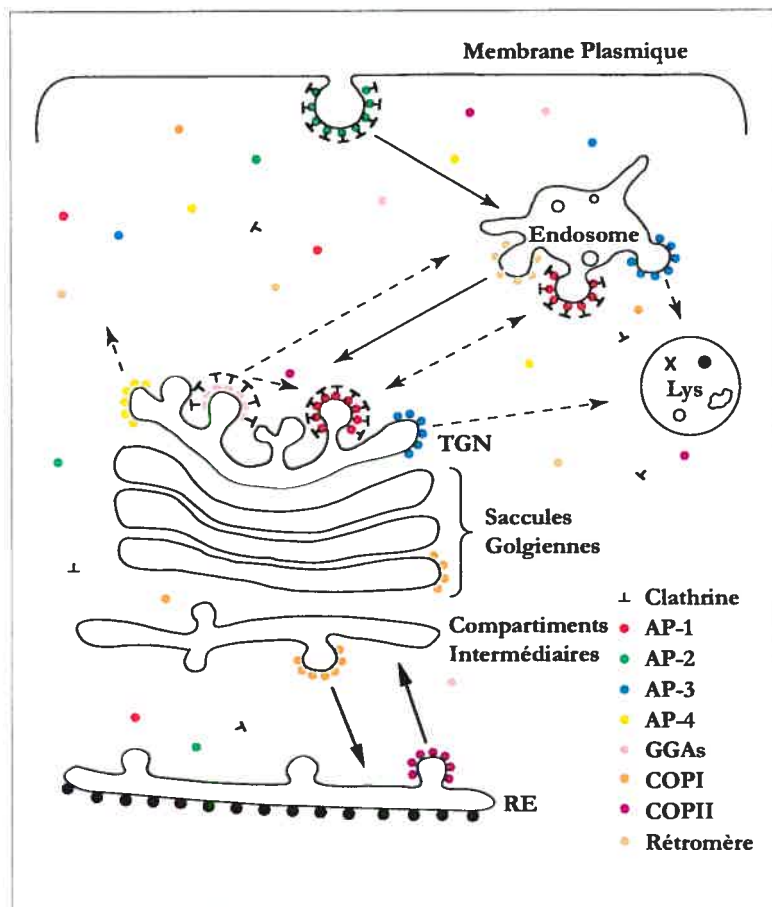
Originellement, l'endocytose a été décrite par des études morphologiques en microscopie électronique. Elles montrent des invaginations à la membrane plasmique accompagné d'une polymérisation d'un matériel dense sur la face interne de la membrane (236)(Figure 1.13(A)). La structure ordonnée qui couvre cette invagination se nomme manteau de clathrine, CCP («clathrin coated pits»)(237). Ce type d'endocytose est hautement spécifique et représente la majorité de l'activité d'endocytose d'une cellule. Cependant, l'utilisation de nouveaux inhibiteurs et le développement de techniques d'inactivation de gènes ont permis de caractériser certaines voies alternatives d'endocytose, indépendantes des manteaux de clathrines. Parmi elles, on retrouve celles exécutées par les cavéoles et les radeaux lipidiques. Ces dernières se caractérisent respectivement par un échafaudage de cavéolines, et par un microdomaine riche en cholestérol et glycosphingolipides (238).





**Figure 1.13 Structure de la clathrine.**

(A) Invagination membranaire formée par le puits couvert de clathrines en microscopie électronique en coupe mince (barre=100nm). (B) Matrice polygonale formée du côté cytosolique de la membrane plasmique par la polymérisation de la clathrine. À droite : formation d'une vésicule membranaire (barre=33nm). (C) Structure d'un tonneau hexagonal formé par l'association de clathrine et d'AP-2. Les vésicules membranaires nécessitent *in vivo* 60 triskèles associés en 20 hexagones et 15 pentagones. Le triskèle se divise en trois domaines: le domaine proximal, distal et terminal. Traduit de Marsh, 1999 (142).



**Figure 1.14** Voies cellulaires desservies par les manteaux cytoplasmiques et les complexes adaptateurs.

Les manteaux COPII assurent le transport antérograde entre le RE et les compartiments intermédiaires. Les manteaux COPI, quant à eux, assurent le transport rétrograde entre l'appareil de Golgi et le RE, et à l'intérieur des saccules golgiennes. Les complexes adaptateurs AP-1 et AP-2 sont associés à la clathrine et jouent un rôle dans le transport à partir du TGN (AP-1) ou de la membrane plasmique (AP-2). La fonction associée à AP-3 et AP-4 demeure controversée. Ils se localisent respectivement aux membranes endosomiques et golgiennes. Les GGA agissent en parallèles avec les différents complexes AP. Les rétromères sont des complexes protéiques responsables du recyclage de certaines protéines de l'endosomes vers le Golgi (239). Traduit de Robinson, 2004(240).

## 1.12 Manteaux cytoplasmiques

Les manteaux cytoplasmiques sont des complexes protéiques qui se polymérisent autour des vésicules en formation lors des différentes étapes du transport membranaire. Ils interagissent spécifiquement avec des motifs d'adressage cellulaire, et assurent la livraison du cargo protéique vers les organelles cibles (Figure 1.14). On distingue cinq familles de manteaux cytoplasmiques cellulaires : les manteaux de clathrine, les manteaux COPI, les manteaux COPII, les rétromères (239) et les manteaux de cavéollines (241). Nous nous attarderons seulement aux trois premières familles de manteaux cytoplasmiques.

### 1.12.1 Manteaux cytoplasmiques de clathrines

La clathrine représente le constituant majeur des manteaux clathrines formés pendant l'endocytose (237). Ces derniers sont composés de la clathrine, de complexes protéiques adaptateurs hétérotétramériques (AP) et de divers facteurs auxiliaires (242). La molécule de clathrine possède une structure trimérique composée de trois chaînes lourdes associées individuellement à une chaîne légère de clathrine. Le site de liaison des trois chaînes lourdes se trouve dans la portion C-terminale de la protéine. Ces six sous unités adoptent la forme d'une triskèle, un motif décoratif celtique composé de trois jambes représentant le mouvement perpétuel autour d'un centre (Figure 1.13 (C)). . Finalement, les triskèles de clathrine s'assemblent ensuite en une superstructure moléculaire formant une cage à face hexagonale. Ces structures de clathrine s'associent à la membrane via les complexes hétérotétramériques soit, les protéines adaptatrices (AP, « assembly polypeptides »)(243-246).

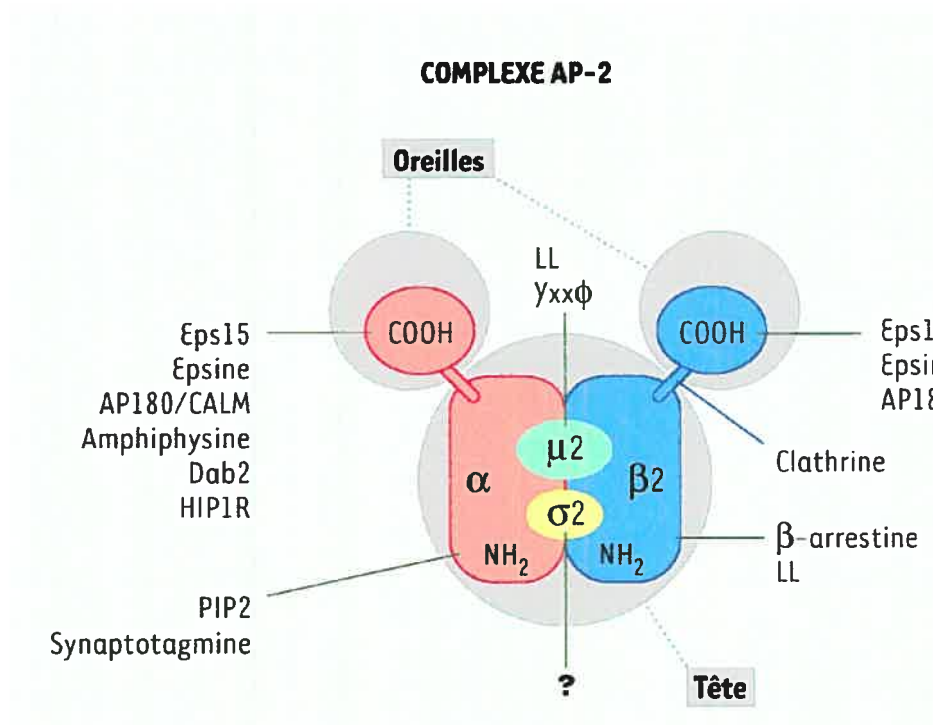
### 1.12.1.1 Protéines adaptatrices (AP)

Les différents complexes AP permettent aux manteaux de clathrine d'accueillir plusieurs voies de transport intracellulaire. On retrouve quatre membres parmi la famille des protéines adaptatrices: AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4 (247). Les complexes AP-1, AP-3 et AP-4 sont impliqués au niveau du ciblage endosomique à partir du TGN, alors que le complexe AP-2 est responsable de l'endocytose à la membrane plasmique. Ces différentes protéines de triage détiennent des structures fonctionnelles conservées. Toutefois, leur distribution intracellulaire et, par conséquent, leurs sites d'action demeurent distincts.

Le complexe adaptateur 1 (AP-1) permet à la vésicule de transport de transiter du TGN vers les endosomes tardifs. L'AP-2 tant qu'à lui, accomode le transport vésiculaire de la surface membranaire aux endosomes précoces (248). L'AP-3 semble posséder une fonction similaire à AP-1 et permet le transport entre le TGN et les lysosomes (249;250). C'est l'utilisation de mutants naturels chez l'homme, la souris et la drosophile qui a permis de faire la caractérisation du complexe AP-3 (251-253). Ces études démontrent qu'il est responsable du ciblage de diverses protéines vers des compartiments endosomiques apparentés aux lysosomes. Le dernier membre de la famille, AP-4, est surtout enrichi au TGN (254). Étrangement, les complexes AP-4 ne semblent pas interagir avec la clathrine (255). Bien qu'ils semblent impliquer dans le ciblage intracellulaire, leur fonction spécifique demeure inconnue (256).

Les protéines adaptatrices, AP, sont des complexes hétérotétramériques formés par l'association de quatre adaptines: deux chaînes lourdes de 100-140kDa ( $\gamma$ - $\beta$ 1,  $\alpha$ - $\beta$ 2,  $\delta$ - $\beta$ 3,  $\epsilon$ - $\beta$ 4), une chaîne moyenne de 47kDa ( $\mu$ 1- $\mu$ 4), et finalement une chaîne légère de 19kDa ( $\sigma$ 1- $\sigma$ 4) (257)(Figure 1.15). La structure cristalline révèle une configuration qui rappelle la tête de « Mickey Mouse © ». Les deux chaînes lourdes ( $\gamma$  et  $\beta$ 1) du complexe AP-1 sont responsables de l'interaction

avec le manteau de clathrine (258-260). Toutefois, seule la sous-unité  $\beta 1$  peut induire la formation de la cage de clathrine, grâce à la présence d'une séquence peptidique ayant une grande affinité pour la clathrine, «la boîte clathrine» (258). À cet égard, la sous-unité  $\gamma$  agit en chaperon moléculaire, en facilitant l'efficacité de la sous-unité  $\beta 1$  à induire la formation de la cage de clathrine (243). La fonction et la structure des différentes adaptines sont généralement conservées entre les quatre complexes AP. Toutefois, l' $\alpha$ -adaptine et les sous-unités correspondantes ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) partagent une faible homologie, ce qui suggère une diversité fonctionnelle. Sans compter leur rôle de chaperon moléculaire, ces dernières sous-unités ont comme fonction d'assurer la liaison avec la membrane cible (256). Les chaînes légères, adaptines  $\sigma 1$ - $\sigma 4$ , stabilisent la formation des complexes AP1-AP4 (257). Finalement, les sous unités  $\mu$ -adaptines sélectionnent le cargo à l'intérieur des vésicules de transport. À cet effet, les adaptines interagissent avec des séquences consensus retrouvées à l'intérieur des domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires (261).



**Figure 1.15 Structure du complexe AP-2**

Le complexe AP-2 est constitué de quatre chaînes adaptines ( $\gamma, \beta_2, \mu_2, \sigma_2$ ). La structure et la fonction des différentes adaptines sont conservées entre les quatre complexes AP. Les domaines  $\gamma$ - $\beta_2$  interagissent avec la clathrine. Le sous-domaine  $\sigma_2$  stabilise le complexe hétérotétramérique. L'adaptine  $\mu_2$  interagit avec les motifs de ciblage endosomique. Chaque sous-domaine interagit avec différentes protéines ou lipides de la voie endosomique. Figure tirée de Benmerah, 2002.(262)

### 1.12.1.2 les adaptateurs GGA

Les GGA (golgi-localized  $\gamma$ -ear ARF binding proteins) constituent une famille de molécules adaptatrices monomériques qui font partie de l'assemblage des manteaux cytoplasmiques de clathrine. On retrouve trois différentes GGA chez les mammifères : GGA1, GGA2 et GGA3. Ces protéines cytosoliques ubiquistes sont composées de 613 à 721 acides aminés. Elles se retrouvent concentrées au niveau du complexe trans-golgien et également au niveau des endosomes précoces. Les GGA possèdent une organisation modulaire constituée de quatre domaines principaux. Le domaine VHS (Vps27, HRS et STAM) est impliqué dans la reconnaissance des motifs dileucines intracytoplasmiques (263). Le domaine GAT (GGA et TOM) interagit avec la forme GTP du facteur d'ADP-ribosylation (ARF)(264). Le troisième domaine sert de charnière moléculaire et lie les clathrines (265). Finalement, le domaine GAE ( $\gamma$ -adaptin ear) interagit avec les protéines accessoires (266).

Initialement, les GGA ont été décrites pour leurs fonctions dans le ciblage intracellulaire du récepteur mannose-6 phosphate (267;268). Ce ciblage intracellulaire est soutenu par le domaine VHS de la protéine GGA, qui interagit avec les motifs dileucines encodés dans les domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires (263). La séquence consensus reconnu est un motif dileucine à résidus acide (ACLL :«acid-cluster dileucine sequence»). La résolution de la structure cristalline du récepteur en association avec le peptide contenant le motif ACLL du récepteur CI-MPR, démontre que trois résidus sont essentiels à cette interaction. La séquence cytoplasmique consensus établit comporte les résidus **DXXLL**, où seulement l'acide aspartique (D) et la dileucine (LL) semblent faire partie des résidus clés pour cette interaction Ces résidus interagissent respectivement avec une poche électropositive et deux poches hydrophobes du domaine VHS (263;268).

D'autre part, GGA participe au ciblage de cargo ubiquitiné (269). L'interaction simultanée des domaines GAT et VHS avec l'ubiquitine semble faciliter cette liaison, ainsi que celle avec Tsg101. Finalement, ces données suggèrent l'implication des GGA comme adaptateur endosomique des protéines ubiquitinées.

### **1.12.2 Manteaux cytoplasmiques COP I et COP II**

Le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi est desservi par un complexe distinct des manteaux de clathrine, les manteaux cytoplasmiques COP («coat protein complex»). Le complexe COP-II est responsable du transport antérograde lors de la biosynthèse protéique (270). Le cargo exporté au niveau du RE se concentre au niveau de domaines spécialisés pour finalement être incorporé à l'intérieur de vésicules et d'éléments tubulaires riches en COP-II. En revanche, le transport rétrograde à partir des compartiments golgiens et du réseau endosomique vers le ER est assuré par les vésicules COP-I. Le transport rétrograde à l'intérieur des saccules golgiennes semble aussi être facilité par la machinerie COPI. COPI interagit avec la séquence térapeptidique K-K-X-X, motif dilysine, présente au niveau des queues cytoplasmiques de certaines protéines transmembranaires (271;272). La fonction de ce motif a été préalablement décrite lors du transport rétrograde de la protéine Lyt2, des compartiments golgiens vers le ER (273).

Dans les cellules présentatrices d'antigènes, on retrouve également ce type motif à l'intérieur de la queue cytoplasmique de la chaîne invariante p35. Cette rétention était toutefois supprimée lors de l'interaction avec les molécules du CMH-II. Le mécanisme responsable de cette rétention demeure encore inconnu. Ces mécanismes responsables du masquage du motif de rétention de la chaîne invariante ont fait l'objet d'une étude présentée en annexe de cette thèse. En résumé, nos résultats démontrent l'importance de la chaîne bêta de la



molécule HLA-DR pour masquer le motif de rétention de la chaîne invariante p35 (274).

### **1.13 Motif de ciblage intracellulaire endosomique**

Les protéines transmembranaires comportent des signaux de ciblage définissant leur localisation intracellulaire. Généralement, ces motifs consistent en de courtes séquences linéaires d'acides aminés dans le domaine cytoplasmique des protéines. On retrouve deux principales familles de motifs d'adressage intracellulaire endosomique: les motifs de type «tyrosine» et les motifs de type «dileucine». Ces appellations ont été adoptées pour tenir compte des résidus critiques à l'intérieur de ces motifs. Par ailleurs, il faut noter l'existence de signaux alternatifs de triage endosomique caractérisés par la liaison de façon covalente d'une molécule d'ubiquitine (voir section 1.9.2.2).

#### **1.13.1 Le motif endosomique de type «tyrosine»**

La découverte du premier motif de ciblage endosomique de type tyrosine a été réalisée en 1986 par le groupe de Goldstein lors d'études portant sur le récepteur LDL d'un patient atteint d'hypercholestérolémie familiale. Ils identifient une mutation ponctuelle dans la queue cytoplasmique de la protéine qui substitue le résidu tyrosine (résidu 807) pour une cystéine (275). Cette mutation bloque l'internalisation du récepteur à la surface membranaire et empêche le recrutement dans les manteaux clathrines. Ces études ont ainsi permis d'identifier le premier motif tyrosine important au niveau de l'endocytose à la membrane plasmique (276). Ce signal d'endocytose possède la séquence consensus suivante, NPXY. Ce type de motif se trouve dans le domaine cytoplasmique de plusieurs récepteurs membranaires (261). Il fonctionne exclusivement à la membrane plasmique lors de l'endocytose vers les endosomes précoces, et n'agit pas comme signal fonctionnel pour le triage du

TGN vers les lysosomes. Il a été démontré que le motif NPXY interagit avec le complexe adaptateur AP2 (277).

Étrangement, plusieurs récepteurs membranaires sont internalisés rapidement à la membrane plasmique dans les CCP sans toutefois posséder la séquence consensus NPXY. Le groupe de Roth a fait l'observation que le résidu tyrosine contenu dans la queue cytoplasmique de ces récepteurs membranaires peut faire partie d'un nouveau type de signal de ciblage endosomal (278). Trois années après la découverte du motif NPXY, un second motif tyrosine dans la queue cytoplasmique du récepteur CI-MPR est identifié (109;279;280). En plus d'être sollicité lors de l'internalisation à la membrane plasmique vers les endosomes précoces, ce nouveau motif est responsable du ciblage lysosomal à partir du TGN. Ce signal se caractérise par la séquence consensus térapeptidique YXXΦ. Le résidu tyrosine (Y) est suivi par deux résidus aléatoires (X), mais préférentiellement hydrophiles. Le résidu en position 4 (Φ) accommode habituellement un résidu hydrophobe à grosse chaîne latérale, comme par exemple les résidus leucines, isoleucines, phénylalanines ou méthionines (261;281). De plus, plusieurs récepteurs membranaires possèdent un résidu glycine devant cette séquence consensus pour former la séquence GYXXΦ. Le résidu glycine semble être important surtout lors des événements de ciblage lysosomal à partir du TGN (282). Les motifs tyrosines retrouvés sur les queues cytoplasmiques des protéines membranaires interagissent directement avec les sous-unités μ des complexes protéiques adaptateurs AP1 et AP2 (283;284).

### **1.13.2 Le motif endosomal de type «dileucine»**

Le premier motif dileucine a été décrit à l'intérieur de la queue cytoplasmique de la protéine membranaire CD3γ, élément important du complexe TCR (285). Tout comme le motif YXXΦ, le motif dileucine permet de cibler les protéines

membranaires vers les compartiments endosomiques à partir de la membrane plasmique et du TGN. Ce motif consiste en un doublet de résidus leucines présent dans le domaine cytoplasmique de certains récepteurs membranaires. La séquence consensus établie est D/EXXXLL, où le D et le E représentent respectivement l'acide aspartique et l'acide glutamique (261). Les résidus X peuvent accommoder différents acides aminés. Dans certains récepteurs cellulaires, une sérine précède le motif dileucine (SD/EXXXLL) et participe à la régulation de l'expression membranaire de la protéine. En effet, la stimulation du récepteur membranaire induit une phosphorylation de la sérine et résulte conséquemment en une internalisation du récepteur. Par exemple, la phosphorylation de la sérine dans la protéine CD3 $\gamma$  contrôle l'internalisation du complexe CD3-TCR vers les compartiments lysosomiques pour sa dégradation (286;287). On observe un phénomène semblable avec le co-récepteur CD4 lors de la phosphorylation d'un résidu sérine dans son motif SQIKRLL (288).

Malgré une grande homologie de fonction entre les motifs dileucine et tyrosines, certaines caractéristiques les distinguent. En effet, les motifs dileucines fonctionnels se retrouvent sur certaines protéines cytosoliques. Ces protéines se lient aux domaines cytoplasmiques de protéines membranaires et induisent leur internalisation. Par exemple, Nef, une protéine régulatrice multifonctionnelle du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), s'associe avec le co-récepteur CD4 et induit son internalisation (289). Dans le même ordre d'idée, l'ubiquitine possède un motif dileucine fonctionnel. Ce signal explique l'internalisation des complexes protéiques induites par l'ubiquitination (290).

## 1.14 Objectifs et hypothèses et de travail

De façon générale, les travaux présentés dans cette thèse traitent des questions relatives au ciblage des molécules du CMH-II classique et non classique aux compartiments endosomiques des cellules présentatrices d'antigènes.

Dans un premier temps, nous étudions la présence de motifs potentiels de ciblage intracellulaire dans le domaine cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  de l'hétérodimère HLA-DO. Il a été démontré que, pour progresser du réticulum endoplasmique vers les compartiments de présentation antigénique, HLA-DO doit obligatoirement s'associer à HLA-DM, faute de quoi il est retenue dans le RE (116). Plusieurs études ont montré que HLA-DM possède un motif tyrosine fonctionnel de ciblage intracellulaire qui permet au complexe DM/DO de progresser vers les compartiments endosomaux où il réside (29;100;101). Une étude préliminaire suggérait déjà l'existence de déterminants de triage intracellulaire dans le domaine cytoplasmique de la chaîne DO $\beta$ , ce qui laissait entrevoir leur rôle dans l'adressage cellulaire du complexe DM-DO (131). Les objectifs de ce premier travail consistent à 1) déterminer la nature du motif de triage intracellulaire de l'hétérodimère HLA-DO, 2) caractériser sa fonction, 3) et déterminer le rôle de ce signal dans le contexte de l'adressage intracellulaire du complexe DM-DO des lymphocytes B.

Le second projet abordé dans cette thèse s'intéresse au ciblage des molécules du CMH-II aux membranes internes des compartiments multivésiculaires des cellules présentatrices d'antigènes ou membranes exosomales. En effet, ces vésicules membranaires se caractérisent par une accumulation marquée des molécules du CMH-II classique, en l'occurrence HLA-DR(176). Curieusement, les molécules du CMH-II non classiques, tel que HLA-DO et HLA-DM, ne s'y trouvent qu'à de faibles niveaux. Dans ce travail, nous avons cherché à 1) établir un système cellulaire dans les cellules HeLa afin de

poursuivre les études de ciblage aux membranes exosomales, 2) caractériser les vésicules exosomales produites par ces cellules HeLa et par les lymphocytes B, 3) et déterminer les mécanismes responsables de la régulation de l'incorporation des molécules du CMH-II dans les membranes exosomales.

**CHAPITRE 2-ARTICLE**

**Functional Characterization of a Lysosomal Sorting Motif in the  
Cytoplasmic Tail of HLA-DO $\beta$ .**

Alexandre Brunet<sup>\*§</sup>, Angela Samaan<sup>†§</sup>, Francis Deshaies<sup>\*§</sup>,  
Thomas J. Kindt<sup>†</sup> and Jacques Thibodeau<sup>\*†</sup>

Publié dans *Journal of Biochemistry*©2000

Vol. 275, No 47, pp. 37062-37071

\* Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada.

† Laboratory of Immunogenetics, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA 20892

**Running title:** Functional lysosomal sorting motif in HLA-DO $\beta$ .

§ These authors contributed equally to this work

† **Corresponding author:** Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie

Moléculaire,

Département de Microbiologie et Immunologie,

Université de Montréal,

CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, (Qué.),

Canada, H3C 3J7

**Tel:** (514) 343-6279; **Fax:** (514) 343-5701

**e-mail:** [REDACTED]

## 2.1 RÉSUMÉ

À titre de molécule du CMH-II non classique qui s'exprime dans les compartiments endosomiques des lymphocytes B, HLA-DO régule le chargement des peptides antigéniques sur les molécules du CMH-II classique. L'activité de DO se réalise par ses interactions avec l'éditeur peptidique HLA-DM. Bien que DO soit dépendant de DM pour sortir du réticulum endoplasmique, nos résultats démontrent que le domaine cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  encode un motif fonctionnel de triage intracellulaire. Les analyses de microscopie confocale et de cytométrie révèlent que la molécule rapporteuse, lorsque fusionnée au domaine cytoplasmique de DO $\beta$ , s'accumule dans les compartiments Lamp-1+ des cellules HeLa transfectées. La mutagenèse du motif dileucine réduit l'accumulation lysosomique et induit une redistribution des molécules rapporteuses en surface cellulaire. Finalement, nos résultats indiquent que la mutation de la séquence dileucine dans le domaine cytoplasmique de DO $\beta$  n'altère pas le ciblage lysosomique du complexe DM/DO. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que le transport lysosomique du complexe DM/DO est dirigé principalement par le motif tyrosine de DM. Ils suggèrent également un rôle de triage secondaire pour le motif dileucine de la chaîne DO $\beta$ .



## 2.2 ABSTRACT

HLA-DO is an intracellular non-classical class II MHC molecule expressed in the endocytic pathway of B lymphocytes and which regulates the loading of antigenic peptides onto classical class II molecules such as HLA-DR. The activity of HLA-DO is mediated through its interaction with the peptide editor HLA-DM. Herein, our results demonstrate that although HLA-DO is absolutely dependant on its association with DM to egress the ER, the cytoplasmic portion of its  $\beta$ -chain encodes a functional lysosomal sorting signal. By confocal microscopy and flow cytometry analysis, we show that reporter transmembrane molecules fused to the cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$  accumulated in Lamp-1<sup>+</sup> vesicles of transfected HeLa cells. Mutagenesis of a leucine-leucine motif abrogated lysosomal accumulation and resulted in cell surface redistribution of reporter molecules. Finally, we show that mutation of the di-leucine sequence in DO $\beta$  did not alter its lysosomal sorting when associated with DM molecules. Taken together, these results demonstrate that lysosomal expression of the DO/DM complex is mediated primarily by the tyrosine-based motif of HLA-DM and suggest that the DO $\beta$ -encoded motif is involved in the fine tuning of the intracellular sorting.

## 2.3 INTRODUCTION

Major histocompatibility complex (MHC) class II molecules are heterodimeric cell surface glycoproteins that present antigens to CD4<sup>+</sup> T cells (1). The antigenic peptide/class II complexes are expressed on specialized antigen-presenting cells (APCs) such as macrophages and B lymphocytes. Following their synthesis, the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the class II molecule associate in the endoplasmic reticulum (ER) together with the invariant chain (Ii) (2). The latter folds in part through the groove of the class II molecule, stabilizing the  $\alpha\beta$  heterodimer and preventing the undesirable binding of ER polypeptides (3-6). Studies using mice with inactivated Ii genes suggested that Ii is necessary for efficient exit of newly synthesized class II molecules from the ER (7,8). However, it was later demonstrated that high levels of class II molecules reach the surface of Ii<sup>-</sup> dendritic cells (9). Moreover, transfected cells express a substantial amount of class II molecule at their plasma membrane even in the absence of Ii (10). Such a phenotype probably results from the binding of endogenous peptides or polypeptides present in the ER (6,11) and supports the notion that occupancy of the peptide-binding groove is sufficient to allow ER egress (12).

Another function of Ii is to efficiently direct MHC class II molecules to the endocytic antigen-loading compartments (13-15). Two short leucine-based sequences located in the cytoplasmic tail of Ii are responsible for trafficking through the endocytic pathway (16,17). Similar motifs in many proteins are specifically recognized at the cell surface and trans-Golgi by elements of the sorting machinery (reviewed in Ref. (18)).

Once the class II-Ii complex reaches the endosomal compartments, the invariant chain is progressively degraded by various proteinases depending on the cell type (19). A residual class II-associated Ii peptide (CLIP) must be removed from the peptide-binding groove to allow the binding of an antigen

and the subsequent export of the MHC molecule to the cell surface (20,21). Removal of the CLIP is catalyzed by the non-classical HLA-DM heterodimer (22-24). This intracellular chaperone plays three critical roles in antigen presentation as it facilitates the withdrawal of the residual CLIP peptide and stabilizes the empty class II prior to peptide loading (25-28). This loading occurs in late endosomal vesicles and in particular, in the MHC class II-rich compartments (MIICs) (29). In addition, it was demonstrated that HLA-DM functions as a peptide editor limiting the repertoire of peptides bound to the class II molecule (23,30-32). In this matter, HLA-DM favors the loading of high affinity peptides.

The activity of HLA-DM is regulated by another non-classical class II molecule called HLA-DO. Experiments using purified complexes demonstrated DO's ability to inhibit DM-mediated CLIP release (33,34). Furthermore, it was shown in transfected class II<sup>+</sup> cells that overexpression of HLA-DO alters the peptide repertoire bound to class II molecule and caused the accumulation of CLIP. Subsequent studies demonstrated that HLA-DO regulates HLA-DM's activity by limiting the pH range, and thus probably the endosomal compartments, where HLA-DM is active (35,36). Based on these results and on experiments using H-2O $\alpha$  knock-out mice, it was proposed that H-2O and HLA-DO favor presentation of antigens internalized by membrane immunoglobulins. This would be achieved by the selective inhibition of H-2M and HLA-DM in endocytic compartments rich in proteins internalized by fluid-phase endocytosis (35). However, the group of Hämmerling suggested that HLA-DO is not involved in the release of CLIP but rather edits the repertoire of class II-bound peptides by chaperoning empty DR molecules through its interaction with HLA-DM. (37) In addition to the controversial DM-related functions of HLA-DO, its role in classical class II-negative thymic epithelial cells remains elusive (38).

In HeLa cells and in murine B lymphocytes, under the experimental conditions tested so far, HLA-DO was shown to be totally dependent of its association with HLA-DM to egress the ER (39). The complex then moves through the Golgi and traffics to endocytic compartments. Although HLA-DM's cytoplasmic tail contains a functional tyrosine-based motif needed for its own targeting to lysosomal compartments (40-43), the sorting signals responsible for the intracellular localization of the DO/DM complex have not yet been characterized. Indeed, we have recently proposed that the HLA-DO $\beta$  chain might also contain a sorting motif to the endocytic pathway (44). In these experiments, a mixed isotopic pair between the classical DR $\alpha$  chain and a recombinant DR/DO $\beta$  chain specifically accumulated in lysosomal compartments of HeLa transfected cells. This phenotype was imparted by the DO $\beta$  chain since the wild-type DR $\alpha$ -DR $\beta$  heterodimer could only be detected at the cell surface. In the present report, we have used chimeric reporter molecules and site-directed mutagenesis to determine 1) the domain localization of the DO $\beta$ -encoded lysosomal sorting motif 2) the exact nature of this sorting signal and 3) its role in the trafficking of the DO-DM complex.

## 2.4 MATERIALS AND METHODS

### *Plasmids*

RSV.5neo DR $\alpha$ TM (45), coding for a HLA-DR $\alpha$  0101 chain lacking its cytoplasmic domain, was a gift from Dr. R.P. Sékaly. RSV.3 DR $\beta$ 008 (46), RSV.3 DO $\beta$  (47) and RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  (44,48) have been previously described. RSV.5gptDN1 (DO $\alpha$ .) (49), 45.1 DO $\beta$  and 45.1 DR $\beta$ 008 (47) cDNAs were obtained from E.Long.

pBS DR $\beta$ 008 was generated by inserting the *Bam*HI insert of 45.1 DR $\beta$ 008 into pBluescript KS<sup>+</sup> vector (Stratagene, CA). pBS DO $\alpha$ .9 was generated by inserting the *Sal*I-*Pst*I fragment of RSV.5gptDN1 into pBluescript KS<sup>+</sup> vector (Stratagene, CA). This was then subcloned in RSV.5 neo by digesting with *Sal*I/*Xba*I to generate RSV.5neoDO $\alpha$ . To construct pBS DO $\beta$ , a *Bam*HI-fragment from .45 DO $\beta$  was inserted into pBluescript KS<sup>+</sup> vector. Before cloning HLA-DO $\alpha$ / $\beta$  gene into pBudCE4-A vector (Invitrogen, CA), we integrated a  $\beta$ -lactamase gene, which allows for selection by resistance to ampicillin, by inserting a 1 Kb fragment from pBluescript KS<sup>+</sup> digested with *Bsp*HI/blunt-ended into *Nhe*I/ blunt-ended site of pBudCE4 (pBudCE4-A). The HLA-DO $\beta$  cDNA was then cloned into pBudCE4-A by digesting pBS DO $\beta$  with *Sal*I-*Xba*I. The HLA-DO $\alpha$  cDNA was inserted in the same vector by cutting pBS DO $\alpha$ .9 with *Bam*HI and cloning the fragment into the *Bgl*II site of the vector (pBudCE4-A DO $\alpha$ / $\beta$ ). The DO $\beta$  cDNA in 45.1 was excised with *Bam*HI and the 1.3 kb fragment was cloned in RSV.5neo plasmid to generate RSV.5neoDO $\beta$ .

In order to generate the p305 DO $\beta$ LL242-243AA, several subcloning steps were done to insert a unique *Hind*III restriction site in a 5' position of the gene. The first step consisted in subcloning a 5' portion of the RSV.5neoDO $\beta$ , which contained a *Hind*III site, in the RSV.3DO $\beta$ LL242-243AA vector by a *Mlu*I/*Eco*RV digestion. From this construct, a *Hind*III

fragment containing DO $\beta$ LL242-243AA was then subcloned into p305 expression vector from which we had previously excised a *Xba*I stuffer to finally yield p305DO $\beta$ LL242-243AA plasmid.

***DO $\beta$  mutagenesis and construction of the DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  molecules***

Introduction of mutations into the DO $\beta$  cytoplasmic tail cDNA sequence was performed by PCR overlap extension (50). Briefly, a 5' PCR product was generated from RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  using the RSV LTR primer (5' to the coding region) and a mutagenic primer which included the desired mutation as well as a unique restriction site used to identify clones harboring the mutation (DO $\beta$ Y227A*Bsp*E1b: 5'-CGT CCG GAC AGC TCC TTT CTG-3', DO $\beta$ T230L*Pst*Ib: 5'-C AGA CAT CTG CAG CCT CAC ATA-3', DO $\beta$ LL242-243AA*Xba*Ib: 5'-TGA CTG AGG GGC CGC AAC AGC TCT AGA GAC-3'). The 3' PCR product was generated using the complementary mutagenic primers (DO $\beta$ Y227A*Bsp*E1c: 5'-CAG AAA GGA GCT GTC CGG ACG-3', DO $\beta$ T230L*Pst*Ic: 5'-TAT GTG AGG CTG CAG ATG TCT G-3', DO $\beta$ LL242-243AA*Xba*Ic: 5'-GTC TCT AGA GCT GTT GCG GCC CCT CAG TCA-3') and DR $\beta$ 008 3' (5'-ACT CGA TCT TTG AGA AAC ATT-3') which hybridized to the non-coding 3' end of the cDNA. The two overlapping PCR products were mixed and a final PCR reaction was performed using the flanking primers. This product was subsequently subcloned into *Sac*I and *Hind*III sites of RSV.3 DO $\beta$ , thereby replacing the wild-type fragment with the PCR product containing the various mutations. The nucleotide sequence was confirmed by DNA sequencing using T7 polymerase (Amersham pharmacia biotech, Canada) before the mutations were introduced into RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  (RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ T230L, RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ Y227A, RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ LL242-243AA) by replacing the *Eco*RV-*Hind*III fragment with the equivalent fragment from mutated DO $\beta$  cDNA in RSV.3 described above. Underlined

nucleotides in primer sequences correspond to mutations introduced in the PCR products.

***DR/DO $\beta$ cyto and DR/DM $\beta$ cyto reporter molecules***

The cytoplasmic tail of HLA-DR $\beta$  was replaced by that of either HLA-DO $\beta$  or HLA-DM $\beta$ . To construct RSV.3 DR/DO $\beta$ cyto chimeric reporter molecule, we used the PCR overlap extension method. A first fragment was amplified from RSV.3 DR $\beta$ 008 using the RSV LTR primer and a mutagenic primer overlapping the end of the DR $\beta$  transmembrane and the N-terminal region of the HLA-DO $\beta$  cytoplasmic tail (oligonucleotide DR $\beta$ /DO $\beta$ Cyto222BssHIIb: 5'-ATA TCC TTT CTG CGC GCG GAA GTA GAT GAA C-3'). A second reaction was made on RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  using a complementary fusion primer (DR $\beta$ /DO $\beta$ Cyto222BssHIIc: 5'-G TTC ATC TAC TTC CGC GCG CAG AAA GGA TAT-3') and the DR $\beta$ 008 3' primer. Following the overlap reaction, the PCR product was subcloned into *Stu*I and *Hind*III sites of RSV3 DR $\beta$ 008. The DNA sequence was confirmed by sequencing. In order to introduce mutations in the cytoplasmic tail of the chimeric molecule, we used a similar strategy to the one described above, but using RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  T230L and RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ LL242-243AA plasmids as templates for the amplification of the DO $\beta$  cytoplasmic regions. Briefly, the DR $\beta$  portion was amplified from pBS DR $\beta$ 008 with the reverse primer and DR $\beta$ /DO $\beta$ Cyto222BssHIIb primer which makes the junction between DR $\beta$  and DO $\beta$  cytoplasmic region. The mutated DO $\beta$  cytoplasmic region was amplified from the RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  mutant with complementary fusion primer DR $\beta$ /DO $\beta$ Cyto222BssHIIc and the DR $\beta$ 008 3' primer. Product of the overlapping reaction was digested with *Sty*I to generate a fragment containing the mutated DR/DO $\beta$ cyto fusion region and subcloned into *Sty*I digested pBS DR $\beta$ 008 to replace the wild-type sequence. The resulting construction was sequenced, excised with *Bam*HI and subcloned into the SR $\alpha$  vector (51) which

allows for selection by resistance to puromycin (puroSR $\alpha$  was kindly provided by Dr. François Denis). To generate SR $\alpha$  puro DR/DO $\beta$ cytoY227A, a different strategy was used. A first PCR product was made from RSV.3 DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  using the RSV LTR primer (5' end of the coding region) and the mutagenic primer (DO $\beta$ Y227A*Bsp*E1b: 5'-CGT CCG GAC AGC TCC TTT CTG-3'). The second PCR product was done using the complementary mutagenic primer (DO $\beta$ Y227A*Bsp*E1c: 5'-CAG AAA GGA GCT GTC CGG ACG-3') and DR $\beta$ 008 3'. The overlapping PCR product was subcloned into *Sty*I of pBS DR $\beta$ 008 to replace the wild-type sequence. The resulting construct was sequenced, excised with *Bam*HI and cloned into the SR $\alpha$  vector as above. In order to generate the triple mutant DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA/T230L, we performed two successive overlap PCR reactions. The first overlap PCR was done as described above to generate a DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA PCR fragment. Using the latter PCR product as a template, we subsequently introduced the third mutation at position T230L. The 5' overlap fragment was amplified with the reverse primer and the DO $\beta$ T230L*Pst*Ib primer. The 3' fragment was obtained using DO $\beta$ T230L*Pst*Ic primer and the universal primer. Following the overlap reaction, the PCR product was subcloned into *Sty*I of pBS DR $\beta$ 008 to replace the wild-type sequence. The resulting construct was sequenced, excised with *Bam*HI and cloned into the SR $\alpha$  vector (SR $\alpha$  puro DR/DO $\beta$ cytoAA/T230L).

In order to make a fusion between the DR $\beta$  and DM $\beta$  cytoplasmic tails, we first cloned the HLA-DM $\beta$  cDNA from Raji cells by PCR. Total mRNA was extracted using TRIZOL Reagent (Gibco BRL, ON) and 10  $\mu$ g was used for cDNA synthesis in the presence of the DM $\beta$ 5'*Sal*I (5'-CTG GAA GAG CTG GTC GAC GGG ACT G-3') and the DM $\beta$ 3'*Eco*RI (5'-GAA GTT GTA GAA TTC TGC CTC TAG-3') oligonucleotides. The first strand cDNA was made using M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, ON) and *Taq* polymerase at 42°C for 15 min. in *Taq* polymerase buffer (BIO/CAN, Canada).



Double-stranded cDNA was then amplified by PCR for 20 cycles, digested with *SalI-EcoRI* and cloned in pBluescript KS<sup>+</sup> (pBS 1-DMβ.1). The complete DNA coding sequence was verified by sequencing and the predicted amino acids sequence corresponds to the published sequence (52).

In order to mutate tyrosine 230 in the DMβ cytoplasmic region, a first PCR reaction was performed on pBS 1-DMβ.1 using the reverse primer and a mutagenic primer (DMβY230A*Eco47IIIb*: 5'-AGG AAG AGG AGT AGC GCT AGA GTG GCC AGC-3'). A second fragment was amplified from pBS 1-DMβ.1 using a complementary mutagenic primer (DMβY230A*Eco47IIIc*: 5'-GCT GGC CAC TCT AGC GCT ACT CCT CTT CCT-3') and the universal primer. The two overlapping PCR products were mixed and a final PCR reaction was completed using the flanking primers. This PCR product was subsequently digested with *SacI* and *HindIII*, cloned into pBS 1-DMβ.1 and sequenced (pBSDMβY230A).

Fusion of the DMβ cytoplasmic tail to the DRβ transmembrane domain was performed by PCR. A first fragment was amplified from pBS DRβ008 using the reverse primer and a fusion primer (DRβ/DMβcyto: 5'-GA GTG GCC AGC TCT GAA GTA GAT GAA CAG-3'), which makes the junction between the DRβ and DMβ cytoplasmic regions. The DMβ cytoplasmic region was amplified from pBS 1-DMβ.1 with a complementary fusion primer (DRβ/DMβcyto: 5'-CTG TTC ATC TAC TTC AGA GCT GGC CAC TC-3') and the universal primer. The overlap product was digested with *StyI-XbaI* to generate a fragment containing the DR/DMβcyto fusion region and subcloned into pBS DRβ008. The resulting cDNA was sequenced, excised with *BamHI* and cloned into the *BamHI* site of SRα puro vector (SRα puro DR/DMβcyto). In order to generate a DMβ cytoplasmic tail mutated at position Y230A and fused to the DRβ molecule, we used a similar strategy to the one described above but using pBS DMβY230A as template (instead of wild type pBS 1-DMβ.1) for the amplification of the DMβ cytoplasmic region. Briefly, a first

fragment was amplified from pBS DR $\beta$ 008 using the reverse primer and the DR $\beta$ /DM $\beta$ cytob primer. The DM $\beta$  cytoplasmic region was amplified from pBS DM $\beta$ Y230A with the complementary DR $\beta$ /DM $\beta$ cytoc primer and the universal primer. Following the overlap reaction, the product was digested with *StyI-XbaI* to generate a fragment containing the DR/DM $\beta$ cyto fusion region and subcloned into *StyI-XbaI* digested pBS DR $\beta$ 008. The resulting cDNA was sequenced, excised with *BamHI* and cloned into SR $\alpha$  puro vector (SR $\alpha$  puro DR/DM $\beta$ cytoY230A).

### ***Antibodies***

L243 monoclonal antibody (IgG<sub>2a</sub>) binds a specific DR $\alpha$  conformational determinant (53). Coupling to biotin using biotin-7-NHS or to FITC using FLUOS was performed as suggested by the manufacturer (Boehringer-Mannheim, Germany). The anti-Lamp-1 (CD107a) monoclonal antibody H4A3 (IgG<sub>1,κ</sub>) reacts with the heavy glycosylated 110 kDa lysosomal-associated membrane protein (Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa, IA.). XD5.117 is an anti-DR $\beta$  (IgG<sub>1</sub>) mAb (54). DA6.147 monoclonal antibody (IgG<sub>1</sub>) is directed at the cytoplasmic tail of the DR $\alpha$  chain (55). The anti-DO $\beta$  serum was produced in C<sub>3</sub>H mice (H-2<sup>d</sup>) by repeated intra-peritoneal injections of DAP fibroblasts transfected with DR $\alpha$  and DR18/DO $\beta$  cDNA (48). Rabbit antisera were raised against keyhole limpet haemocyanin (KLH) conjugated to peptides corresponding to the cytoplasmic tail of HLA-DO $\alpha$  (CMGTYVSSVPR) or HLA-DM $\beta$  (CRAGHSSYTPLPGSNYSEGWHIS).

### ***Cells lines and transfections***

HeLa DR1 (DR $\alpha$  + DR $\beta$ 0101) and HeLa DR $\alpha$ TM +DR $\beta$  cells were kindly provided by Dr. R.P Sékaly. HeLa DR $\alpha$ +DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  and HeLa DR $\alpha$ TM + DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  have been described previously (44). HeLa DM.5 is a clone from

HeLa DM<sup>+</sup> cells (a gift from Dr. R.P. Sékaly) obtained after transfection of the DM $\alpha$  and DM $\beta$  cDNAs (56). Cells were cultured in DMEM, 10% fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, Qc.) and appropriate selective agents (see below). HeLa cells were co-transfected by the calcium phosphate precipitation method as described (57) using 2  $\mu$ g of truncated DR $\alpha$  cDNA (DR $\alpha$ TM) (44) along with 10  $\mu$ g of the different  $\beta$  chain chimeras. Independently, duplicate transfections were done using Fugene6 (Roche Diagnosis, Canada). Selective agents were added to a final concentration of 500  $\mu$ g/ml of G-418 (Gibco-BRL, Burlington, ON), 400  $\eta$ g/ml of puromycin (Sigma-Aldrich, ON), 50 U/ml hygromycin (Cederlane Laboratories, Ont., Canada) or 100 $\mu$ g/ml zeocin<sup>TM</sup> (Cayla, Toulouse, France). Cells expressing the desired class II molecules were sorted using magnetic beads (Dynal Inc., NY, USA) coated with L243 mAb, except for HeLa DR/DM $\beta$ cyto which was cloned by limiting dilutions, and for the HeLa DR $\alpha$ TM+DR $\beta$ , HeLa DR/DO $\beta$ cyto T230L, HeLa DR/DO $\beta$ cyto AA/T230L, HeLa DM.5/DO $\alpha$ +DO $\beta$ , HeLa DM.5/DO $\alpha$ +DO $\beta$ AA cells which represent unsorted populations. The nature of the different reporter molecules expressed in transfected cells was confirmed by western blot using antibodies specific for the different cytoplasmic tails (data not shown).

### ***Flow Cytometry Analysis***

*Cell surface staining* : Cells were harvested using trypsin, washed and incubated with FITC-conjugated L243 antibody or L243-bio in complete medium. After 45 min. at 4°C, cells were washed twice in PBS and L243-bio stained cells were incubated for another 45 min. at 4°C with phycoerythrin conjugated Streptavidin (SA-PE) in PBS. Cells were washed twice in PBS and analyzed by flow cytometry on a FACS<sup>®</sup> calibur (Becton Dickinson, USA, CA). As negative control, cells were stained using only FITC-conjugated goat anti-mouse antibody (Cederlane, Canada) or SA-PE (Coulter, ON, Canada).

*Intracellular staining.* Cells were harvested using trypsin, rinsed in PBS and fixed in 4% formaldehyde for 20 min. at room temperature. After two washings in PBS, cells were treated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 15 min. in 0.05% saponin (Sigma, Canada) in PBS containing 1% bovine serum albumin (Bioshop, Canada). Intracellular staining was performed using L243-FITC. After 30 min. at room temperature, cells were washed twice, fixed in 1% formaldehyde and analyzed by flow cytometry. As negative control, untransfected HeLa cells were stained in the same conditions. In order to analyze by flow cytometry the total (surface and intracellular) versus surface expression of the various class II molecules, the profiles obtained for DR1 were first precisely superimposed and the other samples of transfected cells were acquired under the same exact settings. A shift between the two curves for a given reporter molecule indicates a cellular redistribution. When unsorted populations were analyzed, the peaks of negative cells were used to align the staining profiles and define the settings.

### ***Fluorescence microscopy***

Cells were plated on cover slips in 24 well plates and cultivated for 3 days before intracellular staining. The cover slips were rinsed in PBS and cells were cold-fixed in pre-cooled (-80°C) methanol/acetone (80%/20%v/v) for 20 min. at -20°C. Subsequent manipulations were done at room temperature. After four washings of 10 min. in PBS, the cover slips were immersed in blocking solution (PBS containing 0.2% BSA and 0.2% gelatin) for 10 min. Intracellular staining was performed by using L243-bio and Lamp-1 specific antibodies. After 1 hour, cells were washed twice in PBS-1% BSA buffer and incubated for 1 hour with Texas red-coupled streptavidin (Amersham Life Science, USA) and anti-mouse IgG<sub>1</sub> coupled to fluorescein (Pharmingen, San Diego, CA). Cells were washed twice and the cover slips were mounted using Gelvatol (polyvinyl alcohol, a gift from Dr. M. Desjardins).

When stained with mouse DO $\beta$ - and/or rabbit DM-specific antibodies, cells were washed twice in PBS-1% BSA buffer and incubated at room temperature for another 20 min. with a biotinylated goat anti-mouse antibody and/or FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (Bio/Can Scientific, Ont., Canada). When necessary, cells were washed twice and incubated with Texas red-coupled streptavidin (Amersham Life Science, USA) for 20 min.

Cells were then analyzed by fluorescence microscopy on a Zeiss axioscope microscope (Carl Zeiss, Germany). Photographs were taken with a Zeiss microscope camera MC 100 on Kodak elite chrome 400 film. Confocal laser microscopy was performed on a Zeiss LSM 410 system equipped with a plan- APOCHROMAT 63x oil immersion objective and a Ar/Kr laser.

#### ***Immunoprecipitations and western blotting***

Cells ( $1,2 \times 10^7$ ) were trypsinized, washed in pBS and lysed into Triton-X-100 1% as described previously (58). After centrifugation, supernatants were harvested and incubated with 20  $\mu$ l (50% beads) of CL-6b sepharose (Pharmacia, Canada) for 1 hour at 4°C with agitation. Cell lysates were transferred into a new microtube containing 20  $\mu$ l (50% beads) of sepharose-proteinA (Pharmacia) coupled to HLA-DO $\beta$  antibody. Samples were agitated overnight at 4°C. Beads were centrifuged, washed four times with lysate buffer and resuspended in Laemli buffer (5X). Samples were boiled and loaded on 10% SDS-PAGE. Gels were transferred to Hybond ECL membranes (Amersham, Canada) and blotted with the rabbit anti-DO $\alpha$  serum overnight at 4°C with agitation. Secondary antibody (peroxydase-coupled goat anti-rabbit; Bio/Can. Scientific, Ont. Canada) was used at 1:1000 dilution for 2 hours at room temperature. After washings, the membrane was developed by chemiluminescence (Boehringer-Mannheim, Germany) on Kodak XAR-5 films.

## 2.5 RESULTS

### *The cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$ encodes a lysosomal sorting signal.*

We recently described the lysosomal and cell surface localization of a mixed isotypic pair between DR $\alpha$  and a chimeric recombinant DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  chain (44,48). As wild-type DR $\alpha$ /DR $\beta$  (DR1) molecules did not accumulate in intracellular compartments under the same experimental conditions, we concluded that a lysosomal sorting motif was encoded in the HLA-DO $\beta$  chain. In an effort to localize such a signal and to evaluate the relative importance of the cytoplasmic tail in lysosomal transport as compared to the other domains of HLA-DO, we have designed a new reporter molecule where the cytoplasmic tail of the DR $\beta$  chain was replaced by that of DO $\beta$  (DR/DO $\beta$ cyto) (Fig. 1). To eliminate any possible contribution from the cytoplasmic tail of the DR $\alpha$  chain partner, HeLa cells were stably transfected with the DR/DO $\beta$ cyto construction together with a HLA-DR $\alpha$  chain cDNA encoding a stop codon immediately after the transmembrane domain (DR $\alpha$ TM). Since this chimeric heterodimer can be detected at the plasma membrane, cells were incubated with the DR $\alpha$  chain-specific L243 antibody and sorted using magnetic beads. Surface expression was compared to the wild-type DR $\beta$  or DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ -expressing HeLa cells (Fig. 2) (44). The structural integrity of the DR/DO $\beta$ cyto reporter molecules was confirmed by its ability to bind superantigens and various DR-specific antibodies (data not shown).

The intracellular expression pattern of expression of the DR/DO $\beta$ cyto molecule was analyzed by confocal microscopy using L243. This monoclonal antibody recognizes a conformational epitope on the DR $\alpha$  chain apparent only upon association with the  $\beta$ -chain and maturation through the Golgi apparatus (3). Figure 3A shows that the class II staining was characterized by the presence of large, well defined perinuclear vesicles reminiscent of endosomal/lysosomal compartments. The endocytic nature of these vesicles was confirmed using a Lamp-1-specific monoclonal antibody (H4A3) as

described (Fig. 3B) (44). Figure 3C shows a perfect colocalization between the Lamp<sup>+</sup> and class II<sup>+</sup> vesicles, as was reported previously for cells expressing the mixed isotopic pair between DR $\alpha$ TM and DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  (Fig. 3D-F and(44)). The concomitant cell surface expression and intracellular sorting of these molecules is reminiscent of the Ii expression pattern in B lymphocytes (see discussion). On the other hand, DR1-transfected HeLa cells displayed the highest level of surface expression as determined by flow cytometry (Fig. 2) but failed to show strong intracellular accumulation (Fig. 3G). As described previously by other groups, the intracellular class II staining in Ii<sup>-</sup> HeLa cells was rather diffuse (Fig. 3G) with occasionally, a few cells showing small faint vesicles (14,44,59,60). No colocalization of DR1 and Lamp-1 was detected by confocal microscopy under the exact same settings used above for the analysis of reporter molecules (Fig. 3H,I). Moreover, it is interesting to note the absence of enlarged, swelled Lamp-1<sup>+</sup> lysosomal compartments in cells expressing the wild-type DR1 molecule as compared to those containing the DO $\beta$  cytoplasmic tail (Fig. 3H and E). This important observation was consistent through all the independent transfections generated and supports the conclusions that 1) the wild-type DR1 does not accumulate in large amounts in lysosomes and 2) the DO $\beta$  tail is responsible for the redistribution and accumulation of the reporter molecules to the endocytic pathway, affecting the morphology of the compartments.

Taken together these results show that the cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$  is responsible and sufficient for the efficient targeting of these reporter molecules to Lamp<sup>+</sup> lysosomal compartments. This was confirmed by the diffuse staining and the lack of vesicular accumulation of a mixed isotopic heterodimer between an intact DR $\alpha$  chain and a truncated chimeric DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  chain devoid of its DO $\beta$  cytoplasmic tail (data not shown).

***Tyrosine 227 in HLA-DO $\beta$  is not involved in lysosomal sorting***

The cytoplasmic tail of the DO $\beta$  chain contains two putative sorting signals which have been shown in other molecules to mediate the intracellular targeting to various cellular compartments (Fig. 1B). The first signal is an imperfect tyrosine-based GYVRT motif reminiscent of the GYXXL (where X is any amino acid) motif found for example in LgpA protein (reviewed in Ref. (61)). It has been suggested that the glycine preceding the tyrosine residue might mediate the direct sorting of proteins from the trans-Golgi (TGN) to the endocytic pathway (62). Although in HLA-DO $\beta$  a polar threonine is found instead of the typical hydrophobic or aromatic residues at the end of the putative sequence, some reports have suggested that the GY alone is sufficient to mediate intracellular sorting events (61). The second signal is a leucine-leucine motif analogous to those found in Ii and which mediate the transport of associated class II molecules to the endocytic pathway (14,16,63). It is not known which of these two signals in the mixed pairs is responsible for their lysosomal distribution.

To further dissect the intracellular signals of the DO $\beta$  cytoplasmic tail, we next introduced point mutations in the cDNA sequence coding for these putative motifs. First, the potentially critical tyrosine residue in the GYVRT sequence was changed to an alanine in both the DR/DO $\beta$ cyto and the DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  chains (Fig. 1B). HeLa cells stably transfected with these DR/DO $\beta$ cytoY227A or DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ Y227A cDNAs together with DR $\alpha$ TM were sorted on magnetic beads and flow cytometry analysis confirmed high levels of surface expression (Fig. 4A and C). The confocal microscopy analysis using class II- and Lamp-specific antibodies showed a perfect colocalization between the two markers for both Y227A reporter molecules, containing either the cytoplasmic tail (Fig. 5A-C) or the almost entire DO $\beta$  chain (Fig. 5D-F). This phenotype was similar to that of DR/DO $\beta$ cyto-expressing cells suggesting that tyrosine 227 is not involved in lysosomal targeting or the generation of enlarged vesicles.



### ***The cytoplasmic tail of HLA-DO encodes a functional LL signal***

We then examined the importance of the di-leucine motif in the lysosomal sorting. The DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA cDNA (Fig. 1B) was cotransfected with DR $\alpha$ TM and distribution of this class II molecule was monitored by flow cytometry (Fig. 4B) and immunofluorescence (Fig. 5G-I). This molecule was expressed at high levels at the cell surface but, in contrast to the wild-type DR/DO $\beta$ cyto or DR/DO $\beta$ cytoY227A phenotypes observed above (Fig. 3A and 5A), confocal microscopy revealed a diffuse intracellular labeling and the absence of vesicular accumulation (Fig. 5G). The pattern was similar to the one observed using the DR1 transfected HeLa cells (Fig. 3G). There was a clear loss of the enlarged perinuclear class II<sup>+</sup> vesicles such as those found in DR/DO $\beta$ cyto cells. In addition, the Lamp-1 pattern is made principally of small discrete vesicles scattered all over the cytoplasm. This pattern is reminiscent of the signal obtained using DR1-expressing cells (Fig. 3H and (44,60)) and further demonstrates that the di-leucine motif is functional and necessary for lysosomal sorting of the reporter molecule.

The critical role of the di-leucine motif was confirmed in independent experiments using the mutated mixed pair DR $\alpha$ TM+DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ . The di-leucine mutation (DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ LL242-243AA) (Fig.4D) inhibited lysosomal accumulation of this reporter molecule as judged by the diffuse intracellular staining and the lack of colocalization with the Lamp-1 molecule (Fig. 5 J-L). Altogether, these results clearly establish that the cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$  contains a functional di-leucine lysosomal sorting motif.

### ***Mutation-Induced Cell Surface Redistribution***

Lack of lysosomal sorting caused by mutation of the leucine-leucine motif must result in cell surface accumulation and flow cytometry was used to evaluate this redistribution within a cell population. Similar analysis were

previously reported by others to highlight the plasma membrane redistribution of class II molecules upon dendritic cell maturation (64). To analyze the distribution of the reporter molecule, the staining obtained at the cell surface was compared to the total amount of class II molecules as determined by staining simultaneously the cell surface and the intracellular content following membrane permeabilisation with saponin. To validate this assay in our system, we first used DR molecules fused with the well-characterized DM $\beta$  and DM $\beta$ Y230A cytoplasmic tails (Fig. 1A and B). Indeed, it has been shown previously that the tyrosine motif encoded in the cytoplasmic tail of HLA-DM $\beta$  mediates trafficking to lysosomal compartments and that disruption of this tyrosine motif results in enhanced cell surface expression (40-42). In accordance with these previously published data, figure 6 shows that the mutation of the tyrosine 230 to an alanine in DR/DM $\beta$ cyto (DR/DM $\beta$ cytoY230A) causes a dramatic redistribution of the molecules to the cell surface. Such stably transfected populations contain negative cells which serve as an internal control. These cells probably express only one or the other chain of the heterodimer and did not stain with L243. In these conditions, given the high background obtained with the intracellular staining method used for flow cytometry, there is an apparent underestimation of the total number of class II molecules.

We then analyzed the DO $\beta$  cytoplasmic tail mutants in this assay. When compared to the superimposed total and surface profiles of the DR1-expressing cells (Figure 7A), the curves obtained for the cells expressing the DR/DO $\beta$ cyto reporter molecules (Fig. 7B) showed a distinct pattern; the signal for the surface amount of class II molecules is much weaker than the one for total class II. This result is consistent with an intracellular accumulation of the reporter molecules and the role of the cytoplasmic tail of DO $\beta$  in the sorting to the endocytic pathway. These results have been reproduced consistently using either unsorted and sorted populations expressing low or high levels of reporter

molecules, as well as with the mixed DR $\alpha$ TM + DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  pair (data not shown). The data corroborates the confocal microscopy analysis presented above showing the existence of a lysosomal sorting signal in reporter molecules containing the DO $\beta$  cytoplasmic tail. We next determined the distribution of class II molecules in cells expressing DR/DO $\beta$ cytoY227A. The intracellular and surface staining profiles were similar to those of the wild-type DR/DO $\beta$ cyto chimera inasmuch as the intracellular and cell surface curves did not overlap in these conditions (Fig. 7C). The experiment confirmed that the Y227A mutation does not alter lysosomal sorting.

Finally, we examined the effect of the LL $\rightarrow$ AA mutations in this assay. Figure 7D shows that the DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA molecules were clearly redistributed to the cell surface as the patterns for total versus surface expression are comparable between cells expressing DR $\beta$  or DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA molecules. This result confirmed the critical role of the di-leucine motif in sorting the reporter molecules to the endocytic pathway.

***A consensus tyrosine-based motif rescued the lysosomal expression of the LL $\rightarrow$ AA reporter molecule***

Having generated a mutated reporter molecule which is defective in lysosomal sorting (DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA), it became feasible to further characterize the potential role of tyrosine 227. Indeed, the possibility remained that our cellular or experimental settings did not allow the efficient recognition of the GYVRT sequence. Thus, to test if a known functional tyrosine-based motif would have been recognized in our chimeras, we designed a “gain” experiment by reconstructing a consensus YXXL signal around the pre-existing Y227 of the DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA molecule. This was performed by replacing the threonine 230 by the critical hydrophobic leucine residue to create the YVRL sequence (DR/DO $\beta$ cytoAA/T230L) (Fig. 1B). The mutated cDNA

was transfected in HeLa cells together with the DR $\alpha$ TM cDNA and the pattern of expression of this heterodimer was verified in the bulk population. Wild-type DR $\beta$  and DR/DO $\beta$ cyto molecules were detected mostly at the cell surface by fluorescence microscopy. However, analysis of the HeLa DR/DO $\beta$ cytoAA/T230L cells revealed a defined intracellular staining for the class II molecule with the presence of many enlarged vesicles (Fig. 8C). Little if any surface expression was detected on these cells (and see below) and this pattern is similar to the one observed for the DR/DM $\beta$ cyto molecule (Fig. 8D). These results confirmed the efficient intracellular sorting of molecules containing a functional tyrosine motif. The reduced surface expression of these molecules was confirmed by flow cytometry using unsorted cells from a series of independent transfections (Fig. 9). The weak but detectable surface expression of the DR/DO $\beta$ cytoAA/T230L molecules could be due to the location of the tyrosine with respect to the transmembrane region. When compared to the cytoplasmic tail of HLA-DM, the tyrosine residue in DR/DO $\beta$  is closer to the transmembrane (Fig. 1B) probably resulting in less stringent sorting toward lysosomes (61,65). As whole, these results confirm that the tyrosine 227 in wild-type DO $\beta$  is not part of a classical if any tyrosine-based sorting signal.

We then tested the phenotype of cells expressing a reporter class II molecule bearing both the di-leucine and tyrosine motifs. The presence of two distinct signals is reminiscent of the situation in the DM/DO complex which displays two motifs on separate cytoplasmic tails. The YXXL motif was introduced in the “wild-type” DR/DO $\beta$ cyto molecule which contains the original LL sequence (Fig.1B), and stable transfectants were generated (DR/DO $\beta$ cytoT230L). The class II staining patterns obtained by flow cytometry or fluorescence microscopy were comparable to the ones observed for HeLa DR/DM $\beta$ cyto or DR/DO $\beta$ cytoAA/T230L (Fig. 8-9). Again, the presence of a tyrosine motif precluded high levels of surface expression of a

DR/DO $\beta$  reporter molecule demonstrating that the two families of motifs, LL and YXXL, are not equivalent and suggesting that the tyrosine-based sorting signal is dominant over the di-leucine motif.

***The di-leucine motif of HLA-DO $\beta$  is not absolutely required for lysosomal sorting of the DO-DM complex.***

A previous study showed that HLA-DO must first associate with HLA-DM to egress the ER and gain access to the lysosomal compartments (39). Since both DO and DM contain a sorting motif susceptible to target the complex to the lysosomes, we sought to determine if the di-leucine motif of HLA-DO was necessary in this process. We reasoned that surface expression of the DM/DO complex and loss of intracellular vesicles would result from mutation of the DO $\beta$ LL sequence if this motif was indeed critical for the sorting. To this end, we compared in HeLa cells the intracellular localization of the HLA-DO/DM complex with that obtained for the same complex but formed with a HLA-DO mutated at its di-leucine motif. We transfected wild-type HLA-DO or HLA-DOAA into HeLa DM<sup>+</sup> cells and performed co-immunoprecipitations to confirm by western blotting the presence of associated DO $\alpha$  and  $\beta$  chains in these cells (Fig. 10A). We then analyzed the localization of the DO/DM complexes by fluorescence microscopy using antibodies specific for DO $\beta$  or DM $\beta$ . Immunostaining revealed well defined vesicles for both the DM/DO and DM/DOAA complexes (Fig. 10A). These patterns were similar to the one described previously in HeLa cells for the wild-type DM/DO complex and clearly different from the ER staining obtained for HeLa cells expressing DO alone (Fig. 10B and (39)). Contrary to the drastic effect of the di-leucine mutation introduced in reporter molecules, this amino acid change did not affect the vesicular accumulation of DO in the presence of HLA-DM. Interestingly, both the HeLa DM.5 cells expressing HLA-DO and HLA-DOAA were negative when assayed by flow cytometry for the class II surface expression using the polyclonal mouse serum against DO $\beta$  (data not shown).

Together, these results agree with the observation described above that the tyrosine motif seems to dominate over the LL signal and suggest that the dileucine is not critical for the lysosomal delivery of the DO/DM complex.

## 2.6 DISCUSSION

The first indication that DO $\beta$  contains targeting information came from experiments on the expression of a mixed isotypic pair between DR $\alpha$  and DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  (44). Immunofluorescence microscopy revealed that this heterodimer was localized in Lamp<sup>+</sup> vesicular structures. However, we were concerned that these molecules might accumulate in intracellular compartments non-specifically as a result of increased stability conferred by the luminal portion of DO. Indeed, HLA-DO normally resides in the lysosomal compartments and must therefore be highly stable in this harsh environment (39). To circumvent this problem and as a first step toward the disclosure of potential DO $\beta$ -encoded sorting signals, we addressed the importance of the cytoplasmic domain by constructing a chimeric DR1 molecule where the cytoplasmic tail of the  $\beta$  chain was replaced by the one of HLA-DO $\beta$  (Fig. 1). Our results clearly demonstrate that this portion of DO $\beta$  is sufficient to bring the reporter molecule to Lamp<sup>+</sup> compartments (Fig. 3A). However, we cannot rule out that amino acids motifs in DO $\alpha$  and DO $\beta$  chains might cooperate to increase sorting efficiency of the native HLA-DO molecule.

The two most common endosomal sorting signals are tyrosine- or leucine-based sequences (18). The former is found in the cytoplasmic tail of such protein as HLA-DM and are usually responsible for specific, rapid internalization from the cell surface. The di-leucine motif is thought to direct proteins to the endosomal/lysosomal compartments principally from the TGN (reviewed in Ref. (66)). Interestingly, HLA-DO's cytoplasmic tail contains two such sequences: one imperfect tyrosine motif centered around position 227 and one di-leucine motif at position 242-243 (Fig.1). Our site-directed mutagenesis analysis revealed that the di-leucine motif is responsible for the localization of reporter molecules in lysosomal compartments. Furthermore, our results demonstrate that the putative tyrosine signal is not recognized as such by the cellular machinery. Since functional tyrosine motifs impede plasma membrane

accumulation, the conclusion that the tyrosine 227 of DO plays no role in sorting probably holds true for B lymphocytes as well. Indeed, expression of a mixed DR $\alpha$ +DO $\beta$  heterodimer in a class II negative mutant B cell line also resulted in significant surface expression (not shown).

The exact route taken by molecules of the antigen presentation machinery is still a matter of debate (reviewed in Ref. (66)). Early experiments in HeLa cell showed that the AP1 adaptor was responsible for the transport of the Ii-class II complex to the endocytic compartment suggesting that this process is clathrin-dependant (67). AP-1 would mediate sorting at the trans-Golgi network and it would be recruited by the leucine-based motifs in Ii. It remains to be determined if our reporter molecules are also sorted by AP-1 adaptor proteins.

Although the bulk of the Ii-class II complexes reaches the endocytic pathway directly from the trans-Golgi, a significant proportion of the proteins would first access the cell surface (68-70). Then, AP-2 is probably recruited at the plasma membrane for integration of Ii-class II complexes in clathrin-coated vesicles which mediate transport to the endocytic pathway (66). Plasmon resonance experiments confirmed the interactions between Ii and both AP1 and AP2 chains of the clathrin-coated vesicles (71). We cannot rule out that reporter molecules containing DO $\beta$  reach the lysosomes only after transiting at the cell surface. However, these molecules are internalized and recycle back to the cell surface in HeLa cells with similar kinetics as DR1 which does not accumulate in intracellular compartments ((44) and data not shown). This suggests that sorting, at least in HeLa cells, does not operate from the surface but rather directly at the trans-Golgi. Also, it is not clear if plasma membrane expression conferred by the cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$  is the result of trafficking through the default pathway or exocytosis from lysosomes (72). Whatever the mechanism, cell surface expression of our reporter molecule or of Ii in B lymphocytes suggests that sorting directed by the di-leucine motif is not very stringent. It is unlikely that the surface accumulation of our chimeric molecules



results from the over-expression of the transfected proteins. Indeed, saturation of the sorting machinery in cells expressing the DR/DM $\beta$ cyto would have resulted in the surface expression of molecules such as Lamp-1 which also contain a tyrosine-based motif (73,74). No such expression could be detected by flow cytometry (data not shown).

It is intriguing that mouse and rabbit O $\beta$  chains do not include a LL motif (75,76). This suggests a more specialized function for this molecule in humans. However, it might explain why some H-20 was detected at the surface of splenocytes by radioiodination studies (77). Upon dissociation from DM, few H2-O molecules might escape endosomal retention (see below) and end up at the cell surface.

Although HLA-DO contains a functional sorting signal, association with HLA-DM is an obligatory step in its maturation. Karlsson and co-workers showed that the DO $\alpha$  and DO $\beta$  chains associate in the ER but that egress and acquisition of complex sugars require an interaction with HLA-DM (39). DM most probably assists in the folding of DO allowing its release from ubiquitous ER chaperones. From there however, the relative importance of DO- and DM-encoded motifs in directing the complex to lysosomes was not known. Our results show that substitution of the two leucines for alanines in HLA-DO $\beta$  has no significant effect on vesicular accumulation and suggest that DM's tyrosine-based signal is indeed the functional motif in this complex. Again, the fact that the DO/DM complex does not accumulate at the plasma membrane of B lymphocytes or transfected cells (on the contrary to the reporter molecules relying on DO's di-leucine motif) suggests that the tyrosine motif of DM is recognized by the sorting machinery.

The fact that no DM-free HLA-DO has been found outside the ER (39) and that the tyrosine motif of DM is sufficient to sort the complex to lysosomes, suggests that the role of HLA-DO's LL motif needs to be reconsidered. Maybe this di-leucine motif has a complementary role by targeting some of the DO/DM complexes to earlier, less acidic compartments than MIICs where it

might also modulate class II loading. Presentation of antigens which are independent of Ii expression and are dependant on the capacity of MHC molecules to recycle, could be sensitive to the expression of DO (78). This alternate pathway allows a wider repertoire of peptides to be loaded on class II molecules, probably favoring presentation of epitopes which require limited proteolysis of the antigenic protein (79). The passage of DO through such early compartments would be in agreement with the recent suggestion that this molecule prevents peptide loading of antigens taken-up by fluid phase endocytosis but not of those internalized via surface immunoglobulins and transported to highly acidic compartments (35). Future experiments should address the effect of HLA-DO expression on these different antigen loading pathways.

Another possible function for the di-leucine motif of DO was brought up by studies on Ii which, in HeLa cells, was shown to delay the progression of proteins from early endosome to late endosomes (80). A second group suggested that the Ii chain might even retain class II molecules and endocytosed antigens in early endocytic compartments probably to favor peptide loading (81). In light of these reports, we might envisage that HLA-DO slows down the progression of HLA-DM through the early stages of the endocytic pathway. This may serve to edit or inhibit peptide loading in compartments that are otherwise not very restrictive for peptide loading

Alternatively, DO could compensate for DM's lack of signaling in cellular conditions where DM's tyrosine motif is hidden or fails to be recognized by the sorting machinery. By analogy, Ii was shown to interact with DM and to restore the function of a DM molecule lacking its sorting signal (41). The interplay between multiple sorting motifs, for example, in multimolecular structures including HLA-DM/DO and tetraspan proteins such as CD82, will require further investigation (82).

## 2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Drs. R. P. Sékaly and Eric Long for helpful discussions, antibodies and cell lines; M. Hugo Dilhuidy for confocal microscopy; M. Serge Sénéchal for FACS analysis and cell sorting and Dr. Eric Cohen for the use of the fluorescence microscopy facility. We thank Georges Azar for constructing the DR/DO $\beta$ cyto cDNA and for helpful discussions. The H4A3 monoclonal antibody developed by J.T. August & J.E.K. Hildreth was obtained from the developmental studies hybridoma bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. This work was supported by grants to J.T. from the Medical Research Council of Canada (MRC) and the Cancer Research Society Inc (SRC). F.D. is a scholar of the FCAR (Fonds des Chercheurs et Aides à la Recherche). J.T. is supported by a scholarship from the MRC.

## 2.8 REFERENCES

1. Cresswell, P. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259-293
2. Kvist, S., Wiman, K., Claesson, L., Peterson, P.A. and Dobberstein, B. (1982) *Cell.* **29**, 61-69
3. Roche, P.A. and Cresswell, P. (1990) *Nature.* **345**, 615-618
4. Romagnoli, P. and Germain, R.N. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1107-1113
5. Stumptner, P. and Benaroch, P. (1997) *EMBO J.* **16**, 5807-5818
6. Busch, R., Cloutier, I., Sekaly, R.-P. and Hammerling, G.J. (1996) *EMBO J.* **15**, 418-428
7. Bikoff, E.K., Huang, L.-Y., Episkopou, V., van Meerwijk, J., Germain, R.N. and Robertson, E.J. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 1699-1712
8. Viville, S., Neefjes, J.J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C. and Mathis, D. (1993) *Cell.* **72**, 635-648
9. Rovere, P., Forquet, F., Zimmermann, V.S., Trucy, J., Ricciardi-Castagnoli, P. and Davoust, J. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**, 195-201
10. Sekaly, R.-P., Tonnelle, C., Strubin, M., Mach, B. and Long, E.O. (1986) *J. Exp. Med.* **164**, 1490-1504
11. Runnels, H.A., Weber, D.A., Moore, J.C., Westerman, L.E. and Jensen, P.E. (1997) *Molec. Immunol.* **34**, 471-480

12. Zhong, G.M., Castellino, F., Romagnoli, P. and Germain, R.N. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2061-2066
13. Bakke, O. and Dobberstein, B. (1990) *Cell.* **63**, 707-716
14. Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S.L., Quaranta, V. and Peterson, P.A. (1990) *Nature.* **348**, 600-605
15. Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O. and Germain, R.N. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 583-596
16. Odorizzi, C.G., Trowbridge, I.S., Xue, L., Hopkins, C.R., Davis, C.D. and Collawn, J.F. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 317-330
17. Pieters, J., Bakke, O. and Dobberstein, B. (1993) *J. Cell. Sci.* **106**, 831-846
18. Heilker, R., Spiess, M. and Crottet, P. (1999) *Bioessays.* **21**, 558-567
19. Nakagawa, T.Y. and Rudensky, A.Y. (1999) *Immunol. Rev.* **172**, 121-129
20. Ericson, M.L., Sundstrom, M., Sansom, D.M. and Charron, D.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26531-26538
21. Wu, S. and Gorski, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **272**, 17055-17060
22. Denzin, L.K., Robbins, N.F., Carboy-Newcomb, C. and Cresswell, P. (1994) *Immunity.* **1**, 595-606

23. Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E. and Zaller, D.M. (1995) *Nature*. **375**, 802-806
24. Weber, D.A., Evavold, B.D. and Jensen, P.E. (1996) *Science*. **274**, 618-620
25. Denzin, L.K. and Cresswell, P. (1995) *Cell*. **82**, 155-165
26. Sherman, M.A., Weber, D.A. and Jensen, P.E. (1995) *Immunity*. **3**, 197-205
27. Denzin, L.K., Hammond, C. and Cresswell, P. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2153-2165
28. Kropshofer, H., Arndt, S.O., Moldenhauer, G., Hammerling, G.J. and Vogt, A.B. (1997) *Immunity*. **6**, 293-302
29. Neefjes, J. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 1421-1425
30. Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S. and Hammerling, G.J. (1996) *EMBO J.* **15**, 6144-6154
31. Van Ham, S.M., Grueneberg, U., Malcherek, G., Broeker, I., Melms, A. and Trowsdale, J. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2019-2024
32. Robbins, A.R. and Roff, C.F. (1987) *Meth. Enzymol.* **138**, 458
33. Denzin, L.K., Sant'Angelo, D.B., Hammond, C., Surman, M.J. and Cresswell, P. (1997) *Science*. **278**, 106-109
34. Van Ham, S. M., Tjin, E. P. M., Lillemeir, B. F., Gruneberg, U., Van Meijgaarden, K. E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B.,

- Rahman, D., Ottenhoff, T. H. M., Pappin, D. J. C., Trowsdale, J., Neefjes, J. (1997) *Current Biol.* **7**, 950-957
35. Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C.D., Wong, P., Ngo, K., Teyton, L., Peterson, P.A., Brunmark, A., Rudensky, A.Y., Fung-Leung, W.P. and Karlsson, L. (1998) *Immunity.* **8**, 233-243
36. van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T., Pappin, D. and Neefjes, J. (2000) *J. Exp. Med.* **191**, 1127-1136
37. Kropshofer, H., Vogt, A.B., Thery, C., Armandola, E.A., Li, B.C., Moldenhauer, G., Amigorena, S. and Hammerling, G.J. (1998) *EMBO J.* **17**, 2971-2981
38. Douek, D.C. and Altmann, D.M. (1997) *Int. Immunol.* **9**, 355-364
39. Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W.P., Jackson, M., Peterson, P.A. and Karlsson, L. (1996) *EMBO J.* **15**, 4817-4824
40. Marks, M.S., Roche, P.A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P.J. and Bonifacino, J.S. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 351-369
41. Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P.A. and Karlsson, L. (1995) *Immunity.* **3**, 561-572
42. Copier, J., Kleijmeer, M.J., Ponnambalam, S., Oorschot, V., Potter, P., Trowsdale, J. and Kelly, A. (1996) *J. Immunol.* **157**, 1017-1027

43. Copier, J., Potter, P., Sacks, S.H. and Kelly, A.P. (1998) *Immunology*. **93**, 505-510
44. Samaan, A., Thibodeau, J., Mahana, W., Castellino, F., Cazenave, P.A. and Kindt, T.J. (1999) *Int. Immunol.* **11**, 99-111
45. Robadey, C., Ammerlaan, W., Muller, C., Cloutier, I., Sékaly, R.P., Haefliger, J.A. and Demotz, S. (1997) *J. Immunol.* **159**, 3238-3246
46. Jacobson, S., Sekaly, R.-P., Jacobson, C.L., McFarland, H.E. and Long, E.O. (1989) *J. Virol.* **63**, 1756-1762
47. Tonnelie, C., DeMars, R. and Long, E.O. (1985) *EMBO J.* **4**, 2839-2847
48. Thibodeau, J., Lavoie, P.M., Samaan, A., Corre, J.P., Sékaly, R.P. and Cazenave, P.A. (1998) *Mol. Immunol.* **35**, 885-893
49. Rosen-Bronson, S. and Long, E.O. (1991) *Immunogenetics*. **33**, 124-131
50. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) *Gene*. **77**, 51-59
51. Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J.I., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K.I., Yoshida, M. and Arai, N. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 466-472
52. Kelly, A.P., Monaco, J.J., Cho, S. and Trowsdale, J. (1991) *Nature*. **353**, 571-573
53. Panina-Bordignon, P., Fu, X., Lanzavecchia, A. and Karr, R.W. (1992) *J. Exp. Med.* **176**, 1779-1784



54. Radka, S.F., Machamer, C.E. and Cresswell, P. (1984) *Hum. Immunol.* **10**, 177-188
55. Guy, K., Van Heyningen, V., Cohen, B.B., Deane, D.L. and Steel, C.M. (1982) *Eur. J. Immunol.* **12**, 942-948
56. Pierre, P., Denzin, L.K., Hammond, C., Drake, J.R., Amigorena, S., Cresswell, P. and Mellman, I. (1996) *Immunity.* **4**, 229-239
57. Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) *Virology.* **52**, 456-467
58. Lavoie, P.M., Thibodeau, J., Cloutier, I., Busch, R. and Sekaly, R.P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 6892-6897
59. Lamb, C.A., Yewdell, J.W., Bennink, J.R. and Cresswell, P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 5998-6002
60. Simonsen, A., Momburg, F., Drexler, J., Hammerling, G.J. and Bakke, O. (1993) *Int. Immunol.* **5**, 903-917
61. Sandoval, I.V. and Bakke, O. (1994) *Trends in Cell Biol.* **4**, 292-297
62. Harter, C. and Mellman, I. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 311-325
63. Motta, A., Bremnes, B., Morelli, M.A., Frank, R.W., Saviano, G. and Bakke, O. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27165-27171
64. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. and Lanzavecchia, A. (1997) *Nature.* **388**, 782-787

65. Potter, P.K., Copier, J., Sacks, S.H., Calafat, J., Janssen, H., Neefjes, J.J. and Kelly, A.P. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 3936-3944
66. Nordeng, T.W., Gorvel, J.P. and Bakke, O. (1998) *Curr Top Microbiol Immunol.* **232**, 179-215
67. Salamero, J., Le Borgne, R., Saudrais, C., Goud, B. and Hoflack, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30318-30321
68. Roche, P.A., Teletski, C.L., Stang, E., Bakke, O. and Long, E.O. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8581-8585
69. Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1995) *EMBO J.* **14**, 37-49
70. Wang, K., Peterson, P.A. and Karlsson, L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17055-17060
71. Hofmann, M.W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K. and Bakke, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36153-36158
72. Wubbolts, R., Fernandez-Borja, M., Oomen, L., Verwoerd, D., Janssen, H., Calafat, J., Tulp, A., Dusseljee, S. and Neefjes, J. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 611-622
73. Marks, M.S., Woodruff, L., Ohno, H. and Bonifacino, J.S. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 341-354
74. Nordeng, T.W. and Bakke, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21139-21148

75. Larhammar, D., Hammerling, U., Rask, L. and Peterson, P.A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14111-14119
76. Chouchane, L., Brown, T.J. and Kindt, T.J. (1993) *Immunogenetics.* **38**, 64
77. Karlsson, L., Surh, C.D., Sprent, J. and Peterson, P.A. (1991) *Nature.* **351**, 485-488
78. Pinet, V.M. and Long, E.O. (1998) *Eur. J. Immunol.* **28**, 799-804
79. Zhong, G., Romagnoli, P. and Germain, R.N. (1997) *J. Exp. Med.* **185**, 429-438
80. Gorvel, J.P., Escola, J.M. and Bakke, O. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2741-2746
81. Loss, G.E.J. and Sant, A.J. (1993) *J. Immunol.* **150**, 3187-3197
82. Hammond, C., Denzin, L.K., Pan, M., Griffith, J.M., Geuze, H.J. and Cresswell, P. (1998) *J. Immunol.* **161**, 3282-3291

## 2.9 ABBREVIATIONS

BSA: bovine serum albumin

PBS: Phosphate buffer saline

APCs: antigen presenting cells

Ii : invariant chain,

ER: Endoplasmic reticulum,

MHC: major histocompatibility complex,

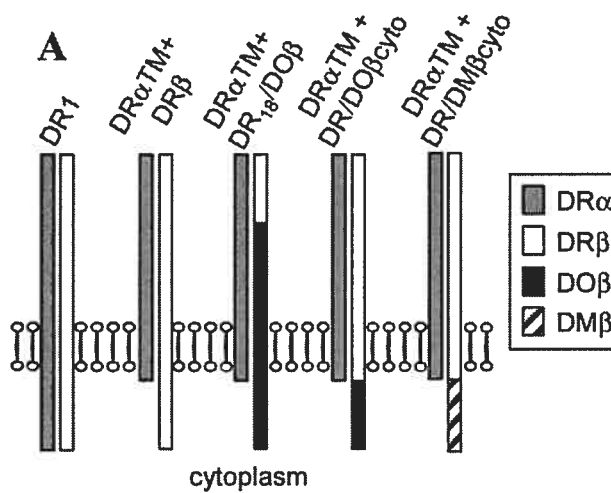
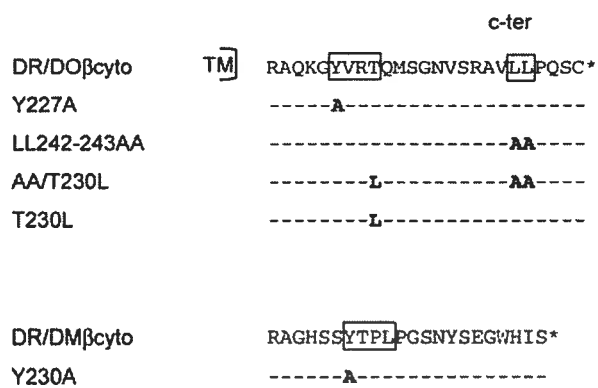
TGN: trans-Golgi network,

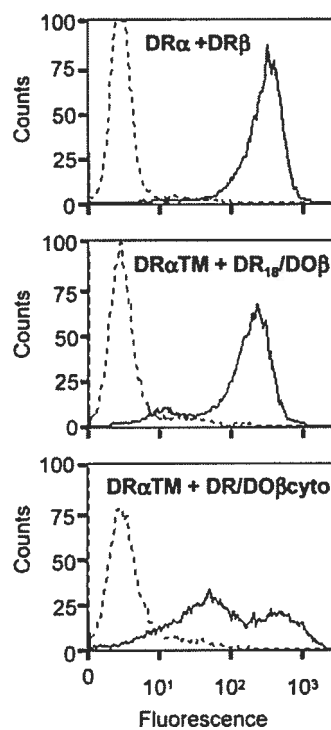
mAb: monoclonal antibody

## 2.10 FIGURES

### **Figure 1. Chimeric molecules and mutants.**

(A) Schematic representation of the different molecules used in this study. These reporter molecules consist of heterodimers between different  $\alpha$  and  $\beta$  chains. Cytoplasmic domain truncations and recombinant molecules are described in Materials and Methods. (B) Amino acid sequence of the chimeric molecules and derived mutants. The star indicates the end of the protein. The first amino acid in DO $\beta$  corresponds to the first amino acid of the cytoplasmic tail. Dashed lines represent identity in the amino acid sequence. Squares represent a potential or documented sorting motif. Bold amino acids identify introduced mutations.

**B**



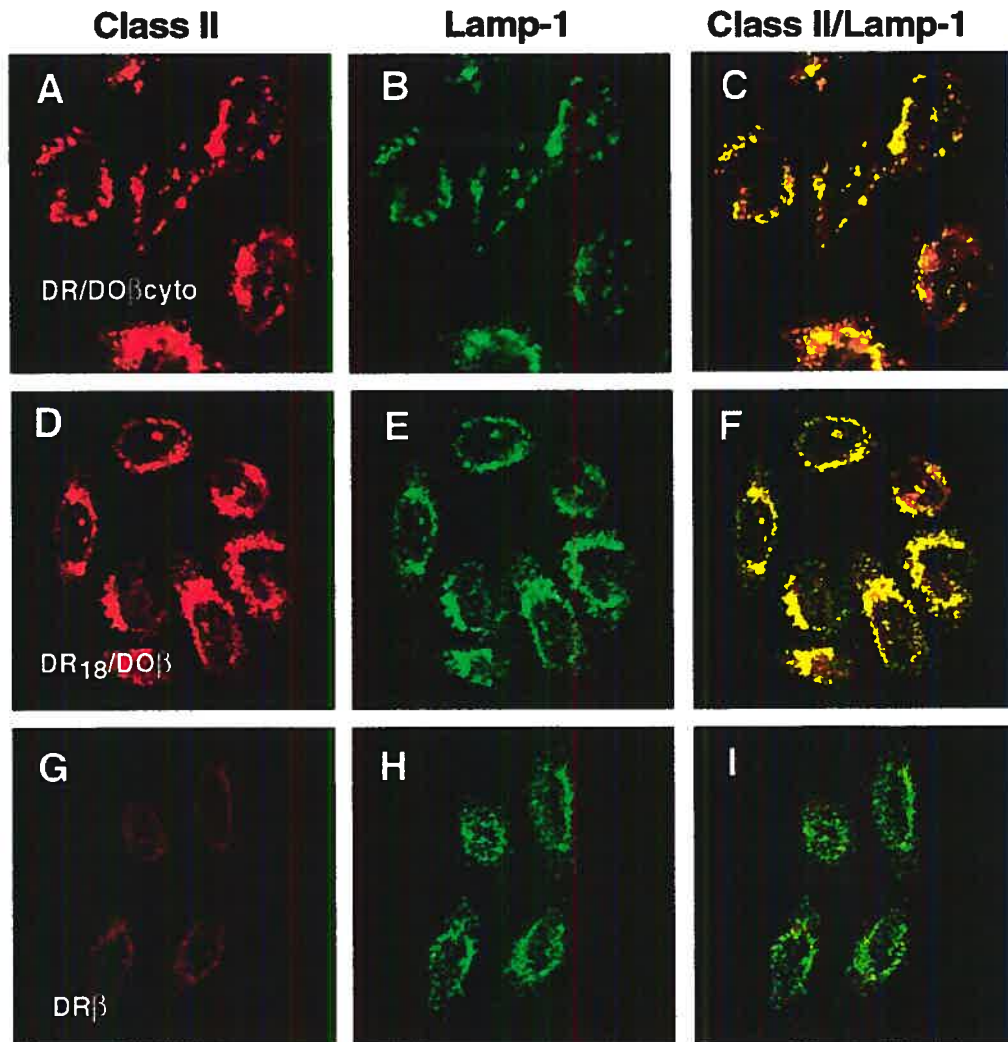
**Figure 2. Cell surface expression of the class II chimeric molecules in transfected HeLa cells.**

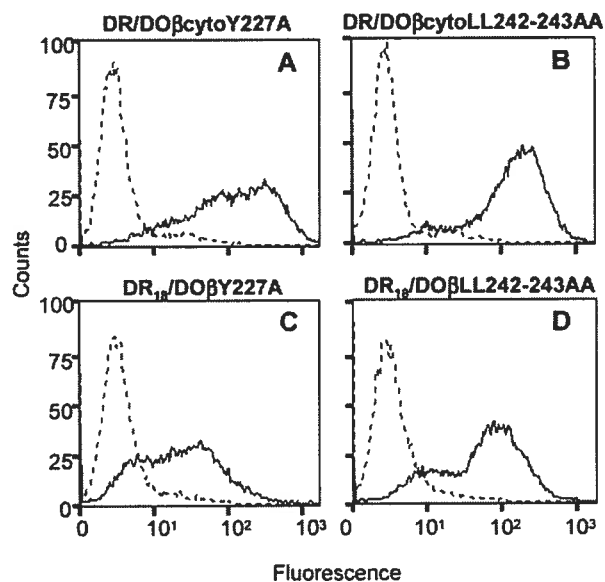
Flow cytometry analysis was performed using FITC-labeled DR $\alpha$  chain-specific L243 antibody (filled line). Dotted lines represent the control fluorescence of cells incubated with a FITC-conjugated goat anti-mouse serum.

**Figure 3. The cytoplasmic tail of HLA-DO $\beta$  is responsible for the lysosomal localization of reporter molecules.**

Saponin-permeabilised cells expressing the DR/DO $\beta$ cyto (A, B, C) or the DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  (D, E, F) molecules paired with the truncated-DR $\alpha$  chain (DR $\alpha$ TM) devoid of its cytoplasmic tail were stained intracellularly to analyze lysosomal sorting. Panels A, D, G show staining with the class II-specific L243 antibody (red), while panels B, E, H highlight the lysosomal staining using the H4A3 antibody specific for Lamp-1 (green). Colocalization of the two antibodies is shown in C, F, I (yellow). Control cells express wild-type DR $\alpha$ +DR $\beta$  (G, H, I). Immunofluorescence was monitored by confocal microscopy.





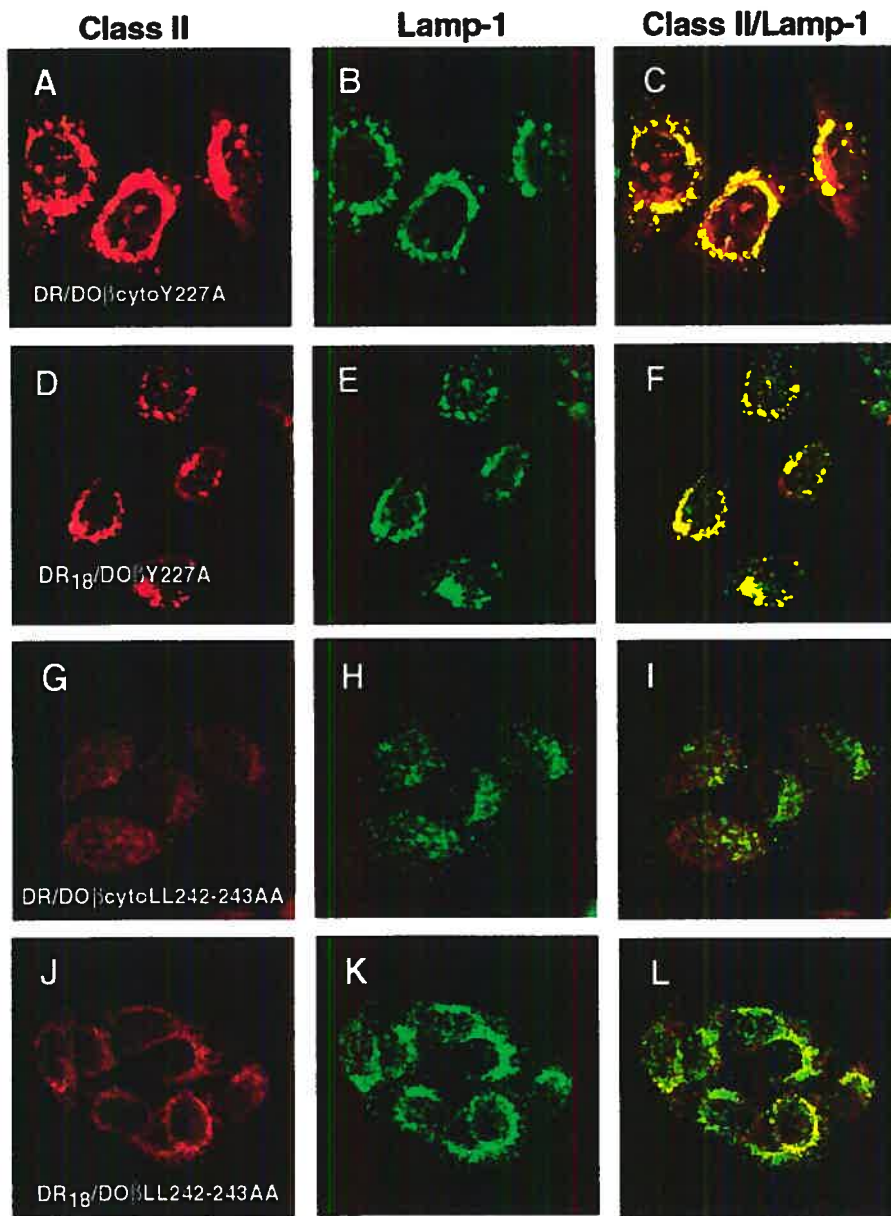


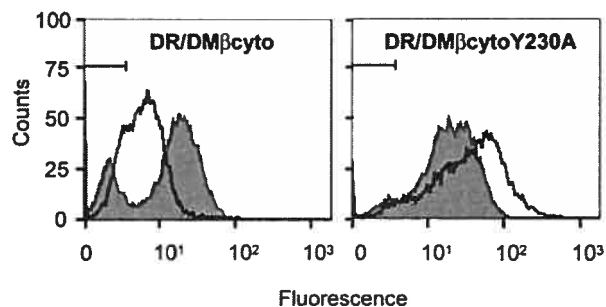
**Figure 4. Cell surface expression of the mutated reporter molecules in transfected HeLa cells.**

HeLa cells were transfected with DR $\alpha$ TM and the indicated cDNAs. Positive cells were sorted and analyzed by flow cytometry analysis using FITC-labeled L243 antibody (filled line). Dotted lines represent the control fluorescence of cells incubated with a FITC-conjugated goat anti-mouse serum.

**Figure 5. The di-leucine motif in DO $\beta$  mediates lysosomal targeting.**

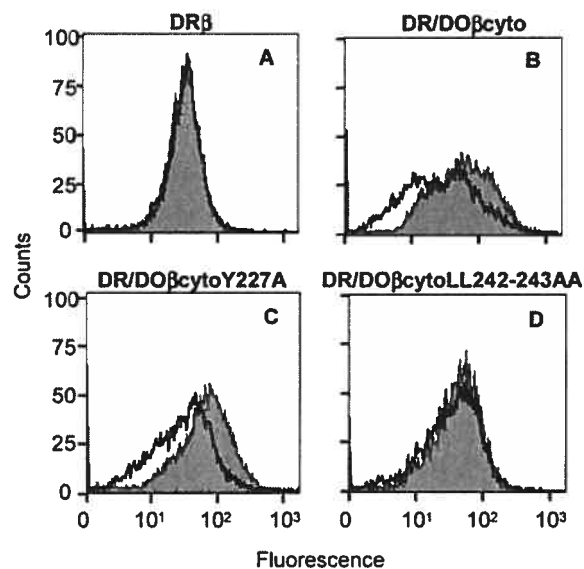
Saponin-permeabilised cells expressing the DR/DO $\beta$ cytoY227A (A, B, C), DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ Y227A (D, E, F), DR/DO $\beta$ cytoLL242-243AA (G, H, I), DR<sub>18</sub>/DO $\beta$ LL242-243AA (J, K, L) molecules paired with the truncated-DR $\alpha$  chain (DR $\alpha$ TM) were stained to analyze the intracellular localization. Panels A, D, G, J show staining using the L243 antibody (red). Panels B, E, H, K represent the lysosomal staining obtained using H4A3 (green) and panel C, F, I, L illustrate the colocalization of the two proteins (yellow). Fluorescence was monitored by confocal microscopy.





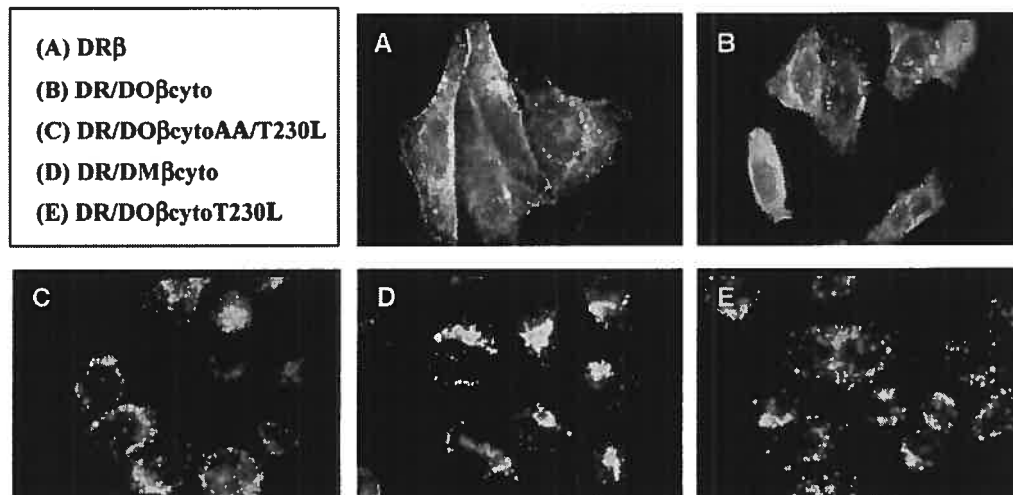
**Figure. 6. Redistribution of the DR/DM $\beta$ cytoY230A molecule to the cell surface.**

Flow cytometry analysis using the L243 illustrates the surface (empty region) and total expression (filled region) of the DR/DM $\beta$ cyto molecule and mutant DR/DM $\beta$ cytoY230A in unsorted HeLa transfected cells. Cells were recovered using trypsin, split and stained separately either at the cell surface, or fixed, permeabilised and stained with the FITC-conjugated L243. Marker indicates the boundary between negative or positive cells for surface expression of the chimeric molecules.



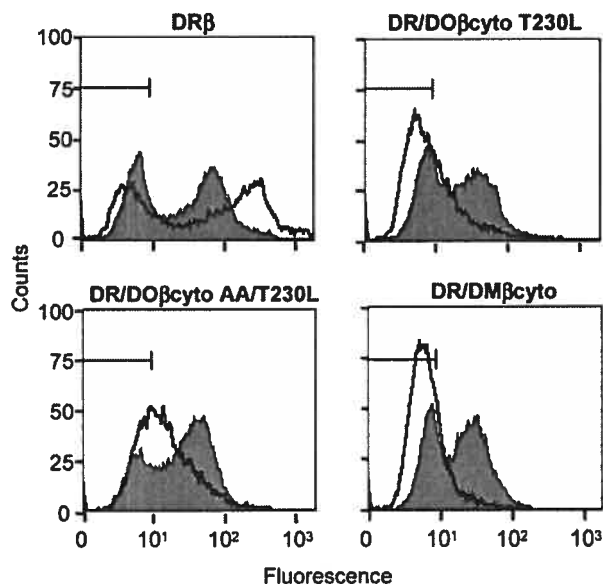
**Figure 7. Cell surface redistribution of the DR/DOβcytoLL242-243AA.**

Surface (bold line) and total (dark region) class II expression was monitored in stably transfected cells using FITC-conjugated L243; (A) DRβ, (B) DR/DOβcyto, (C) DR/DOβcytoY227A, (D) DR/DOβcytoLL242-243AA transfectants. Cells were treated as figure 6. All these cells were transfected with DRα<sup>TM</sup>. Data acquisition was performed under the same settings for all comparable samples after matching the surface and total profiles obtained for the DRβ cells.



**Figure 8. Characterization of the putative tyrosine motif in HLA-DOβ.**

Total class II expression was analyzed simultaneously on permeabilised cells by fluorescence microscopy using biotinylated-L243 followed by Texas red-coupled streptavidin; (A) DRβ, (B) DR/DOβcyto, (C) DR/DOβcytoAA/T230L, (D) DR/DMβcyto, (E) DR/DOβcytoT230L. These β chains were transfected together with DRαTM.



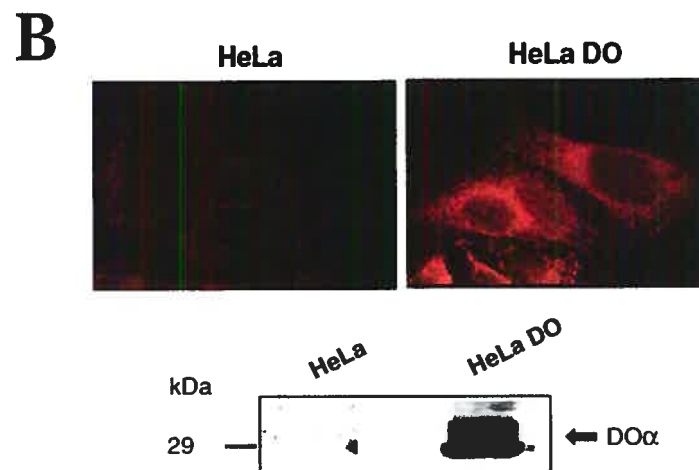
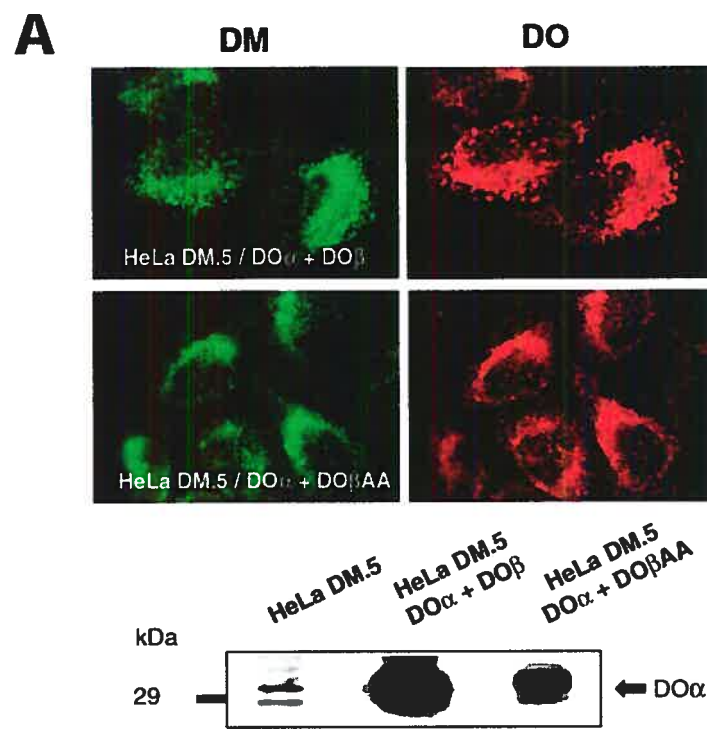
**Figure 9. Reduced surface expression of reporter molecules containing a consensus tyrosine motif.**

Surface (bold line) and total (dark region) class II expression was monitored in independent, stably transfected, unsorted cell populations using FITC-conjugated L243. All these cells were transfected with DR $\alpha$ TM. Cells located left of the marker in the DR $\beta$  panel are negative for class II expression and served as internal controls to adjust acquisition settings.



**Figure 10. Mutation of the LL motif in DO $\beta$  does not prevent lysosomal accumulation of the DO/DM complex.**

(A) Immunofluorescence microscopy showing the pattern of expression of DO and DM. Saponin-permeabilised HeLa DM.5 cells expressing either the full length DO $\alpha$  + DO $\beta$  or the full length DO $\alpha$  + DO $\beta$ AA molecule were stained intracellularly to analyze localization. Cells were stained with the DM-specific antibody (green) and with the mouse serum specific for HLA-DO $\beta$  (red). The presence of both the DO $\alpha$  and DO $\beta$  chains in transfected DM.5 HeLa cells was confirmed by Western blot analysis of samples immunoprecipitated with the mouse DO $\beta$ -specific serum and revealed with a DO $\alpha$ -specific rabbit serum. (B) Intracellular staining of control HeLa cells expressing HLA-DO molecules alone revealed a weak localized ER pattern but no scattered endosomal vesicles. Western blot analysis as above revealed the presence of both the DO $\alpha$  and DO $\beta$  chains in transfected HeLa DO cells.





**CHAPITRE 3 – ARTICLE**

**The YXXL cytoplamic motif of HLA-DM regulates sorting into exosomes**

Alexandre Brunet<sup>\*</sup>, Marie-Élaine Gauvreau<sup>\*</sup>, Andrew Shaw<sup>†</sup> and Jacques Thibodeau<sup>\*</sup>

TO BE SUBMITTED TO *Traffic*

Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada. <sup>†</sup> Laboratory of Oncology, Department of Oncology, University of Alberta, Cross Cancer Institute, 11560 University Avenue, Edmonton, Alberta, Canada.

**Running title:** HLA-DM sorting to exosomes

**Corresponding author:** Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, (Qué.), Canada, H3C 3J7  
**Tel:** (514) 343-6279; **Fax:** (514) 343-5701

e-mail: 

### 3.1 RÉSUMÉ

HLA-DM est une molécule non classique du CMH-II, qui contrôle le chargement des peptides antigéniques sur les molécules classiques HLA-DR. Le chargement peptidique a lieu dans les compartiments endosomiques riches en molécules du CMH-II, où HLA-DM réside grâce à son motif tyrosine. Les molécules HLA-DR matures atteignent la surface cellulaire, mais s'accumulent également dans les membranes exosomales. Ces vésicules membranaires sont relâchées dans le milieu ambiant lors de la fusion du compartiment multivésiculaire avec la membrane cellulaire. Ils sont extraits des milieux de culture par centrifugation à grande vitesse. Notre étude vise à déterminer la nature des mécanismes de ciblage exosomal des molécules du CMH-II. Nos résultats démontrent que DM est présent dans les fractions exosomales de la lignée cellulaire lymphoblastoïde 721.45. Des résultats similaires sont obtenus avec les cellules HeLa transfectées avec CIITA. Afin de comprendre les mécanismes qui dirigent l'entrée et la rétention de cargos dans les exosomes, HLA-DM a été transfecté seul dans les cellules HeLa. Dans ces conditions, DM est exclue des membranes exosomales, à moins d'avoir préalablement inactivé son signal tyrosine (YXXL) par mutagenèse dirigée. Ces résultats suggèrent que ce signal est sans doute inactivé dans les lymphocytes B et les cellules HeLa CIITA. Étonnamment, une molécule chimérique DR fusionnée au domaine cytoplasmique de DM $\beta$ , demeure incorporée dans les membranes exosomales des cellules HeLa transfectées. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que le destin des protéines transmembranaires dans les compartiments multivésiculaire est dicté par les signaux cytoplasmiques et par d'autres facteurs cellulaires, probablement liés à la capacité de formation de complexes multimoléculaires.

### 3.2 ABSTRACT

HLA-DM is a non-classical MHC class II molecule that modulates the loading of antigenic peptides on molecules such as HLA-DR. Peptide exchange occurs in class II-rich compartments of the endocytic pathway where DM resides due to its tyrosine-based sorting signal. Mature peptide-loaded HLA-DR molecules end-up at the cell surface but also accumulate in exosomal vesicles. These small structures are shed presumably through the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane and are obtained by high speed centrifugation of the culture medium. Immunoblot analyses revealed that DM is present in exosomal fractions of the 721.45 B lymphoblastoid cell line. A similar conclusion was reached when looking at exosomes from HeLa cells transfected with CIITA. To gain insight into the intracellular mechanisms regulating exosome entry and retention of cargo, HLA-DM was transfected in HeLa cells. Interestingly, under these conditions, DM was excluded from exosomes unless its tyrosine-based lysosomal sorting motif (YXXL) was inactivated by site-directed mutagenesis. These results suggest that this signal can be overcome in B cells and HeLa CIITA. Unexpectedly, a chimeric DR molecule with the cytoplasmic tail of DM was still efficiently incorporated into exosomes of transfected HeLa cells. Altogether, these results demonstrate that the fate of transmembrane proteins delivered to MVBs is dictated by signals in their cytoplasmic tail as well as other intrinsic factors, probably related to the formation of specific supramolecular complexes in membrane microdomains.

### 3.3 INTRODUCTION

Multivesicular bodies (MVBs) of the endocytic pathway contain internal vesicles which are formed by an inward budding from the outer membrane of the compartment (1). They contain lipids and transmembrane proteins such as endocytosed activated receptors that will be degraded by the lysosomal acid hydrolases upon fusion with lysosomes (reviewed in (2,3)). Alternatively, upon fusion with the plasma membrane, MVBs are thought to release their content outside the cell in the form of exosomes (4,5). These 50-90 nm exocytic membrane vesicles have been described mostly in hematopoietic cell lineage but there has been numerous reports suggesting that they are part of a more general cellular phenomenon (reviewed in(6)). Of the various roles attributed to exosomes, some overlap cell-specific effector functions. One of the most striking examples of their potential importance is the capacity of DCs-derived exosomes to induce a specific T cell response (7). Interestingly, it was demonstrated that exosomes could be used as a cell free tumor antigen-presenting vehicle for immunotherapy (8). One persistent feature of exosomes secreted by human and mouse APCs is the extensive enrichment of classical MHC class II molecules such as DR. This was observed for almost every MHC class II expressing cell, including cell line transfectants and tumor cells (9-12). The mechanisms that regulate cargo entry into these exocytic vesicles are beginning to emerge. For some proteins, especially in yeast, mono-ubiquitination-dependent or independent mechanisms have been described (13). The evidence that monoubiquitination regulates entry into MVB vesicles is compelling. The group of Emr group has shown that this post-translational modification serves as a signal for cargo entry into MVBs and demonstrated the importance of the ESCRT machinery in this pathway (reviewed in (3)). In mammalian cells, monoubiquitination of activated tyrosine kinase receptors such as EGFR would allow degradation following endocytosis from the plasma membrane and sorting into internal membranes of MVBs (14).



Other mechanisms involved in MVB sorting are less well characterized. It was recently proposed for MHC class II molecules that lipid raft domains might constitute the platform for entry into MVBs internal vesicles. Proteins with low recycling kinetics can be packaged into these microdomains for degradation or for exosomal secretion (15). The exact relationship between the exosomal and degradative outcome of MVB sorting is not clear (16). Still, as internal vesicles of some MVBs will become exosomes, the clathrin coats and the HRS protein from the ESCRT complex are most likely involved in their biogenesis (1).

HLA-DM is a well-characterized non-classical MHC class II molecule which as been shown to regulate the peptide loading onto classical MHC II molecules. Its principal functions include removal of the invariant chain peptide (CLIP), peptide editing and stabilization of empty MHC II molecules (reviewed in (17)). Contrarily to other classical MHC II molecules, DM encodes a functional tyrosine-based lysosomal sorting motif and is found mostly inside late endosomal compartments, referred to as MIICs (MHC class II compartments) (18-20). Once thought of as specialized compartments of APCs, MIICs are now considered as regular endosomal compartments enriched with the MHC II presentation machinery (21,22). On the whole, these late endosomal compartments share a distinct multivesicular or multilaminar morphology, the former consisting of an outer membrane enclosing free vesicles while the later is formed by concentric membrane sheets (1,23).

The exact sub-vesicular location of DM is not clear. IEM studies using various cell types suggest that DM would be mostly localized to the limiting membrane of MVBs (24-26). Clearly however, DM or reporter molecules fused to the cytoplasmic tail of DM $\beta$  have been observed on internal membranes of MVBs or multilaminar compartments (18,19,27,28). Here, to gain insight into the molecular features responsible for sorting cargo proteins into exosomal

vesicles, we eliminated the tyrosine-based motif on the DM $\beta$  chain by site-directed mutagenesis. Our results suggest that such cytoplasmic signals can affect the whereabouts of transmembrane proteins inside MVBs.

### 3.4 EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### *Plasmids*

The RSV.5 DMY-A plasmid was generated by overlap PCR to modify the cytoplasmic 230-YTPL sorting motif. In order to mutate tyrosine 230 in the DM $\beta$  cytoplasmic region, a first PCR reaction was performed on pBS 1-DM $\beta$ .1 using the reverse primer and a mutagenic primer (DM $\beta$ Y230A*Eco*47IIIb: 5'-AGG AAG AGG AGT AGC GCT AGA GTG GCC AGC-3'). A second fragment was amplified from pBS 1-DM $\beta$ .1 using a complementary mutagenic primer (DM $\beta$ Y230A*Eco*47IIIc: 5'-GCT GGC CAC TCT AGC GCT ACT CCT CTT CCT-3') and the universal primer. The two overlapping PCR products were mixed and a final PCR reaction was completed using the flanking primers. This PCR product was subsequently digested with *Sac*I and *Hind*III, cloned into pBS 1-DM $\beta$ .1 and sequenced (pBSDM $\beta$ Y230A). Finally, a *Sal*I-*Xba*I fragment was cloned into RSV.5 neo plasmid (29).

#### *Antibodies*

L243 mAb (IgG<sub>2a</sub>) binds a specific DR $\alpha$  conformational determinant (30). The anti-Lamp-3 (CD63) monoclonal antibody H5C6 (IgG<sub>1,κ</sub>) is from the Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa, IA. The 50H19 antibody mAb reacts with the human CD9 (31). XD5.117 is an anti-DR $\beta$  (IgG<sub>1</sub>) mAb (32). MaP.DM1 against HLA-DM was from Pharmingen (Pharmingen, USA) (33). The rabbit serum against the cytoplasmic tail of DM $\beta$  has been previously described (34). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG coupled to 12nm and 18nm gold were obtained from Jackson ImmunoResearch

Laboratories (Pennsylvania, USA). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa<sup>TM</sup>Fluor were from Molecular Probe (Pennsylvania, USA).

### ***Cells lines and transfections***

The Epstein-Barr virus-transformed HLA-hemizygous B cell line 721.45 has been described (35). HeLa DR $\alpha$ <sup>TM</sup> +DR $\beta$  (here called DR) and HeLa DM.5 cells were obtained from Dr. R.P. Sékaly (33). HeLa DM.5 is a clone from HeLa DM<sup>+</sup> cells (a gift from Dr. R.P. Sékaly) obtained after transfection of the DM8 and DM8 cDNAs (33). HeLa CIITA cells were previously described (12,36). Cells were cultured in DMEM, 10% fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, Qc.) and appropriate selective agents (see below). HeLa cells were transfected with DM $\alpha$  and Dm $\beta$ Y-A using Fugene6 (Roche Diagnosis, Canada). Selective agents were added to a final concentration of 500  $\mu$ g /ml of G-418 (Gibco-BRL, Burlington, ON). Cells were sorted using magnetic beads (Dynal Inc., NY, USA).

### ***Flow Cytometry Analysis***

*Cell surface staining:* Cells were harvested using trypsin and incubated with primary mouse antibody. After 45 min. at 4°C, cells were washed twice in PBS and were incubated for another 45 min. at 4°C with alexa-488 conjugated goat-anti-mouse secondary antibody in PBS. Cells were analyzed on a FACS<sup>®</sup>calibur (Becton Dickinson, USA, CA). As negative control, cells were stained using secondary Ab alone.

*Intracellular staining:* Cells were fixed in 4% formaldehyde, permeabilized and stained as previously described (34).

### ***Fluorescence microscopy***

Cells were plated on cover slips in 24 well plates and cultivated for 3 days before intracellular staining as described (34,37). Conventional epifluorescence micrographs were obtained on a Zeiss Cell Observer system equipped with an

Axiovert 200M microscope using the 100X oil lens. Images were digitally deconvoluted with the AxioVision 3.1 software using the nearest neighbor deconvolution method that uses the Agard's formula.

#### *Exosome extraction and purification*

Cells were grown in ten 175-cm<sup>2</sup> flasks in medium supplemented with serum that was spun at 100000g for 60 min to remove bovine exosomes. When cells reached confluence (3 X 10<sup>8</sup> cells), fresh exosome-free cell culture media was added to flasks and cells were incubated 24hrs. Cell culture media was harvested and centrifuged for 10 min at 1200 g to remove the cells and cellular debris. The supernatant was filtered on a .22um Qiagen stericup. After a second centrifugation at 1200 g, the medium was centrifuged for 30 min at 10000g and 60min at 100000g (2X). Approximately, 60 ug of exosomal proteins were used for HeLa cell gradients. B-cell experiments were done with 90 ug of exosomal proteins. The amount of exosomal protein was measured with a Shimadzu UV-Vis scanning spectrophotometer. The final pellet was resuspended in 5 ml 2.6 M Sucrose, 20 mM Tris/HCL, pH7.2 and floated into an overlaid linear density gradient (2.0-0.25 M Sucrose, 20mM Tris/HCL, pH 7.2) in a SW41Ti tube for 18h at 270000g. Gradient fractions of 1ml were collected and TCA-precipitated (20%TCA v/v, 30 min on ice). Fractions were spun, washed with cold acetone and spun again. Supernatant was removed and pellets were dried.

#### *Western blotting*

The exosomes fractions were solubilized in reducing SDS sample buffer. Samples were boiled and loaded on 12% SDS-PAGE. Gels were transferred to Hybond ECL membranes (Amersham, Canada) and blotted with specific mAbs. Secondary antibody (peroxydase-coupled goat anti-rabbit and anti-mouse; Bio/Can. Scientific, Ont. Canada) was used at 1:1000 dilution for 2 hours at room temperature. After washings, the membrane was developed by

chemiluminescence (Boehringer-Mannheim, Germany) on Kodak XAR-5 films.

#### ***Preparation and Examination of Negative Stain by electron microscopy***

After flotation gradients, exosome fractions were centrifuged on nickel grid using an airfuge. Exosome fractions (approx.  $10^7$  particles per ml) were loaded into a micro-ultracentrifuge tube (Airfuge, Beckman) (38,39). Formvar coated electron microscopy grid were placed into the bottom of the tube. Exosomes were centrifugated at 120 000g (20psig) for 5 minutes in an Airfuge ultracentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Staining of exosomes was performed directly on grids. Grids were fixed in PBS-PFA4% and pre incubated with PBS-ovalbumin 1% to block non-specific binding. Grids were then incubated in PBS-primary antibodies for 1h at RT and then followed by 3 consecutive 5 min PBS wash. Exosomes are then incubated with 12nm- and 18nm-bead coupled secondary antibodies for 1h in PBS (Jackson Laboratories). After three washes, samples were stained with a drop of 3% phosphotungstic acid (pH 6.0) and dried out. The grids were examined on a transmission electron microscope (Hitachi 7100, Japan)

### **3.5 RESULTS & DISCUSSION**

#### **HLA-DM is present in exosomal fractions of B-lymphoblastoid cell line, 721.45.**

Cell derived exosomes have been biochemically defined by their protein composition, by their density on sucrose gradients (1.15-1.18g/ml) and by their physical size in EM (12,25,40,41). Classical MHC class II molecules are ubiquitously enriched in exosome vesicles produced by most class II positive cells (9-12). HLA-DM molecule has been described as being excluded from these vesicles in human B-cells (25). However, while attempting to measure HLA-DO's impact on the exclusion of DM from internal membranes of MVBs

in B cells (27), we found that a significant amount of DM was incorporated into exosomes. These were extracted from cell culture media of 721.45 B cells and purified by linear sucrose density gradients, as described (12). Fractions collected from the gradient were blotted for the presence of MHC class II, CD9 and HLA-DM. The CD9 glycoprotein is a 24 kDa tetraspan family member associated with surface and exosomal membranes (41,42). This tetraspanin is highly enriched in murine DC-derived exosomes (40). Therefore, CD9 is henceforth used as an exosomal marker in all our experiments. Western blot experiments showed the presence of DR molecules mostly inside fractions with sucrose densities ranging from 1.11 to 1.27 g/ml (Fig.1A). This is similar to D1-derived exosomes which migrate on a continuous sucrose gradient at densities of 1.14-1.20 g/ml (40). Exosomes isolated from tissue culture supernatants from various cell types typically have a sucrose buoyancy of 1.13g/ml (43). However, exosomal membranes densities can vary depending on protein content, and float up to sucrose densities that can fluctuate between 1.08-1.20g/ml (15,25,40,40,44). Here, only membranes with a sucrose density of 1.08-1.18 g/ml are considered exosomal membranes and are identified by asterisks (\*). The CD9 distribution overlaps the HLA-DR signal and confirms the exosomal nature of these membranes. As for DR and CD9, DM was found to be present in fractions 3 and 4 (F3-F4) corresponding to exosomes (Fig. 1A). All three molecules were also detected in some heavier density fractions (F5-F8) which most probably represent membranes derived from apoptotic cells. These have been described to float at densities ranging from 1.24-1.28 g/ml (41).

To confirm that HLA-DM is indeed present in these B cell derived exosomes, we turned to immunoelectron microscopy. Membranes equilibrating at 1.11 g/ml (F3) were spun, washed and immunolabeled for HLA-DR, CD9 and HLA-DM (Fig. 1B). Staining for DR was very strong with formation of 12nm bead rings around exosomes sharing an average size of 90 nm. Labeling for CD9 was

also very strong with many binding events on single exosomes. Importantly, staining for DM was also distinctly positive but clearly at lower levels. The presence of DM on exosomes was not totally unexpected in light of the work of Van Lith et al. who reported that DO can drag some DM from the internal to the limiting membranes of MVBs (27). MVBs from Mel JuSo cells and their DO-transfected counterpart were, respectively, 70% and 50% positive for DM inside the internal vesicles.

#### **HeLa CIITA exosomes accumulate HLA-DM.**

The presence of DM in exosomes was confirmed using HeLa cells transfected with CIITA, a transactivating factor regulating the constitutive and inducible expression of class II related genes (45). We tested exosomes released from HeLa CIITA for the presence of class II molecules. IEM shows that HeLa CIITA cells produce exosomes that are enriched for MHC class II molecules (Figure 2A). Sucrose gradient experiments show that DR molecules can be found in light density exosomal fractions, 1.09-1.15 g/ml (Figure 2B). The CD9 expression coincides with the MHC II expression pattern within these fractions. Finally, we have found that DM was also present in exosomal fractions 3 and 4, confirming the above-described results using B cells.

#### **HLA-DM's tyrosine motif prevents entry into exosomes.**

It is well established that H2-M $\beta$  and HLA-DM $\beta$  chains encode a functional tyrosine-based sorting motif (YXXL) responsible for their lysosomal localization (18-20). Such motif is also found in the cytoplasmic tail of many proteins such as Lamp-1, transferrin receptor and the mannose 6-phosphate receptor (46). A DM molecule devoid of its cytoplasmic YTPL motif accumulates at the plasma membrane. To determine the relative importance of trafficking signals in exosomes entry, we used a DM molecule devoid of its cytoplasmic YTPL motif. Thus, we compared exosomes from stably transfected HeLa cells expressing DM $\alpha$ -DM $\beta$  molecules (DM) or the DM $\alpha$ DM $\beta$ Y-A

mutant (DMY-A). Flow cytometry analysis of permeabilized cells confirmed the high and comparable levels of expression for both molecules (Fig. 3A). As expected, DM is expressed at very low level at the cell surface of HeLa DM cells. Fluorescence microscopy confirmed the enrichment of wild-type DM in late endosomal compartments, as assed by colocalization with CD63 (Fig. 3B). On the other hand, as previously described, the DMY-A mutant is redistributed at the plasma membrane and does not seem to accumulate in defined intracellular structures (18-20).

Exosomes were isolated from the culture media of stably transfected HeLa DM and HeLa DMY-A cells and analyzed by western blotting. Surprisingly, we found no accumulation of DM in exosomal fractions. Indeed, exosome fractions 2 to 4 (1.10-1.16 g/ml) are almost completely devoid of HLA-DM (Figure 3C). As for exosomes prepared from HeLa CIITA and B cells, the CD9 marker is enriched in densities ranging from 1.10-1.16 g/ml (F2-4). However, the DMY-A molecule was found dramatically enriched in the lighter exosomal fractions (1.10-1.17 g/ml), which are also positive for CD9. These results strongly suggest that HLA-DM's tyrosine motif has a critical role in sub-compartment trafficking and incorporation into exosomal vesicles.

In order to confirm these results, we analyzed by immunoEM the presence of DM on exosomes. The exosomal fraction were spun on grids and stained for DM, CD9 and CD63. Fig. 3D shows that DM molecules were only detected in exosomal fraction taken from DMY-A cells (F3: 1.13 g/ml). The equivalent fraction from HeLa DM cells was completely negative with no detectable binding. The presence of the tetraspanin CD63 on exosomes confirms the endocytic nature of these membranes (25,47). Based on these observations, we conclude that DMY-A is included in exosomes as a result of the inactivation of the tyrosine motif encoded in its  $\beta$  chain cytoplasmic tail. Interestingly, CD63 also encodes a tyrosine-based motif, suggesting that other levels of control



related to the nature of the molecule itself operate to regulate sorting into MVBs.

The means by which DM is excluded from exosomes in these transfected HeLa cells remains to be determined. Membrane exchange between the internal and limiting membranes of MVBs is a continuous process (26,48). DM molecules entering MVBs internal structures could be retrieved to the limiting membrane by adaptor proteins such as Alix, which was suggested to regulate back fusion of internal membranes (49). Alternatively, Alix may bind the YXXL motif of DM and redirect its trafficking to internal vesicles intended for degradation. These results are particularly exciting and compatible with current hypothesis in the MVB sorting pathway. Indeed, the adaptor protein Alix (AIP1) as been shown to modulate the structural and functional properties of LBPA-containing late endosomal compartments (50). These elegant in vitro experiments show the spontaneous formation of multivesicular bodies and its inhibition by Alix protein. It was also demonstrated that Alix specifically recognize the YPXL/I motif of PacC protein (51). Similar, results were obtained with the discovery of the interaction between the YPXL-Type L domain of the equine infectious anemia virus and the Alix protein (52). Additionally, Alix interacts with the ESCRTIII component, Tsg101 and with CHMP4 protein. Taken together, these results strongly suggest that the Alix adaptor protein could share a dual function of regulating the structural morphology of MVBs and the sorting of tyrosine encoded transmembrane protein inside these compartments. We can hypothesis that unless its motif is somehow masked, HLA-DM will bind Alix through its tyrosine motif and will be localized at the limiting membrane or sorted for degradation.

Then how can wild-type DM accumulate in exosomal preparations of B cells and HeLa CIITA? Most likely some mechanism dominates over the effect of the sorting motif. Other proteins induced by CIITA could affect the localization

of DM or interact in a way that overcomes recognition of its YXXL motif, allowing the complex to attain the internal membranes of MVBs and not be retrieved or be targeted to lysosomes. CIITA regulates the expression of over 50 genes, some of which may influence the behavior of DM (53). Class II is a likely candidate. Long lasting DM/DR complexes that did not dissociate could be dragged to exosomes for extracellular release. This would predict a cell-type and/or haplotype-dependent localization of DM in exosomes and may explain the work of Escola and collaborators who suggested that DM is excluded from the internal vesicles of multivesicular compartments and exosomes of B cells (25). Interestingly, truncated forms of DM arising from differential splicing have been suggested to encode molecules devoid of their YXXL motif (54). According to our results, such molecules would likely be included into exosomes.

#### **An ectopic YXXL sorting motif on DR $\beta$ does not prevent exosome entry**

As there was a discrepancy in the behavior of DM between CIITA<sup>+</sup> or CIITA<sup>-</sup> HeLa cells and from the differential inclusion of CD63 and DM into exosomes of HeLa cells, we confirmed that factors other than tyrosine motifs participate in regulating exosomal entry. To shed light on such mechanisms, we fused the cytoplasmic tail of DM with its YXXL motif onto the transmembrane region of DR $\beta$  (DR/DMcyto). HLA-DR is normally highly expressed on exosomes and DR/DMcyto should therefore not be affected by the sorting motif. Exosomal incorporation was tested in DR/DMcyto cells in comparison to stably transfected DR cells. As expected, the DR<sup>+</sup> cells produced exosomes rich in MHC II molecules. Also, we still found high levels of the DR/DM $\beta$ cyto chimera in fractions corresponding to sucrose densities ranging from 1.09 to 1.24 g/ml, with the majority of class II found in exosomal fractions with sucrose buoyancy ranging from 1.10-1.17 g/ml. A replicate membrane was also blotted with the DM $\beta$ -specific rabbit serum against the cytoplasmic tail. A DR

reporter molecule fused to the DO $\beta$  cytoplasmic tail encoding a di-leucine sorting signal was also found in exosomes (data not shown) (34).

These results suggest that the variable effect of the YXXL motif depend on other specific interactions taking place at the level of the lumenal and/or transmembrane regions of the MHC class II molecule. The initial characterization of HLA-DM's tyrosine-based signal showed that reporter molecules fused to the DM $\beta$  cytoplasmic tail were sorted to the internal vesicles as well as to the limiting membrane of MVBs (18,19). The possibility remains that DR/DMcyto and DR are sorted to exosomes through mono-ubiquitination of the single and common DR $\alpha$  lysine residue in these cytoplasmic tails. However, our preliminary results suggest that K residues are dispensable for exosomal sorting (data not shown). It has been shown that DR molecule is incorporated inside Triton-insoluble lipid rafts along the intracellular transport route and at the plasma membrane (55,56). These membrane microdomains have been found in exosomes and account for the sorting of raft resident proteins within exosomal membrane (15). The fact that DR enters lipid rafts suggests that this pathway may overcome any negative effect that could exert the YXXL motif on accumulation of DR/DMcyto into exosomes. The structural basis for the selective inclusion of proteins into lipid rafts has yet to be discovered. Still, as recently suggested, the fact that DMY-A is present at the cell surface and not actively reinternalized may 1) slow down mobility, 2) favor inclusion into membrane microdomains or protein web and 3) increase efficiency of sorting into exosomes (16). Interestingly, HLA-DM is not particularly enriched in these membrane entities but rather accumulate in supramolecular tetraspanin membrane complexes (57). On the other hand, DM accumulates in late compartments and molecules included in MVBs would be destined for degradation. In B cells, specific interactions would overcome its sorting signal and allow DM to gain access to exosomes-forming MVBs.

### 3.6 REFERENCES

1. Murk, J. L., Humbel, B. M., Ziese, U., Griffith, J. M., Posthuma, G., Slot, J. W., Koster, A. J., Verkleij, A. J., Geuze, H. J., and Kleijmeer, M. J. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 13332-13337
2. Blott, E. J. and Griffiths, G. M. (2002) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 122-131
3. Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 893-905
4. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., and Turbide, C. (1987) *Journal of Biological Chemistry* **262**, 9412-9420
5. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R. M. (1985) *J.Cell Biol.* **101**, 942-948
6. They, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002) *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 569-579
7. They, C., Duban, L., Segura, E., Veron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002) *Nat.Immunol.* **3**, 1156-1162
8. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998) *Nat.Med.* **4**, 594-600
9. Lamparski, H. G., Metha-Damani, A., Yao, J. Y., Patel, S., Hsu, D. H., Ruegg, C., and Le Pecq, J. B. (2002) *J.Immunol.Methods* **270**, 211-226
10. Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J. K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2003) *Gut* **52**, 1690-1697

11. Vincent-Schneider, H., Thery, C., Mazzeo, D., Tenza, D., Raposo, G., and Bonnerot, C. (2001) *J.Cell Sci.* **114**, 323-334
12. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. M., and Geuze, H. J. (1996) *J.Exp.Med.* **183**, 1161-1172
13. Reggiori, F. and Pelham, H. R. (2001) *EMBO J.* **20**, 5176-5186
14. Haglund, K., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003) *Trends Biochem.Sci.* **28**, 598-603
15. de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003) *Blood* **102**, 4336-4344
16. de Gassart, A., Geminard, C., Hoekstra, D., and Vidal, M. (2004) *Traffic.* **5**, 896-903
17. Vogt, A. B., Arndt, S. O., Hammerling, G. J., and Kropshofer, H. (1999) *Semin.Immunol.* **11**, 391-403
18. Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J., and Bonifacino, J. S. (1995) *J.Cell Biol.* **131**, 351-369
19. Copier, J., Kleijmeer, M. J., Ponnambalam, S., Oorschot, V., Potter, P., Trowsdale, J., and Kelly, A. (1996) *J.Immunol.* **157**, 1017-1027
20. Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P. A., and Karlsson, L. (1995) *Immunity* **3**, 561-572
21. Geuze, H. J. (1998) *Immunol.Today* **19**, 282-287
22. Pierre, P. and Mellman, I. (1998) *Curr.Opin.Immunol.* **10**, 145-153

23. Murk, J. L., Lebbink, M. N., Humbel, B. M., Geerts, W. J., Griffith, J. M., Langenberg, D. M., Verreck, F. A., Verkleij, A. J., Koster, A. J., Geuze, H. J., and Kleijmeer, M. J. (2004) *Traffic* **5**, 936-945
24. Hammond, C., Denzin, L. K., Pan, M., Griffith, J. M., Geuze, H. J., and Cresswell, P. (1998) *J.Immunol.* **161**, 3282-3291
25. Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., and Geuze, H. J. (1998) *J.Biol.Chem.* **273**, 20121-20127
26. Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A. Y., Ossendorp, F., Melief, C. J., Stoorvogel, W., and Geuze, H. J. (2001) *J.Cell Biol.* **155**, 53-63
27. van Lith, M., van Ham, M., Griekspoor, A., Tjin, E., Verwoerd, D., Calafat, J., Janssen, H., Reits, E., Pastoors, L., and Neefjes, J. (2001) *J.Immunol.* **167**, 884-892
28. Barois, N., Saint-Vis, B., Lebecque, S., Geuze, H. J., and Kleijmeer, M. J. (2002) *Traffic* **3**, 894-905
29. Robadey, C., Ammerlaan, W., Muller, C., Cloutier, I., Sékaly, R. P., Haefliger, J. A., and Demotz, S. (1997) *J.Immunol.* **159**, 3238-3246
30. Lampson, L. A. and Levy, R. (1980) *J.Immunol.* **125**, 293-299
31. Masellis-Smith, A. and Shaw, A. R. (1994) *J.Immunol.* **152**, 2768-2777
32. Radka, S. F., Machamer, C. E., and Cresswell, P. (1984) *Hum.Immunol.* **10**, 177-188
33. Denzin, L. K., Robbins, N. F., Carboy-Newcomb, C., and Cresswell, P. (1994) *Immunity* **1**, 595-606

34. Brunet, A., Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. J., and Thibodeau, J. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 37062-37071
35. DeMars, R., Chang, C. C., Shaw, S., Reitnauer, P. J., and Sondel, P. M. (1984) *Hum.Immunol.* **11**, 77-97
36. Khalil, H., Deshaies, F., Bellemare-Pelletier, A., Brunet, A., Faubert, A., Azar, G. A., and Thibodeau, J. (2002) *Tissue Antigens* **60**, 372-382
37. Faubert, A., Samaan, A., and Thibodeau, J. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 2750-2755
38. Hammond, G. W., Hazelton, P. R., Chuang, I., and Klisko, B. (1981) *J.Clin.Microbiol.* **14**, 210-221
39. Alain, R., Nadon, F., Seguin, C., Payment, P., and Trudel, M. (1987) *J.Virol.Methods* **16**, 209-216
40. They, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1999) *J.Cell Biol.* **147**, 599-610
41. They, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001) *J.Immunol.* **166**, 7309-7318
42. Wright, M. D. and Tomlinson, M. G. (1994) *Immunol.Today* **15**, 588-594
43. Fevrier, B. and Raposo, G. (2004) *Curr.Opin.Cell Biol.* **16**, 415-421
44. Wubbolts, R., Leckie, R. S., Veenhuizen, P. T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J. W., Geuze, H. J., and Stoorvogel, W. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 10963-10972
45. Steimle, V., Siegrist, C.-A., Mottet, A., Lisowska-Groszpiere, B., and Mach, B. (1994) *Science* **265**, 106-109

46. Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003) *Annual Review of Biochemistry* **72**, 395-447
47. Metzelaar, M. J., Wijngaard, P. L., Peters, P. J., Sixma, J. J., Nieuwenhuis, H. K., and Clevers, H. C. (1991) *J.Biol.Chem.* **266**, 3239-3245
48. Gruenberg, J. and Stenmark, H. (2004) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**, 317-323
49. Dikic, I. (2004) *Bioessays* **26**, 604-607
50. Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le, B., I, Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R. G., Vilbois, F., and Gruenberg, J. (2004) *Science* **303**, 531-534
51. Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr., and Penalva, M. A. (2003) *Mol.Cell Biol.* **23**, 1647-1655
52. Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Gottlinger, H. G. (2003) *Cell* **114**, 689-699
53. Nagarajan, U. M., Bushey, A., and Boss, J. M. (2002) *J.Immunol.* **169**, 5078-5088
54. Modrek, B., Resch, A., Grasso, C., and Lee, C. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 2850-2859
55. Poloso, N. J., Muntasell, A., and Roche, P. A. (2004) *J.Immunol.* **173**, 4539-4546
56. Huby, R. D., Dearman, R. J., and Kimber, I. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 22591-22596



57. Kropshofer, H., Spindeldreher, S., Rohn, T. A., Platania, N., Grygar, C., Daniel, N., Wolpl, A., Langen, H., Horejsi, V., and Vogt, A. B. (2002)  
*Nat. Immunol.* **3**, 61-68

### **3.7 ABBREVIATIONS**

ER: endoplasmic reticulum.

MHC: major histocompatibility complex

MVB: multivesicular bodies

MIIC: MHC class II compartments.

CLIP: class II invariant chain peptide.

DM: HLA-DM.

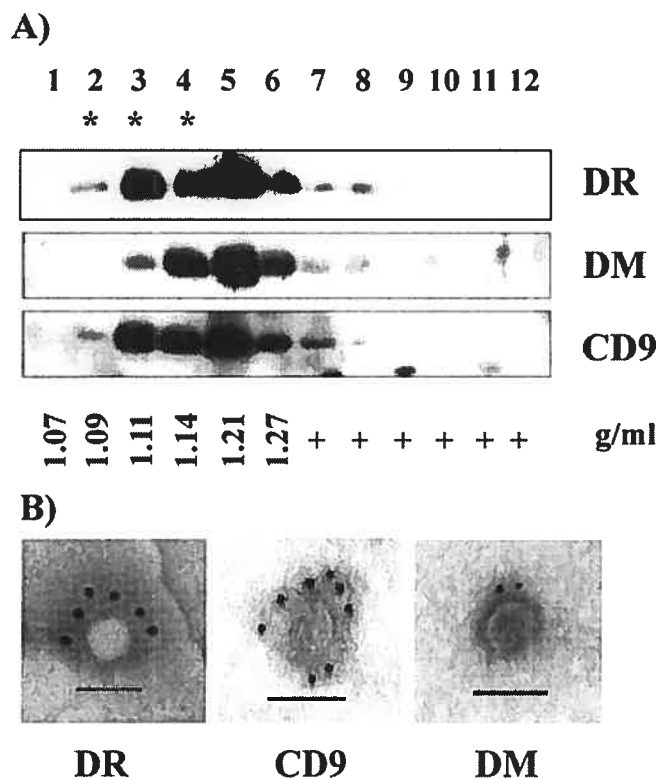
DR: HLA-DR.

### **3.8 ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Eric O. Long, Robert DeMars and Rafick Sékaly for providing cDNAs and cell lines. We thank Jacques Neefjes for the rabbit DR serum. We are grateful to Angela Samaan for the gift of DM $\beta$ - specific antisera. We also thank Eric Cohen for the use of fluorescent microscopy facilities and Robert Alain for EM experiments (Institut Armand Frappier). AB is supported by studentship from the Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (Fonds FCAR-FRSQ). JT was supported by a New Investigator fellowship from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). This work was supported by grants from the CIHR. The H5C6 monoclonal antibody developed by Hildreth, J.E.K. was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of NICHD and maintained by

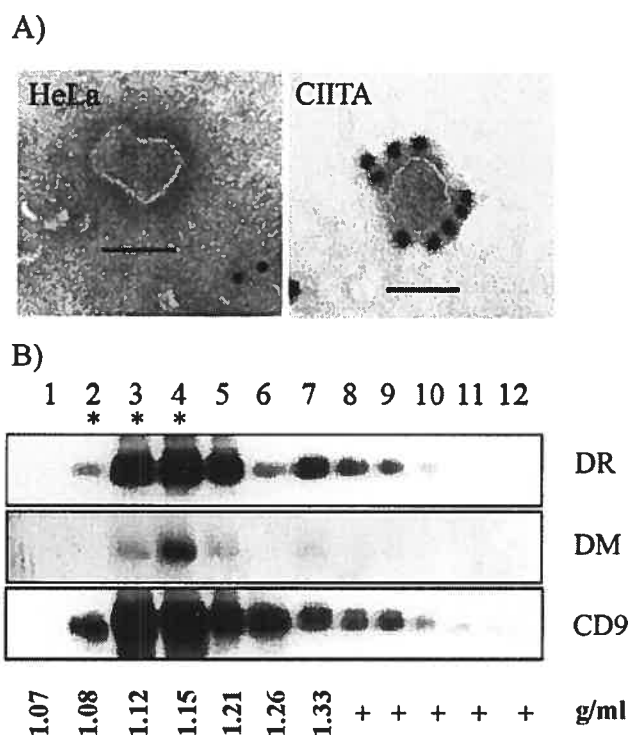
the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA  
52242.

## 3.9 FIGURES



**Figure 1. HLA-DM is present in exosomes secreted from the B-lymphoblastoid cell line 721.45.**

(A) Exosomes from 721.45 were purified on a continuous sucrose gradient (.25M-2M sucrose). Fractions were collected and blotted for expression of DR $\beta$  (XD5), CD9 (50H.19) and DM $\beta$  (rabbit anti-DM). Exosome-associated MHC class II molecules float at a density of about 1.08 to 1.18 g/ml. Asterisks (\*) indicate exosomal fractions. (B) IEM was performed on whole-mounted exosomes from fraction 3. Exosomes were stained with rabbit anti-DR serum or 50H.19 (CD9) and Map.DM1 (HLA-DM) mouse mAbs. Secondary Abs were 12nm bead-coupled goat anti-mouse and 18nm bead-coupled goat anti-rabbit antibodies. Bar, 100nm.

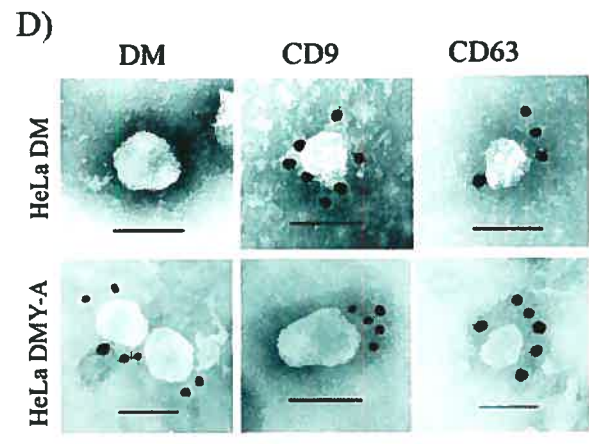
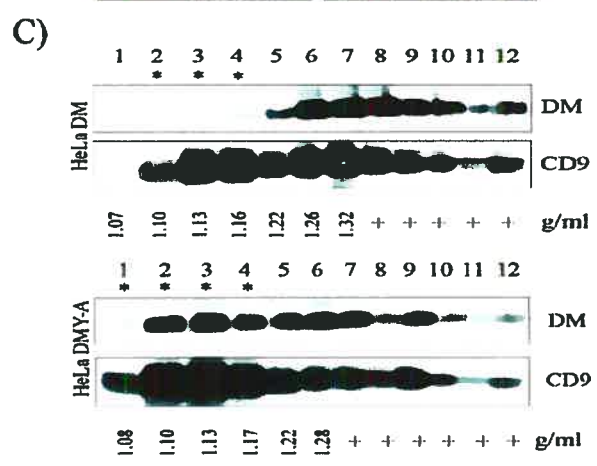
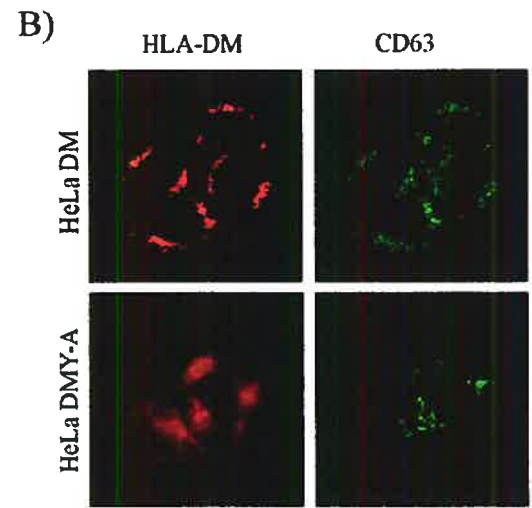
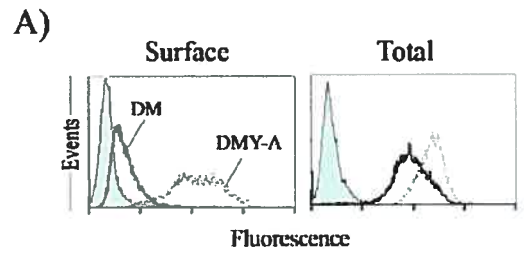


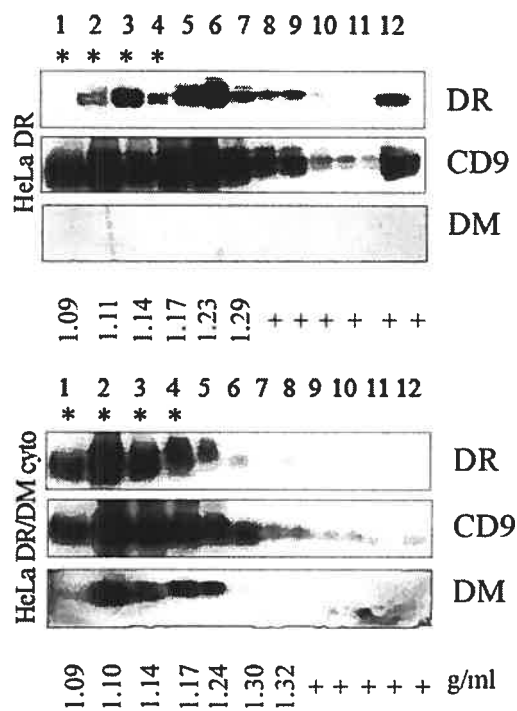
**Figure 2. HeLa CIITA exosomes accumulate HLA-DM.**

(A) Whole-mount IEM using rabbit the anti-DR serum was performed on exosomes from untransfected HeLa or HeLa CIITA cells as in Fig.1. Bar, 100nm. (B) Exosomes purified from HeLa CIITA culture medium were analyzed for DR, DM and CD9 as in Fig.1.

**Figure 3. HLA-DM's tyrosine motif prevents entry into exosomes.**

(A) HeLa cells expressing DM or DMY-A cells were stained using Map.DM1 for DM expression at the plasma membrane (Surface) or following permeabilization (Total). (B) Permeabilized HeLa cells were stained intracellularly to analyze intracellular localization. Cells were stained with the DM $\beta$  specific rabbit serum (red) and with the mouse CD63 monoclonal antibody (green)(H5C6). (C) Exosomes extracted from the culture medium of HeLa DM or DMY-A cell lines were analyzed as in Fig.1. (D) IEM was performed on whole-mounted fraction 3 purified exosomes using H5C6 (CD63), 50H.19 (CD9) and Map.DM1 (HLA-DM) mouse mAbs. Bar, 100nm.





**Figure 4. DR/DM cyto chimera is sorted to exosomal membranes.**

Exosomes from HeLa DR and DR/DMcyto cells were analyzed as in Fig.1. The DM anti-serum against the cytoplasmic tail of DM was used to detect the DR/DMcyto chimeric molecule.



## CHAPITRE 4 – DISCUSSION

L'efficacité du système de présentation antigénique nécessite l'intégrité du réseau endosomique et de la machinerie de transport intracellulaire. Celle-ci permet aux molécules du CMH-II de parvenir aux compartiments endosomiques où se manifeste l'apprêtement antigénique. À cet effet, HLA-DM et HLA-DO sont deux molécules non classiques du CMH-II qui jouent un rôle central dans la présentation antigénique et qui encodent un motif de ciblage fonctionnel. L'importance de ces signaux de triage intracellulaire lors du trafic de ces protéines a été soulignée tout au long des chapitres précédents. Notre discussion portera, dans un premier temps, sur la découverte d'un motif de ciblage intracellulaire de type dileucine sur la queue cytoplasmique de DO $\beta$  (28). Puis, nous examinerons un signal tyrosine de la queue cytoplasmique de DM $\beta$  qui régule l'intégration de HLA-DM dans les membranes exosomales. Finalement, nous discuterons brièvement de deux études complémentaires (Annexe : Article supplémentaire #1 et #2) qui cherchent à mieux caractériser la molécule HLA-DO (129) et la chaîne invariante (291). Cette dernière joue également un rôle important dans l'adressage des molécules du CMH-II.

### 4.1 Caractérisation du motif dileucine de la chaîne DO $\beta$

Le complexe DM-DO régule la présentation antigénique dans les lymphocytes B. Au départ, le ciblage intracellulaire de ce complexe à travers le système endosomique était attribué principalement au motif tyrosine encodé sur la queue cytoplasmique de DM $\beta$ . Notre étude a cependant démontré que la queue cytoplasmique de DO $\beta$  encode également un motif fonctionnel de ciblage intracellulaire (28), ce qui suggère que l'expression de DO peut avoir un impact sur le ciblage du complexe DM/DO.

La progression dans la recherche de la caractérisation structurale de la molécule HLA-DO se heurte à un obstacle expérimental majeur. En effet, cet

hétérodimère est retenu dans le réticulum endoplasmique et n'accède pas à la voie endosomique lorsqu'il est exprimé seul. Cette rétention est corrigée uniquement par la coexpression de la molécule HLA-DM. De plus, la majorité de HLA-DO reste associée à HLA-DM tout au long de la voie endosomique. Il est, par conséquent, difficile d'étudier cette molécule dans un système cellulaire qui ne tient pas compte de l'effet de HLA-DM. Pour palier à ces problèmes expérimentaux, notre groupe a mis au point une molécule chimérique dans laquelle le domaine C-terminal de HLA-DR $\beta$  est remplacé par le domaine correspondant de la molécule HLA-DO $\beta$  (131). Ce système de paires mixtes isotypiques suggère que DO $\beta$  adopte une structure similaire à celle de DR $\beta$ , ce qui permet l'expression membranaire de l'hétérodimère. De plus, l'expression de cette molécule induit la formation de lysosomes qui se distinguent nettement par leur gonflement, ce qui suggère fortement la présence de motifs de ciblage sur la queue cytoplasmique de DO $\beta$  (Figure 8C-D de (131)).

#### **4.1.1 La queue cytoplasmique de DO $\beta$ encode un motif dileucine fonctionnel.**

Lorsqu'on analyse la séquence protéique de la queue cytoplasmique de DO $\beta$ , on y distingue deux signaux potentiels d'adressage intracellulaire: un motif «dileucine» et un motif «tyrosine». Le motif dileucine est composé d'un doublet de leucine en position 242 et 243 au niveau du domaine C-terminal. Ce signal est conforme au motif LL classique de ciblage intracellulaire. De plus, il est homologue à ceux retrouvés dans la queue cytoplasmique de la chaîne invariante (70;292). Le second signal d'adressage potentiel intracellulaire prend la forme d'un motif tyrosine imparfait (GYVRT). On y retrouve deux éléments-clés du motif tyrosine classique : la tyrosine (Y) centrale, précédée d'une glycine (G). Par contre, un résidu thréonine (T) polaire occupe la position habituellement réservée aux résidus hydrophobes ou aromatiques dans les signaux tyrosines classiques. Il a été suggéré que le motif GY à lui seul constitue un motif fonctionnel complet (282). Afin de caractériser le domaine

cytoplasmique de DO $\beta$ , nous avons tiré profit du système de paire mixte isotypique, ainsi que des molécules chimériques construites en fusionnant le domaine cytoplasmique de DO $\beta$  à la molécule DR $\beta$ . Nos expériences effectuées dans les cellules HeLa démontrent que la queue cytoplasmique de DO $\beta$  encode un motif dileucine de triage intracellulaire et que la tyrosine 227 ne constitue pas un signal fonctionnel dans ce contexte.

L'expression de la molécule DR/DO $\beta$ cyto et DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  en association avec DR $\alpha$  dans les cellules HeLa se caractérise par une accumulation de molécules chimériques à l'intérieur de compartiments de nature lysosomique. Curieusement, la présence de ces molécules augmente la taille des endosomes tardifs comparativement aux cellules exprimant les molécules DR sauvages. De plus, on observe une distribution favorisant l'accumulation intracellulaire de la molécule. En revanche, la mutation du motif dileucine engendre une redistribution des molécules vers la membrane plasmique. Pour sa part, la mutation de la tyrosine 227 est sans effet notable. En effet, les molécules rapporteuses semblent toujours être redistribuées en faveur des compartiments endosomiques, comme c'est le cas pour les molécules portant la queue cytoplasmique de DO $\beta$ . Ces résultats suggèrent que la tyrosine 227 ne fait pas partie d'un motif fonctionnel YXX $\Phi$  classique. De plus, la reconstruction d'un motif tyrosine « parfait » sur notre molécule rapporteuse confirme notre hypothèse. En effet, les molécules rapporteuses DR/DO $\beta$ cytoAA/T230L s'accumulent au niveau des compartiments lysosomiques. On observe également une réduction de l'expression de surface de la molécule. Les résultats obtenus avec cette chimère confirment donc l'absence d'un motif tyrosine fonctionnel dans la queue de DO $\beta$  humain.

Finalement, nous avons tenté de mesurer l'impact du motif dileucine de DO $\beta$  sur le triage du complexe DM-DO. Nos expériences démontrent que la molécule DO ne semble pas modifier dramatiquement le ciblage du complexe

DM/DO et illustrent la dominance du motif tyrosine de DM dans le ciblage du complexe aux lysosomes. Toutefois, il n'est pas exclu que la molécule HLA-DO joue un rôle plus subtil dans le ciblage du complexe. En effet, les travaux de van Lith illustrent la fonction de DO au niveau de ce ciblage spécialisé dans les compartiments MVB(104). Nous discuterons davantage de ces résultats dans les sections suivantes. En conclusion, il serait intéressant de poursuivre ces études en caractérisant davantage les compartiments endosomiques multivésiculaires enrichis avec les molécules rapporteuses. Les approches biochimiques de purification de compartiments par gradients de sucrose et la caractérisation de ces vésicules par microscopie électronique permettraient de mieux définir la nature des compartiments en question.

#### **4.1.2 Site de reconnaissance du motif dileucine de HLA-DO $\beta$**

Bien que nos études illustrent la présence d'un motif dileucine sur la queue de HLA-DO $\beta$ , elles ne nous permettent pas d'identifier les voies intracellulaires empruntées par les molécules rapporteuses avant de gagner accès aux lysosomes. Les molécules rapporteuses aboutissent aux lysosomes soit à partir de la surface membranaire ou soit directement de l'appareil de Golgi. Nos études de cinétique d'internalisation à la surface membranaire révèlent que la molécule rapporteuse DR/DO $\beta$ cyto se comporte de façon identique à la molécule sauvage DR1 (figure supplémentaire de(28)). Le fait que la molécule DR1 s'accumule beaucoup moins au niveau des lysosomes, nous suggère fortement que le ciblage de la molécule rapporteuse s'effectue principalement à partir du réseau TGN.

Pour confirmer cette hypothèse, il serait important d'identifier les adaptateurs cytoplasmiques qui interagissent avec le motif dileucine de DO $\beta$ . Ceci permettrait de mieux comprendre l'importance de ce motif dans les complexes multimoléculaires et d'identifier les sites cellulaires où surviennent la

reconnaissance du motif. Les complexes adaptateurs (AP) des manteaux de clathrine détiennent une grande affinité pour ce type de motif. Par exemple, les motifs dileucine (ML et LI) de la chaîne invariante interagissent spécifiquement avec les chaînes mu des complexes AP-1 et AP-2 (293) (294). Dans le même ordre d'idée, l'unité VHS de l'adaptateur monomériques GGA1 interagit également avec les motifs dileucines à résidus acides (ACLL). La reconnaissance de ce motif permet de réguler le transport du TGN vers les endosomes (267). L'interaction entre ces adaptateurs cellulaires et le motif LL de DO $\beta$  peut être mesuré par différentes approches dont, le test des levures à deux hybrides (283) et la technique de résonance plasmonique de surface (BIAcore)(293), avec laquelle on mesurerait l'interaction des protéines adaptatrices purifiées avec les peptides de la queue de DO $\beta$ . Finalement, il serait intéressant d'utiliser l'ARN interférence pour mesurer le rôle de la clathrine et des complexes adaptateurs (AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4) sur le ciblage de HLA-DO in vivo. Cette approche a récemment permis d'établir le rôle de la clathrine et de l'adaptateur AP-2 sur le trafic des molécules du CMH-II (294). Nul doute que conjointement, ces expériences permettraient d'identifier les manteaux cytoplasmiques impliqués dans le ciblage de l'hétérodimère HLA-DO.

#### **4.1.3 Expression membranaire de la molécule rapporteuse DR/DO $\beta$ cyto**

La présence de la molécule rapporteuse DR/DO $\beta$ cyto à la surface cellulaire suggère que le ciblage intracellulaire dirigé par le motif dileucine n'est pas très strict. En revanche la molécule sœur DR/DMcyto, encodant un motif tyrosine parfait, ne s'accumule que très peu à la surface membranaire et se retrouve presque exclusivement aux niveaux des compartiments lysosomiques. Il est probable que les motifs de ciblage de ces deux molécules ne sont pas reconnus de la même façon par la machinerie de triage intracellulaire. L'interaction entre les motifs de ciblage intracellulaire et les adaptateurs cytoplasmiques varie

d'une protéine à l'autre. Certaines molécules adaptatrices démontrent une affinité supérieure pour un motif donné. En effet, les motifs dileucines ne sont pas tous dotés de la même efficacité : le motif LI constitue un signal plus efficace que le FL lors de l'internalisation de chaîne invariante (293).

La surexpression de protéines engendre parfois une saturation de la machinerie de triage intracellulaire et une expression membranaire atypique de certains marqueurs. À son tour, la saturation de la machinerie de ciblage provoque une accumulation artificielle de protéines intracellulaires dotées des mêmes motifs de triage, à la surface membranaire (295;296). Dans notre étude, l'expression de surface de la molécule DR/DOcyto pourrait être attribuable à un tel phénomène (28). Toutefois, l'expression de la molécule rapporteuse DR/DMcyto n'occasionne pas la redistribution de la protéine intracellulaire Lamp-1 vers la surface cellulaire, malgré la présence d'un motif tyrosine de ciblage équivalent. Notre système cellulaire ne manifesterait donc aucune évidence de surexpression protéique ou de saturation des voies de transport protéique.

#### **4.1.4 Le motif dileucine est non conservé**

Il importe de signaler les divergences retrouvées entre la chaîne DO $\beta$  de l'homme et des autres espèces. Celle exprimée chez la souris et chez le lapin n'encode pas de motif dileucine (93). Cette absence de motif pourrait expliquer l'expression de surface de DO dans les splénocytes des souris (113). Il est intéressant de noter que l'absence de DO chez la souris ne provoque pas une baisse de CLIP, ce qui lui confère possiblement un rôle différent de celui retrouvé chez l'homme. La présence d'un motif dileucine à l'intérieur du domaine cytoplasmique de DO $\beta$  humain suggère une fonction spécialisée pour l'hétérodimère HLA-DO humain.

#### 4.1.5 Quelle est la fonction du motif dileucine de HLA-DO $\beta$ ?

La molécule HLA-DO régule la fonction de HLA-DM à l'intérieur de la voie endosomique des lymphocytes B. L'association avec HLA-DM survient au réticulum endoplasmique et semble persister à travers la voie endosomique. Bien que le motif tyrosine de DM agisse de façon dominante, il est possible que le motif dileucine de HLA-DO $\beta$  module le triage cellulaire en adressant le complexe à des compartiments endosomiques plus précoces afin de moduler le chargement peptidique survenant dans ces compartiments. Cette idée est compatible avec l'hypothèse voulant que HLA-DO inhibe le chargement de peptides internalisés par pinocytose (dans les compartiments précoces) et favorise ceux internalisés par les Ig de surface (dans les compartiments tardifs) des lymphocytes B (121).

Quelques indices sur la fonction potentielle du motif dileucine de DO $\beta$  proviennent d'études effectuées sur la chaîne invariante. Cette molécule détient deux motifs dileucines, encodés dans le domaine cytoplasmique, responsables du ciblage intracellulaire du complexe CMH-II-Ii aux endosomes. Ces motifs sont également impliqués dans le retardement du transport de protéines dans la voie d'endocytose (297;298). La chaîne invariante cause aussi une rétention du complexe CMH-Ii dans les compartiments précoces et, dans certain cas, génère des compartiments endosomiques gonflés nommés macrosomes (299;300) Le mécanisme qui explique ce phénomène de rétention endosomique demeure inconnu. Par contre, la similarité entre ces vésicules et celles observées dans les cellules exprimant DO, est frappante. On peut dès lors spéculer que HLA-DO retarde la progression de DM dans la voie précoce endosomique, ce qui permettrait de faire l'édition ou de restreindre le chargement peptidique dans ces compartiments endosomiques où le chargement est normalement peu rigide.

Enfin, il est possible d'imaginer que HLA-DO compense pour le manque de signalisation de DM lors d'événements cellulaires dans lesquels le motif tyrosine de DM se trouve inactif ou masqué. Curieusement, il existe un isoforme de HLA-DM où la queue cytoplasmique est complètement tronquée (301). Cet isoforme existe dans plusieurs tissus distincts et résulte d'un épissage alternatif de l'ARNm. Il est clair que cette absence de motif change complètement la progression et le ciblage de HLA-DM dans la voie endosomique. Dans ce contexte singulier, le motif dileucine de DO $\beta$  pourrait devenir important pour cibler le complexe DM-DO à travers la voie endosomique. Bien que la manifestation de cet isoforme dans les lymphocytes B reste méconnue, il serait intéressant d'étudier l'impact de HLA-DO sur son ciblage intracellulaire. Finalement, sachant que HLA-DM joue un rôle crucial dans le chargement peptidique des molécules du CMH-II, l'effet de ce complexe DM «tronqué»-DO sur la présentation de peptides exogènes s'avère être une voie à explorer.

#### **4.1.6 Ciblage de la molécule HLA-DO $\alpha$ P11V/DO $\beta$**

Récemment, lors d'études de mutagenèse dirigée, notre laboratoire a fait la découverte d'une mutation qui restaure l'expression de HLA-DO lorsque celui-ci est exprimé seul (Annexe : Article supplémentaire I (129)). La mutation d'une proline (P11V) dans le domaine N-terminal de DO $\alpha$  permet à l'hétérodimère de se libérer de la rétention du RE. De plus, malgré l'expression à la surface membranaire du complexe DO $\alpha$ P11V/DO $\beta$ , celui-ci s'accumule également au niveau des compartiments endosomiques tardifs enrichis en CD63 (Figure 5B ; (129)). Ceci supporte bien nos résultats démontrant la présence d'un signal d'adressage endosomique. Finalement, l'expression transitoire du double mutant HLA-DO $\alpha$ P11V/DO $\beta$ LL242-243AA, (hétérodimère ne portant plus de signaux de ciblage) dans les cellules 293T montre une légère augmentation de son expression à la surface membranaire (Résultats non



publiés). Ceci confirme, une fois de plus, la présence d'un motif fonctionnel dileucine de DO $\beta$ .

#### **4.1.7 Ciblage du complexe DM-DO à la membrane limitante des MVBs**

Suite à notre publication sur la caractérisation du motif dileucine de DO $\beta$ , le groupe du Dr Neefjes a réalisé une étude exhaustive sur le ciblage du complexe DM/DO dans les compartiments endosomiques multivésiculaire des cellules MelJuSo(104). La prochaine section présente les similitudes et les différences entre ces deux études.

##### **4.1.7.1 Voie de transport du complexe DM/DO**

Plusieurs études se sont attardées à déterminer précisément la voie intracellulaire empruntée par les molécules du CMH-II classique avant d'apparaître à la surface membranaire. La même question s'est posée pour le transport du complexe DM-DO, et nous avons spéculé que la région cytoplasmique de DO $\beta$  cible directement les molécules chimériques du TGN vers les MIICs, sans transit à la surface membranaire (28). Les travaux de Van Lith confirment cette hypothèse (104). En effet, ils démontrent qu'après leur synthèse le complexe DM/DO accède directement aux MIICs, et ce, sans transit à la surface cellulaire. De plus, ils mettent en évidence la présence transitoire du complexe DM-DO à la surface membranaire, qui s'explique par une internalisation rapide et un recyclage aux compartiments MIICs.

##### **4.1.7.2 Les motifs de ciblage de DO $\beta$**

Les travaux du Dr Neefjes utilisent une approche expérimentale similaire à la nôtre pour caractériser les motifs de ciblage encodés dans la queue de DO $\beta$ . Ils utilisent une molécule chimérique CD8-DO $\beta$  et procèdent à la transfection des ADNc dans la lignée MelJuso afin d'analyser la localisation intracellulaire de la

protéine par microscopie confocale. Dans un premier temps, cette étude confirme l'importance du domaine cytoplasmique de DO $\beta$  dans la localisation endosomique de la chimère CD8-DO. De plus, leurs études de mutagenèse supportent nos conclusions et mettent en évidence le rôle du motif dileucine dans le ciblage intracellulaire endosomique de la molécule HLA-DO. Toutefois, selon leurs données, le résidu tyrosine 227 de DO $\beta$  constitue également un motif fonctionnel de ciblage intracellulaire. Notre analyse démontre pourtant clairement que ce motif n'est pas reconnu par la machinerie de ciblage, puisque la reconstitution d'un motif tyrosine parfait rétablit le ciblage endosomique de notre molécule chimérique et prévient l'accumulation de surface.

Les différences obtenues résultent sans doute de la variation dans le type de cellules utilisées. Ces auteurs utilisent la lignée mélanome Mel JuSo alors que nous avons utilisé la lignée épithéliale HeLa. Les cellules Mel JuSo, à l'encontre des cellules HeLa, expriment de façon endogène certaines molécules du CMH-II (DR3 et DQ2). L'utilisation de ce système cellulaire s'avère questionnable, surtout à la lumière des résultats qui mettent en évidence l'inhibition du chargement peptidique par la molécule CD8-DO. Dans ce système cellulaire, les molécules endogènes du CMH-II semblent interagir avec le domaine cytoplasmique de DO $\beta$  dans la chimère CD8-DO. Ceci peut potentiellement influencer la localisation intracellulaire de cette chimère. L'étude du trafic de ces chimères dans un système cellulaire où les molécules du CMH-II ne s'expriment pas de façon endogène, s'avèrerait donc fort intéressante.

#### **4.1.7.3 Transport endosomique spécialisé**

Les compartiments multivésiculaires (MVBs) sont des endosomes tardifs caractérisés par la présence de vésicules membranaires internes. La régulation

de la formation et du ciblage à l'intérieur de ces compartiments n'est pas encore complètement élucidée, et demeure l'objet de nombreuses investigations. Les molécules du CMH-II s'accumulent à la fois aux membranes limitantes et internes de ces compartiments. La découverte étonnante du groupe de Neefjes démontre l'implication de HLA-DO $\beta$  dans le ciblage endosomique spécialisé, à l'intérieur même des compartiments multivésiculaires. Leurs travaux suggèrent que la chaîne beta de DO cible le complexe DM-DO à partir des membranes vésiculaires internes vers la membrane limitante des MVBs. Ce ciblage spécialisé contrôle également l'exclusion des molécules classiques. Cette étude met en lumière l'importance du domaine cytoplasmique de DO $\beta$  pour la régulation du ciblage de DR et DM, à l'intérieur même du compartiment multivésiculaire. En conclusion, le motif de DO $\beta$  influence la distribution des molécules du CMH-II et l'efficacité de l'échange peptidique.

#### **4.1.7.4 Rôle de HLA-DO dans le ciblage exosomale**

Nous avons entrepris l'étude des mécanismes qui dirigent le ciblage exosomale des molécules du CMH-II classiques et non classiques, à la lumière des résultats des études de Neefjes. En effet, ces derniers laissent entrevoir que l'expression de la molécule HLA-DO modifie l'intégration des molécules du CMH-II à l'intérieur des exosomes sécrétés par les lymphocytes B. La seconde étude de cette thèse concerne donc les mécanismes de régulation du ciblage exosomale des molécules HLA-DM et HLA-DR.

## **4.2 Gestion du ciblage de HLA-DM aux exosomes par HLA-DR**

Les compartiments spécialisés dans la présentation antigénique (MIIC) sont des compartiments endosomiques tardifs communs caractérisés par un enrichissement en molécules du CMH-II. Ils partagent une morphologie multivésiculaire ou multilaminaire. Les vésicules membranaires internes des

compartiments multivésiculaires correspondent topologiquement aux exosomes sécrétés dans le milieu extracellulaire. Bien que les motifs assurant le ciblage à ces compartiments aient été identifiés, les mécanismes régularisant leur entrée dans les membranes internes, et ceux qui régissent l'enrichissement des molécules du CMH-II à l'intérieur de ces membranes sont toujours inconnus.

Tel que mentionné précédemment, HLA-DM encode un motif tyrosine de ciblage intracellulaire endosomique. Ce motif est responsable de la localisation de DM dans ces compartiments endosomiques tardifs multivésiculaires. Cependant, sa distribution à l'intérieur de ces compartiments reste controversée. Plusieurs études suggèrent que DM est enrichi principalement au niveau des membranes limitantes de ces compartiments (102-104). Par contre, la molécule HLA-DM et certaines chimères DM $\beta$  s'observent clairement aux membranes internes des compartiments MIICs (29;100;101). La seconde étude présentée dans le cadre de cette thèse analysait les déterminants moléculaires régulant le trafic des protéines transmembranaires du CMH-II au niveau des sous domaines membranaires des compartiments multivésiculaires et des membranes exosomales. Dans ce contexte, la molécule HLA-DM est utilisée à titre de modèle pour comprendre et définir les éléments qui contrôlent le ciblage protéique aux exosomes.

#### **4.2.1 Présence de HLA-DM aux fractions exosomales**

Bien que certaines études suggèrent l'absence de DM dans les exosomes (103;140), nos travaux démontrent clairement une accumulation de l'hétérodimère HLA-DM dans les vésicules sécrétées par lymphocytes B, et dans les cellules HeLa exprimant CIITA. Ces résultats vont dans le même sens que ceux récemment obtenus par Zwart, publiés dans la revue *Immunity* (302). Ces derniers caractérisent les sites privilégiés pour la formation des complexes entre DR et DM dans les compartiments multivésiculaires. Étonnamment, leur

étude révèle que l'interaction entre DM et DR se produit exclusivement sur les membranes internes. Par conséquent, l'édition peptidique s'effectue uniquement dans ce domaine membranaire; suite à la formation du complexe stable, HLA-DR se dissocie de DM et regagne la membrane limitante après la fusion membranaire. De plus, leurs études de FRET permettent de conclure que les interactions entre DM et DR sont inexistantes au niveau des membranes limitantes. Dans l'ensemble, ces travaux supportent donc nos observations et expliquent la présence de HLA-DM dans les membranes exosomales des cellules B.

#### **4.2.2 Absence de HLA-DM dans les exosomes des cellules HeLa DM.5**

La distribution, le transport et les interactions de la molécule HLA-DM à l'intérieur des sous-domaines des compartiments multivésiculaires sont formés d'une série d'événements complexes dont les implications fonctionnelles ne sont pas encore élucidées. Afin de mieux caractériser le transport de DM, nous avons évalué le ciblage de HLA-DM dans les cellules HeLa transfectées. Bien que la molécule HLA-DM soit présente dans les exosomes extraits des lymphocytes B 721.45 et des cellules HeLa CIITA, nous avons été surpris de constater qu'elle était exclue des exosomes purifiés des surnageants des cellules HeLa exprimant DM de façon ectopique. Ce résultat inattendu démontre à nouveau la complexité de cette voie intracellulaire. Le transport de DM à l'intérieur du compartiment MVB est sans-doute régité par des facteurs cellulaires induits par l'expression de CIITA. Le premier facteur potentiel est, bien entendu, HLA-DR.

#### **4.2.3 Cyclage de HLA-DM aux exosomes par HLA-DR**

Les interactions entre les molécules HLA-DR et HLA-DM sont bien identifiées (303-305). Toutefois, leur impact sur leurs trafics membranaires demeure confus. Nous avons émis l'hypothèse que l'interaction entre HLA-DM et

HLA-DR au niveau des membranes internes a vraisemblablement un impact sur la distribution de DM à travers les sous-domaines du MVB. Cette hypothèse fut confirmée dans les cellules HeLa exprimant DR et DM (manuscrit en préparation, Gauvreau, M.E. et al). En effet, l'expression de DR dans les cellules HeLa DM donne accès aux membranes exosomales. Ces résultats sont complémentaires à ceux du groupe de Neefjes montrant la présence des complexes DM-DR seulement dans les vésicules internes des compartiments multivésiculaires. Nos résultats mettent en évidence, pour la première fois, que l'interaction entre deux molécules peut gérer l'entrée dans les membranes exosomales.

#### **4.2.4 Rétention de HLA-DM à la membrane limitante du MVB et proscription de son entrée dans les membranes exosomales**

Étonnamment, nos résultats suggèrent également que le motif «tyrosine» de HLA-DM possède un rôle au niveau de son ciblage à la membrane limitante des MVBs. L'enrichissement important de DM à l'intérieur des membranes exosomales purifiées, à partir du surnageant de culture de cellules HeLa exprimant la molécule DMY-A, démontre hors de tout doute l'impact de la mutation du motif tyrosine de la chaîne  $\beta$  de HLA-DM. Bien que ce système cellulaire ne reflète pas le contexte physiologique complexe d'une cellule présentatrice d'antigènes, il permet l'identification d'un motif responsable de la régulation des échanges membranaires dans les compartiments MVB.

Il est tentant de faire un rapprochement entre nos résultats et ceux obtenus par le groupe du Dr Neefjes. En effet, les travaux de Van Lith définissent la fonction du motif dileucine de HLA-DO $\beta$  dans le transport des complexes DM-DO (104). Le signal dileucine encodé sur HLA-DO $\beta$  est responsable du ciblage du complexe, de la membrane interne vers la membrane limitante des MVBs. La fonction des motifs classiques de triage intracellulaire dans la sélection et le transport de cargos protéiques vers les compartiments endosomiques, y est bien

définie. Toutefois, la régulation des échanges membranaires par ces signaux à l'intérieur d'un même compartiment endosomique représente un concept relativement nouveau. Finalement, l'absence de DM aux fractions exosomales pourrait aussi refléter une rétention aux membranes limitantes et, par conséquent, une absence d'incorporation aux membranes exosomales.

#### **4.2.5 Masquage du motif YXXL de HLA-DM**

À ce jour, nous ne pouvons que spéculer sur la nature des mécanismes qui expliquent l'effet de HLA-DR sur l'incorporation exosomale de HLA-DM. Nos résultats suggèrent que la proximité des domaines cytoplasmiques de DR et DM génère un encombrement stérique qui empêche les molécules adaptatrices d'interagir avec le motif YXXL de DM. Le complexe devient alors libre d'accéder aux membranes internes. À l'intérieur de ces vésicules, HLA-DM interagit avec HLA-DR lors du chargement peptidique, duquel s'ensuit la dissociation et le recyclage de DM à la membrane limitante. Cette circulation de HLA-DM, entre les deux sous domaines membranaires, explique sa présence dans les exosomes suite à la fusion du MVB avec la membrane plasmique (171).

#### **4.2.6 Intégration au radeau lipidique**

Une autre hypothèse peut être envisagée pour expliquer le trafic membranaire du complexe DR-DM vers les exosomes. En effet, son interaction avec HLA-DR permettrait à HLA-DM d'intégrer les radeaux lipidiques. L'incorporation de HLA-DR dans ces domaines lipidiques se fait à la membrane plasmique et au niveau de la voie endosomique (306;307). L'enrichissement des radeaux lipidiques dans les membranes exosomales, qui a déjà été décrit (225), explique la présence de protéines typiquement associées à ces radeaux dans les membranes des exosomes. Par conséquent, l'intégration de DR dans ces «rafts» pourrait entraîner DM aux membranes exosomales. Les mécanismes

responsables de l'intégration sélective aux radeaux lipidiques demeurent toutefois inconnus.

#### **4.2.6 Voie de ciblage indépendante de l'ubiquitine**

L'ubiquitination contrôle plusieurs fonctions cellulaires indispensables, dont la monoubiquitination. Celle-ci identifie les protéines transmembranaires et les oriente vers les membranes internes des compartiments multivésiculaires. Bien que cette modification transitoire gère l'entrée de certaines protéines à l'intérieur de ces endosomes spécialisés, les voies alternatives d'entrée sont également sous intense investigation. Nos résultats démontrent clairement la présence de HLA-DR et HLA-DM dans la membrane des exosomes en devenir, chez les cellules HeLa CIITA et de la lignée B 721.45. Présentement, aucune évidence ne supporte l'ubiquitination directe des molécules du CMH-II. La molécule DR $\alpha$  possède 2 lysines cytoplasmiques conservées qui pourraient servir de substrat à une ubiquitine ligase. La molécule DR $\beta$  quant à elle encode seulement un de ces résidus.

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle difficile à mesurer avec les méthodes classiques de biochimie puisque cette liaison est sensible aux enzymes relâchés pendant la lyse cellulaire. Afin d'investiguer le rôle direct de l'ubiquitination dans le ciblage exosomal des molécules du CMH-II, nous avons utilisé notre système de production exosomale chez les cellules HeLa. Tout d'abord, nous avons développé des molécules chimériques par la fusion de DR à l'ubiquitine K48R (DR $\alpha$ /DR $\beta$ -Ubiquitine K48R). Cette mutation de l'ubiquitine empêche la formation d'une chaîne d'ubiquitine. Ensuite, nous avons entrepris la mutation de toutes les lysines cytoplasmiques de l'hétérodimère DR1. L'incorporation exosomale de ces molécules a ensuite été évaluée dans les cellules HeLa. Cette stratégie nous a permis d'évaluer



indirectement le rôle de l'ubiquitine sur le ciblage exosomal des molécules du CMH-II.

Nous avons été surpris de constater que la mutation des lysines n'affecte pas l'incorporation des molécules du CMH-II dans les membranes exosomales. Ces résultats suggèrent fortement que l'ubiquitination directe des CMH-II ne représente pas un mécanisme probable pour l'entrée de ces molécules dans les membranes exosomales. De plus, les résultats obtenus avec les chimères DR-ubiquitine K48R suggèrent une interprétation similaire, puisque aucune augmentation de l'incorporation exosomale de ces chimères DR n'est observée. Conjointement, ces résultats indiquent donc que le trafic des molécules du CMH-II vers les exosomes n'est pas géré par l'ubiquitination.

D'autre part, nous croyons que l'ubiquitination directe de HLA-DM est improbable. La queue cytoplasmique de la chaîne DM $\alpha$  contient seulement un site potentiel d'ubiquitination, tandis que la chaîne  $\beta$  n'en contient aucun. De plus, depuis sa découverte, il n'existe aucune mention de son ubiquitination dans la littérature scientifique. Bien que l'ubiquitination de DM soit peu probable, il serait intéressant d'effectuer la mutation de la lysine potentielle, afin d'en exclure le rôle potentiel dans son ciblage exosomal. Toutefois, il a été récemment démontré que l'ubiquitination peut avoir lieu sur les molécules du CMH-I qui n'encodent aucun résidu lysine dans le domaine cytoplasmique (308). Cette ubiquitination requiert uniquement un résidu cystéine sur la queue cytoplasmique. Par conséquent, il serait important de compléter cette étude avec l'évaluation du rôle des résidus cystéines cytoplasmiques dans le ciblage exosomal des molécules du CMH-II.

#### **4.2.7 Exosomes et dissémination de l'information antigénique**

Les glycoprotéines du CMH-I et du CMH-II sont fortement enrichies à la surface des membranes exosomales sécrétées par les CPA. Le rôle de ces vésicules dans la régulation et la présentation directe de l'antigène aux cellules effectrices du système immunitaire fait l'objet de nombreuses études (187;189;223;229;309). La forte expression de la molécule co-stimulatrice CD86 (B7-2) et d'une variété de protéines tétraspanes à la membrane exosomale supporte bien ce concept. Toutefois, plusieurs études démontrent que les exosomes agissent plutôt à titre de transporteur « FedEx » biologique, et qu'ils ont évolué pour transporter les métabolites d'une cellule à l'autre. Dans le contexte spécifique de la présentation antigénique, les exosomes sont responsables de la dissémination et de la communication de l'information antigénique entre les cellules du système immunitaire. Dans ce modèle, une cellule présentatrice d'antigène partage son information antigénique, les complexes CMH-peptides immunogéniques, avec les autres CPA du système immunitaire par l'entremise de la sécrétion des exosomes. L'avantage de ce système tient au fait que l'activation d'une seule cellule dendritique peut transférer des antigènes spécifiques à plusieurs nouvelles cellules dendritiques, multipliant ainsi le nombre de cellules activées. Une étude récente a d'ailleurs validé ce modèle en démontrant l'échange de complexes CMH-II/peptide entre les cellules dendritiques (177).

Le plus bel exemple de cette capacité d'échange d'information provient des cellules dendritiques folliculaires. Ces cellules accessoires ont une fonction essentielle lors des événements de maturation des lymphocytes B dans les centres germinatifs (310). Ces cellules ne synthétisent pas de façon endogène les molécules du CMH-II, acquérant plutôt les complexes CMH-II/peptides passivement via les exosomes produits par les lymphocytes B (311). La fonction potentielle des exosomes sur la régularisation de la présentation antigénique par les molécules du CMH-II demeure largement spéculative. Les processus qui dictent l'incorporation et la régulation des molécules du CMH-II

dans ces membranes demeurent, à toutes fins pratiques, incompris. Il reste également à définir la fonction physiologique de l'exosome enrichi de molécules du CMH-II. L'exosome agit-il directement en tant que vésicule de présentation antigénique ou bien sert-il simplement de navette biologique au niveau du transfert de protéines cytosoliques et membranaires?

L'enrichissement des molécules du CMH-II SDS-stable dans les membranes exosomales a été confirmé par plusieurs groupes de chercheurs (140;176). La capacité des exosomes dérivés des lymphocytes à stimuler les lymphocytes T CD4+ *in vitro* est également bien décrite (176;190). Par contre, le rôle du chaperon moléculaire HLA-DM au niveau des membranes exosomales est inconnu. Il est fort probable que la présence de HLA-DM dans ces vésicules permet aux cellules cibles de modifier leur activité de présentation antigénique. Par exemple, il n'est pas impossible d'imaginer un modèle où les lymphocytes B transfèrent le complexe CMH-peptide, les protéines co-stimulatrices, et HLA-DM vers les cellules dendritiques folliculaires. Par conséquent, ces cellules gagneraient la capacité de faire de l'édition peptidique. Ces hypothèses demeurent toutefois purement spéculatives et la « raison d'être » physiologique de DM au niveau des membranes exosomales est complètement inconnue.

#### **4.2.8 Fonction de HLA-DO dans les membranes exosomales**

La réponse immunitaire dirigée contre les antigènes se base habituellement sur une variété restreinte d'épitopes immunodominants dérivés de la protéine antigénique. Les autres épitopes sont négligés à cause d'une faible affinité ou d'une dégradation inadéquate. Depuis la découverte de HLA-DO, notre laboratoire a évoqué la possibilité d'utiliser cette molécule pour moduler l'activité de HLA-DM dans les cellules dendritiques, dans le but d'activer de nouvelles spécificités antigéniques (115). Les lymphocytes B, exprimant DO, ont en effet la capacité de présenter des épitopes suboptimaux. De plus,

l'expression de HLA-DO favorise clairement certains épitopes aux dépens d'autres. Les travaux récents menés par notre laboratoire ont démontré que l'expression ectopique de HLA-DO dans les cellules dendritiques réduit la présentation de certains antigènes (115). En somme, ces résultats évoquent la réelle possibilité de moduler la présentation antigénique des cellules dendritiques par l'expression de HLA-DO.

À la lumière des résultats décrits dans cette thèse, il est possible d'envisager de nouvelles hypothèses quant à la régularisation de la présentation antigénique restreinte par le CMH-II. D'une part, nous avons démontré que HLA-DM se retrouve dans les exosomes produits par les lymphocytes B. À notre connaissance, il s'agit de la première étude démontrant cet événement. D'autre part, l'association de HLA-DM à son régulateur HLA-DO est bien décrite à l'intérieur des compartiments endosomiques des lymphocytes B (98;116). Les motifs de triage encodés sur les domaines cytoplasmiques de ces protéines sont responsables du ciblage du complexe vers les compartiments endosomiques, et de sa localisation dans les sous-domaines membranaires de ces compartiments. La présence de DM dans les membranes exosomales des lymphocytes B nous amène à poser l'hypothèse qu'une certaine quantité de DO s'y retrouve également. Cette hypothèse est appuyée par les travaux récents de Zwart et de ses collaborateurs, qui décrivent une présence significative de la molécule HLA-DO dans les membranes internes des compartiments multivésiculaires des cellules HEK293 (302). De plus, nos résultats préliminaires ont démontré la présence de HLA-DO dans les membranes exosomales des lymphocytes B (résultats non publiés).

Jusqu'à maintenant, l'expression de HLA-DO est majoritairement restreinte à l'intérieur des lymphocytes B. Bien que la compréhension de sa fonction physiologique reste incomplète, HLA-DO demeure le principal modulateur du chaperon HLA-DM. Si l'on présuppose que HLA-DO se trouve exprimé sur

les membranes exosomales, la présentation antigénique des APC ciblées s'en trouve fort probablement modifiée. Compte tenu de son activité inhibitrice, il peut réduire la présentation antigénique ou permettre la présentation d'épitopes suboptimaux. Les lymphocytes B seraient par conséquent en mesure d'altérer la présentation antigénique des principales cellules spécialisées dans la présentation antigénique, en occurrence les cellules dendritiques.

Il est clair que ces hypothèses sont purement spéculatives car, pour étudier ce modèle nous devons tout d'abord confirmer la présence significative de HLA-DO dans les membranes exosomales des lymphocytes B. De plus, il s'avère également important de mesurer les quantités de DO nécessaires pour obtenir un effet réel. L'interaction et le transfert de molécules à partir des exosomes des lymphocytes B vers les cellules dendritiques doivent ensuite être confirmés *in vitro* et *in vivo*. Finalement, l'impact de l'expression de HLA-DO de source exosomale sur la présentation antigénique des cellules dendritiques pourra enfin être considéré. Éventuellement, HLA-DO pourrait être utilisé pour maximiser le potentiel thérapeutique des cellules dendritiques pour le développement de vaccins anti-tumoraux.

## CHAPITRE 5 – CONCLUSION

Le système immunitaire développe plusieurs stratégies pour faire face aux divers micro-organismes étrangers. La présentation antigénique, dans le contexte des molécules du CMH-II, permet au système immunitaire de monter une réponse spécifique pour contrecarrer les corps étrangers. La nature même de cette réponse nécessite l'intégrité de la voie endosomique puisque les déterminants antigéniques y sont générés. De plus, ses différentes composantes doivent accéder correctement à la voie endosomique pour jouer leur rôle. La régularisation des échanges et du ciblage membranaire sont par conséquent des processus hautement ordonnés.

Le premier travail présenté dans cette thèse aborde la découverte d'un motif dileucine fonctionnel, encodé sur la queue cytoplasmique bêta de l'hétérodimère HLA-DO. Nous proposons alors l'hypothèse que DO module le ciblage de DM. Le concept général s'avère correct, puisqu'il a été ensuite démontré que DO cible le chaperon moléculaire DM à la membrane limitante des compartiments multivésiculaires(104). Par la suite, ces études nous ont amenés à travailler sur les exosomes cellulaires. La seconde partie de cette thèse tente de définir les règles qui régissent le ciblage des molécules du CMH-II à ces vésicules membranaires. La présence de molécules du CMH-II dans les exosomes purifiés des cellules HeLa CIITA, 293T CIITA, et d'une lignée B lymphoblastoïde est confirmée par nos travaux, qui suggèrent la nature ubiquiste de ce phénomène cellulaire. Nous nous sommes également intéressé au litigieux sujet de la présence ou l'absence de DM dans les différents sous-domaines des compartiments MVBs. Nos travaux démontrent la présence de HLA-DM au niveau des exosomes. Il s'agit de la première étude à obtenir ces résultats. De plus, nos études identifient HLA-DR comme le principal chaperon du ciblage exosomal de DM. Cette découverte est d'autant plus importante qu'il a tout récemment été démontré que l'interaction entre DR et

DM, lors de l'édition peptidique, se fait uniquement dans les vésicules internes des compartiments multivésiculaires. Il serait intéressant de poursuivre cette étude pour déterminer la machinerie cellulaire responsable de ce ciblage aux exosomes. Cette question a d'ailleurs fait l'objet de récents travaux qui concluent que l'ubiquitination des queues cytoplasmique de HLA-DR n'est pas requise pour son ciblage aux exosome (Gauvreau, M.E, manuscrit en préparation).

Les exosomes sont des vésicules membranaires dont les propriétés varient en fonction du type cellulaire. Depuis quelques années, plusieurs travaux ont élucidé les fonctions réelles de ces vésicules dans les cellules hématopoïétiques et non- hématopoïétiques. Il sera important de porter davantage attention à la présence de ces nanovésicules dans les milieux de culture cellulaire lors des diverses expérimentations. En virologie, ces vésicules représentent à elles seules, la principale source de contamination membranaire lors des purifications virales par ultracentrifugation. En terminant, il importe de souligner que cette notion de propriétés fonctionnelles chez ces vésicules soulève d'importantes interrogations. L'omission, dans plusieurs processus physiologiques, de la contribution potentielle des exosomes en constitue une.

## **Contribution et participation de l'auteur aux publications.**

Cette thèse est le fruit de plusieurs années de recherche. Dans les paragraphes qui suivent, ma contribution à chacune des publications présentées dans le cadre de cette thèse sera décrite. Il s'agit de deux publications principales, suivies de deux publications secondaires présentées en annexe.

Dans le travail intitulé « Functional Characterization of a Lysosomal Sorting Motif in the Cytoplasmic Tail of HLA-DO $\beta$  », je figure à titre de premier auteur avec Francis Deshaies (28). Ayant dirigé ce projet pendant deux années, ma contribution dans cette publication est majeure. Mes réalisations dans ce projet consistent en la génération d'une bonne partie des constructions plasmidiques, des transfectants stables, de la mise au point des différents protocoles expérimentaux (transfection, microscopie, analyse en cytométrie) et de l'écriture du manuscrit final. J'ai effectué le travail ou bien contribué à la réalisation d'une majorité des figures de la publication (à l'exception de la figure 10), sans compter les figures supplémentaires que j'ai pratiquement toutes réalisées (10 figures supplémentaires).

Le second projet auquel je suis associé, « The YXXL cytoplasmic motif of HLA-DM regulates sorting into exosomes », découle du projet HLA-DO. J'ai initié ce travail suite aux résultats obtenus au cours de mon premier projet (28) et à ceux obtenus par le groupe de Jacques Neefjes (104). J'ai réalisé toutes les expériences préliminaires pour développer ce projet. La mise au point de ce projet a été particulièrement laborieuse. En effet, il est important de noter que chaque caractérisation exosomale (production, purification et caractérisation des exosomes) prend approximativement un mois à réaliser. De plus, j'ai mis au point tous les protocoles expérimentaux pour poursuivre nos études (microscopie électronique, isolation des exosomes, purification des exosomes, identification de marqueurs adéquats). Dans la publication, j'ai contribué à la



réalisation de toutes les figures finales. J'ai également réalisé l'écriture du manuscrit. Il faut cependant tenir compte de la contribution importante de Marie-Élaine Gauvreau au niveau de la production et de la réalisation des figures finales. La finalisation de ce projet aurait été impossible sans sa contribution. Ce projet a également donné naissance à un autre projet d'études exosomales, qui ne figure toutefois pas dans le cadre de cette thèse (Gauvreau, M-E., Brunet, A, Thibodeau, J. manuscrit en préparation.).

Le manuscrit intitulé, « The MHC class II beta chain overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal », a été initié en collaboration avec Hayssam Khalil (291). Ayant travaillé à ce projet approximativement deux ans à plein temps, j'ai réalisé plusieurs constructions plasmidiques (Iip35LIML, IiP33, DR $\beta$ RNRS, DR/DQ $\beta$ cyto et DR/DP $\beta$ cyto), généré pratiquement tous les nouveaux transfectants dans le système cellulaire HeLa et fait la mise au point du système expérimental. Ma contribution survient au niveau de toutes les figures et je l'évalue à approximativement 45% du travail total. Ce travail a mené à une seconde publication intitulée « A three amino acid-long HLA-DR $\beta$  cytoplasmic tail overcomes ER retention of invariant chain p35 » qui a été récemment acceptée dans la revue « Journal of Cell Science». Je figure à titre de deuxième auteur (publication non présentée dans cette thèse) (312).

Finalement, la publication intitulée « A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM » a été réalisée principalement par Francis Deshaies (129). Ma contribution à ce projet consiste principalement en la conception et la génération de trois mutants (DO $\alpha$ P11V, DO $\alpha$ A12N, DO $\alpha$ F13L). J'ai, de plus, contribué à la caractérisation du mutant DO $\alpha$ P11V. L'étude et la caractérisation du mutant DO $\alpha$ P11V sont parmi les principaux accomplissements de cette étude. J'ai également participé à la transfection de quelques autres mutants.

## CHAPITRE 6- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Little,C.C. 1916. Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor, carcinoma (JWA) of the Japanese waltzing mouse. *J.Med.Res.* 33:393-453.
2. Bover,K.H. 1927. Homoisotransplantation von Epidermis bei eineiigen Zwillingen. *Beitr.Klin.Chir.* 141:442-447.
3. Gorer,P.A. 1936. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br.J.Exp.Pathol.* 17:42-50.
4. Gorer,P.A. 1937. The genetic and antigenic basis for tumor transplantation. *J.Pathol.Bacteriol.* 44:691-697.
5. Snell,G.D. 2005. Methods for the study of histocompatibility genes. *J.Genet.* 49:87-108.
6. McDevitt,H.O. and A.Chinitz. 1969. Genetic control of the antibody response: relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type. *Science* 163:1207-1208.
7. Gorer,P.A. 1950. Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br.J.Cancer* 4:372-379.
8. Amadou,C., A.Kumanovics, E.P.Jones, D.Lambracht-Washington, M.Yoshino, and K.F.Lindahl. 1999. The mouse major histocompatibility complex: some assembly required. *Immunol.Rev.* 167:211-221.
9. Klein,J. and A.Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
10. Trowsdale,J., J.Ragoussis, and R.D.Campbell. 1991. Map of the human MHC. *Immunol.Today* 12:443-446.
11. York,I.A. and K.L.Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu.Rev.Immunol.* 14:369-396.
12. Claesson-Welsh,L., H.Ploegh, and P.A.Peterson. 1986. Determination of attachment sites for N-linked carbohydrate groups of class II histocompatibility alpha-chain and analysis of possible O-linked glycosylation of alpha- and gamma-chains. *Mol.Immunol.* 23:15-25.

13. Steimle, V., C.-A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Groszpiette, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106-109.
14. Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: Lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14:301-331.
15. Zhu, X.S., M.W. Linhoff, G. Li, K.C. Chin, S.N. Maity, and J.P. Ting. 2000. Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF- $\kappa$ B, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol. Cell Biol.* 20:6051-6061.
16. Servenius, B., L. Rask, and P.A. Peterson. 1987. Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO beta gene is a divergent member of the class II beta gene family. *J. Biol. Chem.* 262:8759-8766.
17. Tonnelde, C., R. DeMars, and E.O. Long. 1985. DO $\beta$ : a new  $\beta$  chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-2847.
18. Young, J.A. and J. Trowsdale. 1990. The HLA-DNA (DZA) gene is correctly expressed as a 1.1 kb mature mRNA transcript. *Immunogenetics* 31:386-388.
19. Arndt, S.O., A.B. Vogt, S. Markovic-Plese, R. Martin, G. Moldenhauer, A. Wolpl, Y. Sun, D. Schadendorf, G.J. Hammerling, and H. Kropshofer. 2000. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J.* 19:1241-1251.
20. Brown, J.H., T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
21. Rudensky, A.Y., P. Preston-Hurlburt, S.C. Hong, A. Barlow, and C.A. Janeway, Jr. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353:622-627.
22. Chicz, R.M., R.G. Urban, W.S. Lane, J.C. Gorga, L.J. Stern, D.A.A. Vignali, and J.L. Strominger. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogenous in size. *Nature* 358:764-768.

23. Brown, J.H., T.Jardetzky, M.A.Saper, B.Samraoui, P.J.Bjorkman, and D.C.Wiley. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332:845-850.
24. Lechler, R.I., A.J.Sant, N.S.Braunstein, R.Sekaly, E.O.Long, and R.N.Germain. 1990. Cell surface expression of hybrid murine/human MHC class II  $\alpha\beta$  dimers. *J.Immunol.* 144:329-333.
25. Cammarota, G., A.Scheirle, B.Takacs, D.M.Doran, R.Knorr, W.Bannwarth, J.Guardiola, and F.Sinigaglia. 1992. Identification of a CD4 binding site on the  $\beta_2$  domain of HLA- DR molecules. *Nature* 356:799-801.
26. Konig, R., L.-Y.Huang, and R.N.Germain. 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356:796-798.
27. Harton, J.A., A.E.Van Hagen, and G.A.Bishop. 1995. The cytoplasmic and transmembrane domains of MHC class II beta chains deliver distinct signals required for MHC class II-mediated B cell activation. *Immunity* 3:349-358.
28. Brunet, A., A.Samaan, F.Deshaies, T.J.Kindt, and J.Thibodeau. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.
29. Copier, J., M.J.Kleijmeer, S.Ponnambalam, V.Oorschot, P.Potter, J.Trowsdale, and A.Kelly. 1996. Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J.Immunol.* 157:1017-1027.
30. Zhong, G., P.Romagnoli, and R.N.Germain. 1997. Related leucine-based cytoplasmic targeting signals in invariant chain and major histocompatibility complex class II molecules control endocytic presentation of distinct determinants in a single protein. *J.Exp.Med.* 185:429-438.
31. El Fakhry, Y., M.Bouillon, C.Leveille, A.Brunet, H.Khalil, J.Thibodeau, and W.Mourad. 2004. Delineation of the HLA-DR region and the residues involved in the association with the cytoskeleton. *J.Biol.Chem.* 279:18472-18480.
32. Wade, W.F., Z.Z.Chen, R.Maki, S.McKercher, E.Palmer, J.C.Cambier, and J.H.Freed. 1989. Altered I-A protein-mediated transmembrane signaling in B cells that express truncated I-Ak protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 86:6297-6301.

33. Nabavi,N., G.J.Freeman, A.Gault, D.Godfrey, L.M.Nadler, and L.H.Glimcher. 1992. Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 360:266-268.
34. Nabavi,N., Z.Ghogawala, A.Myer, I.J.Griffith, W.F.Wade, Z.Z.Chen, D.J.McKean, and L.H.Glimcher. 1989. Antigen presentation abrogated in cells expressing truncated Ia molecules. *J.Immunol.* 142:1444-1447.
35. St-Pierre,Y., N.Nabavi, Z.Ghogawala, L.H.Glimcher, and T.H.Watts. 1989. A functional role for signal transduction via the cytoplasmic domains of MHC class II proteins. *J.Immunol.* 143:808-812.
36. Wade,W.F., E.D.Ward, E.F.Rosloniec, B.G.Barisas, and J.H.Freed. 1994. Truncation of the A alpha chain of MHC class II molecules results in inefficient antigen presentation to antigen-specific T cells. *Int.Immunol.* 6:1457-1465.
37. Smiley,S.T., T.M.Laufer, D.Lo, L.H.Glimcher, and M.J.Grusby. 1995. Transgenic mice expressing MHC class II molecules with truncated A $\beta$  cytoplasmic domains reveal signaling-independent defects in antigen presentation. *Int.Immunol.* 7:665-677.
38. Falk,K., O.Rötzschke, S.Stevanovic, G.Jung, and H.-G.Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296.
39. Townsend,A.R., F.M.Gotch, and J.Davey. 1985. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* 42:457-467.
40. Bevan,M.J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J.Exp.Med.* 143:1283-1288.
41. Brossart,P. and M.J.Bevan. 1997. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90:1594-1599.
42. Ackerman,A.L. and P.Cresswell. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat.Immunol.* 5:678-684.
43. Houde,M., S.Bertholet, E.Gagnon, S.Brunet, G.Goyette, A.Laplante, M.F.Princiotta, P.Thibault, D.Sacks, and M.Desjardins. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.

44. Gagnon,E., S.Duclos, C.Rondeau, E.Chevet, P.H.Cameron, O.Steele-Mortimer, J.Paiement, J.J.Bergeron, and M.Desjardins. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110:119-131.
45. Klionsky,D.J. and S.D.Emr. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721.
46. Chen,B.P., A.Madrigal, and P.Parham. 1990. Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule. *J.Exp.Med.* 172:779-788.
47. Jameson,S.C., K.A.Hogquist, and M.J.Bevan. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:93-126.
48. Lo,D. and J.Sprent. 1986. Identity of cells that imprint H-2-restricted T-cell specificity in the thymus. *Nature* 319:672-675.
49. Vukmanovic,S. 1996. The molecular jury: deciding whether immature thymocytes should live or die. *J.Exp.Med.* 184:305-309.
50. Geuze,H.J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol.Today* 19:282-287.
51. Roche,P.A., M.S.Marks, and P.Cresswell. 1991. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354:392-394.
52. Bakke,O. and B.Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
53. Lotteau,V., L.Teyton, A.Peleraux, T.Nilsson, L.Karlsson, S.L.Schmid, V.Quaranta, and P.A.Peterson. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600-605.
54. Roche,P.A. and P.Cresswell. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-618.
55. Ghosh,P., M.Amaya, E.Mellins, and D.C.Wiley. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457-462.
56. Riese,R.J., P.R.Wolf, D.Bromme, L.R.Natkin, J.A.Villadangos, H.L.Ploegh, and H.A.Chapman. 1996. Essential role for cathepsin S in

MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357-366.

57. Wubbolts,R., M.Fernandez-Borja, L.Oomen, D.Verwoerd, H.Janssen, J.Calafat, A.Tulp, S.Dusseljee, and J.Neefjes. 1996. Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J.Cell Biol.* 135:611-622.
58. Jones,P.P., D.B.Murphy, D.Hewgill, and H.O.McDevitt. 1979. Detection of a common polypeptide chain in I--A and I--E sub-region immunoprecipitates. *Mol.Immunol.* 16:51-60.
59. Long,E.O. 1985. In search of a function for the invariant chain associated with Ia antigens. *Surv.Immunol.Res.* 4:27-34.
60. Sung,E. and P.P.Jones. 1981. The invariant chain of murine Ia antigens: its glycosylation, abundance and subcellular localization. *Mol.Immunol.* 18:899-913.
61. Claessonwelsh,L., P.E.Barker, D.Larhammar, L.Rask, F.H.Ruddle, and P.A.Peterson. 1984. The Gene Encoding the Human Class-II Antigen-Associated Gamma-Chain Is Located on Chromosome-5. *Immunogenetics* 20:89-93.
62. Lipp,J. and B.Dobberstein. 1986. The membrane-spanning segment of invariant chain (I gamma) contains a potentially cleavable signal sequence. *Cell* 46:1103-1112.
63. Strubin,M., B.Mach, and E.O.Long. 1984. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity. *EMBO J.* 3:869-872.
64. Gedde-Dahl,M., I.Freisewinkel, M.Staschewski, K.Schenck, N.Koch, and O.Bakke. 1997. Exon 6 is essential for invariant chain trimerization and induction of large endosomal structures. *J.Biol.Chem.* 272:8281-8287.
65. O'Sullivan,D.M., D.Noonan, and V.Quaranta. 1987. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J.Exp.Med.* 166:444-450.
66. Littman,D.R. 1987. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu.Rev.Immunol.* 5:561-584.

67. Strubin,M., E.O.Long, and B.Mach. 1986. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* 47:619-625.
68. Strubin,M., C.Berte, and B.Mach. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5:3485-3488.
69. Long,E.O., M.Strubin, C.T.Wake, N.Gross, S.Carrel, P.Goodfellow, R.S.Accolla, and B.Mach. 1983. Isolation of cDNA clones for the p33 invariant chain associated with HLA-DR antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80:5714-5718.
70. Odorizzi,C.G., I.S.Trowbridge, L.Xue, C.R.Hopkins, C.D.Davis, and J.F.Collawn. 1994. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J.Cell Biol.* 126:317-330.
71. Bremnes,B., T.Madsen, M.Gedde-Dahl, and O.Bakke. 1994. An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 7):2021-2032.
72. Schutze,M.-P., P.A.Peterson, and M.R.Jackson. 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 13:1696-1705.
73. Anderson,H.A. and P.A.Roche. 1998. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J.Immunol.* 160:4850-4858.
74. Kuwana,T., P.A.Peterson, and L.Karlsson. 1998. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 95:1056-1061.
75. Pieters,J. 1997. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 9:89-96.
76. Khalil, H. Régulation de la présentation antigénique par la chaîne invariante Iip35 et la molécule non-classique HLA-DO. 2003. Université de Montréal.
77. Freisewinkel,I.M., K.Schenck, and N.Koch. 1993. 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.U.S.A* 90:9703-9706.

78. Bevec,T., V.Stoka, G.Pungercic, I.Dolenc, and V.Turk. 1996. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J.Exp.Med.* 183:1331-1338.
79. Guncar,G., G.Pungercic, I.Klemencic, V.Turk, and D.Turk. 1999. Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J.* 18:793-803.
80. Turk,D., G.Guncar, and V.Turk. 1999. The p41 fragment story. *IUBMB.Life* 48:7-12.
81. Cresswell,P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.
82. Zhu,L. and P.P.Jones. 1990. Transcriptional Control of the Invariant Chain Gene Involves Promoter and Enhancer Elements Common to and Distinct from Major Histocompatibility Complex Class-II Genes. *Mol.Cell.Biol.* 10:3906-3916.
83. Mellins,E., L.Smith, B.Arp, T.Cotner, E.Celis, and D.Pious. 1990. Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* 343:71-74.
84. Riberdy,J.M., J.R.Newcomb, M.J.Surman, J.A.Barbosa, and P.Cresswell. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360:474-477.
85. Sette,A., S.Ceman, R.T.Kubo, K.Sakaguchi, E.Appella, D.F.Hunt, T.A.Davis, H.Michel, J.Shabanowitz, R.Rudersdorf, H.M.Grey, and R.DeMars. 1992. Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen- processing mutant. *Science* 258:1801-1804.
86. Denzin,L.K., N.F.Robbins, C.Carboy-Newcomb, and P.Cresswell. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606.
87. Fling,S.P., B.Arp, and D.Pious. 1994. HLA-DM and -DMB genes are both required for complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368:554-558.

88. Morris,P., J.Shaman, M.Attaya, M.Amaya, S.Goodman, C.Bergman, J.J.Monaco, and E.Mellins. 1994. An essential role for the HLA-DM in antigen presentation by MHC class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368:551-554.
89. Hermel,E., J.Yuan, and J.J.Monaco. 1995. Characterization of polymorphism within the *H2-M* MHC class II loci. *Immunogenetics* 42:136-142.
90. Walter,W., M.Loos, and M.J.Maeurer. 1996. H2-M polymorphism in mice susceptible to collagen-induced arthritis involves the peptide binding groove. *Immunogenetics* 44:19-26.
91. Mosyak,L., D.M.Zaller, and D.C.Wiley. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377-383.
92. Fremont,D.H., F.Crawford, P.Marrack, W.A.Hendrickson, and J.Kappler. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385-393.
93. Cho,S., M.Attaya, and J.J.Monaco. 1991. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* 353:573-576.
94. Kelly,A.P., J.J.Monaco, S.Cho, and J.Trowsdale. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353:571-573.
95. Denzin,L.K. and P.Cresswell. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-165.
96. Van Ham,S.M., U.Grueneberg, G.Malcherek, I.Broeker, A.Melms, and J.Trowsdale. 1996. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J.Exp.Med.* 184:2019-2024.
97. Sherman,M.A., D.A.Weber, and P.E.Jensen. 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3:197-205.
98. Van Ham,S.M., E.P.M.Tjin, B.F.Lillemeir, U.Gruneberg, K.E.Van Meijgaarden, L.Pastoor, D.Verwoerd, A.Tulp, B.Canas, D.Rahman, T.H.M.Ottenhoff, D.J.C.Pappin, J.Trowsdale, and J.Neefjes. 1997. HLA-DO is a negative regulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Current Biol.* 7:950-957.

99. Pierre,P., L.K.Denzin, C.Hammond, J.R.Drake, S.Amigorena, P.Cresswell, and I.Mellman. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 4:229-239.
100. Lindstedt,R., M.Liljedahl, A.Peleraux, P.A.Peterson, and L.Karlsson. 1995. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* 3:561-572.
101. Marks,M.S., P.A.Roche, E.van Donselaar, L.Woodruff, P.J.Peters, and J.S.Bonifacino. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the  $\beta$  chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J.Cell Biol.* 131:351-369.
102. Kleijmeer,M., G.Ramm, D.Schuurhuis, J.Griffith, M.Rescigno, P.Ricciardi-Castagnoli, A.Y.Rudensky, F.Ossendorp, C.J.Melief, W.Stoorvogel, and H.J.Geuze. 2001. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J.Cell Biol.* 155:53-63.
103. Hammond,C., L.K.Denzin, M.Pan, J.M.Griffith, H.J.Geuze, and P.Cresswell. 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J.Immunol.* 161:3282-3291.
104. van Lith,M., M.van Ham, A.Griekspoor, E.Tjin, D.Verwoerd, J.Calafat, H.Janssen, E.Reits, L.Pastors, and J.Neeffjes. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J.Immunol.* 167:884-892.
105. Copier,J., P.Potter, S.H.Sacks, and A.P.Kelly. 1998. Multiple signals regulate the intracellular trafficking of HLA-DM in B-lymphoblastoid cells. *Immunology* 93:505-510.
106. Potter,P.K., J.Copier, S.H.Sacks, J.Calafat, H.Janssen, J.J.Neeffjes, and A.P.Kelly. 1999. Accurate intracellular localization of HLA-DM requires correct spacing of a cytoplasmic YTPL targeting motif relative to the transmembrane domain. *Eur.J.Immunol.* 29:3936-3944.
107. Rothenberger,S., B.J.Iacopetta, and L.C.Kuhn. 1987. Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell* 49:423-431.
108. Iacopetta,B.J., S.Rothenberger, and L.C.Kuhn. 1988. A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis. *Cell* 54:485-489.

109. Lobel,P., K.Fujimoto, R.D.Ye, G.Griffiths, and S.Kornfeld. 1989. Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis. *Cell* 57:787-796.
110. Guarnieri,F.G., L.M.Arterburn, M.B.Penno, Y.Cha, and J.T.August. 1993. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J.Biol.Chem.* 268:1941-1946.
111. Martin,W.D., G.G.Hicks, S.K.Mendiratta, H.I.Leva, H.E.Ruley, and L.Van Kaer. 1996. *H2-M* mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* 84:543-550.
112. van Ham,M., M.van Lith, A.Griekspoor, and J.Neefjes. 2000. What to do with HLA-DO? *Immunogenetics* 51:765-770.
113. Karlsson,L., C.D.Surh, J.Sprent, and P.A.Peterson. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351:485-488.
114. Douek,D.C. and D.M.Altmann. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int.Immunol.* 9:355-364.
115. Bellemare-Pelletier,A., J.Tremblay, S.Beaulieu, M.R.Boulassel, J.P.Routy, B.Massie, R.Lapointe, and J.Thibodeau. 2005. HLA-DO transduced in human monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen processing. *J.Leukoc.Biol.*
116. Liljedahl,M., T.Kuwana, W.P.Fung-Leung, M.Jackson, P.A.Peterson, and L.Karlsson. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-4824.
117. Denzin,L.K., D.B.Sant'Angelo, C.Hammond, M.J.Surman, and P.Cresswell. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.
118. van Ham,M., M.van Lith, B.Lillemeier, E.Tjin, U.Gruneberg, D.Rahman, L.Pastors, K.van Meijgaarden, C.Roucard, J.Trowsdale, T.Ottenhoff, D.Pappin, and J.Neefjes. 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J.Exp.Med.* 191:1127-1136.

119. Liljedahl,M., O.Winqvist, C.D.Surh, P.Wong, K.Ngo, L.Teyton, P.A.Peterson, A.Brunmark, A.Y.Rudensky, W.P.Fung-Leung, and L.Karlsson. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-243.
120. Alfonso,C., G.S.Williams, and L.Karlsson. 2003. H2-O influence on antigen presentation in H2-E-expressing mice. *Eur.J.Immunol.* 33:2014-2021.
121. Alfonso,C. and L.Karlsson. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 18:113-142.
122. Chen,X., O.Laur, T.Kambayashi, S.Li, R.A.Bray, D.A.Weber, L.Karlsson, and P.E.Jensen. 2002. Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J.Exp.Med.* 195:1053-1062.
123. Denzin,L., J.Fallas, M.Prendes, and W.Yi. 2005. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol.Rev.* 207:279-292.
124. Chalouni,C., J.Banchereau, A.B.Vogt, V.Pascual, and J.Davoust. 2003. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. *Int.Immunol.* 15:457-466.
125. Glazier,K.S., S.B.Hake, H.M.Tobin, A.Chadburn, E.J.Schattner, and L.K.Denzin. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J.Exp.Med.* 195:1063-1069.
126. Roucard,C., C.Thomas, M.A.Pasquier, J.Trowsdale, J.J.Sotto, J.Neefjes, and M.van Ham. 2001. In vivo and in vitro modulation of HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation. *J.Immunol.* 167:6849-6858.
127. Trowsdale,J. and A.Kelly. 1985. The human HLA class II alpha chain DZ alpha is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J.* 4:2231-2237.
128. Thibodeau,J., P.M.Lavoie, A.Samaan, J.P.Corre, R.P.Sékaly, and P.A.Cazenave. 1998. Conserved structural features between HLA-DO $\beta$  and -DR $\beta$ . *Mol.Immunol.* 35:885-893.
129. Deshaies,F., A.Brunet, D.A.Diallo, L.K.Denzin, A.Samaan, and J.Thibodeau. 2005. A point mutation in the groove of HLA-DO allows

egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*

130. Kropshofer,H., A.B.Vogt, C.Thery, E.A.Armandola, B.C.Li, G.Moldenhauer, S.Amigorena, and G.J.Hammerling. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-2981.
131. Samaan,A., J.Thibodeau, W.Mahana, F.Castellino, P.A.Cazenave, and T.J.Kindt. 1999. Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DR $\alpha$  and a chimeric DO $\beta$  chain. *Int.Immunol.* 11:99-111.
132. Boucheix,C. and E.Rubinstein. 2001. Tetraspanins. *Cell Mol.Life Sci.* 58:1189-1205.
133. Maecker,H.T., S.C.Todd, and S.Levy. 1997. The tetraspanin superfamily: Molecular facilitators. *Faseb Journal* 11:428-442.
134. Szollosi,J., V.Horejsi, L.Bene, P.Angelisova, and S.Damjanovich. 1996. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J.Immunol.* 157:2939-2946.
135. Engering,A. and J.Pieters. 2001. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *Int.Immunol.* 13:127-134.
136. Kleijmeer,M.J., G.Raposo, and H.J.Geuze. 1996. Characterization of MHC Class II Compartments by Immunoelectron Microscopy. *Methods* 10:191-207.
137. Kitadokoro,K., D.Bordo, G.Galli, R.Petracca, F.Falugi, S.Abrignani, G.Grandi, and M.Bolognesi. 2001. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J.* 20:12-18.
138. Levy,S. and T.Shoham. 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat.Rev.Immunol.* 5:136-148.
139. Metzelaar,M.J., P.L.Wijngaard, P.J.Peters, J.J.Sixma, H.K.Nieuwenhuis, and H.C.Clevers. 1991. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J.Biol.Chem.* 266:3239-3245.

140. Escola, J.M., M.J.Kleijmeer, W.Stoorvogel, J.M.Griffith, O.Yoshie, and H.J.Geuze. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 273:20121-20127.
141. Kleijmeer, M.J., S.Morkowski, J.M.Griffith, A.Y.Rudensky, and H.J.Geuze. 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J.Cell Biol.* 139:639-649.
142. Marsh, M. and H.T.McMahon. 1999. The structural era of endocytosis. *Science* 285:215-220.
143. Kornfeld, S. and I.Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu.Rev.Cell Biol.* 5:483-525.
144. Blott, E.J. and G.M.Griffiths. 2002. Secretory lysosomes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3:122-131.
145. McCoy, K.L. 1990. Contribution of endosomal acidification to antigen processing. *Semin.Immunol.* 2:239-246.
146. Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358.
147. Shurety, W., N.L.Stewart, and J.L.Stow. 1998. Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide. *Mol.Biol.Cell* 9:957-975.
148. Knapp, W., P.Rieber, B.Dorken, R.E.Schmidt, H.Stein, and A.E.vd Borne. 1989. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol.Today* 10:253-258.
149. Zerial, M. and H.Stenmark. 1993. Rab GTPases in vesicular transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5:613-620.
150. Gorvel, J.P., P.Chavrier, M.Zerial, and J.Gruenberg. 1991. Rab5 Controls Early Endosome Fusion In vitro. *Cell* 64:915-925.
151. McCaffrey, M.W., A.Bielli, G.Cantalupo, S.Mora, V.Roberti, M.Santillo, F.Drummond, and C.Bucci. 2001. Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Lett.* 495:21-30.
152. Meresse, S., J.P.Gorvel, and P.Chavrier. 1995. The Rab7 Gtpase Resides on A Vesicular Compartment Connected to Lysosomes. *Journal of Cell Science* 108:3349-3358.

153. Meresse, S., J.P. Gorvel, and P. Chavrier. 1995. The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 11):3349-3358.
154. Yamashiro, D.J., B. Tycko, S.R. Fluss, and F.R. Maxfield. 1984. Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 37:789-800.
155. Mu, F.T., J.M. Callaghan, O. Steele-Mortimer, H. Stenmark, R.G. Parton, P.L. Campbell, J. McCluskey, J.P. Yeo, E.P. Tock, and B.H. Toh. 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J. Biol. Chem.* 270:13503-13511.
156. Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266:21327-21330.
157. Peters, P.J., J.J. Neefjes, V. Oorschot, H.L. Ploegh, and H.J. Geuze. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349:669-676.
158. Peters, P.J., G. Raposo, J.J. Neefjes, V. Oorschot, R.L. Leijendekker, H.J. Geuze, and H.L. Ploegh. 1995. Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J. Exp. Med.* 182:325-334.
159. Calafat, J., M. Nijenhuis, H. Janssen, A. Tulp, S. Dusseljee, R. Wubbolts, and J. Neefjes. 1994. Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures. *J. Cell Biol.* 126:967-978.
160. Pierre, P. and I. Mellman. 1998. Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation. *Curr. Opin. Immunol.* 10:145-153.
161. Murk, J.L., W. Stoorvogel, M.J. Kleijmeer, and H.J. Geuze. 2002. The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13:303-311.
162. Robbins, N.F., C. Hammond, L.K. Denzin, M. Pan, and P. Cresswell. 1996. Trafficking of major histocompatibility complex class II molecules through intracellular compartments containing HLA-DM. *Hum. Immunol.* 45:13-23.



163. Amigorena,S., J.R.Drake, P.Webster, and I.Mellman. 1994. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369:113-120.
164. Amigorena,S., P.Webster, J.Drake, J.Newcomb, P.Cresswell, and I.Mellman. 1995. Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J.Exp.Med.* 181:1729-1741.
165. Castellino,F. and R.N.Germain. 1995. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 2:73-88.
166. Kobayashi,T., E.Stang, K.S.Fang, P.de Moerloose, R.G.Parton, and J.Gruenberg. 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392:193-197.
167. Matsuo,H., J.Chevallier, N.Mayran, B.Le, I, C.Ferguson, J.Faure, N.S.Blanc, S.Matile, J.Dubochet, R.Sadoul, R.G.Parton, F.Vilbois, and J.Gruenberg. 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303:531-534.
168. Katzmann,D.J., G.Odorizzi, and S.D.Emr. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3:893-905.
169. Pan,B.T. and R.M.Johnstone. 1983. Fate of the Transferrin Receptor During Maturation of Sheep Reticulocytes Invitro - Selective Externalization of the Receptor. *Cell* 33:967-977.
170. Murk,J.L., B.M.Humbel, U.Ziese, J.M.Griffith, G.Posthuma, J.W.Slot, A.J.Koster, A.J.Verkleij, H.J.Geuze, and M.J.Kleijmeer. 2003. Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:13332-13337.
171. Fevrier,B. and G.Raposo. 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr.Opin.Cell Biol.* 16:415-421.
172. Amigorena,S. 2001. [Exosomes derived from dendritic cells]. *J.Soc.Biol.* 195:25-27.
173. Pan,B.T., K.Teng, C.Wu, M.Adam, and R.M.Johnstone. 1985. Electron-Microscopic Evidence for Externalization of the Transferrin Receptor in Vesicular Form in Sheep Reticulocytes. *J.Cell Biol.* 101:942-948.

174. Johnstone,R.M., M.Adam, J.R.Hammond, L.Orr, and C.Turbide. 1987. Vesicle Formation During Reticulocyte Maturation - Association of Plasma-Membrane Activities with Released Vesicles (Exosomes). *Journal of Biological Chemistry* 262:9412-9420.
175. Pan,B.T. and R.Johnstone. 1984. Selective Externalization of the Transferrin Receptor by Sheep Reticulocytes Invitro - Response to Ligands and Inhibitors of Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 259:9776-9782.
176. Raposo,G., H.W.Nijman, W.Stoorvogel, R.Leijendekker, C.V.Harding, C.J.M.Melief, and H.J.Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J.Exp.Med.* 183:1161-1172.
177. Morelli,A.E., A.T.Larregina, W.J.Shufesky, M.L.Sullivan, D.B.Stolz, G.D.Papworth, A.F.Zahorchak, A.J.Logar, Z.Wang, S.C.Watkins, L.D.Falo, Jr., and A.W.Thomson. 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104:3257-3266.
178. Gray,D., M.Kosco, and B.Stockinger. 1991. Novel pathways of antigen presentation for the maintenance of memory. *Int.Immunol.* 3:141-148.
179. Peters,P.J., H.J.Geuze, H.A.Van der Donk, J.W.Slot, J.M.Griffith, N.J.Stam, H.C.Clevers, and J.Borst. 1989. Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 19:1469-1475.
180. Peters,P.J., J.Borst, V.Oorschot, M.Fukuda, O.Krahenbuhl, J.Tschopp, J.W.Slot, and H.J.Geuze. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J.Exp.Med.* 173:1099-1109.
181. Jiang,L., A.Erickson, and J.Rogers. 2002. Multivesicular bodies: a mechanism to package lytic and storage functions in one organelle? *Trends Cell Biol.* 12:362-367.
182. Burkhardt,J.K., S.Hester, C.K.Lapham, and Y.Argon. 1990. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J.Cell Biol.* 111:2327-2340.
183. Griffiths,G.M. and Y.Argon. 1995. Structure and biogenesis of lytic granules. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 198:39-58.
184. McNicol,A. and S.J.Israels. 1999. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb.Res.* 95:1-18.

185. Heijnen, H.F., A.E.Schiel, R.Fijnheer, H.J.Geuze, and J.J.Sixma. 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94:3791-3799.
186. Zitvogel, L., A.Regnault, A.Lozier, J.Wolfers, C.Flament, D.Tenza, P.Ricciardi-Castagnoli, G.Raposo, and S.Amigorena. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat.Med.* 4:594-600.
187. Skokos, D., H.G.Botros, C.Demeure, J.Morin, R.Peronet, G.Birkenmeier, S.Boudaly, and S.Mecheri. 2003. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J.Immunol.* 170:3037-3045.
188. Lamparski, H.G., A.Metha-Damani, J.Y.Yao, S.Patel, D.H.Hsu, C.Ruegg, and J.B.Le Pecq. 2002. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J.Immunol.Methods* 270:211-226.
189. Clayton, A., J.Court, H.Navabi, M.Adams, M.D.Mason, J.A.Hobot, G.R.Newman, and B.Jasani. 2001. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 247:163-174.
190. Thery, C., L.Duban, E.Segura, P.Veron, O.Lantz, and S.Amigorena. 2002. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat.Immunol.* 3:1156-1162.
191. Griffiths, G., R.G.Parton, J.Lucocq, B.van Deurs, D.Brown, J.W.Slot, and H.J.Geuze. 1993. The immunofluorescent era of membrane traffic. *Trends Cell Biol.* 3:214-219.
192. Stoorvogel, W., M.J.Kleijmeer, H.J.Geuze, and G.Raposo. 2002. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3:321-330.
193. Denzer, K., M.J.Kleijmeer, H.F.Heijnen, W.Stoorvogel, and H.J.Geuze. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J.Cell Sci.* 113 Pt 19:3365-3374.
194. Odorizzi, G., M.Babst, and S.D.Emr. 1998. Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* 95:847-858.

195. Raymond,C.K., I.Howald-Stevenson, C.A.Vater, and T.H.Stevens. 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol.Biol.Cell* 3:1389-1402.
196. Raiborg,C., T.E.Rusten, and H.Stenmark. 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:446-455.
197. Rothman,J.H. and T.H.Stevens. 1986. Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* 47:1041-1051.
198. Burd,C.G. and S.D.Emr. 1998. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol.Cell* 2:157-162.
199. Kutateladze,T.G., K.D.Ogburn, W.T.Watson, T.de Beer, S.D.Emr, C.G.Burd, and M.Overduin. 1999. Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. *Mol.Cell* 3:805-811.
200. Bilodeau,P.S., J.L.Urbanowski, S.C.Winistorfer, and R.C.Piper. 2002. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat.Cell Biol.* 4:534-539.
201. Bache,K.G., A.Brech, A.Mehlum, and H.Stenmark. 2003. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J.Cell Biol.* 162:435-442.
202. Li,L., J.Liao, J.Ruland, T.W.Mak, and S.N.Cohen. 2001. A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:1619-1624.
203. Bishop,N., A.Horman, and P.Woodman. 2002. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J.Cell Biol.* 157:91-101.
204. Amerik,A.Y., J.Nowak, S.Swaminathan, and M.Hochstrasser. 2000. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol.Biol.Cell* 11:3365-3380.
205. Katzmann,D.J., M.Babst, and S.D.Emr. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106:145-155.

206. Hsu, V.W. and P.J.Peters. 1998. Current views in intracellular transport: insights from studies in immunology. *Adv.Immunol.* 70:369-415.
207. Wilkinson, K.D. 1995. Roles of ubiquitylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu.Rev.Nutr.* 15:161-189.
208. Hochstrasser, M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu.Rev.Genet.* 30:405-439.
209. Hershko, A. and A.Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu.Rev.Biochem.* 67:425-479.
210. Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2:169-178.
211. Deveraux, Q., C.Jensen, and M.Rechsteiner. 1995. Molecular cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J.Biol.Chem.* 270:23726-23729.
212. Pickart, C.M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu.Rev.Biochem.* 70:503-533.
213. Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2:195-201.
214. Lyubchenko, T.A., G.A.Wurth, and A.Zweifach. 2001. Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity.* 15:847-859.
215. Reddy, A., E.V.Caler, and N.W.Andrews. 2001. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106:157-169.
216. Martinez, I., S.Chakrabarti, T.Hellevik, J.Morehead, K.Fowler, and N.W.Andrews. 2000. Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J.Cell Biol.* 148:1141-1149.
217. Vidal, M., P.Mangeat, and D.Hoekstra. 1997. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *Journal of Cell Science* 110:1867-1877.
218. Savina, A., M.Vidal, and M.I.Colombo. 2002. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J.Cell Sci.* 115:2505-2515.

219. Sjolín, C., O. Stendahl, and C. Dahlgren. 1994. Calcium-induced translocation of annexins to subcellular organelles of human neutrophils. *Biochem. J.* 300 ( Pt 2):325-330.
220. Oliver, C. and E. Essner. 1973. Distribution of anomalous lysosomes in the beige mouse: a homologue of Chediak-Higashi syndrome. *J. Histochem. Cytochem.* 21:218-228.
221. Baetz, K., S. Isaaz, and G. M. Griffiths. 1995. Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. *J. Immunol.* 154:6122-6131.
222. They, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* 166:7309-7318.
223. Wubbolts, R., R. S. Leckie, P. T. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Mobius, J. Hoernschemeyer, J. W. Slot, H. J. Geuze, and W. Stoorvogel. 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278:10963-10972.
224. Murk, J. L., W. Stoorvogel, M. J. Kleijmeer, and H. J. Geuze. 2002. The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13:303-311.
225. de Gassart, A., C. Geminard, B. Fevrier, G. Raposo, and M. Vidal. 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102:4336-4344.
226. Gould, S. J., A. M. Booth, and J. E. K. Hildreth. 2003. The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10592-10597.
227. Nguyen, D. G., A. Booth, S. J. Gould, and J. E. K. Hildreth. 2003. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *Journal of Biological Chemistry* 278:52347-52354.
228. Orenstein, J. M., C. Fox, and S. M. Wahl. 1997. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 276:1857-1861.
229. Clayton, A., C. L. Harris, J. Court, M. D. Mason, and B. P. Morgan. 2003. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *Eur. J. Immunol.* 33:522-531.

230. Rothman, J.E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372:55-63.
231. Sollner, T., S.W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J.E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318-324.
232. Jahn, R. and T.C. Sudhof. 1999. Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:863-911.
233. Lin, R.C. and R.H. Scheller. 2000. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:19-49.
234. Aderem, A. and D.M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623.
235. Lamaze, C. and S.L. Schmid. 1995. The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:573-580.
236. Kanaseki, T. and K. Kadota. 1969. The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J. Cell Biol.* 42:202-220.
237. Pearse, B.M. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97:93-98.
238. Galbiati, F., B. Razani, and M.P. Lisanti. 2001. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106:403-411.
239. Seaman, M.N., J.M. McCaffery, and S.D. Emr. 1998. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J. Cell Biol.* 142:665-681.
240. Robinson, M.S. 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* 14:167-174.
241. Anderson, R.G. 1998. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:199-225.
242. Slepnev, V.I. and P. De Camilli. 2000. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nature Reviews Neuroscience* 1:161-172.
243. Schmid, S.L. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* 66:511-548.

244. Keen, J.H., M.C. Willingham, and I.H. Pastan. 1979. Clathrin-coated vesicles: isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell* 16:303-312.
245. Unanue, E.R., E. Ungewickell, and D. Branton. 1981. The Binding of Clathrin Triskelions to Membranes from Coated Vesicles. *Cell* 26:439-446.
246. Vigers, G.P., R.A. Crowther, and B.M. Pearse. 1986. Location of the 100 kd-50 kd accessory proteins in clathrin coats. *EMBO J.* 5:2079-2085.
247. Boehm, M. and J.S. Bonifacino. 2001. Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* 12:2907-2920.
248. Rapoport, I., M. Miyazaki, W. Boll, B. Duckworth, L.C. Cantley, S. Shoelson, and T. Kirchhausen. 1997. Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *EMBO J.* 16:2240-2250.
249. Dell'Angelica, E.C., J. Klumperman, W. Stoorvogel, and J.S. Bonifacino. 1998. Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* 280:431-434.
250. Simpson, F., A.A. Peden, L. Christopoulou, and M.S. Robinson. 1997. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* 137:835-845.
251. Kantheti, P., X.X. Qiao, M.E. Diaz, A.A. Peden, G.E. Meyer, S.L. Carskadon, D. Kapfhamer, D. Sufalko, M.S. Robinson, J.L. Noebels, and M. Burmeister. 1998. Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* 21:111-122.
252. Dell'Angelica, E.C., V. Shotelersuk, R.C. Aguilar, W.A. Gahl, and J.S. Bonifacino. 1999. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Molecular Cell* 3:11-21.
253. Clark, R.H., J.C. Stinchcombe, A. Day, E. Blott, S. Booth, G. Bossi, T. Hamblin, E.G. Davies, and G.M. Griffiths. 2003. Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nature Immunology* 4:1111-1120.
254. Dell'Angelica, E.C., C. Mullins, M. Boehm, and J.S. Bonifacino. 1999. Identification of AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *Mol. Biol. Cell* 10:223A.



255. Hirst, J., N.A. Bright, B. Rous, and M.S. Robinson. 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol. Biol. Cell* 10:2787-2802.
256. Nakatsu, F. and H. Ohno. 2003. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct. Funct.* 28:419-429.
257. Collins, B.M., A.J. McCoy, H.M. Kent, P.R. Evans, and D.J. Owen. 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109:523-535.
258. Brodsky, F.M., C.Y. Chen, C. Knuehl, M.C. Towler, and D.E. Wakeham. 2001. Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17:517-568.
259. Stamnes, M.A. and J.E. Rothman. 1993. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* 73:999-1005.
260. Gallusser, A. and T. Kirchhausen. 1993. The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *EMBO J.* 12:5237-5244.
261. Bonifacino, J.S. and L.M. Traub. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:395-447.
262. Benmerah, A. and C. Lamaze. 2002. Endocytose: chaque voie compte! *Méd/Sc* 18:1126-1136.
263. Misra, S., R. Puertollano, Y. Kato, J.S. Bonifacino, and J.H. Hurley. 2002. Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature* 415:933-937.
264. Hirsch, D.S., K.T. Stanley, L.X. Chen, K.M. Jacques, R. Puertollano, and P.A. Randazzo. 2003. Arf regulates interaction of GGA with mannose-6-phosphate receptor. *Traffic* 4:26-35.
265. Dell'Angelica, E.C., R. Puertollano, C. Mullins, R.C. Aguilar, J.D. Vargas, L.M. Hartnell, and J.S. Bonifacino. 2000. GGAs: A family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 149:81-93.

266. Miller, G.J., R. Mattera, J.S. Bonifacino, and J.H. Hurley. 2003. Recognition of accessory protein motifs by the gamma-adaptin ear domain of GGA3. *Nat. Struct. Biol.* 10:599-606.
267. Puertollano, R., R.C. Aguilar, I. Gorshkova, R.J. Crouch, and J.S. Bonifacino. 2001. Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* 292:1712-1716.
268. Shiba, T., H. Takatsu, T. Nogi, N. Matsugaki, M. Kawasaki, N. Igarashi, M. Suzuki, R. Kato, T. Earnest, K. Nakayama, and S. Wakatsuki. 2002. Structural basis for recognition of acidic-cluster dileucine sequence by GGA1. *Nature* 415:937-941.
269. Puertollano, R. and J.S. Bonifacino. 2004. Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nature Cell Biology* 6:244-251.
270. Barlowe, C. 1998. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1404:67-76.
271. Cosson, P. and F. Letourneur. 1994. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263:1629-1631.
272. Cosson, P., Y. Lefkir, C. Demolliere, and F. Letourneur. 1998. New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J.* 17:6863-6870.
273. Jackson, M.R., T. Nilsson, and P.A. Peterson. 1990. Identification of a consensus motif for the retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9:3153-3162.
274. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R.P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int. Immunol.* 15:1249-1263.
275. Davis, C.G., M.A. Lehrman, D.W. Russell, R.G. Anderson, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 1986. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* 45:15-24.
276. Chen, W.J., J.L. Goldstein, and M.S. Brown. 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265:3116-3123.

277. Boll, W., I. Rapoport, C. Brunner, Y. Modis, S. Prehn, and T. Kirchhausen. 2002. The mu2 subunit of the clathrin adaptor AP-2 binds to FDNPVY and YppO sorting signals at distinct sites. *Traffic* 3:590-600.
278. Lazarovits, J. and M. Roth. 1988. A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits. *Cell* 53:743-752.
279. Canfield, W.M., K.F. Johnson, R.D. Ye, W. Gregory, and S. Kornfeld. 1991. Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* 266:5682-5688.
280. Jadot, M., W.M. Canfield, W. Gregory, and S. Kornfeld. 1992. Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J. Biol. Chem.* 267:11069-11077.
281. Trowbridge, I.S., J.F. Collawn, and C.R. Hopkins. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:129-161.
282. Harter, C. and I. Mellman. 1992. Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (lgp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 117:311-325.
283. Ohno, H., M.C. Fournier, G. Poy, and J.S. Bonifacino. 1996. Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J. Biol. Chem.* 271:29009-29015.
284. Boll, W., H. Ohno, Z. Songyang, I. Rapoport, L.C. Cantley, J.S. Bonifacino, and T. Kirchhausen. 1996. Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J.* 15:5789-5795.
285. Letourneur, F. and R.D. Klausner. 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-1157.
286. Dietrich, J., X. Hou, A.M. Wegener, and C. Geisler. 1994. CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J.* 13:2156-2166.
287. Dietrich, J., J. Kastrop, B.L. Nielsen, N. Odum, and C. Geisler. 1997. Regulation and function of the CD3 gamma DxxxLL motif: a binding

- site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J.Cell Biol.* 138:271-281.
288. Pitcher,C., S.Honing, A.Fingerhut, K.Bowers, and M.Marsh. 1999. Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol.Biol.Cell* 10:677-691.
289. Greenberg,M., L.DeTulleo, I.Rapoport, J.Skowronski, and T.Kirchhausen. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr.Biol.* 8:1239-1242.
290. Nakatsu,F., M.Sakuma, Y.Matsuo, H.Arase, S.Yamasaki, N.Nakamura, T.Saito, and H.Ohno. 2000. A Di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis. *J.Biol.Chem.* 275:26213-26219.
291. Khalil,H., A.Brunet, I.Saba, R.Terra, R.P.Sekaly, and J.Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
292. Pieters,J., H.Horstmann, O.Bakke, G.Griffiths, and J.Lipp. 1991. Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J.Cell Biol.* 115:1213-1223.
293. Hofmann,M.W., S.Honing, D.Rodionov, B.Dobberstein, K.von Figura, and O.Bakke. 1999. The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J.Biol.Chem.* 274:36153-36158.
294. McCormick,P.J., J.A.Martina, and J.S.Bonifacino. 2005. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:7910-7915.
295. Marks,M.S., L.Woodruff, H.Ohno, and J.S.Bonifacino. 1996. Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J.Cell Biol.* 135:341-354.
296. Nordeng,T.W. and O.Bakke. 1999. Overexpression of proteins containing tyrosine- or leucine-based sorting signals affects transferrin receptor trafficking. *J.Biol.Chem.* 274:21139-21148.

297. Gorvel, J.P., J.M. Escola, and O. Bakke. 1995. Invariant chain induces a delayed transport from early to late endosomes. *J. Biol. Chem.* 270:2741-2746.
298. Romagnoli, P., C. Layet, J. Yewdell, O. Bakke, and R.N. Germain. 1993. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J. Exp. Med.* 177:583-596.
299. Lagaudriere-Gesbert, C., S.L. Newmyer, T.F. Gregers, O. Bakke, and H.L. Ploegh. 2002. Uncoating ATPase Hsc70 is recruited by invariant chain and controls the size of endocytic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:1515-1520.
300. Nordeng, T.W., T.F. Gregers, T.L. Kongsvik, S. Meresse, J.P. Gorvel, F. Jourdan, A. Motta, and O. Bakke. 2002. The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology. *Mol. Biol. Cell* 13:1846-1856.
301. Modrek, B., A. Resch, C. Grasso, and C. Lee. 2001. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res.* 29:2850-2859.
302. Zwart, W., A. Griekspoor, C. Kuijl, M. Marsman, J. van Rheezen, H. Janssen, J. Calafat, M. van Ham, L. Janssen, M. van Lith, K. Jalink, and J. Neefjes. 2005. Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. *Immunity.* 22:221-233.
303. Doebele, C.R., R. Busch, M.H. Scott, A. Pashine, and D.E. Mellins. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* 13:517-527.
304. Faubert, A., A. Samaan, and J. Thibodeau. 2002. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J. Biol. Chem.* 277:2750-2755.
305. Pashine, A., R. Busch, M.P. Belmares, J.N. Munning, R.C. Doebele, M. Buckingham, G.P. Nolan, and E.D. Mellins. 2003. Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides. *Immunity.* 19:183-192.
306. Huby, R.D., R.J. Dearman, and I. Kimber. 1999. Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 274:22591-22596.

307. Poloso,N.J., A.Muntasell, and P.A.Roche. 2004. MHC class II molecules traffic into lipid rafts during intracellular transport. *J.Immunol.* 173:4539-4546.
308. Cadwell,K. and L.Coscoy. 2005. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* 309:127-130.
309. Blanchard,N., D.Lankar, F.Faure, A.Regnault, C.Dumont, G.Raposo, and C.Hivroz. 2002. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J.Immunol.* 168:3235-3241.
310. van Nierop,K. and C.De Groot. 2002. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin.Immunol.* 14:251-257.
311. Denzer,K., M.van Eijk, M.J.Kleijmeer, E.Jakobson, C.De Groot, and H.J.Geuze. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J.Immunol.* 165:1259-1265.
312. Khalil,H., A.Brunet, and J.Thibodeau. 2005. A three amino acid-long HLA-DRb cytoplasmic Tail overcomes ER retention of invariant chain p35. *J Cell Sci.* 118:4679-4687.
313. Germain,R.N., D.M.Bentley, and H.Quill. 1985. Influence of allelic polymorphism on the assembly and surface expression of class II MHC (Ia) molecules. *Cell* 43:233-242.
314. Germain,R.N. and H.Quill. 1986. Unexpected expression of a unique mixed-isotype class II MHC molecule by transfected L-cells. *Nature* 320:72-75.
315. Karp,D.R., C.L.Teletski, D.Jaraquemada, W.L.Maloy, J.E.Coligan, and E.O.Long. 1990. Structural requirements for pairing of  $\alpha$  and  $\beta$  chains in HLA-DR and HLA-DP molecules. *J.Exp.Med.* 171:615-628.
316. Lechler,R.I., M.A.Norcross, and R.N.Germain. 1985. Qualitative and quantitative studies of antigen-presenting cell function by using I-A-expressing L cells. *J.Immunol.* 135:2914-2922.
317. Sant,A.J., L.R.Hendrix, J.E.Coligan, W.L.Maloy, and R.N.Germain. 1991. Defective intracellular transport as a common mechanism limiting expression of inappropriately paired class II major histocompatibility complex  $\alpha\beta$  chains. *J.Exp.Med.* 174:799-808.

318. O'Kelly, I., M.H. Butler, N. Zilberberg, and S.A. Goldstein. 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111:577-588.

## **CHAPITRE 7- ANNEXES**



**Article supplémentaire #1**

Deshaies, F., **Brunet**, A., Diallo, D.A., Denzin, R, L.K., Samaan, A., Thibodeau, J.(2005). A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 102(18):6443-8.

## AVANT-PROPOS

### 7.1 Sortie solitaire du RE de la molécule HLA-DO

La progression des protéines du CMH-II dans la voie de synthèse est régit par un contrôle rigoureux de qualité. Ce dernier se manifeste habituellement sous la forme d'une rétention des complexes au niveau du RE. Les mécanismes qui expliquent la rétention prématurée de HLA-DO humain au niveau du réticulum endoplasmique demeurent non définis. À notre connaissance, les chaînes  $DO\alpha$  et  $DO\beta$  n'encodent pas de motifs de rétention connus. Cette rétention résulte plutôt d'une mauvaise association entre ces deux chaînes. En effet, nos travaux démontrent clairement la présence d'une quantité normale des complexes  $DO\alpha/DO\beta$  dans les cellules HeLa transfectées (129). Cependant, la qualité de l'interaction entre ces deux chaînes semble être la source de la rétention au niveau du RE.

Les règles régissant l'association des chaînes alpha et bêta du CMH-II ont été définies dans plusieurs travaux (313-317). Ces études démontrent la rétention des molécules du CMH-II suite à une mauvaise association des chaînes  $\alpha\beta$  lors de l'expression d'allèles non correspondants. De plus, ces études font ressortir l'importance des domaines N-terminaux pour l'interaction stable entre ces deux chaînes (313). Dans cet optique, nous avons constaté que l'alignement des séquences  $DO\alpha$  et  $DQ\alpha$  révèle des différences en acides aminés au niveau du domaine N-terminal. Ces différences sont potentiellement responsables de la rétention de l'hétérodimère HLA-DO au niveau du RE. Nos travaux révèlent que la mutation d'une proline 11 de  $DO\alpha$  en une valine, restaure la sortie de l'hétérodimère même en l'absence de HLA-DM (129). Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la liaison de HLA-DM à  $DO\alpha$ , en stabilisant les contacts au niveau des domaines N-terminaux de l'hétérodimère  $DO\alpha\beta$ , permet au complexe de sortir du RE.

Nos travaux permettent également de mieux comprendre les interfaces d'interaction entre HLA-DM et HLA-DO. Nos résultats démontrent clairement que la chaîne  $\alpha$  contient des éléments critiques impliqués dans l'interaction avec DM. Le site principal se trouve près du résidu DO $\alpha$  41 sur une boucle latérale du domaine  $\alpha$ 1 alors qu'un site secondaire d'interaction se situe probablement au niveau du domaine  $\alpha$ 2.

Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant de caractériser les sites d'interaction de DO sur la molécule DM. Cette étude permettrait de vérifier si ces sites sont identiques à ceux de l'interaction DM-DR ou s'ils prennent place dans des régions complètement différentes.

Ces travaux ont permis d'entreprendre les démarches pour résoudre la structure tridimensionnelle de l'hétérodimère HLA-DO. La production de grandes quantités de cette protéine dans les cellules d'insectes, la cristallisation de la protéine et la cristallographie à rayon X qui mèneront éventuellement à la résolution de la structure tridimensionnelle de l'hétérodimère non classique HLA-DO.

**Article supplémentaire #2**

Khalil, H., **Brunet, A.**, Saba, I., Terra, R., Sekaly, R.P., Thibodeau, J.(2003). The MHC class II beta chain overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *International Immunology*. 15(10):1249-63.

## AVANT-PROPOS

### **7.2 Dissimulation du motif de rétention de la chaîne invariante Iip35 par la queue cytoplasmique de HLA-DR $\beta$**

La chaîne invariante est le principal chaperon moléculaire des molécules classiques du CMH-II. La chaîne invariante forme un complexe nonamérique avec les molécules du CMH-II et protège la niche peptidique des CMH-II lors de leur biosynthèse. Elle participe également à l'adressage endosomique du complexe CMH-II-Ii. De plus, l'isoforme p35 de la chaîne invariante humaine possède un motif de rétention de type diarginine. Bien que la nature du mécanisme de rétention demeure controversée, est reconnu qu'il implique le transport rétrograde du TGN vers le RE (72;318). L'inactivation de ce motif de rétention nécessite la phosphorylation des résidus sérines cytoplasmiques, ainsi que le masquage induit par la molécule HLA-DR. La capacité de DR à masquer le motif de rétention RE est attribuée à son domaine cytoplasmique.

Dans cette étude, nous avons procédé à la caractérisation des déterminants moléculaires requis sur les molécules du CMH-II, pour masquer le motif de rétention de l'isoforme Iip35 (Annexe : Article supplémentaire #2 (274)). À l'aide de molécules hétérodimériques tronquées, nous avons été en mesure d'évaluer l'importance respective des domaines cytoplasmiques alpha et bêta de HLA-DR. Nos résultats démontrent que seule la chaîne  $\beta$  est requise pour contrevénir à cette rétention. De plus, nos travaux suggèrent que les chaînes  $\beta$  de tous les isotypes du CMH-II (DR/DP/DQ) possèdent la capacité de masquer le motif de rétention R-X-R.

Dans une seconde étude, nous avons procédé à la caractérisation complète du masquage de l'isoforme Iip35 par la chaîne  $\beta$  de HLA-DR(312). Nos résultats démontrent que le masquage dépend d'une séquence spécifique encodée sur le

domaine cytoplasmique de la chaîne  $\beta$ , mais plutôt de la taille du domaine cytoplasmique. Il apparaît donc qu'un masquage efficace nécessite un motif de relâche composé d'une chaîne  $\beta$  cytoplasmique d'une taille minimale de trois résidus (312).

Il a récemment été démontré que la liaison de la chaîne invariante Iip35 à la famille de protéines 14-3-3, et à  $\beta$ COP est mutuellement exclusive (318). Cette famille de protéines interagit avec les motifs phosphosérines, et sa liaison au domaine cytoplasmique masque le motif de rétention, et permet la sortie de la chaîne invariante du RE (318). Ces résultats sont toutefois difficiles à concilier avec ceux qui démontrent la sortie du RE du mutant Iip35S8D. Malgré l'absence de liaison à 14-3-3, cette chaîne invariante se développe à pleine maturité en présence des molécules du CMH-II (74). Les mécanismes moléculaires responsables de la rétention de la chaîne Iip35 au RE ne sont toujours pas élucidés. Dans l'espoir de comprendre ces phénomènes de rétention, il serait important d'identifier tous les chaperons moléculaires impliqués dans cette régulation.

# A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM

Francis Deshaies\*, Alexandre Brunet\*, Djibril A. Diallo\*, Lisa K. Denzin<sup>†‡</sup>, Angela Samaan<sup>§¶</sup>, and Jacques Thibodeau\*<sup>¶</sup>

\*Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre Ville, Montréal, QC, Canada H3T 1J4; <sup>¶</sup>Immunology Program, Weill Graduate School of Medical Sciences, Cornell University, New York, NY 10021; <sup>†</sup>Immunology Program, Sloan-Kettering Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021; and <sup>§</sup>Immunité Cellulaire Antivirale, Institut Pasteur, 28 Rue Du Dr Roux, 75015 Paris, France

Edited by Peter Cresswell, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, and approved March 17, 2005 (received for review February 1, 2005)

B lymphocytes express the nonclassical class II molecule HLA-DO, which modulates the peptide loading activity of HLA-DM in the endocytic pathway. Binding to HLA-DM is required for HLA-DO to egress from the endoplasmic reticulum (ER). To gain insights into the mode of action of DO and on the role of DM in ER release, we sought to identify DM-binding residues on DO. Our results show that DO $\alpha$  encompasses the binding site for HLA-DM. More specifically, mutation of residue DO $\alpha$ 41 on an exposed lateral loop of the  $\alpha$ 1 domain affects the binding to DM, ER egress, and activity of DO. Using a series of chimeric DR/DO molecules, we confirmed the role of the  $\alpha$  chain and established that a second DM-binding region is located C-terminal to the DO $\alpha$ 80 residue, most probably in the  $\alpha$ 2 domain. Interestingly, after mutation of a buried proline ( $\alpha$ 11) on the floor of the putative peptide-binding groove, HLA-DO remained functional but became independent of HLA-DM for ER egress and intracellular trafficking. Collectively, these results suggest that the binding of HLA-DM to DO $\alpha$  allows the complex to egress from the ER by stabilizing intramolecular contacts between the N-terminal antiparallel  $\beta$ -strands of the DO $\alpha\beta$  heterodimer.

antigen processing | MHC | class II | HLA-DR

Classical MHC class II proteins are highly polymorphic heterodimers expressed at the surface of antigen-presenting cells where they bind antigenic peptides derived from endocytosed antigens (1). The  $\alpha$  and  $\beta$  subunits associate in the endoplasmic reticulum (ER) with the nonpolymorphic invariant chain (Ii), and the complex is sorted to endocytic compartments where Ii is degraded. A small fragment [class II-associated Ii peptide (CLIP)] of the Ii is protected inside the groove and must be released before the binding of antigenic peptides (2). HLA-DM (DM), a nonpolymorphic intracellular chaperone, is responsible for CLIP removal and also for editing the peptide repertoire to favor those of higher class II-binding affinity (3).

Class II-restricted antigen presentation in B lymphocytes is tightly regulated to ensure specificity of the activation process. These cells express another nonclassical class II molecule called HLA-DO (DO; H2-O in mice) that modulates the presentation of antigens in the endocytic pathway (4). Recently, it was shown that transfection of DO in class II transactivator (CIITA)<sup>+</sup> cells caused the accumulation of classical class II molecules associated with CLIP (5, 6). These results clearly showed the inhibitory role of DO on class II-restricted antigen presentation.

The precise molecular mechanism by which DO inhibits the catalytic activity of DM remains to be clarified. DO is found mostly in endosomes but is retained in the ER of DM<sup>-</sup> cells. Interestingly, DO-bound DM is not sequestered there but rather allows the complex to egress from the ER (7). Trafficking of DO/DM to and inside the endocytic pathway is regulated by sorting signals located in the cytoplasmic tails of both molecules (8, 9). The need for DO to access peptide-loading compartments and to modify the subcellular sorting of DM suggests an elaborate modulator role on the antigen-processing rather than a unique inhibitory function (10–

13). More recently, it was proposed that the capacity of H2-O to affect, positively or negatively, the presentation of antigens depends on the particular B cell receptor–antigen combination (14).

The mechanism by which DO is retained in the ER and how DM allows for efficient ER egress remains unknown. DO lacks ER-retention motifs such as the cytoplasmic di-basic sequences (15). Pulse-chase and immunoprecipitation experiments revealed that DO $\alpha$ - and  $\beta$ -chains associate early after biosynthesis. However, in the absence of DM, DO $\alpha$ - and  $\beta$ -chains do not show carbohydrate modifications to suggest a passage through the Golgi (7). To gain insights into the role of DM in ER release, we sought to delineate the DM binding site on DO and to characterize the defect in the assembly of DO $\alpha$ - and  $\beta$ -chains.

## Materials and Methods

**Plasmids and Mutagenesis.** pBSDO $\alpha$ .9, pBSDO $\beta$ , pBudCE4-A, pBudDO $\alpha\beta$ , RSV.5gptDN1, RSV.3DR $\beta$ 008, and pBudDM are described in refs. 8 and 16. pBudDR $\beta$  is the BamHI fragment of RSV.3DR $\beta$ 008 in pBudCE4-A. pREP4CIITA and pCDNA3CIITA cDNAs were obtained from J. Ting (University of North Carolina, Chapel Hill). pBudDO $\alpha$  is the BamHI fragment of pBSDO $\alpha$ .9 into the BglII site of pBudCE4-A. pBudDO $\beta$  is the BamHI fragment from pBSDO $\beta$  into BglII site of pBudCE4-A. The pBudDMY was generated by PCR to modify the cytoplasmic 226-YTPL motif (8). A frameshift past this motif resulted in a longer cytoplasmic tail (226-ATPLLGPIIQKDGTFPRGRIP-AARGIH).

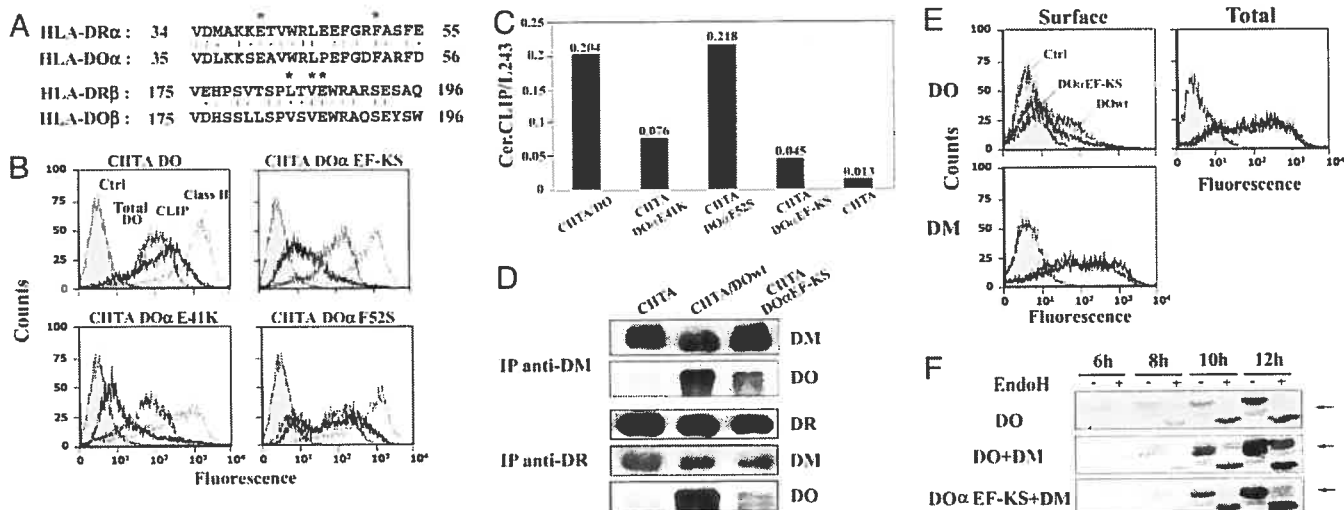
A DR $\alpha$ /DO $\alpha$  chimeric cDNA (cDO $\alpha$ ) was made by PCR using the DR $\alpha$  cDNA cloned in the BamHI site of pBlueScript (Stratagene) and RSV.5gptDN1 as templates. The SalI–PvuII fragment encompassing the junction was cloned in RSV.5gptDN1. A 2-kbp BamHI fragment was cloned into the BglII site of pBudDR $\beta$  to generate pBudDR $\beta$ /DO $\alpha$  + DR $\beta$ . For pBudDR $\beta$ <sub>42</sub>/DO $\alpha$  + DR $\beta$ , pBudDR $\beta$ <sub>63</sub>/DO $\alpha$  + DR $\beta$ , pBudDR $\beta$ <sub>77</sub>/DO $\alpha$  + DR $\beta$ , and pBudDR $\beta$ <sub>84</sub>/DO $\alpha$ , pBSDO $\alpha$ .9 and pBSDR $\alpha$  were used as templates. The NotI–BstEII fragment including the junction was cloned into pBudDR $\beta$ /DO $\alpha$  + DR $\beta$ . The DO $\alpha$  mutations were created by using pBSDO $\alpha$ .9. PCR products were digested with SalI–PvuII and cloned in pBudDO $\alpha\beta$  (pBudDO $\alpha$ P11V/ $\beta$ w $\beta$ t, pBudDO $\alpha$  $\Delta$ P11/ $\beta$ w $\beta$ t, and pBudDO $\alpha$ A12N/ $\beta$ w $\beta$ t). For other DO $\alpha$  mutations (E41K, F52S, and  $\alpha$ EF-KS), a 450-bp SalI–BstEII PCR fragment was simultaneously cloned with a BstEII–XbaI fragment, digested from pBSDO $\alpha$ .9, into the SalI–XbaI sites of pBudCE4-A (pBudDO $\alpha$ E41K, pBudDO $\alpha$ F52S, and pBudDO $\alpha$ EF-KS). A pBSDO $\beta$  BamHI fragment was cloned in

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; Ii, invariant chain; CLIP, class II-associated Ii peptide; CIITA, class II transactivator; cDO, chimeric DO.

<sup>†</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: [REDACTED]

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA



**Fig. 2.** Mutation of residue DO $\alpha$ E41 affects the interaction with DM. (A) Homology between DR and DO in the regions important for DR-DM association (25). Residues interacting with DM are denoted with asterisks. (B) HeLa cells were stably transfected with CIITA together with DO or DO mutants and purified with magnetic beads coated with L243. Cells were later analyzed after surface staining for DR (L243; gray line) or CLIP (CerCLIP.1; bold line) or after intracellular staining for DO (HKC5; thin line). Control represents untransfected HeLa cells stained with L243 (filled histogram). (C) Transfected HeLa cells were analyzed as above for class II and CLIP cell-surface expression. The histogram shows the ratios of the mean fluorescence values. (D) DM or DR were immunoprecipitated in CHAPS from stably transfected HeLa CIITA cells expressing DO (DOwt) or the DO $\alpha$ EF-KS mutant. Coprecipitating material was analyzed on immunoblots by using Abs for DM $\beta$ , DO $\alpha$ , or DR $\beta$ . As a control, HeLa cells transfected with CIITA alone were used. (E) 293T cells were transiently transfected with DO $\alpha$ EF-KS (bold line) or wild-type DO (thin line) along with DM lacking its cytoplasmic tyrosine sorting motif (DMY). Surface expression of DO was monitored by using Mags.DO5 Ab (Upper Left). Cells were permeabilized and total expression of DO was assessed by using HKC5 (Upper Right). Control cells were incubated with the secondary Ab alone (filled histogram). Cells were also stained for surface DM by using Map.DM1 (Lower). (F) 293T cells were transfected with DO, DO + DM, or DO $\alpha$ EF-KS + DM and lysed 6, 8, 10, or 12 h posttransfection. Half of each sample was treated with EndoH and analyzed on immunoblots by using a DO $\alpha$ -specific rabbit antiserum. Arrows indicate the position of glycosylated DO $\alpha$ .

was determined by flow cytometry. Although CIITA alone slightly up-regulated DO expression, the level of CLIP remained low (22). The ratio of class II-CLIP (CerCLIP.1) to DR (L243) shows that cotransfection of DO strongly inhibits peptide loading (Fig. 2B and C). In contrast, the double mutant DO $\alpha$ EF-KS no longer inhibits DM function because only low levels of class II-CLIP were generated (Fig. 2B and C). Staining of permeabilized cells revealed that the observed difference was not due to DO expression levels (Fig. 2B). Next, we found that DO $\alpha$ 41 alone is critical for DM inhibition, whereas mutation of  $\alpha$ 52 had no effect (Fig. 2B and C). The fact that the conserved glutamate is involved in the binding of DM for both DO and DR suggests possible models for the inhibition of antigen processing by DO (see Discussion). However, the lack of involvement of  $\alpha$ 52F indicates that DO interacts with DM through a region that is not completely analogous to the one described for DR (26). Moreover, point mutations  $\beta$ V184H or  $\beta$ E187A did not affect the function of DO (data not shown).

Despite comparable levels of DO and DM expression (Fig. 2B and data not shown), immunoprecipitations showed that DM interacts less efficiently with DO $\alpha$ EF-KS than with wild-type DO (Fig. 2D). However, the DM/DO $\alpha$ EF-KS interaction was not totally abolished, perhaps explaining the low level of class II-CLIP at the surface of these cells (Fig. 2B and C). Trimolecular DO-DM-DR complexes can be precipitated from B cell lysates as well as from isolated MHC class II compartments (10, 27). DR was immunoprecipitated from the stable transfectants described above and the level of associated DM/DO complexes was determined by Western blotting (Fig. 2D). Results show that both DO and DM are coprecipitated with DR but that the  $\alpha$ E41K mutation reduced the amount of DO in the complex.

We confirmed the weak DO $\alpha$ E41K-DM interaction by using transient transfections. We took advantage of the fact that a DM molecule devoid of its cytoplasmic YTPL motif (DMY) is expressed at the cell surface (28, 29) and drags DO to the plasma

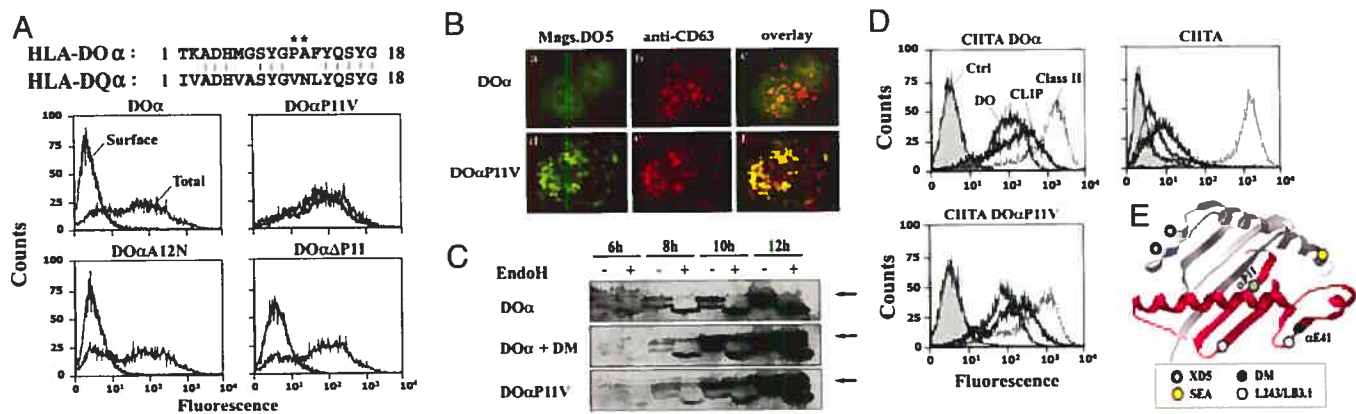
membrane (Fig. 2E). As expected from the immunoprecipitation data, the DO $\alpha$ EF-KS mutant was expressed at lower levels on the cell surface than wild-type DO. Overall, DO levels were comparable as assessed by staining of permeabilized cells with a mAb specific for the cytoplasmic tail of DO $\beta$  (HKC5; Fig. 2E Upper Right). Because DO $\alpha$  and DO $\beta$  are encoded on the same plasmid, DO $\alpha$  levels were also identical. Finally, the low surface expression of DO $\alpha$ EF-KS could not be attributed to lower DM expression (Fig. 2E Lower).

To measure DO egress from the ER, we transfected DO and tested for the acquisition of complex carbohydrates over time. In cells expressing DO only, the  $\beta$  chain remained sensitive to EndoH even 12 h posttransfection (Fig. 2F). This finding confirms that DO does not transit through the Golgi in the absence of DM. However, a substantial proportion of the DO pool had acquired EndoH resistance as early as 8 h posttransfection in the presence of DM. On the other hand, DO $\alpha$ EF-KS showed little EndoH resistance at 12 h, confirming its reduced capacity to assemble with DM in the ER.

**DM Binds Other Regions of DO $\alpha$ .** To further characterize the DM-binding region, we generated a series of chimeric DR $\alpha$ /DO molecules. We reasoned that a stepwise increase in the content of DR $\alpha$  should, at some point, abrogate the capacity of DM to interact in the ER and sequester the chimeric molecules in endosomes (Fig. 1). Four more chimeric  $\alpha$ -chains were generated to cover most of the  $\alpha$ 1 domain. Assuming a classical class II-like structure, the DR $\alpha$ 40/DO covers two  $\beta$ -strands of the groove floor and most of the two exposed external loops. The DR $\alpha$ 63/DO molecule includes DR residues up to about half of the  $\alpha$ -helix lining the putative groove. The DR portion in DR $\alpha$ 77/DO covers almost the entire  $\alpha$ -helix (30).

To assess the interaction with DM, the chimeric molecules were transiently transfected into 293T cells together with DR $\beta$  and with





**Fig. 5.** Mutation of DO $\alpha$ P11 abrogates DM-dependency for ER egress. (A) Alignment between the DO $\alpha$  and DQ $\alpha$  N-terminal regions. Mutated residues on DO are denoted with asterisks. 293T cells were transfected transiently with DO $\alpha$  $\beta$ -chains (DO) or mutated versions of DO $\alpha$  (DO $\alpha$ P11V, DO $\alpha$  $\Delta$ P, or DO $\alpha$ A12N) along with DO $\beta$  chain. Cells were stained for surface expression of DO with Mags.DO (bold line) or permeabilized and stained with HKC5 (total; thin line). (B) Fluorescence microscopy on permeabilized HEK 293T cells expressing DO (a–c) or DO $\alpha$ P11V mutant (d–f). (C) 293T cells were transfected with DO, DO + DM, or DO $\alpha$ P11V and analyzed as in Fig. 2F. (D) HeLa cells were stably transfected with CIITA alone or together with DO or DO $\alpha$ P11V + DO $\beta$  and purified with magnetic beads coated with L243. Cells were subsequently analyzed by flow cytometry after surface staining for DR (L243; gray line) and CLIP (CerCLIP.1; bold line) and after intracellular staining for DO (HKC5; thin line). Control cells represent untransfected HeLa cells stained with L243 (filled histogram). (E) Generic class II structure showing the probable location of key DO residues.

line with our statement made above that DO interacts with DM through a region that is not akin to the interface on DR.

Although the lack of competition between XD5 and DM suggests that the latter does not significantly contact the  $\beta$ 1 chain, we confirmed this by analyzing the binding of the superantigen SEA to DR $\alpha$ 63/DO + DR $\beta$ . SEA binds through coordination of a zinc ion with DR $\beta$ H81 (23), and our results show that its interaction with the chimeric molecule was as effective in the presence or absence of DMY (Fig. 4A). Collectively, these competition experiments with class II ligands confirm that DM binds to DO $\alpha$ .

**A Mutation in the Groove of DO Restores ER Egress.** Next, we addressed the functional importance of the newly identified DM binding site for the maturation of DO. The inability of classical class II molecules to leave the ER has been previously reported in the context of mismatched  $\alpha\beta$  pairs between various isotypes or haplotypes. In some cases, surface expression was restored after site-directed mutagenesis or by the construction of chimeric molecules, often implicating regions close to the N terminus of either the  $\alpha$  or  $\beta$  chain (34–36). Thus, we postulated that the DO $\alpha\beta$  interaction was suboptimal and that the binding of DM may stabilize the DO heterodimer. Indeed, introducing the first 18 aa of DR into DO allows the formation of mixed DR/DO pairs (Fig. 1). A sequence alignment of DR, DO, and DQ revealed the presence of an amino acid insertion in both DQ $\alpha$  and DO $\alpha$ . This extra Gly residue ( $\alpha$ G10) was numbered 9a in I-A (the mouse equivalent of DQ), and the crystal structure revealed that it protrudes in a  $\beta$  bulge conformation outward from the floor of the class II peptide binding groove (37). This bulge maintains the respective arrangement, seen in other class II, of the conserved  $\alpha\beta$  residues involved in interchain contacts. However, in DO $\alpha$ , this glycine is next to a proline ( $\alpha$ P11) that we thought might disrupt the  $\beta$ -sheet and prevent the glycine from bulging (Fig. 5A). This finding is especially interesting given the fact that this proline is close to the  $\alpha$  chain loops supporting DM interactions.

We investigated the importance of this region in DO $\alpha$  by generating a series of mutants ( $\alpha\Delta$ P11,  $\alpha$ P11V,  $\alpha$ A12N,  $\alpha$ Y9Q, and  $\alpha\Delta$ P11/A12E). After transfection of these DO $\alpha$ -chains together with DO $\beta$ , the transport and subsequent cell-surface expression of DO in the absence of DM was assessed by staining with a DO-specific mAb. Remarkably, DO $\alpha$ P11V + DO $\beta$  was efficiently expressed at the cell surface in the absence of DM (Fig. 5A). Surface

expression of this DO mutant was also observed in stably transfected HeLa cells (data not shown). None of the other mutations that were introduced in this region ( $\alpha\Delta$ P11,  $\alpha$ A12N,  $\alpha$ Y9Q,  $\alpha$ P11/A12E, and  $\beta$ I9Y/A11F) restored surface DO expression in the absence of DM (Fig. 5A and data not shown).

The strong surface expression of DO $\alpha$ P11V suggested that ER egress was highly efficient. DO contains a functional dileucine motif in its  $\beta$  chain cytoplasmic tail (8). This sorting signal should allow DO $\alpha$ P11V to gain access to endosomes, probably after endocytosis. Transfected cells were permeabilized, stained for DO, and analyzed by fluorescence microscopy. The presence of scattered vesicles colocalizing with the endocytic marker CD63 (Fig. 5B) further confirms the overall integrity of DO $\alpha$ P11V mutant and its intrinsic capacity to transport and accumulate in the absence of DM.

To compare the kinetics of maturation between DO $\alpha$ P11V and DO/DM, the acquisition of EndoH resistance by the  $\alpha$ -chains was analyzed at various time points after transfection (Fig. 5C). DO was retained in the ER in the absence of DM and, therefore, did not acquire complex sugars. However, the same analysis showed the emergence of EndoH-resistant forms of DO $\alpha$ P11V as early as 8 h posttransfection. Importantly, the kinetic of EndoH resistance was similar for DO molecules coexpressed with DM. Altogether, these results suggest that mutation of the proline to a valine at residue  $\alpha$ P11 allows ER egress by correcting a conformation defect in DO.

Finally, we tested the ability of DO $\alpha$ P11V to inhibit CLIP release from classical class II molecules. HeLa CIITA cells were transfected with either DO $\alpha$ P11V or wild-type DO. After selection, the levels of cell-surface class II-CLIP were measured by flow cytometry (Fig. 5D). The results show that both mutant and wild-type DO are functional in terms of their ability to inhibit DM and peptide loading.

### Discussion

The regulation of antigen processing and peptide binding to classical class II molecules is a complex process that varies depending on the type of APC or the receptors used for antigen internalization. In B cells, DM is the target of regulatory control through the expression of DO. Although the role and mechanism of action of DM are well characterized, the need for DM modulation in B cells is not well understood.

The crystal structure of DR-DM complexes remains unknown, but models for the mechanism of peptide exchange has been

# The MHC class II $\beta$ chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal

Hayssam Khalil<sup>1</sup>, Alexandre Brunet<sup>1</sup>, Ingrid Saba<sup>1</sup>, Rafik Terra<sup>1</sup>,  
Rafick Pierre Sékaly<sup>2–4</sup> and Jacques Thibodeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Immunologie Moléculaire and <sup>2</sup>Laboratoire d'Immunologie, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada  
<sup>3</sup>Department of Experimental Medicine, McGill School of Medicine, Montréal H3G 1A4, Canada  
<sup>4</sup>Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Hôtel-Dieu, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal H2W 1T8, Canada

Keywords: antigen presentation, di-arginine, HLA

## Abstract

The human-specific p35 isoform of the invariant chain (Ii) contains an endoplasmic reticulum (ER) retention motif that is inactivated upon cleavage. To investigate the role of Ii cytoplasmic tails in the transport of class II molecules to the cell surface, we generated a series of class II molecules with truncated cytoplasmic tails. As shown by flow cytometry, the expression of these truncated class II molecules was prevented on the cell surface. These truncated class II molecules and lip35, a calnexin, as determined by confocal microscopy, were retained in the ER. Treatment with lip35 confirmed that these molecules do not escape the ER. Further characterization revealed that DP and DQ isotypes can also overcome the ER retention signal. These results suggest that class II molecules further dissect the masking of di-basic retention signals, and emphasize the interplay between class II molecules and Ii for the transport of the complex to the endocytic pathway.

## Introduction

MHC class II molecules are cell-surface heterodimeric glycoproteins which present antigenic peptides to CD4<sup>+</sup> T cells. HLA-DR, -DP and -DQ represent co-dominantly expressed isotypes each composed of polymorphic  $\alpha$  (~35 kDa) and  $\beta$  (~27 kDa) transmembrane (TM) polypeptides (1). Following their synthesis, the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits associate in the endoplasmic reticulum (ER) together with pre-formed trimers of the invariant chain (Ii) to produce  $(\alpha\beta Ii)_3$  nonamers (2–4). Ii is a non-polymorphic type II protein that folds in part through the groove of the class II molecule, stabilizing the  $\alpha\beta$  heterodimer and preventing the undesirable binding of ER polypeptides (5–8). Another function of Ii is to direct MHC

class II molecules to the endocytic antigen-loading compartments. Two short leucine-based signals located in the cytoplasmic tail of Ii are responsible for sorting the complex to the endocytic pathway: the membrane-distal sorting signal (Leu-Ile residues at positions 7 and 8) and the membrane-proximal signal (Met-Leu residues at positions 16 and 17). Either signal is sufficient for endosomal localization of Ii (9,10). Such leucine-based signals were first identified in the CD3  $\gamma$  chain and the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor (11,12). When these endosomal localization signals are obliterated, Ii is found mostly at the cell surface and has a much longer half-life (13–17).

Correspondence to: J. Thibodeau; E-mail: [REDACTED]

Transmitting editor: C. J. Paige

Received 8 April 2003, accepted 28 July 2003

DRUSE DRUG  
ORIGINALS JOURNAL

alum  
d to  
ains  
tle

A-  
lls  
)

H  
d  
ER  
e



# The MHC class II $\beta$ chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal

Hayssam Khalil<sup>1</sup>, Alexandre Brunet<sup>1</sup>, Ingrid Saba<sup>1</sup>, Rafik Terra<sup>1</sup>,  
Rafick Pierre Sékaly<sup>2–4</sup> and Jacques Thibodeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Immunologie Moléculaire and <sup>2</sup>Laboratoire d'Immunologie, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

<sup>3</sup>Department of Experimental Medicine, McGill School of Medicine, Montréal H3G 1A4, Canada

<sup>4</sup>Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Hôtel-Dieu, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal H2W 1T8, Canada

**Keywords:** antigen presentation, di-arginine, HLA, lip35, R-X-R

## Abstract

The human-specific p35 isoform of the invariant chain (Ii) includes an R-X-R endoplasmic reticulum (ER) retention motif that is inactivated upon HLA-DR binding. Although the masking is assumed to involve the cytoplasmic tails of class II molecules, the mechanism underlying this function remains to be investigated. Moreover, in light of the polymorphic nature of the class II cytosolic tails, little is known about the capacity of various isotypes or alleles to overcome the retention signal of lip35. To gain further insights into these issues, we first addressed the proposed role of the HLA-DR cytoplasmic tails. As shown by flow cytometry, the presence of lip35 in transfected HeLa cells prevented surface expression of HLA-DR molecules lacking their cytoplasmic tails (DR $\alpha$ TM/ $\beta$ TM). These truncated class II molecules and lip35 accumulated in the ER, and co-localized with calnexin, as determined by confocal microscopy. Sensitivity of DR $\alpha$ TM/ $\beta$ TM to endoglycosidase H treatment confirmed that these molecules do not reach the *trans*-Golgi network when associated with lip35. Further characterization revealed that the  $\beta$  chain cytosolic tail is critical for efficient ER egress of class II/lip35 complexes. Interestingly, our results clearly demonstrate for the first time that DP and DQ isotypes can also overcome the retention motif of lip35 through a mechanism involving their very distinctive polymorphic  $\beta$  chain cytoplasmic tails. Altogether, these results further dissect the masking of di-basic retention signals, and emphasize the interplay between class II molecules and Ii for the transport of the complex to the endocytic pathway.

## Introduction

MHC class II molecules are cell-surface heterodimeric glycoproteins which present antigenic peptides to CD4<sup>+</sup> T cells. HLA-DR, -DP and -DQ represent co-dominantly expressed isotypes each composed of polymorphic  $\alpha$  (~35 kDa) and  $\beta$  (~27 kDa) transmembrane (TM) polypeptides (1). Following their synthesis, the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits associate in the endoplasmic reticulum (ER) together with pre-formed trimers of the invariant chain (Ii) to produce ( $\alpha\beta$ Ii)<sub>3</sub> nonamers (2–4). Ii is a non-polymorphic type II protein that folds in part through the groove of the class II molecule, stabilizing the  $\alpha\beta$  heterodimer and preventing the undesirable binding of ER polypeptides (5–8). Another function of Ii is to direct MHC

class II molecules to the endocytic antigen-loading compartments. Two short leucine-based signals located in the cytoplasmic tail of Ii are responsible for sorting the complex to the endocytic pathway: the membrane-distal sorting signal (Leu-Ile residues at positions 7 and 8) and the membrane-proximal signal (Met-Leu residues at positions 16 and 17). Either signal is sufficient for endosomal localization of Ii (9,10). Such leucine-based signals were first identified in the CD3  $\gamma$  chain and the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor (11,12). When these endosomal localization signals are obliterated, Ii is found mostly at the cell surface and has a much longer half-life (13–17).

lip35 was also subcloned as a *KpnI*–*NotI* fragment into pREP4 (Invitrogen, San Diego, CA). Serines 6 and 8 on li were changed to lysine and histidine respectively (pRep4 lip35 S6K,S8H). The HLA-DR $\beta$  chain cDNA coding for a truncated protein (see Fig. 1A) was obtained after introducing a stop codon instead of the phenylalanine-coding triplet at position 221. This DR $\beta$ TM cDNA was cloned into the RSV.3 vector. The cDNA coding for the truncated DR $\alpha$  chain (Fig. 1A) was described previously (49). The two leucine-based sorting signals of the p35 li were mutated to alanines and cloned into the SR $\alpha$  vector (SR $\alpha$ puro lip35 LI/ML). The p33 isoform of li was generated by mutating the first start ATG triplet of li cDNA cloned into pREP4 (pREP lip33).

The cytoplasmic tail of HLA-DR $\beta$  was replaced by that of either HLA-DP $\beta$  or -DQ $\beta$ . An intermediate DR $\beta$  molecule (DR $\beta$  RN:RS) had to be constructed to facilitate cloning. This mutation creates a *XbaI* restriction site near the junction between the TM and the cytosolic region. A first fragment was amplified from pBS KS 3'DR $\beta$ 008.14 using a DR $\beta$  3' BamHI:Clal.D primer which harbors *Bam*HI and *Clal* restriction sites for latter cloning steps, and a mutagenic primer encoding the RN:RS mutation (DR $\beta$ RN:RS.BglI.c). A second reaction was made on pBS KS 3'DR $\beta$ 008.14 using a complementary fusion primer (DR $\beta$ RN:RS.BglI.b). Following the overlap reaction, the PCR product was subcloned into *StyI* and *Clal* sites of pBS KS 3'DR $\beta$ 008.14 (pBS DR $\beta$ RN:RS). The DNA sequence was confirmed by sequencing.

Prior to cloning the cytoplasmic tails of DP $\beta$  and DQ $\beta$ , pBS DR $\beta$ RN:RS was digested with *Bam*HI and cloned in the opposite orientation. Overlapping oligonucleotides corresponding to the sequence of DP or DQ cytosolic tails were cloned in pBS DR $\beta$ RN:RS.1 vector digested with *Bgl*II and *Xba*I. The oligonucleotides used were: DR $\beta$ /DP $\beta$ b (5'-CT AGA CTA TGC AGA TCC TCG TTG AAC TTT CTT A-3'), DR $\beta$ /DP $\beta$ c (5'-GA TCT AAG AAA GTT CAA CGA GGA TCT GCA TAG T-3'), DR $\beta$ /DQ $\beta$ Cyto-B401.b (5'-CT AGA CTA AT GCA GTA GAC CTT TCT GA-3') and DR $\beta$ /DQ $\beta$ Cyto-B401.c (5'-GA TCT CAG AAA GGT CTA CTG CAT TAG T-3'). The correct sequence was confirmed by sequencing. The chimeric cDNA was cloned as a *XbaI*–*HincII* fragment into the *XbaI*–*SmaI* site of SR $\alpha$ puro.

#### Cell lines and transfections

MHC class II<sup>-</sup> epithelial HeLa (ATCC CCL-2) cells were cultured in DMEM (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada) containing 10% FBS (Wisent) and appropriate selective agents (see below). HeLa cells expressing the wild-type HLA-DR molecule (DR $\alpha$ + DR $\beta$  0101) (HeLa DR) or the wild-type DR $\beta$  chain together with a truncated DR $\alpha$  chain devoid of most of its cytoplasmic tail (see Fig. 1) (HeLa DR $\alpha$ TM/DR $\beta$ ) have been described elsewhere (49). Stable transfection of the mutated class II molecules was performed by the calcium phosphate co-precipitation technique as described (50). Cells resistant to G-418 (Life Technologies) and expressing class II  $\alpha\beta$  heterodimers were sorted by flow cytometry using the L243 mAb. The li cDNAs were transfected using Fugene6 (Roche, Mississauga, Canada) and selected in 400  $\mu$ g/ml puromycin (Sigma, Oakville, Canada) or 50 U/ml hygromycin (Cederlane, Toronto, Canada).

HEK 293T cells were kindly provided by Dr Eric Cohen. For transient expression, cells were co-transfected by the calcium phosphate precipitation method using 2  $\mu$ g of each DNA (50). Cells were analyzed 2–3 days post-transfection.

#### Antibodies

L243 (IgG2a) is an anti-DR mAb which recognizes a conformational epitope on the DR $\alpha$  chain (51). XD5.117 (IgG1) recognizes a linear epitope in the  $\beta$ 1 domain of all class II molecules (52). ISCR3, a kind gift from Dr Robert Busch, recognizes the  $\alpha\beta$  heterodimer through an epitope on the DR $\alpha$  chain (53). R.lip35N, a kind gift from Dr Peter Cresswell, is a rabbit antisera specific for a synthetic peptide corresponding to amino acids 1–16 of the N-terminal extension present on the p35 isoform of li (4). BU45 (IgG1) is a mouse mAb specific for a C-terminal epitope of human li (The Binding Site, Birmingham, UK). Pin.1 mAb (3) recognizes the N-terminal cytoplasmic domain of lip33 and p35. mAb CerCLIP.1 (IgG1) is directed against the N-terminal segment of CLIP (PharMingen, San Diego, CA). The polyclonal rabbit antibody against calnexin recognizes the C-terminal part of the protein (Stressgen, Victoria, Canada). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor or phycoerythrin (PE) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR).

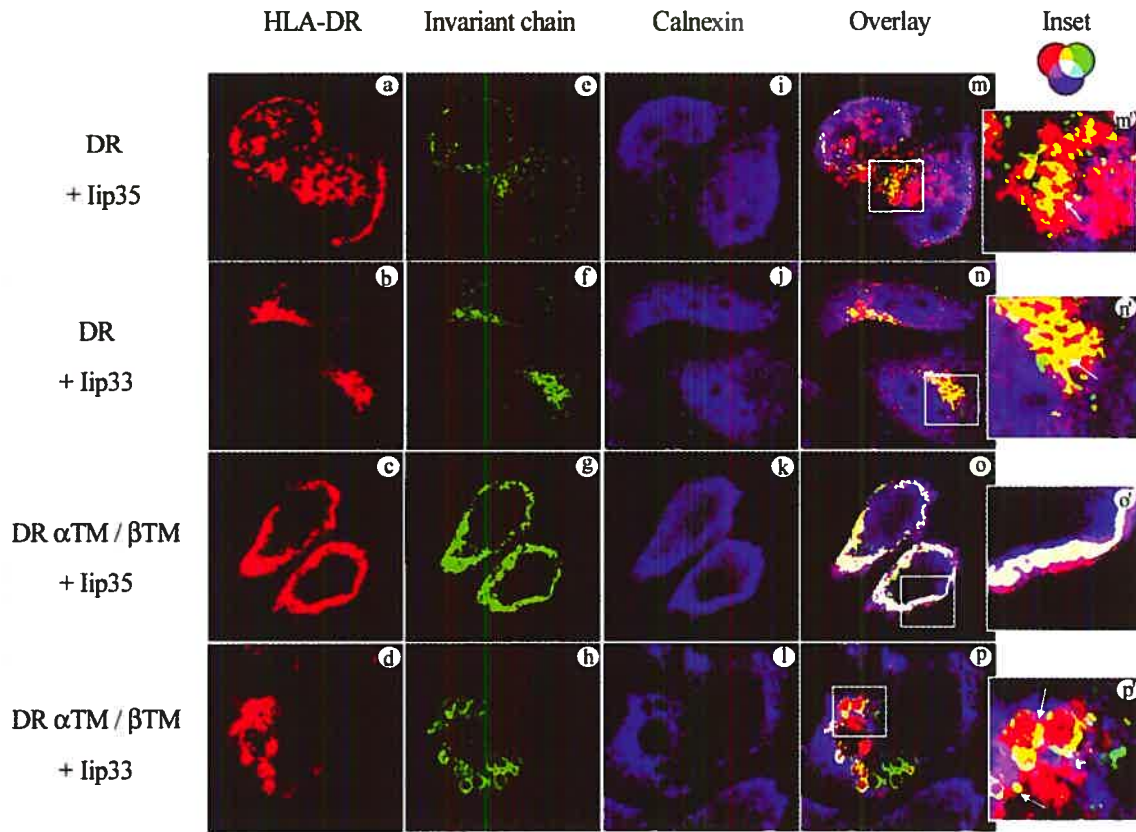
#### Flow cytometry and fluorescence microscopy

Intracellular staining for class II molecules or li was performed on saponin-permeabilized cells as previously described (50). For double stainings, cells were first stained at the surface using biotinylated L243 and avidin-PE or in some cases with ISCR3 and an IgG2b-specific antibody coupled to PE (Molecular Probes). Then, cells were washed, fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with saponin (50), and stained for li using BU45 and an IgG1-specific secondary antibody (PharMingen) coupled to FITC. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, Canada). For confocal microscopy analyses, HeLa cells were grown on coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with saponin (50) before staining. HEK 293T cells were first fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with saponin (50) before staining with Pin.1 mAb followed by a goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488. HEK 293T cells were centrifuged onto microscope slides and examined with a Leica TCS-SP1 confocal microscope using a  $\times$ 100 planapochromat objective.

#### Western blotting and immunoprecipitations

Cells were trypsinized, washed with cold PBS and sonicated in 400  $\mu$ l lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5 and 150 mM NaCl) containing protease inhibitors (Roche). Following sonication, 100  $\mu$ l of 5% Triton X-100 was added to the supernatant and incubated at 4°C for 30 min. After centrifugation, supernatants were harvested and incubated for 2 h with goat anti-mouse IgG-coated magnetic beads (BioMag; Polysciences, Warrington, PA) coupled to the appropriate antibody. Following washes in lysis buffer, samples were resuspended in reducing buffer, boiled and subjected to SDS-PAGE. After transfer to nylon membranes (Amersham Biosciences, Quebec, Canada), proteins were blotted with the appropriate





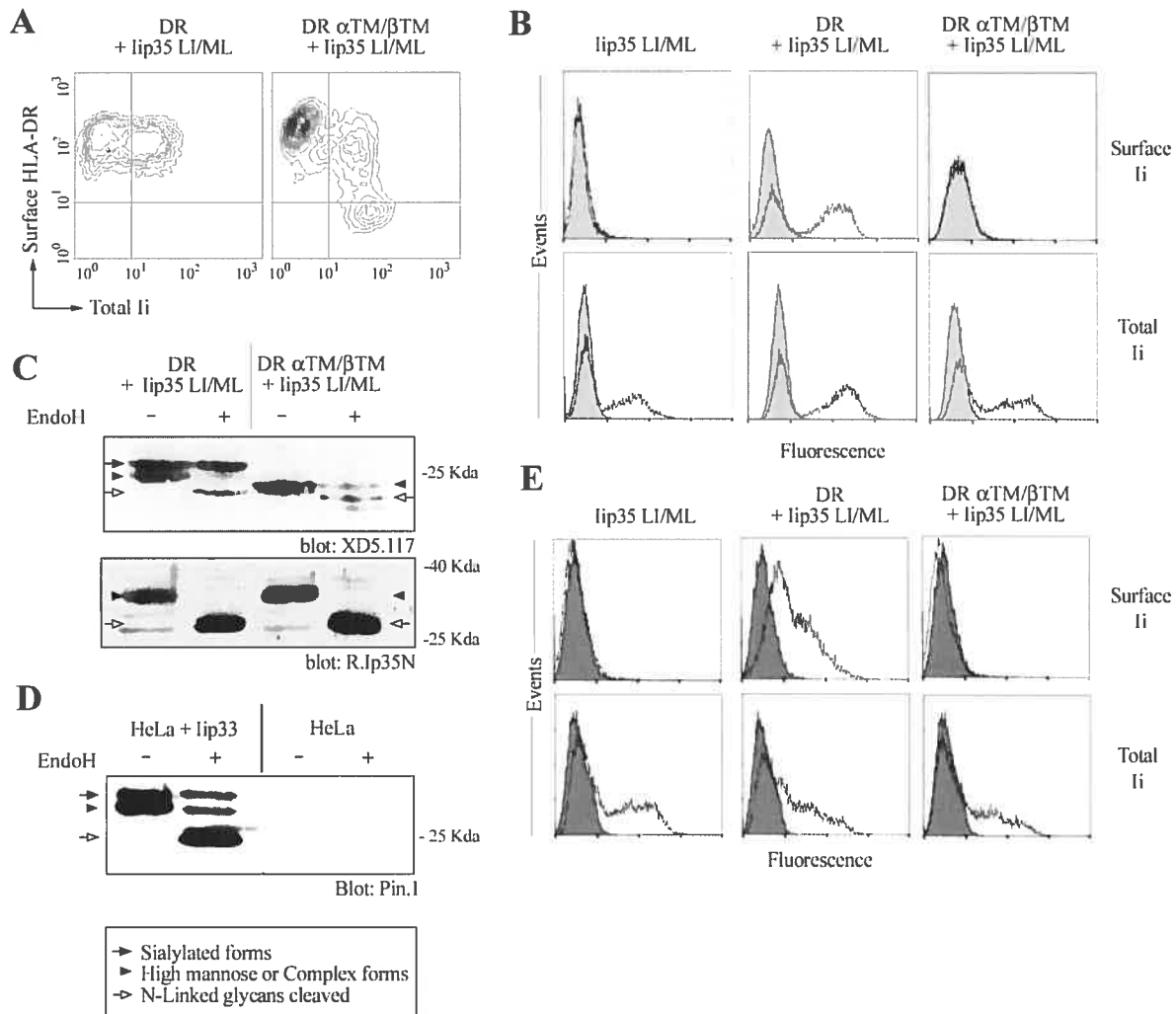
**Fig. 3.** Intracellular localization of class II molecules in the presence of lip35. Cells were grown on coverslips for 24–48 h before permeabilization and simultaneous staining for class II (ISCR3) (a–d), Ii (Pin.1) (e–h) and calnexin (i–l). The secondary antibodies used were goat anti-mouse IgG2b coupled to PE, goat anti-mouse IgG1 coupled to Alexa Fluor 488 and goat anti-rabbit coupled to Alexa Fluor 633 respectively. Cells were analyzed by confocal microscopy. Shown in (m)–(p) are overlays of class II, Ii and calnexin staining for the representative cells. White boxes indicate the areas shown at higher magnification in (m')–(p'). Co-localization of class II and Ii is seen in yellow, whereas co-localization of class II, Ii and calnexin is seen in white. The arrows indicate vesicles containing class II and Ii, but devoid of calnexin.

are internally controlled as all stably transfected populations always include a proportion of cells becoming resistant to the selective agent, but which are negative for Ii expression. This allows the direct, simultaneous and unbiased comparison of class II surface expression between the Ii<sup>+</sup> and Ii<sup>-</sup> subpopulations. Thus, in our flow cytometry analyses, any lip35-induced intracellular retention of class II molecules unable to mask the ERM would result in a specific decrease of surface HLA-DR staining for cells in the Ii<sup>+</sup> quadrants as compared to those in the Ii<sup>-</sup> quadrants.

The utility of this system for the detection of lip35-induced retention of class II molecules was tested using the control lip35 S6K,S8H molecule having the two N-terminal phosphorylated serine residues substituted for positively charged amino acids (Fig. 2A). Although the precise effect of these mutations remains to be established, it is clear that these serine residues are critical for the Ii delivery to the endocytic pathway (34,39,40). Indeed, a sharp decrease in class II expression was observed at the surface of Ii<sup>+</sup> cells (Fig. 2A). This intracellular retention by the S6K,S8H mutant confirms the DR/lip35 interaction and validates our experimental system for monitoring the masking of the ERM.

We then assessed the role of the HLA-DR cytoplasmic tails on the ER egress of lip35. HeLa cells expressing both truncated HLA-DR  $\alpha$  and  $\beta$  chains (DR $\alpha$ TM/ $\beta$ TM, Fig. 1A and B) were stably transfected with lip35. Cell-surface expression of class II molecules was monitored by flow cytometry as above. Figure 2(A) demonstrates that those cells expressing lip35 have less surface class II molecules as compared to Ii<sup>-</sup> cells and that the decrease appears proportional to the level of Ii expression. However, this reduction in class II surface expression was not observed when co-expressed with lip33 (Fig. 2A). The lip35-induced down-modulation of truncated HLA-DR expression was confirmed using different class II-specific antibodies (Fig. 2B and data not shown). Importantly, we ruled out the trivial possibility that Ii-expressing cells selectively lost one or both of the  $\alpha$ TM/ $\beta$ TM chains, precluding cell-surface expression. Figure 2(C) shows that despite heterogeneous staining for surface class II molecules, the Ii-transfected total population of DR $\alpha$ TM/ $\beta$ TM cells expresses homogeneous levels of total class II molecules.

Due to the lack of HLA-DM in these transfectants, CLIP is not removed from the class II molecules. Therefore, the presence of CLIP at the cell surface reflects the efficient DR/Ii interaction



**Fig. 5.** lip35 LI/ML is not expressed at the cell surface in the presence of DR $\alpha$ TM/ $\beta$ TM. (A) HeLa cells expressing homogenous levels of class II molecules were stably transfected with the SR $\alpha$ puro lip35 LI/ML cDNA. Expression of surface class II molecules and li was monitored as in Fig. 2. (B) HeLa cells were stably transfected with the indicated molecules and analyzed by flow cytometry using BU45 either before (upper panel) or after permeabilization with saponin (lower panel). (C) Cells were sorted positively (DR1) using CerClip.1 or negatively (DR $\alpha$ TM/ $\beta$ TM) using L243 to obtain a homogenous expression of li (data not shown). After lysis in 1% Triton X-100, the DR $\beta$  chain was analyzed by Western blotting as in Fig. 4 using mAb XD5.117 or the lip35-specific rabbit antiserum (R.Ip35N) which recognizes the LI/ML li mutant. The R.Ip35N antibody was used for this experiment instead of Pin.1 because the latter mAb would not recognize the LI/ML li mutant. (D) HeLa cells were stably transfected with pREP4 lip33 or a mock pREP4 vector. Cell lysates were treated or not with Endo H and analyzed by Western blotting using Pin.1. (E) 293T cells were stably transfected with the indicated molecules and analyzed by flow cytometry using BU45 either before (upper panel) or after permeabilization with saponin (lower panel).

analyzed by flow cytometry as above. The level of DR $\alpha$ TM/ $\beta$ TM at the cell surface sharply decreases upon co-expression of lip35 ERM (Fig. 5B). Accordingly, in these cells, the DR $\beta$ TM chain did not acquire Endo H-resistant sialylated sugars (Fig. 5C, upper panel). Our biochemical analysis presented above failed to detect Endo H-resistant sugars on lip35 in DR $^+$  cells (Fig. 4C). One possibility to explain this result is that lip35 is degraded rapidly after leaving the Golgi and gaining access to the endosomes. We took advantage of the fact that lip35 LI/ML accumulates at the cell surface of DR $^+$  cells to further characterize the nature of its glycans. Nonetheless, we could not detect Endo H-resistant forms of li in DR $^+$  cells (Fig. 5C, lower panel), suggesting that upon association with class II molecules in the

cytoplasmic tails of HLA-DR are required to overcome the lip35 ERM (Fig. 5B). Accordingly, in these cells, the DR $\beta$ TM chain did not acquire Endo H-resistant sialylated sugars (Fig. 5C, upper panel).

Our biochemical analysis presented above failed to detect Endo H-resistant sugars on lip35 in DR $^+$  cells (Fig. 4C). One possibility to explain this result is that lip35 is degraded rapidly after leaving the Golgi and gaining access to the endosomes. We took advantage of the fact that lip35 LI/ML accumulates at the cell surface of DR $^+$  cells to further characterize the nature of its glycans. Nonetheless, we could not detect Endo H-resistant forms of li in DR $^+$  cells (Fig. 5C, lower panel), suggesting that upon association with class II molecules in the

Schaiff *et al.* have shown that only one of the two *N*-linked carbohydrates on HLA-DR $\alpha$  is processed to complex-type oligosaccharides in the presence of Ii, whereas both are processed in Ii<sup>-</sup> transfectants (60). Taken together these results demonstrate the reciprocal impact of MHC class II molecules and Ii, especially p35, on their maturation.

#### HLA-DR $\beta$ cytosolic tail is responsible for masking the lip35 ERM

In order to determine which cytoplasmic tail of the HLA-DR heterodimer is involved in the ER egress of lip35, mixed pairs containing either a truncated  $\alpha$  or  $\beta$  chain were expressed in HeLa cells (see Fig. 1A and B). Cell-surface expression of these truncated molecules in HeLa cells confirmed their proper folding and membrane anchoring (Fig. 1B). As shown in Fig. 6(A), the expression profile of DR $\alpha$ TM/ $\beta$  in the presence of lip35 was similar to the one observed for Ii<sup>-</sup> cells. On the other hand, we observed a markedly decreased cell-surface expression of DR $\alpha$ / $\beta$ TM in Ii<sup>+</sup> cells. These results suggest that the DR $\beta$  chain is required to overcome the Ii ERM.

The critical role of the  $\beta$  chain in masking the Ii ERM was validated by looking at the maturation of class II and lip35 glycans. Figure 6(B) shows that a significant proportion of the Ii-associated DR $\alpha$ TM/ $\beta$  class II molecules became Endo H-resistant. Coupled to the near complete absence of complex sugars on DR $\alpha$ / $\beta$ TM molecules, these results further support the fact that the  $\beta$  chain cytoplasmic tail masks the lip35 ERM.

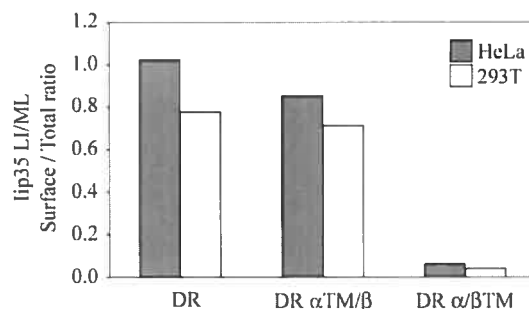
The intracellular localization of the truncated molecules was analyzed by confocal microscopy. In DR $\alpha$ TM/ $\beta$  cells, class II molecules co-localized with lip35 or lip33 in small endosomal/lysosomal vesicles (Fig. 6C). On the other hand, when the  $\beta$  chain cytoplasmic tail is truncated, DR $\alpha$ / $\beta$ TM and lip35 molecules co-localized with the ER marker calnexin and no punctuated, scattered vesicles could be observed (Fig. 6C, o'). This pattern contrasts with the vesicular co-localization observed between the  $\beta$ -truncated class II molecule and control lip33 (Fig. 6C, p').

Finally, to decisively demonstrate that only the DR $\beta$  cytoplasmic tail can mask the R-X-R motif, we tested the ability of truncated  $\alpha\beta$  combinations to support cell-surface expression of lip35 LI/ML. DR and lip35 molecules were co-expressed stably in HeLa cells or transiently in HEK 293T cells. As predicted from the above-described experiments using lip35, we observed the surface expression of lip35 LI/ML on cells transfected with DR or DR $\alpha$ TM/ $\beta$  but not on those expressing DR $\alpha$ / $\beta$ TM (Fig. 7). These results conclusively pinpoint the DR $\beta$  cytosolic tail as the key element needed to overcome the lip35 ERM.

#### All class II isotypes mask the lip35 di-arginine motif

In humans, the family of classical MHC class II molecules comprises three isotypes called HLA-DR, -DP and -DQ. Overall, the crystal structures of the extracellular domains of DR and DQ are very much alike (61), and DP is likely to adopt a similar quaternary structure (62). Isotypic polymorphisms are found in all regions of the proteins including the cytoplasmic portions of both the  $\alpha$  and  $\beta$  chains (63). Interestingly, allelic polymorphisms in DQ $\beta$  allotypes have been described, and some arise from the differential splicing of exon 5 in DQB1\*06011 and DQB1\*05031. Thus, in addition to variations in their own primary structure, most DQ molecules are 8 and 2 amino acids shorter than DR and DP respectively. This significant polymorphism prompted us to test the capacity of each isotype to mask the R-X-R motif of lip35.

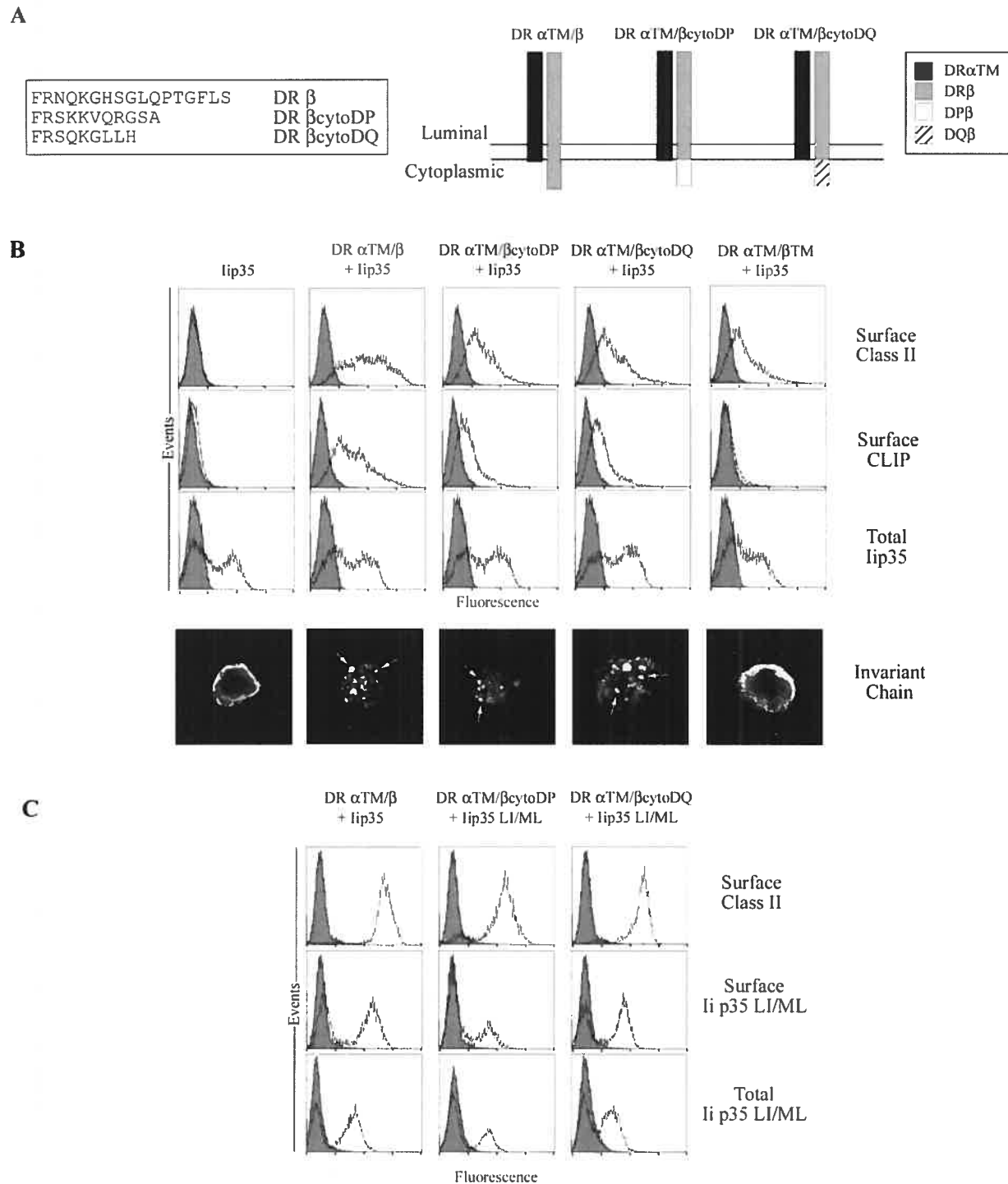
Having demonstrated the utility of screening for cell-surface expression of lip35 LI/ML (Figs 5 and 7), we turned to transient transfections to rapidly assess the capacity of any class II molecule or mutant to mask the R-X-R motif. Moreover, we used human HEK 293T cells to circumvent our repeated inability to generate stable HeLa cells expressing HLA-DQ. All three isotypes, in addition to the DR $\alpha$ / $\beta$ TM molecule, were efficiently expressed after 48 h (see legend, Fig. 8A). As described above, class II molecules lacking the  $\beta$  chain cytoplasmic tail could not support the maturation and sorting



**Fig. 7.** lip35 LI/ML is not expressed at the cell surface in the presence of DR $\alpha$ / $\beta$ TM. HeLa cells expressing class II molecules were stably transfected with pREP4 lip35 LI/ML. HEK 293T cells were transiently co-transfected with the indicated DR molecules and with pREP4 lip35 LI/ML, and tested after 48 h. Cells were analyzed by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface:total Ii ratios are shown. The XD5.117 mean fluorescent values (MFV) for DR, DR  $\alpha$ TM/ $\beta$ , DR  $\alpha$ / $\beta$ TM expression were 411, 331, 109 in HeLa cells, and 298, 229, 290 in HEK 293T cells respectively. The MFV for the secondary antibody alone was 4 (data not shown).

**Fig. 6.** The DR $\beta$  chain cytoplasmic tail is required to overcome the lip35 ER retention motif. (A) HeLa cells expressing truncated class II molecules were stably transfected with pREP4 lip35 and double stained as in Fig. 2(A). Independent transfections using SR $\alpha$ puro lip35 gave similar results (data not shown). (B) Unsorted populations shown in (A) were used. The Ii was immunoprecipitated from cell lysates using BU45. The samples were treated or not with Endo H and analyzed by Western blotting using the HLA-DR $\beta$ -specific mAb (XD5.117). Black arrows depict proteins containing Endo H-resistant sialic acid. A filled arrowhead indicates molecules that have acquired high mannose or complex type oligosaccharides and an open arrow indicates Endo H-sensitive species. (C) Cells were grown on coverslips for 24–48 h before permeabilization and simultaneous staining for class II (ISCR3) (a–d), Ii (Pin.1) (c–h) and calnexin (i–l). The secondary antibodies used were as in Fig. 3. Cells were analyzed by confocal microscopy. Shown in (m)–(p) are overlays of class II, Ii and calnexin staining for the representative cells. White boxes indicates the areas shown at higher magnification in (m')–(p'). Co-localization of class II and Ii is seen in yellow, whereas co-localization of class II, Ii and calnexin is seen in white. The arrows point to vesicles containing class II and Ii but devoid of calnexin.





**Fig. 9.** The DP $\beta$  and DQ $\beta$  chain cytoplasmic tails are sufficient to overcome lip35 ER retention motif. (A) Schematic representation of the chimeric class II  $\alpha$  and  $\beta$  chain combinations expressed in HeLa cells. The C-terminal amino acid sequence of the recombinant DR $\beta$  chains is shown. (B) HEK 293T cells transfected with pBUD lip35 and either a mock vector or a combination of chimeric chains, as indicated. Cells were analyzed by flow cytometry for either surface class II (XD5.117) or CLIP (CerCLIP.1). A fraction of the transfected cells was also permeabilized with saponin and stained with BU45. Total li expression was monitored by flow cytometry and the subcellular localization of li was analyzed by confocal microscopy. (C) HeLa cells stably expressing combinations of chimeric DR chains were transfected with pREP4 lip35 LI/ML and analyzed by flow cytometry for the surface expression of class II molecules (XD5.117) or li (BU45). Cells were also permeabilized with saponin and stained for li using BU45 (total lip35 LI/ML). Filled histograms represent the background obtained using the secondary antibody alone.