

2 n 11, 3399,7

Université de Montréal

**Ubiquitination et ciblage des molécules du complexe
majeur d'histocompatibilité de classe-II aux
exosomes**

par

Marie-Elaine Gauvreau

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Magister Scientiae (M.Sc.)
en Microbiologie et Immunologie

19 mai 2006

© Marie-Elaine Gauvreau, 2006



W

4

U58

2006

V-100

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

Ce mémoire intitulé :

Ubiquitination et ciblage des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de
classe II aux exosomes

présenté par :

Marie-Elaine Gauvreau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hugo Soudeyns, président-rapporteur
Dr Jacques Thibodeau, directeur de recherche
Dr Michel Desjardins, membre du jury

Résumé

Le système immunitaire est supporté par plusieurs types de cellules spécialisées. Les cellules présentatrices d'antigènes favorisent, par leur activation, l'élimination des pathogènes extra- et intracellulaires. La présentation de peptides antigéniques exogènes est principalement assurée par le CMH de classe-II. Le chargement de l'antigène dans la niche peptidique des molécules du CMH s'effectue dans les compartiments de la voie endosomiale. Certains de ces compartiments possèdent des caractéristiques particulières afin de favoriser les interactions entre les différentes protéines impliquées dans la présentation antigénique. Les MIICs en maturation peuvent contenir des vésicules luminales dans lesquelles HLA-DR et HLA-DM interagissent. HLA-DM peut alors catalyser l'échange peptidique contenu dans la niche peptidique de HLA-DR.

Les compartiments contenant des microvésicules sont nommés MVBs. Ces derniers, sous certaines conditions, peuvent fusionner avec la membrane plasmique et relâcher leur contenu dans le milieu externe. Les vésicules seront alors appelées exosomes. Comme les exosomes sont générés dans les MVBs et que ces derniers contiennent beaucoup de HLA-DR, il est possible de détecter du DR à la surface des exosomes. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la façon dont les protéines sont intégrées dans ces membranes vésiculaires. La présence de radeaux lipidiques à la surface des exosomes et l'introduction de certaines protéines dans les MVBs suivant une ubiquitination peuvent entre autre influencer le ciblage protéinique vers les exosomes.

Nous avons tenté de démontrer par des approches de biologie moléculaire et cellulaire que l'inclusion de HLA-DR dans les vésicules exosomales était indépendante de l'ubiquitination. En effet, le ciblage des chimères DR β -ubiquitine et des molécules DR dépourvues de résidus lysines cytoplasmiques n'est pas du tout modifié. Néanmoins, nos recherches sur l'intégration du HLA-DM aux exosomes nous ont permis de comprendre un peu mieux le ciblage de molécules du CMH aux exosomes. En fait, le HLA-DM possède dans sa portion cytoplasmique un motif tyrosine de format YXXL. Ce dernier assure le maintien du HLA-DM à la membrane limitante des MVBs. Toutefois, il semblerait que l'interaction avec HLA-DR provoquerait le masquage de ce motif et donc la présence de DM dans les exosomes. Nos résultats montrent donc que la présence de DR ne peut être expliquée par l'ubiquitination; il apparaît plutôt que des interactions entre protéines peuvent favoriser l'inclusion de certaines molécules du CMH de classe-II dans les microvésicules exosomales.

Mots-clés : HLA-DR, HLA-DM, ciblage endosomal, MVBs, exosomes, ubiquitination,

Abstract

The immune system is supported by many specialized cells. Activated antigen presenting cells promote elimination of extra- and intracellular pathogens. Exogenic antigenic peptides are mainly presented on MHC class-II molecules and the binding of antigen in MHC peptide-binding groove occurs in compartments of the endosomal pathway. Some particular characteristics of these compartments are required to support interactions between antigenic presentation proteins. Maturing MIICs contain microvesicles in which HLA-DR and HLA-DM interact. Peptide exchange in HLA-DR's peptide-binding groove is then catalysed by HLA-DM.

Microvesicles-containing compartments are also called MVBs. Under certain conditions, MVB's limiting membrane fuses with the plasma membrane to release their contents in the extracellular milieu. These vesicles are named exosomes. As exosomes are generated in MVBs in which HLA-DR is highly expressed, it is possible to detect DR o exosomes. Many hypotheses have been proposed to explain the way proteins are introduced into these vesicular membranes. Membrane composition of exosomes and targeting of many proteins in MVBs following ubiquitination can affect protein introduction into these nanovesicles.

By a molecular and cellular approach, we have demonstrated HLA-DR ubiquitination-independant inclusion into exosomal vesicles. Indeed, targeting of both DR β -ubiquitin chimera and lysine-less DR mutants is unaffected by this process. Nevertheless, our investigations on HLA-DM integration into exosomes have permitted a better comprehension of MHC molecules targeting into exosomes. In fact, HLA-DM's cytoplasmic YXXL tyrosine motif confines HLA-DM to the limiting membrane of MVBs. However, the expression of HLA-DR into DM.5 cells, shows that DR interaction with DM masks the tyrosine motif and consequently promotes DM entry into exosomes. These results imply that DR presence in exosomal vesicles is not a consequence of ubiquitination; however, protein interactions appear to affect exosomal inclusion of some MHC class-II molecules.

Keywords : HLA-DR, HLA-DM, endosomal targeting, MVBs, exosomes, ubiquitination

Table des matières

Chapitre 1 Revue de littérature	12
1.1 PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE.....	12
1.1.1 HLA-DR, DP et DQ.....	16
1.1.2 HLA-DM	17
1.1.3 HLA-DO.....	18
1.2 LES EXOSOMES.....	19
1.2.1 Voie endocytiq.	19
1.2.2 Biogenèse des exosomes	22
1.2.3 Caractéristiques des exosomes	23
1.2.3.1 Réticulocytes	23
1.2.3.2 Lymphocytes T cytotoxiques	24
1.2.3.3 Cellules présentatrices d'antigènes	25
1.2.4 Fonctions des exosomes	27
1.2.4.1 Présentation antigénique.....	27
1.2.4.2 Autres	29
1.2.4.2.1 Cancer et immunothérapie.....	29
1.2.4.2.2 Propagation de pathogènes.....	29
1.2.5 Ciblage des protéines aux exosomes.....	30
1.2.5.1 Microdomaines lipidiques.....	30
1.2.5.2 Tétraspandines.....	31
1.2.5.2.1 Structure.....	31
1.2.5.2.2 Ciblage des tétraspandines vers les exosomes	32
1.2.5.2.3 Interactions protéine-protéine.....	33
1.3 L'UBIQUITINATION.....	35
1.3.1 Découverte.....	35
1.3.2 Processus d'ubiquitination.....	35
1.3.3 Fonctions de l'ubiquitination	38
1.3.3.1 Dégradation par le protéasome.....	38
1.3.3.2 Internalisation et dégradation lysosomale	39
1.3.3.3 Ciblage endosomal.....	40

1.3.4	Aspects immunologiques.....	42
1.3.4.1	Apprêtement et présentation d'antigènes.....	42
1.3.4.2	Régulation négative du CMH de classe I.....	42
1.4	Objectifs et hypothèses de travail.....	44
Chapitre 2	Articles.....	46
2.1	EVIDENCE THAT INCORPORATION OF HLA-DR INTO EXOSOMES IS INDEPENDENT OF UBIQUITINATION OF ITS CYTOPLASMIC TAILS.....	46
2.1.1	Contribution et accord des auteurs.....	47
2.1.2	Résumé.....	48
2.1.3	Abstract.....	49
2.1.4	Introduction.....	50
2.1.5	Experimental procedures.....	52
2.1.6	Results and Discussion.....	55
2.1.7	Conclusion.....	58
2.1.8	References.....	59
2.1.9	Figures.....	63
2.2	THE YXXL CYTOPLASMIC MOTIF OF HLA-DM PREVENTS SORTING INTO EXOSOMES.....	69
2.2.1	Contribution et accord des auteurs.....	70
2.2.2	Résumé.....	71
2.2.3	Abstract.....	72
2.2.4	Introduction.....	73
2.2.5	Experimental procedures.....	75
2.2.6	Results.....	78
2.2.7	Discussion.....	81
2.2.8	References.....	85
2.2.9	Footnotes.....	92
2.2.10	Acknowledgements.....	93
2.2.11	Figures.....	94
Chapitre 3	Discussion.....	99
3.1	L'ubiquitination et le ciblage exosomal de HLA-DR.....	99

3.1.1	L'ubiquitine est importante pour l'intégration de protéines dans les MVBs	99
3.1.2	Les chimères ubiquitine	100
3.1.3	HLA-DR possède plusieurs résidus lysines dans sa queue cytoplasmique	103
3.1.4	Pourquoi retrouve-t-on DR dans les exosomes?.....	106
3.2	L'implication de HLA-DR dans l'entrée du HLA-DM aux exosomes.....	107
3.2.1	Motifs de ciblage des molécules du CMH de classe-II.....	107
3.2.2	HLA-DM est présent dans les exosomes de cellules B.....	110
3.2.3	HLA-DM possède un Motif qui le retient à la membrane limitante des MVBs	112
3.2.4	Masquage du motif YXXL par HLA-DR	113
3.2.5	l'expression de HLA-DR favorise la formation de MIICs	117
3.2.6	Pourquoi retrouve-t-on le HLA-DM dans les exosomes?.....	117
Chapitre 4 Conclusion		119

Liste des tableaux

Tableau I . Composition lipidique et protéinique des exosomes.....	27
--	----

Liste des figures

Figure 1. Locus du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	13
Figure 2. Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe-I.....	14
Figure 3. Structure moléculaire des molécules du CMH	15
Figure 4. Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe-II.....	17
Figure 5. La voie endocytaire.....	21
Figure 6. Structure générale des tétraspanines.....	32
Figure 7. Interactions dans les microdomaines enrichis en tétraspanines.....	34
Figure 8. Types d'ubiquitination.....	36
Figure 9. Réaction enzymatique de l'ubiquitination.....	37
Figure 10. Ciblage de protéines membranaires ubiquitinées vers les MVBs.....	41
Figure 11. HeLa CIITA cells possess multivesicular bodies and secrete exosomes.....	63
Figure 12. Molecules used in this study.....	64
Figure 13. HLA-DR β -ubiquitin chimeras are endoH sensitive.....	65
Figure 14. Ubiquitin does not positively affect HLA-DR exosomal targeting.....	66
Figure 15. Lysine-less DR molecules accumulate in large compartments.....	67
Figure 16. Lysine-less DR molecules have a normal level of expression in exosomal vesicles.....	68
Figure 17. HLA-DM is present in exosomes secreted from the B-lymphoblastoid cell line 721.45.	94
Figure 18. HeLa CIITA exosomes accumulate HLA-DM.....	95
Figure 19. HLA-DM's tyrosine motif prevents entry into exosomes.....	96
Figure 20. HLA-DM is found in exosomes upon co-expression of HLA-DR.....	97
Figure 21. Modèle proposé du masquage du motif tyrosine de DM par DR et de l'impact sur le ciblage de DM.	116

*Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui ont
des projets audacieux et qui les concrétisent.*

Remerciements

Je ne pourrais passer sous silence toute la reconnaissance que j'ai pour les gens qui m'ont supporté et aidé tout au long de mes études supérieures. Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche Jacques Thibodeau pour avoir su exploiter mes forces et accepté mes lacunes. Je voudrais évidemment remercier mon mentor Alex pour la poussée dans le dos quand j'en avais besoin et pour l'aide lorsque je me mettais les pieds dans les plats. Sans lui, je n'aurais sûrement pas été si loin! Je voudrais aussi remercier les étudiants du labo; Francis, Sam, Georges, Angie, Nath, Catherine, Jessy, Djibril, Marie-Hélène, Mammad, Jean-Simon et les stagiaires pour les rires et discussions partagés.

Je voudrais aussi dire merci à mes parents, Réjean et Suzanne, pour avoir toujours cru en moi et toujours m'avoir soutenu dans mes projets et idées saugrenus. Je voudrais remercier mes frères, Jean-Mi et Oli, pour les bons moments en leur compagnie quand j'étais découragée! J'aimerais aussi remercier ma belle-sœur Véro et ma « sœur » Marie-Eve pour leur support émotif. Je ne peux remercier tout ce beau monde sans parler des « cinq doigts de la main ». Merci les filles pour nos soupers à potins et nos dégustations d'alcool improvisées. Sans vous, j'aurais sûrement sauté une coche!! Merci aussi à mon copain Jonathan pour sa musique et son épaulement constant lors de ma rédaction.

Finalement, je voudrais dire merci à tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin, et que je n'ai pas mentionné. Et dites-vous que si j'ai pu le faire, tout le monde est capable! Il ne s'agit que de bien s'entourer et d'aller au bout de ses projets.

Chapitre 1 Revue de littérature

1.1 PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE

Le système immunitaire constitue la seconde barrière de protection pour l'organisme après la peau et les muqueuses. Les différentes cellules opérant dans ce mécanisme disposent de moyens variés afin d'éliminer les pathogènes intra- et extracellulaires. Les lymphocytes B par exemple, possèdent la particularité de présenter à leur surface des particules (ou antigènes) provenant d'un envahisseur étranger. Ces cellules font parties de la famille des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Il en est de même pour les cellules dendritiques et les macrophages.

Dans le but d'activer des cellules effectrices, comme les lymphocytes T, les antigènes doivent être disposés sur un récepteur, à la surface de la CPA, appelé le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce dernier est encodé par les gènes contenus dans le bras court du chromosome 6 et est divisé en deux classes : I et II (Figure 1)[1]. Chacune des classes a une structure et une façon différente d'apprêter et de présenter l'antigène.

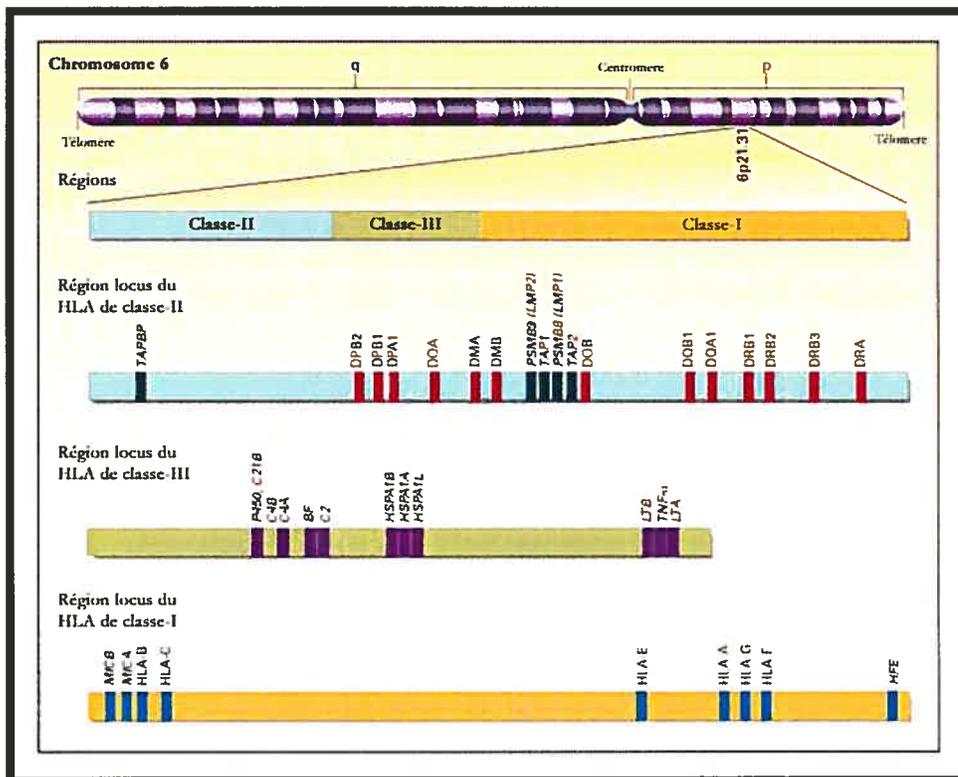


Figure 1. Locus du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Les gènes encodant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont disposés sur le chromosome 6 chez l'humain et sont répartis en trois régions : I, II et III. Seuls quelques gènes importants sont ici inscrits. Traduit de: [2]

Le CMH de classe I est formé d'une chaîne polymorphe alpha composée de trois domaines : $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et d'une deuxième chaîne non-polymorphe liée de façon non-covalente à la première, la $\beta 2$ -microglobuline (Figure 3). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont disposés de manière à permettre d'y nicher un peptide antigénique [3]. Toutes les cellules nucléées expriment le CMH-I à leur surface. Dans une situation physiologique normale, le CMH-I présente à la surface cellulaire des peptides endogènes dérivés de molécules du soi. Ces peptides n'activent pas de réponse immunitaire grâce au phénomène de tolérance [4]. Toutefois, lors d'une infection, les antigènes présentés sur le CMH de classe I proviennent de pathogènes intracellulaires ou de protéines étrangères cytosoliques dégradées en peptides par le protéasome (voir section 1.3.4.1) [5].

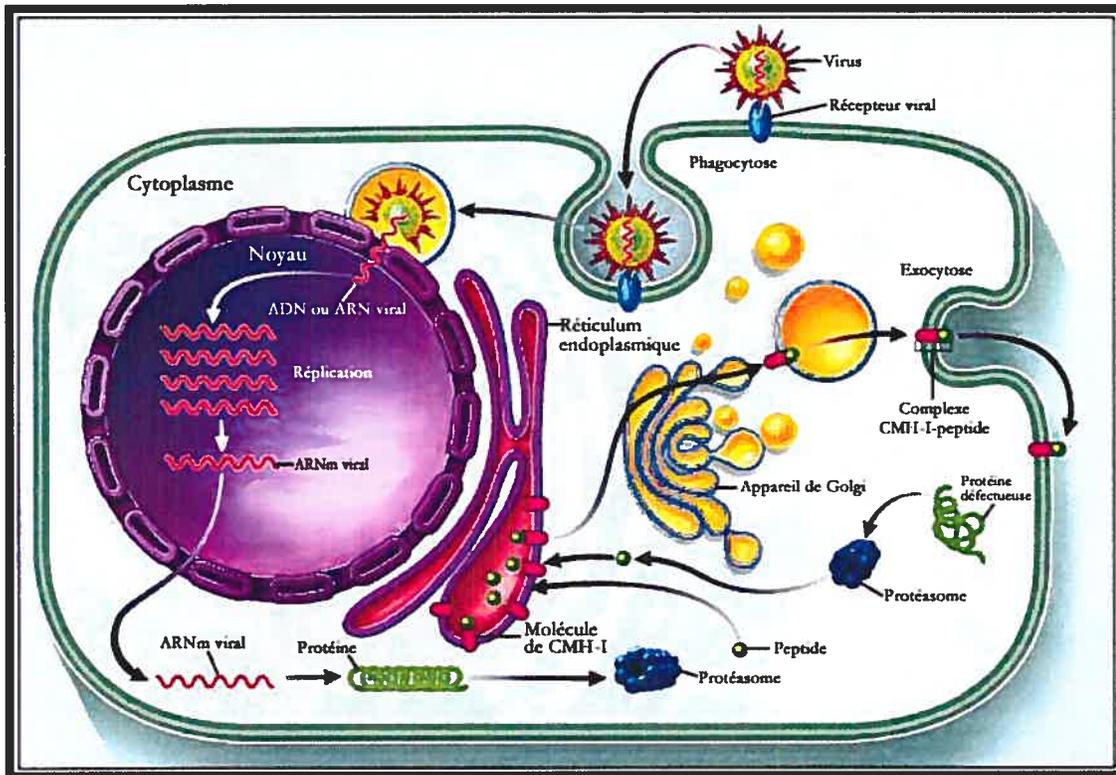


Figure 2. Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe-I

La principale voie de présentation antigénique par les CMH-I se traduit par la génération de peptides par le protéasome. Les protéines produites par un pathogène ou les protéines endogènes cytoplasmiques défectueuses seront dégradées et leurs produits seront sélectionnés, puis envoyés au réticulum endoplasmique pour le chargement sur les molécules du CMH-I nouvellement synthétisées. Le complexe CMH-peptide traversera le Golgi, puis les endosomes avant d'être finalement présenté à la membrane plasmique. Traduit de l'original : [2] figure 3.

Le CMH de classe II se différencie par sa structure hétérodimérique. Il est composé de deux chaînes polypeptidiques : α et β (Figure 3). Ces chaînes ont deux domaines extracellulaires, $\alpha 1$ et $\beta 1$, qui forment la niche peptidique. L'antigène qui s'y lie, provenant en général du milieu extracellulaire, est apprêté dans les compartiments endosomiaux acides et peut être d'une longueur de 11 à 20 acides aminés[5].

Plusieurs protéines sont impliquées dans le chargement de peptides sur les molécules du CMH. Leur action est nécessaire afin d'assurer la stabilité des peptides antigéniques à la surface de la cellule. Ce mémoire s'attardera principalement à décrire la voie de présentation antigénique du CMH de classe II et les signaux hypothétiques nécessaires à son incorporation dans les microvésicules des compartiments multivésiculaires.

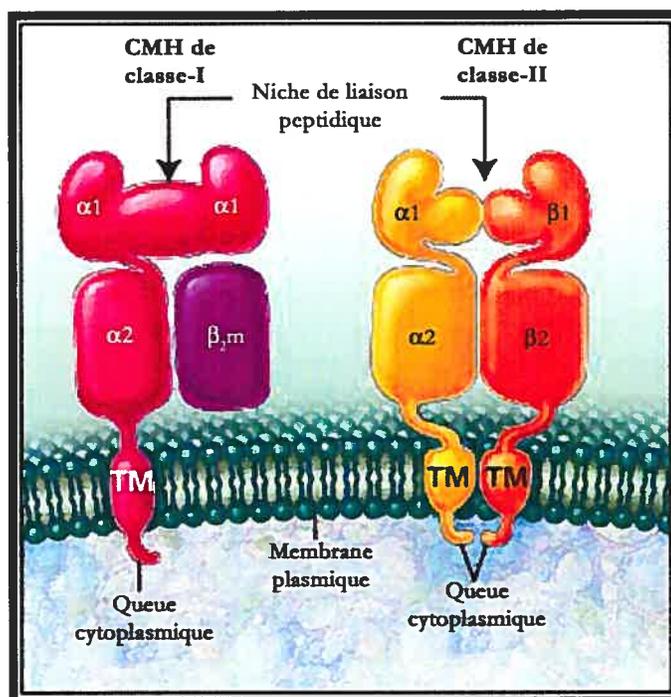


Figure 3. Structure moléculaire des molécules du CMH

Les molécules du CMH de classe-I sont constituées d'une chaîne alpha ancrée dans la membrane plasmique et d'une chaîne bêta (β_2 -microglobuline) liée à la chaîne alpha. La chaîne alpha est composée des domaines α_1 , et α_2 et d'un domaine transmembranaire (TM) et cytoplasmique. Le domaine α_1 forme la niche peptidique servant à lier le peptide antigénique. Les CMHs de classe-II sont des hétérodimères formés d'une chaîne alpha et d'une chaîne bêta. Chacune des chaînes comporte une portion extracellulaire (α/β 1 et 2), une portion transmembranaire (TM) et une portion cytoplasmique. Les domaines α_1 et β_1 forment la niche de liaison peptidique des molécules du classe-II. Traduit de l'original : [2], figure 2.

1.1.1 HLA-DR, DP ET DQ

Les molécules classiques de classe II comprennent les « human leukocyte antigen » (HLA)-DR, DP et DQ. Celles-ci sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) [6] sous forme d'un hétérodimère. Les molécules immatures ont une taille de 27 kDa pour le DR α et environ 25 kDa pour le DR β . Afin de poursuivre leur chemin vers la surface cellulaire, les molécules HLA classiques seront trimérisées et formeront un complexe nonamérique avec la chaîne invariante (Ii) [7;8]. La chaîne invariante permet au DR de sortir du RE par un signal approprié dans sa queue cytoplasmique. Elle favorise aussi la stabilité du complexe par l'intégration de sa partie C-terminale dans la niche peptidique du classe II. Ce lien empêche toute liaison d'un peptide endogène du RE. Le nonamère traverse ensuite le Golgi, où les molécules seront glycosylées avant de se rendre aux endosomes. Une partie de Ii y sera dégradée afin de ne garder que la partie nichée dans la molécule présentatrice d'antigène. La partie restante porte le nom de « CLIP » ou « class II-associated invariant chain peptide ». Le complexe CMH-CLIP, dans certains cas, peut être exprimé à la surface cellulaire (Figure 4). Toutefois, l'action d'une autre molécule du CMH de classe II, HLA-DM, peut interférer dans ce processus.

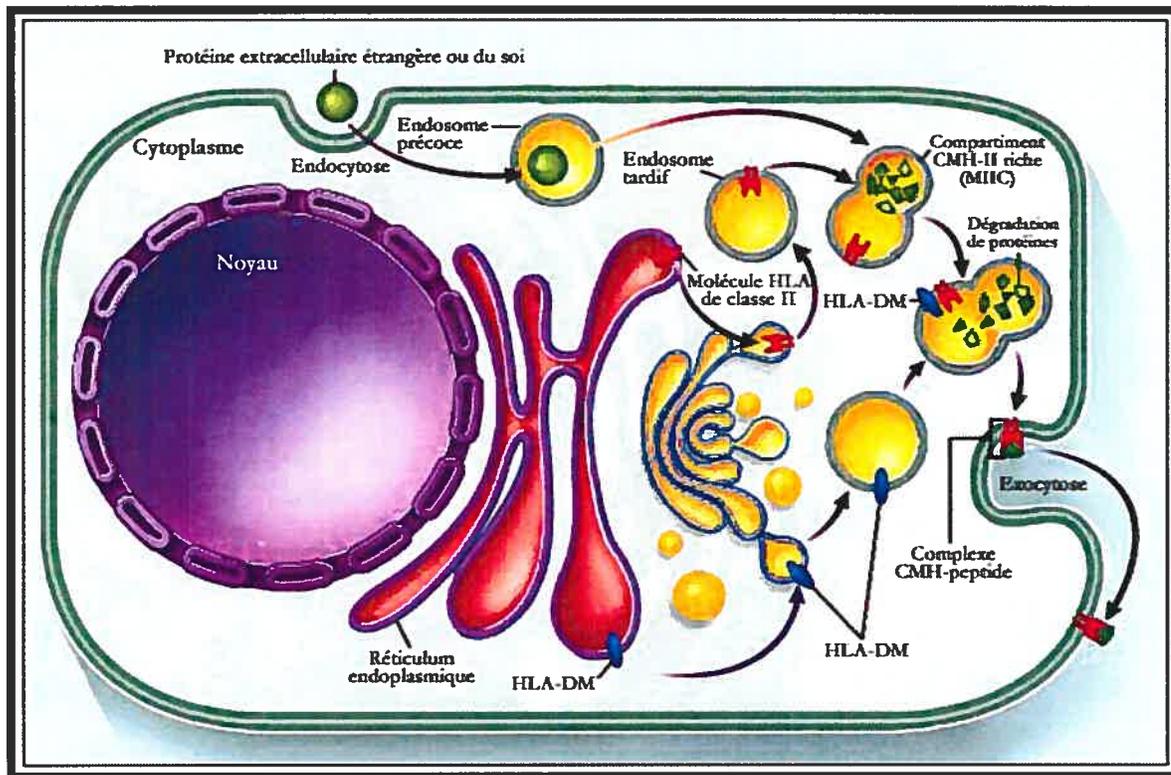


Figure 4. Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe-II

La présentation antigénique par le CMH de classe-II est caractérisée par l'endocytose des protéines étrangères et leur dégradation au sein des compartiments endosomiaux. Les molécules du CMH sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et voyage à travers l'appareil de Golgi avant d'atteindre les endosomes tardifs. La chaîne invariante (non schématisée) se fera graduellement dégrader pour ne conserver que la partie CLIP au sein de la niche peptidique du CMH. C'est à cet endroit que la modulation de la présentation antigénique sera faite par le HLA-DM. Ce dernier catalysera l'échange du CLIP pour un peptide de bonne affinité avant que le complexe CMH-peptide ne soit présenté à la surface cellulaire suite à l'exocytose. Traduit de l'original : [2] figure 3.

1.1.2 HLA-DM

La structure de HLA-DM n'est qu'apparenté aux autres molécules du locus de classe-II par 30% [9]. Par conséquent, HLA-DM ne possède pas de niche peptidique fonctionnelle et n'est pas polymorphe [10;11]. Le HLA-DM α mature possède un poids de 33-35 kDa, tandis que la chaîne β est de 30-31 kDa. C'est une molécule qui, contrairement à HLA-DR, n'est pas exprimée à la surface des cellules puisque sa queue

cytoplasmique porte un motif tyrosine qui la retient au niveau des compartiments riches en molécules de classe-II (MIIC) [12;13]. HLA-DM a, par conséquent, un rôle bien différent des autres classes-II. En effet, il agit sur le CLIP maintenu dans la niche peptidique du HLA-DR. Il catalyse l'échange du CLIP contre un peptide de plus forte affinité [14;15]. HLA-DM agit aussi comme chaperon en stabilisant le HLA-DR non-lié à un peptide [16]. L'échange CLIP/peptide antigénique survient particulièrement dans les endosomes tardifs et assure que seuls les complexes CMH-peptides stables seront exprimés à la surface des cellules. Le pH acide des MIIC et l'interaction directe entre DR et DM sont essentiels à ce processus [14;15]. Ce rôle d'édition du peptide favorise une présentation antigénique plus spécifique aux cellules T interagissant avec la CPA [17;18].

1.1.3 HLA-DO

Comparativement à HLA-DM, HLA-DO est près de 60% identique au DR, DP et DQ, mais tout comme le DM, il est très peu polymorphe. Sa distribution tissulaire est aussi plus restreinte que ces autres molécules de classe-II. HLA-DO est principalement exprimée dans les cellules B et dans les cellules épithéliales thymiques [19]. Le rôle de DO a été élucidé par une étude sur la régulation de la présentation antigénique des molécules de classe-II dans laquelle il était possible d'observer le blocage de l'échange peptidique de DM par DO. Il était alors possible de noter une accumulation de CLIP dans les compartiments endosomiaux [20]. DO est donc responsable du ralentissement de l'action de DM. Il est essentiel à l'action de DM autant que DM lui est nécessaire. En effet, DM permet la sortie de DO du réticulum endoplasmique et son ciblage vers le lysosome. Sans cette action, DO n'est que très peu exprimé dans les cellules et semble être dégradé prématurément [21]. La chaîne DO β porte dans sa queue cytoplasmique un motif di-leucine qui, selon les conditions, peut affecter son ciblage vers les compartiments lysosomiques. Toutefois, ce signal n'est pas requis lorsqu'elle est en présence de DM. En effet, si le motif di-leucine contenu dans la queue cytoplasmique de DO est muté, le complexe DM-DO se rend tout de même au lysosome. Le signal de DO serait davantage complémentaire à celui de DM en ciblant le complexe DM-DO dans les compartiments moins acides [22]. Par conséquent, l'interaction entre DM-DO permet à

l'échange peptidique de se faire dans des compartiments précis. Ces compartiments doivent être suffisamment acides pour empêcher l'action de DO sur DM et subséquemment permettre à ce dernier d'accomplir son rôle catalytique. Ainsi, le DO affecte indirectement le répertoire des peptides antigéniques présentés [23].

1.2 LES EXOSOMES

1.2.1 VOIE ENDOCYTIQUE

La voie endocytiq ue est composée de compartiments de fonctions et d'apparences différentes (voir Figure 5). Les endosomes précoces constituent les premiers compartiments de la voie endocytiq ue et ce sont eux qui, lors de l'endocytose d'une protéine exogène ou membranaire, vont en permettre la dégradation ou le recyclage éventuel. [24;25] Ce sont des compartiments ayant un pH entre 6 et 6.8 dû à la présence d'une pompe à proton ATP-dépendante. Ils sont caract eris es par la présence de EEA1 et de récepteurs recycl es endocytos es. [26]. Les endosomes en maturation accumulent graduellement des vésicules internes et donnent naissance aux compartiments multivésiculaires (MVB) [27]. Ces compartiments contiennent les marqueurs lysosomiques Lamp-1/2, CD63 (aussi connu sous le nom de Lamp-3) et CD9 [28]. Les microvésicules internes sont formées par l'invagination de la membrane limitante du compartiment, provoquant un bourgeonnement et la libération de la vésicule dans le lumen. Conséquemment, il est possible de retrouver ces mêmes marqueurs de lysosomes à leur surface.

Dans certaines conditions, encore mal comprises, les MVBs fusionnent avec la membrane plasmique, permettant la libération des vésicules que l'on peut alors nommer exosomes [29]. La relâche des exosomes est régulée par un mécanisme dépendant du calcium dans des lignées de cellules hématopoïétiques comme les K562. Il a été d emontr e que l'utilisation de monensine, un échangeur d'ions Na^+/H^+ qui induit des changements dans le calcium intracellulaire, provoque la génération de MVBs élargis.

Ceux-ci accumuleraient le Ca^{2+} qui accentuerait la relâche d'exosomes. Ce processus peut être bloqué par un composé chimique: le BAPTA-AM [30].

Dans d'autres conditions, les MVBs vont progressivement s'acidifier, ce qui provoquera un changement physiologique générant la formation de compartiments ou corps multilamellaires (MLB). C'est à l'aide de billes d'or colloïdal couplées à de l'albumine sérique bovine (BSA) que la formation de MLB a été démontrée comme survenant plus tardivement dans la route endocytyque que les MVBs [31]. L'acidification continue permettra de finalement atteindre la dernière étape de la voie endocytyque : les lysosomes. Ces derniers sont principalement responsables de la dégradation des protéines qui y sont ciblées. Le processus de dégradation des molécules est incertain. Certaines expériences soutiennent que les endosomes tardifs fusionnent avec les lysosomes [32], permettant le déchargement de protéines. D'autres hypothèses suggèrent davantage une tactique «kiss and run» selon laquelle les endosomes et les lysosomes interagiraient continuellement par des fusions et fissions transitoires [33]. Il serait logique de déduire que les protéines voyagent par transport vésiculaire entre les deux organites, étant donné que ce mécanisme constitue le principal mode de transport dans le trafic membranaire et les voies de sécrétions endocytyques [34].

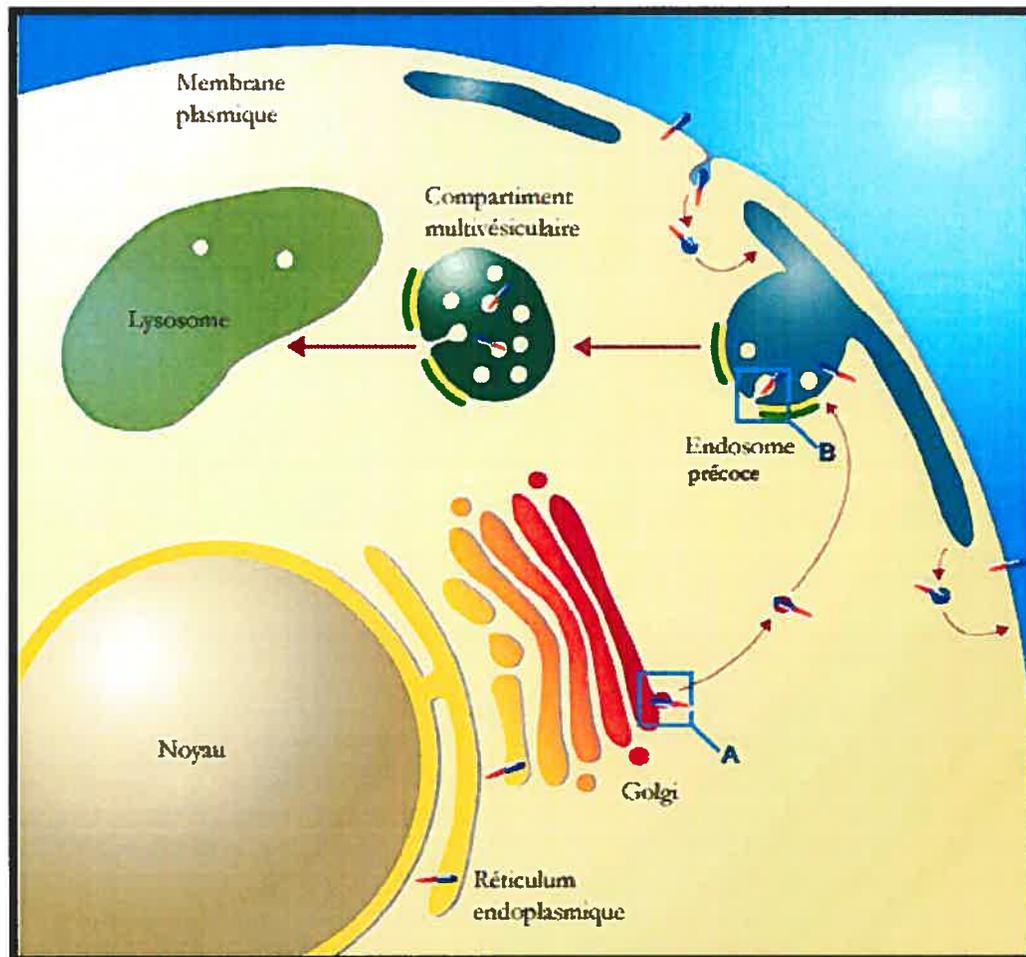


Figure 5. La voie endocytaire

Les molécules synthétisées dans le réticulum endoplasmique sont acheminées vers l'appareil de Golgi d'où elles bourgeonneront (A) avant d'être envoyées dans les endosomes. À partir des endosomes précoces, ces protéines peuvent être disposées à la surface de la cellule. Les protéines membranaires endocytosées se retrouveront dans ces mêmes endosomes qui matureront en endosomes tardifs. L'invagination de la membrane limitante aux sites couverts de manteaux de clathrine (B) induira la formation de compartiments multivésiculaires (MVBs). Ces derniers fusionneront avec les lysosomes, provoquant la décharge des vésicules intraluminales et leur destruction. Les MVBs peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique afin de libérer leur contenu dans le milieu extérieur (non schématisé). Une protéine hypothétique est représentée afin de montrer l'orientation de celle-ci dans les différents compartiments. La portion cytoplasmique est en orange (//) et celle extracellulaire, en bleue (//). Traduit de l'original provenant du site du Dr. Birgit Singer-Krüger, Universität Stuttgart, Inst. f. Biochemie (www.uni-stuttgart.de/.../opportunities.html)

1.2.2 BIOGENESE DES EXOSOMES

Comme les exosomes sont originaires des MVBs, leurs compositions protéïniques et lipidiques sont hautement apparentées. Ainsi, la machinerie responsable de la formation des MVBs est directement liée à la production d'exosomes. Ce sont des études chez la levure qui ont principalement levé le voile sur le mécanisme d'intégration de protéïnes dans les MVBs. Ce dispositif a été conservé dans l'évolution, puisqu'il est possible de retrouver des homologues des molécules impliquées également chez les mammifères. La formation des MVBs requiert le métabolisme des lipides de la famille des phosphatidyl-inositols (PI(3)P et PI(3,5)P₂) par les kinases du même nom sans toutefois que l'on connaisse le rôle exact de ces produits. En effet, le blocage des kinases n'affecte pas le ciblage de protéïnes mais empêche la conception de vésicules dans le lumen du compartiment [35]. La protéïne Hrs, liant le PI(3)P, est aussi importante dans la biogenèse des MVBs, puisqu'elles semble impliquée dans le recrutement de clathrines aux endosomes. De plus, elle est responsable de la régulation négative du récepteur de facteur de croissance épithélial (EGFR) [36]. Il faut noter qu'une grande partie de la compréhension de la genèse des compartiments multivésiculaires a été dérivée de l'étude de ce récepteur de facteur de croissance.

Beaucoup des molécules responsables de la formation des MVBs sont aussi impliquées dans le recrutement de protéïnes qui se retrouveront à la surface des vésicules intraluminales. Tsg101, une protéïne appartenant au complexe de transport responsable du ciblage endosomal (ESCRT-I), a été détectée sur les exosomes de DCs tout comme Alix, reliée à ESCRT-II et III. Ces protéïnes font partie de la machinerie qui sélectionne les protéïnes ubiquitinées pour les cibler vers les microvésicules internes. Ces complexes multi-protéïniques permettent l'invagination, le bourgeonnement et la fission de la membrane limitante des endosomes (voir Figure 10 section 1.3.3.3). Plusieurs autres protéïnes comme les Vps et les EAPs, sont incluses dans les complexes ESCRT. Certains auteurs croient que la perte de protéïnes par l'internalisation dans les vésicules du lumen serait trop importante pour que seules des protéïnes soient impliquées [35;37]. Il a donc été proposé que certains lipides seraient responsables de la genèse des vésicules intraluminales. Le LBPA (phospholipid lysobisphosphatidic acid) est exclusivement retrouvé dans les endosomes et dans les vésicules internes, et l'endocytose d'anticorps

liant ces lipides interfère avec la formation des MVBs [38]. Toutefois, le mécanisme concret est inconnu et le même modèle n'est pas observable chez la levure [35;37].

1.2.3 CARACTERISTIQUES DES EXOSOMES

Les exosomes sont des microvésicules dont le diamètre varie entre 30 et 100 nm et dont la densité se situe aux alentours de 1,13 g/ml selon le contenu protéinique. Ils ont une composition lipidique et protéinique très particulière et caractéristique (voir Tableau I), dépendant de la cellule génératrice. Ils peuvent être sécrétés par des réticulocytes [39], des cellules T cytotoxiques [40], des lymphocytes B [28;41], des cellules dendritiques [42-44], des macrophages [45] et des plaquettes [46]. Ce sont principalement des cellules de provenance hématopoïétique qui possèdent la capacité de relâcher les exosomes.

Des études de protéomiques, de même que des analyses par immunoblot et microscopie électronique, ont révélé la présence de marqueurs communs et de certains spécifiques au type de cellule d'origine. Les protéines communes retrouvées incluent les chaperons Hsc-70, -73 et -90, les sous unités des protéines G trimériques, le Tsg101, les protéines du cytosquelette et les tétraspanines CD9, CD63, CD81 et CD82 [42;44;47]. Certaines des protéines présentes sur les exosomes sont absentes de la surface cellulaire, ce qui permet de les différencier des débris de membranes ou des vésicules apoptotiques [43].

1.2.3.1 Réticulocytes

Les réticulocytes sont des érythrocytes immatures contenant des restes de compartiments cellulaires comme le Golgi et les endosomes. Lors de la maturation, ces cellules devront éliminer certains récepteurs membranaires, comme le récepteur de la transferrine chez les mammifères [48]. Pour ce faire, le récepteur sera ciblé vers les MVBs, puis sécrété à la surface d'exosomes [29;39;49;50]. C'est grâce à ces études qu'un intérêt pour les exosomes est né. L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) est aussi négativement

régulée et ciblée vers les exosomes lors de l'érythropoïèse [51]. Il est important pour les érythrocytes d'évacuer cette protéine, puisque si elle se retrouve à la surface des érythrocytes matures, elle pourrait provoquer des complications sanguines.

1.2.3.2 Lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T périphériques, après activation, peuvent se différencier en lymphocytes T cytotoxiques (LTC) possédant des granules caractéristiques. Ces granules ont été identifiées comme étant des lysosomes sécrétoires ayant les apparences d'un MVB par la présence de marqueur comme lamp-1 et CD63 [40]. En fait, avec des études plus approfondies, il a été démontré que ces compartiments contenaient des vésicules internes remplies de perforines et de granzymes. Ce sont les agents destructeurs employés par les LTC pour détruire la cellule infectée en interaction avec celle-ci. Les vésicules internes portent aussi à leur surface des molécules ayant un rôle important dans l'interaction LTC-cellule cible, comme le récepteur des cellules T, le CD3 et le CD8. C'est lors de l'activation des cellules Tc que les granules vont fusionner avec la membrane plasmique afin de libérer leur contenu dans la synapse immunologique. D'ailleurs, il a été proposé que la présence de protéines de stimulation et de co-stimulation sur les vésicules assurait la spécificité de l'attaque [52]. Malgré tout, il n'y avait jusque là aucune preuve que les particules contenant les perforines et les granzymes étaient des exosomes. Ce n'est que quelques années plus tard qu'un autre groupe a montré que les cellules T produisaient bel et bien des exosomes. En effet, suite à leur activation *in vitro*, les lymphocytes T cytotoxiques semblaient sécréter des microvésicules de morphologie comparable aux exosomes. D'un diamètre entre 50 et 100 nm, délimitées par une double membrane lipidique et exprimant des molécules d'adhésion et des marqueurs spécifiques aux compartiments endosomiaux (CD63), ces particules sécrétées ressemblaient grandement aux vésicules exosomales. Ces caractéristiques ont été établies par des techniques éprouvées dans l'étude de ces microvésicules comme la microscopie électronique, l'immunobuvardage et la cytométrie en flux [53].

1.2.3.3 Cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont certainement la catégorie de cellules la plus étudiée en ce qui a trait à la caractérisation des exosomes. Ces cellules regroupent entre autres les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Ce sont des cellules spécialisées dans la présentation de particules antigéniques. Elles activeront des cellules effectrices afin d'enrayer les pathogènes présents dans l'organisme infecté (voir section 1.1). Ces cellules expriment donc les molécules du CMH de classe I et de classe II. Le CMH-II se retrouve en grande partie dans les endosomes pour y lier son peptide antigénique. Ces compartiments tardifs portent alors le nom de MIIC et acquièrent les caractéristiques des MVB lors de leur maturation. Plusieurs protéines se retrouvent à la surface des MVB et/ou à la surface des microvésicules internes. Les tétraspanines sont particulièrement enrichies sur les microvésicules (CD81, CD82 et CD63) (voir section 1.2.5.2) avec le CMH-II classique, tandis que Lamp-1/2 et HLA-DM se retrouvent surtout sur la membrane limitante des MVBs [28;54]. Toutefois, cette distribution protéinique varie d'une CPA à l'autre.

Les cellules dendritiques (DC) immatures expriment à leur surface le marqueur CD1a et sécrèteront des exosomes portant cette même protéine, de même que du CD63 qui, lui, est absent de la surface cellulaire. Les exosomes de DC comprennent aussi du CD59, très peu de CD80/86, ICAM-I et aucune trace de CD20, un marqueur spécifique aux cellules B. Les exosomes des lymphocytes B, quant à eux, expriment fortement les molécules CD20, CD80/86, ICAM-I, mais très peu de CD63 et aucun CD1a. Selon cette étude, l'expression du CD63 dépendrait de la lignée de cellules B testée [47].

Néanmoins, la différence entre exosomes provenant de lymphocytes B et de DC ne s'arrête pas là. Des études plus approfondies ont été effectuées afin de déterminer la composition lipidique et l'organisation membranaire des exosomes.

De façon générale, les exosomes sont riches en lipides tels que les sphingomyélines, les phosphatidyl-inositols/sérines/cholines/éthanolamines et les gangliosides (GM3). Ce sont ces différentes familles de lipides, de même que la présence de cholestérol, qui permettent aux exosomes d'acquérir une résistance aux détergents non-ioniques [55]. Cette propriété a d'abord été établie pour les radeaux lipidiques ou « rafts » enrichis en

ces mêmes lipides avant d'être testé sur les vésicules exosomales [56]. Notons que la composition en cholestérol peut différer entre CPA. Les cellules B sécrètent des exosomes enrichis en cholestérol par rapport à la membrane plasmique, tandis qu'il ne semble pas y avoir de distinction entre la teneur en cholestérol de la membrane plasmique et celle des exosomes chez les DC.

L'analyse des lipides des exosomes des DC a aussi permis d'observer le mouvement des phospholipides de la double membrane lipidique par un phénomène nommé le « flip-flop ». Ce déplacement mène à l'asymétrie des lipides de la membrane des exosomes. Il semblerait que le pH du milieu affecte aussi la fluidité de la membrane, le pH neutre la rendant plus rigide. Cet aspect affecte conséquemment la fusion des vésicules exosomales avec les autres membranes, de même que la stabilité de ceux-ci lorsqu'ils circulent dans l'organisme [57].

Tableau I. Composition lipidique et protéinique des exosomes

Présentation antigénique	CMH-I et II, CD80 et CD86 (co-stimulation)
Molécules d'adhésion	<u>Tétraspanines:</u> CD63, CD9, CD37, CD53, CD81, CD82 <u>Intégrines:</u> $\alpha3$, $\alpha4$, αM , $\beta1$, $\beta2$ MFG-E8 (cellules murines)
Transport et fusion membranaire	<u>Annexines:</u> I, II, IV, V, VI, VII RAP1B/RABGDI, Rab7, Rab2
Protéines de choc thermique	HSC70/73, HSP84/90
Protéines du cytosquelette	Actine, tubuline, cofiline, meosine
Glycolipides et protéines reliées aux radeaux lipidiques	Flotilline, CD55, CD59, GM1, GM3, $Gi2\alpha$
Enzymes	Pyruvate kinase, alpha enolase
Autres	Facteur d'élongation 1α , 14-3-3, clathrine, ferritine <u>protéines ESCRT</u> : Alix, Tsg101

Résultats obtenus suite à des analyses de protéomiques, de « western blot » et de microscopie électronique sur des exosomes provenant de lymphocytes B humains, de cellules dendritiques murines, de cellules épithéliales intestinales humaines et murines, de réticulocytes et de mastocytes. Tableau tiré de [58]

1.2.4 FONCTIONS DES EXOSOMES

1.2.4.1 Présentation antigénique

Tel que mentionné plus haut, les exosomes provenant de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) portent les molécules du CMH. Ainsi, les exosomes dérivés de cellules

B ont été les premiers testés pour l'activation directe de clones T CD4⁺ [41]. Il a alors été établi que les peptides endocytosés et liés au CMH-II se retrouvaient à la surface des exosomes et que ces complexes étaient capables d'activer des cellules T spécifiques. Des molécules accessoires telles que B7.1/.2, ICAM et LFA-3 semblaient aussi présentes dans les préparations exosomales. La découverte de molécules de co-stimulation à la surface des exosomes des DCs a permis de supporter l'hypothèse d'une présentation antigénique alternative à celle effectuée par les cellules et même d'envisager, grâce à ces molécules, la possibilité d'éradiquer des tumeurs (voir section cancer/immunothérapie).

Les cellules dendritiques folliculaires (CDF) peuvent aussi présenter des peptides aux CPAs grâce aux exosomes. En effet, les CDFs, principalement impliquées dans la stimulation continue des lymphocytes B dans les centres germinaux, peuvent non seulement capturer des antigènes natifs sous forme de complexes immuns, mais aussi présenter des antigènes apprêtés sur des molécules du CMH-II [59]. La microscopie de base a permis d'observer cette molécule à la surface des CDFs (revue dans [60]). Malgré cela, les CDFs ne possèdent pas d'activité phagocytaire [61] et ne synthétisent pas la classe-II elles-mêmes [62]. Il fallut utiliser la microscopie électronique pour démontrer que les CDFs portaient en fait à leur surface des microvésicules représentant des exosomes originaires des cellules B. La capture d'exosomes semble ainsi donner aux cellules folliculaires un rôle de raffinement de la réponse immunitaire [63]. Il a ainsi été proposé que les exosomes avaient un rôle dans le maintien de la réponse mémoire cellulaire à long terme et dans la tolérance des lymphocytes T [41].

1.2.4.2 Autres

1.2.4.2.1 *Cancer et immunothérapie*

Les LTCs sont généralement disposés à éliminer une masse cancéreuse. Cependant, leur activation dépend de la présentation d'antigènes tumoraux spécifiques par les DCs. Comme mentionné plus haut, les DCs peuvent relâcher des exosomes portant les molécules du CMH-I et activer des LTCs (voir section 1.2.4.1 ci-dessus). Pour tester cette hypothèse, des exosomes ont été mis en contact avec des peptides dérivés de tumeurs autologues murines et ensuite avec des cellules T. En poussant l'expérience *in vivo*, il a été possible d'observer la régression d'un carcinome murin [44]. De plus, certains chercheurs semblent aujourd'hui enclins à employer les DCs en immunothérapie anti-cancéreuse, tandis que les exosomes font tranquillement leur entrée dans les études cliniques (revue dans [64]).

1.2.4.2.2 *Propagation de pathogènes*

Prion. Le prion est une protéine exprimée de façon ubiquitaire et dont le changement conformationnel provoque une accumulation neurocervicale nocive [65]. L'implication des exosomes dans la propagation des prions a été soupçonnée suite à la mise en culture de cellules saines dans un milieu provenant de cellules infectées. En effet, les premières devenaient infectées à leur tour [66]. La démonstration de l'incorporation de la protéine prion infectieuse dans les exosomes a été faite en mettant ce milieu sur gradient de sucrose. Il a ainsi été possible d'isoler des exosomes interagissant avec la protéine prion infectieuse (PrP^{sc}) [67].

VIH. Il est connu que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) bourgeoine préférentiellement dans les microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol [68]. Conséquemment, il peut se faire autant à la surface cellulaire qu'au niveau des compartiments multivésiculaires [69]. En comparant la composition protéique des virions et des exosomes, il a été possible de noter la présence des mêmes protéines. Ces dernières différaient de celles contenues dans les radeaux lipidiques ou la membrane

plasmique. Les virions semblent donc exploiter le mécanisme de biogenèse des exosomes [70]. De plus, « the Trojan exosome hypothesis » suggère l'emploi de la voie de communication intercellulaire des exosomes par le VIH pour accélérer sa propagation [71].

1.2.5 CIBLAGE DES PROTEINES AUX EXOSOMES

1.2.5.1 Microdomaines lipidiques

Les radeaux lipidiques sont des domaines résultant de l'agrégation et de l'association de lipides et de protéines spécifiques dont la composition globale est différente du reste de la membrane plasmique. Il est possible de les isoler grâce à leur insolubilité dans les détergents non-anioniques et à leur faible densité dans les gradients de sucrose [72]. Les radeaux lipidiques n'ont pas été immédiatement associés à la composition membranaire des exosomes. Les exosomes sont enrichis en cholestérol et ils contiennent des gangliosides G_{M1} , des protéines comme CD55 et CD59 ancrées dans des glycosides-phosphatidylinositol (GPI) [73], des protéines kinases Lyn de la famille des Src, et des sous-unités de la protéine G. Ces différentes molécules sont reconnues comme étant des marqueurs typiques des radeaux lipidiques. Leur expression dans des domaines résistants aux détergents a été montrée par l'analyse du milieu de culture de cellules et d'associer ainsi les radeaux lipidiques aux composés membranaires des exosomes. Il est donc possible de croire que les domaines lipidiques seraient responsables du ciblage de ces protéines vers les exosomes. Le CMH de classe-II pourrait aussi être ciblé aux exosomes par son entrée dans ces domaines lipidiques puisqu'il est retrouvé partiellement associé aux domaines résistants aux détergents [74]. D'un autre côté, l'ubiquitination joue un grand rôle dans le ciblage de protéines vers les radeaux lipidiques (voir chapitre Ubiquitination). Ainsi, l'entrée de protéines dans les exosomes est peut-être le résultat de l'action de plusieurs facteurs internes et externes.

1.2.5.2 Tétraspamines

Les tétraspamines sont des protéines membranaires relativement conservées dans l'évolution, et qui ont tendance à se regrouper entre elles et avec d'autres protéines afin de former des micro-domaines de la membrane plasmique. Cette famille est caractérisée par la présence de quatre domaines transmembranaires et un profil d'expression cellulaire très ubiquitaire. Leurs rôles sont variés passant de l'adhésion à la stimulation des cellules T [75].

1.2.5.2.1 *Structure*

Les protéines de la famille des tétraspamines possèdent une structure globale semblable avec des domaines extra- et intra-cellulaires (Figure 6). La partie extracellulaire est formée par deux boucles de tailles différentes. La grande boucle contient les motifs caractéristiques tels le cystéine-cystéine-glycine (CCG), qui peut former des ponts disulfures avec d'autres cystéines de la boucle. De plus, cette boucle contient plusieurs sites de N-glycosylation. Certaines cystéines sont retrouvées au niveau du cytoplasme et sont aussi particulières à la famille. Elles sont d'ailleurs grandement impliquées, sinon responsables, de la formation de « filet de tétraspamines » lorsqu'elles sont palmitoylées (revue dans [76]).

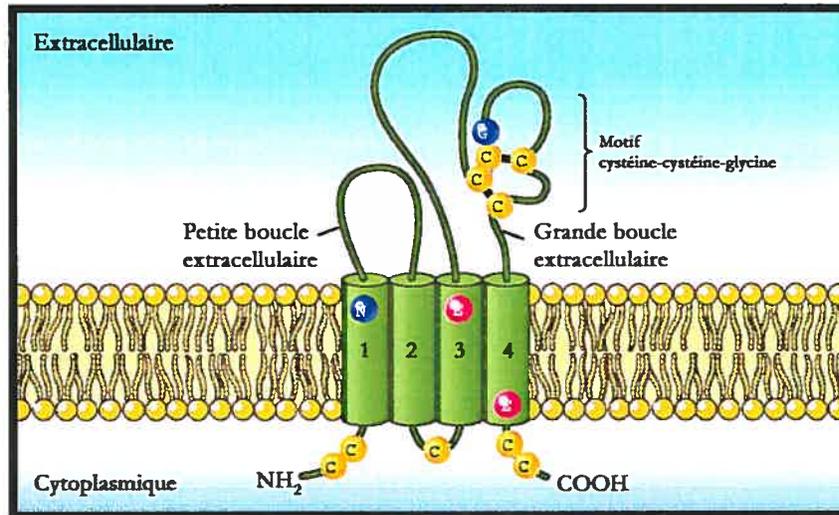


Figure 6. Structure générale des tétraspanines

Les cylindres verts représentent les domaines transmembranaires numérotés de 1 à 4. Les ponts disulfures formés entre les résidus conservés de la grande boucle sont schématisés par des lignes noires (exemple de CD81). G, glycine ; C, cystéine ; N, asparagine ; E, glutamate. Traduit de l'original : [75]

1.2.5.2.2 Ciblage des tétraspanines vers les exosomes

Il est encore impossible de dire de quelle façon les tétraspanines sont transportées dans les MIICs. Peut-être sont-elles directement dirigées du Golgi vers les endosomes ou peut-être passent-elles par la membrane plasmique avant de se retrouver dans ces compartiments tardifs? Il ne semble n'y avoir aucun signal de ciblage consensus, malgré le fait que certaines tétraspanines vont posséder un motif tyrosine en C-terminal. Celui-ci est impliqué dans l'internalisation et le ciblage lysosomal et basolatéral [77]. Le CD63 contient le motif GYEVN lui permettant d'être exprimé principalement dans les lysosomes. Le transport de cette tétraspanine du *trans*-Golgi vers les lysosomes nécessite la protéine adaptatrice AP3 [78]. Le niveau différentiel d'expression de CD63 entre la surface cellulaire et les compartiments endosomiaux porte à croire que le transport de cette protéine varie entre la membrane plasmique et les endosomes [28].

Les tétraspanines sont hautement impliquées dans la formation de complexes polypeptidiques qui pourraient faciliter l'incorporation d'autres protéines dans les microvésicules internes des MVBs. Ces complexes préviendraient donc le recyclage des molécules et faciliteraient leur élimination de la surface cellulaire [79]. Ces complexes formés par les tétraspanines sont aussi appelés « filet » (web). La capacité de ces protéines à interagir entre elles et avec d'autres protéines partenaires semble découler de la présence de résidus glycine hautement conservés dans la région transmembranaire. Ce sont des études biochimiques sur le CD9 qui ont permis d'établir la possibilité d'interactions inter- et intramoléculaires [80]. Le « filet de tétraspanines » revêt une grande importance puisqu'il est impliqué dans plusieurs contacts cellule-cellule et dans la fusion intercellulaire. Entre autre, il a été noté que le CD81 se retrouvait dans la synapse immunologique des cellules B et T, ce qui semble suggérer son implication dans l'interaction entre cellules ([81] et revue dans [75]).

1.2.5.2.3 *Interactions protéine-protéine*

Les tétraspanines peuvent s'associer entre elles mais aussi avec d'autres partenaires (voir Figure 7). Ceux-ci varient d'une cellule à l'autre, les plus communs étant les membres de la famille des intégrines et de la superfamille des immunoglobulines. L'interaction tétraspanine-partenaire peut être influencée par la stoechiométrie des protéines et elle est résistante aux détergents. La liaison tétraspanine-tétraspanine, quant à elle, ne dépend pas de la stoechiométrie, mais nécessite la palmitoylation de ses résidus cystéine cytoplasmiques [82]. Le regroupement de protéines tétraspanes, de molécules partenaires et de cholestérol donne naissance à des microdomaines membranaires enrichis en tétraspanines (TEM) (revue dans [83;84]). Cette association est fonctionnelle puisqu'elle est observée à la surface d'exosomes provenant de CPAs et que ceux-ci sont capables de présentation antigénique (voir section 1.1). Des protéines se retrouvant dans les exosomes suite à une association avec des tétraspanines est donc une hypothèse envisageable.

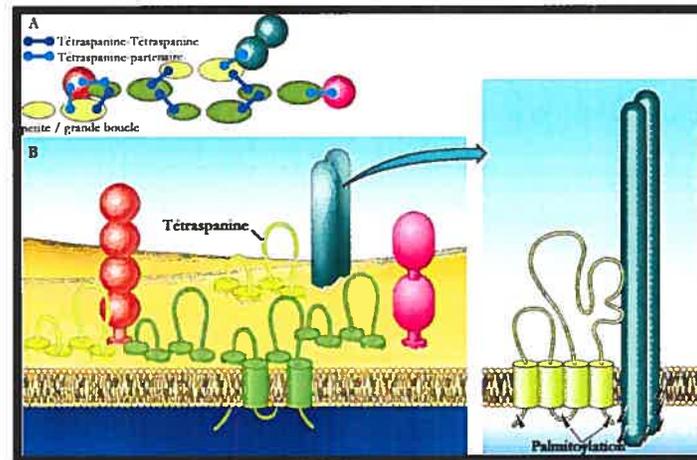


Figure 7. Interactions dans les microdomaines enrichis en tétraspanines

A : Vue aérienne des interactions tétraspanine-tétraspanine et tétraspanine-partenaire.

B : Vue de côté de ces mêmes interactions. Panneau de droite : l'agglomération est facilitée par la palmitoylation des résidus cystéines conservés. Teintes de vert, tétraspanines; brun et rose, superfamille des immunoglobuline; bleu, intégrines. Traduit de l'original : [75].

Le CMH-II a la particularité de s'associer avec certaines tétraspanines à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. En effet, certaines sous-populations de CMHs vont s'associer et présenter le même antigène à la surface de la cellule. Ces molécules sont reconnues par l'anticorps anti-CDw78, qui peut reconnaître les protéines HLA-DR formant des complexes entre elles [85], comme il est possible de le voir dans les TEMs (revue dans [86]). Il est donc envisagé que le contact tétraspanines-CMH-II soit sélectif.

Des études biochimiques et l'observation de co-localisation à la surface cellulaire ont permis de démontrer que les tétraspanines CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 et CD82 peuvent interagir avec le CMH-II. Dans les compartiments MIICs, le CD82 s'associe même avec HLA-DM et HLA-DO [54].

Les tétraspanines sont retrouvées en grande quantité à la surface des exosomes ainsi que dans les membranes des vésicules internes des MVBs [28]. Ainsi, les exosomes dérivés de cellules présentatrices d'antigènes sont enrichis en CMH-II et en tétraspanines, laissant présager l'influence de celles-ci sur le ciblage du CMH-II.

Les tétraspanines et les microdomaines lipidiques ne sont pas les seuls facteurs influençant le ciblage de protéines vers les vésicules intraluminales des MVBs. Effectivement, l'ubiquitination peut aussi être grandement impliquée dans le trafic de protéines dans la voie endocytique et donc peut jouer un rôle dans leur entrée au sein des MVBs.

1.3 L'UBIQUITINATION

1.3.1 DECOUVERTE

L'ubiquitine, d'abord appelée « ubiquitous immunopoietic polypeptide » ou UBIP, est une protéine de 76 acides aminés dont le poids moléculaire est de 8500 Da. Elle a d'abord été isolée du thymus bovin, puis dans plusieurs autres tissus d'origines diverses. L'ubiquitine était principalement reconnue comme responsable de la différenciation *in vitro* des cellules T et B via les récepteurs β -adrénergiques et l'activation de l'adénylate cyclase [87]. C'est une molécule qui a été hautement conservée au cours de l'évolution, ce qui suggère un rôle biologique important. Les premières démonstrations d'une liaison covalente ont été faites avec les histones H2A [88;89]. Plusieurs études sur l'ubiquitination ont été réalisées afin d'identifier les autres molécules impliquées dans cette modification post-traductionnelle et dans le but d'en déterminer le rôle dans la dégradation des protéines. La découverte de la destruction protéinique par protéolyse a permis, une vingtaine d'années plus tard, aux chercheurs Ciechanover, Hershko et Rose, d'obtenir le Prix Nobel de Chimie de 2004 (revue de leurs travaux dans [90]).

1.3.2 PROCESSUS D'UBIQUITINATION

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle dont les fonctions sont très nombreuses, la plus répandue étant la dégradation des protéines via le protéasome 26S. Afin de suivre cette route, l'ubiquitine liera la protéine cible via un lien

covalent entre sa glycine C-terminale et une lysine de la protéine. Selon la quantité d'ubiquitines liées au substrat ou entre elles, il est possible de classifier l'ubiquitination en trois types : (1) mono-ubiquitination, (2) multi-ubiquitination et (3) poly-ubiquitination. La mono-ubiquitination est le lien entre un seul polypeptide ubiquitine et une lysine d'une protéine cible, ce qui induira soit l'endocytose, le trafic membranaire ou la réparation de l'ADN selon la protéine impliquée. La multi-ubiquitination représente, quant à elle, l'attachement d'une ubiquitine sur plusieurs lysines présentes sur la portion cytoplasmique de la cible. Elle provoque en général l'internalisation de la protéine ubiquitinée. Finalement, la poly-ubiquitination consiste à la liaison de plusieurs molécules d'ubiquitine entre elles et dont la première liera le substrat d'intérêt (voir Figure 8). Ce dernier type d'ubiquitination est possible grâce à la présence de lysines au sein de l'ubiquitine. Cette dernière contient sept lysines. La fonction et l'implication de trois de ces lysines (Lys29, Lys48 et Lys63) ont mieux été cernées [91].

Selon la lysine employée pour former une chaîne de poly-ubiquitines, le destin de la protéine cible peut changer. Par exemple, lorsque la poly-ubiquitination se fait par un lien avec la lysine-48, les protéines membranaires du noyau, du cytoplasme et du réticulum endoplasmique seront envoyées au protéasome pour y être dégradées et ce, suivant la liaison d'un minimum de quatre ubiquitines [92]. La lysine-63 serait davantage responsable de l'endocytose de protéines membranaires en plus d'autres processus cellulaires ; un rôle différent pouvant être expliqué par une conformation différente de la chaîne de poly-ubiquitine formée [93].

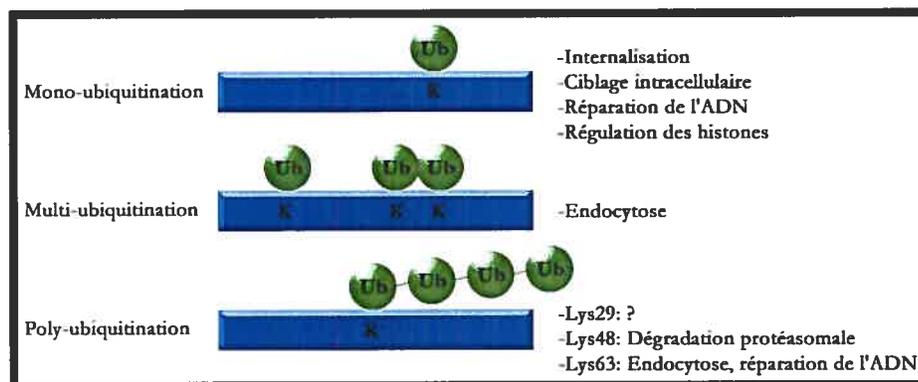


Figure 8. Types d'ubiquitination

Ub, ubiquitine ; K, résidu lysine. Inspirée de la [figure 1](#) de [94]

L'ubiquitination requiert l'activité de trois enzymes. Tout d'abord, la glycine se retrouvant en C-terminal de l'ubiquitine sera activée par l'enzyme d'activation E1 (étape 1 dans la Figure 9). Cette étape nécessite de l'ATP et permettra la formation d'une ubiquitine adénylée avec relâchement de pyrophosphate inorganique (PPi). Ce dernier pourra ensuite lier un résidu cystéine de E1 par un lien thioester. L'ubiquitine est par la suite transférée sur une autre enzyme, E2 (étape 2), responsable du transport et de la conjugaison de l'ubiquitine vers la dernière enzyme, la ligase E3 (revue dans [95]). L'interaction entre E2 et E3 provoque le transfert de l'ubiquitine vers la protéine cible (étape 3). L'ajout graduel d'ubiquitines sur le substrat pour former une chaîne de poly-ubiquitines provoquera sa dégradation par le protéasome 26S (étape 4) (voir section 1.3.3.1 ci-dessous). L'ubiquitine sera alors recyclée grâce à l'action d'enzymes de désubiquitination (étape 5). Ces enzymes sont généralement des protéases qui reconnaissent les résidus ou domaines C-terminaux de l'ubiquitine. Elles sont divisées en deux classes : « ubiquitin C-terminal hydrolases » (UCHs) et « ubiquitin-specific proteases » (UBPs). Les UBPs sont les plus répandues et possèdent des fonctions, des caractéristiques et des mécanismes d'action différents leur permettant de reconnaître une variété de cibles (revue dans [96]). Le recyclage de l'ubiquitine permet ainsi de qualifier l'ubiquitination de processus réversible.

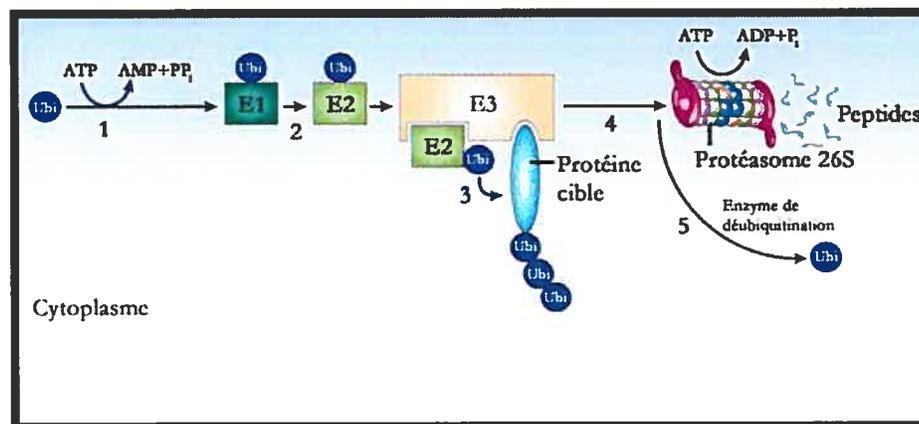


Figure 9. Réaction enzymatique de l'ubiquitination

L'ubiquitine est activée par l'enzyme d'activation E1 (1) et transférée à l'enzyme de conjugaison E2 (2). E2 et la protéine cible lie une ligase E3 spécifique afin de procéder au transfert de l'ubiquitine vers le substrat d'intérêt (3). L'attachement de plusieurs ubiquitines entraîne une poly-ubiquitination et le ciblage de la

protéine vers le protéasome 26S pour la dégradation (4), tandis que les molécules d'ubiquitines seront recyclées grâce aux enzymes de désubiquitination (5). PPI, pyrophosphate inorganique ; Pi, phosphate inorganique ; Ubi, ubiquitine. Traduit de l'original : [96;97].

1.3.3 FONCTIONS DE L'UBIQUITINATION

1.3.3.1 Dégradation par le protéasome

La poly-ubiquitination entraîne plus souvent qu'autrement la dégradation protéasomale (revue dans [98]) de la protéine affectée dans le but, dans certains cas, d'arrêter l'induction de signaux ou d'empêcher le recyclage. Le protéasome 26S est en fait une protéase composée de deux sous-unités dont la fonction avait été découverte par son habileté à dégrader les conjugués lysozyme-ubiquitine [99]. Les sous-unités 19S, ou le complexe de régulation, sont responsables de la reconnaissance du substrat ubiquitiné et de l'apport énergétique du complexe, et couvrent chaque extrémité de la sous-unité 20S. Cette dernière porte le nom de protéasome et est garante de l'activité protéolytique. Le 20S est composé de quatre anneaux organisés en une structure $\alpha\beta\beta\alpha$, une forme déterminée par l'analyse du cristal du protéasome de la levure [100]. Les sites catalytiques sont principalement contenus dans les anneaux β , tandis que les anneaux α maintiennent la stabilité de l'ensemble du complexe (revue dans [101]).

Toutefois, il ne s'agit pas simplement d'être poly-ubiquitiné pour être dégradé par le protéasome ; l'action de protéines détentrices de domaines de liaison de l'ubiquitine (UBD) est souvent nécessaire afin de promouvoir la destruction d'une molécule ubiquitinée. Certaines familles de protéines dites « navettes » contiennent un domaine « ubiquitin-like » (UBL) et un domaine « ubiquitin-associated » (UBA). Ceux-ci leur permettent alors d'interagir à la fois avec les poly-ubiquitines et le protéasome. Les protéines comportant des UBDs peuvent agir de façon transitoire ou font tout simplement partie des sous-unités stables du complexe protéasomal. Ainsi, la simple interaction avec un récepteur de poly-ubiquitination au sein du protéasome provoque l'entrée de la cible vers la chambre catalytique [102]. Les ligases E3 peuvent aussi contenir des domaines UBLs favorisant la liaison avec le protéasome et donc la

dégradation du substrat [103]. Certaines études ont montré, que lors d'une poly-ubiquitination incomplète, les protéines cibles nécessitent l'action d'une autre enzyme : la E4. Cette dernière coopérerait avec E3 afin d'allonger la chaîne de poly-ubiquitines pour envoyer la protéine cible vers le protéasome 26S (revue dans [104]).

1.3.3.2 Internalisation et dégradation lysosomale

Afin d'arrêter une cascade signalétique engendrée par l'interaction d'un récepteur membranaire avec son ligand, il est souvent nécessaire de provoquer l'endocytose du complexe. À partir de là, le complexe récepteur-ligand peut soit retourner à la membrane plasmique (recyclage), soit être ciblé vers les lysosomes (dégradation). La cellule retrouve ainsi son état de base. L'ubiquitination est impliquée à deux niveaux de ce processus : l'internalisation à partir de la membrane et le ciblage endosomal.

La majorité des protéines membranaires régulées négativement chez la levure *S. cerevisiae*, requièrent l'ubiquitination afin d'être internalisées. Ce procédé fait généralement suite à la liaison du ligand et induit la dégradation du récepteur, non pas par le protéasome, mais plutôt dans la vacuole (lysosome). À l'aide de mutants de la machinerie d'ubiquitination et de protéines membranaires dépourvues de lysines, il a été possible de prouver l'importance de l'ubiquitine dans cette interruption de signalisation [105]. Chez l'humain, plusieurs canaux ioniques et récepteurs subissent un sort similaire (revue dans [106]). En fait, la plupart des protéines ubiquitinées à la surface cellulaire sont ciblées vers les lysosomes pour leur dégradation et la mono-ubiquitination expliquerait la différence entre le ciblage protéasomal et lysosomal (revue dans [107]). De plus, l'internalisation serait directement assurée par la molécule d'ubiquitine. Il a été montré qu'une molécule peut être internalisée lorsque sa portion cytoplasmique est remplacée par un polypeptide ubiquitine. C'est un motif di-leucine encodé dans ce dernier qui est responsable de l'entrée de la molécule chimérique [108].

Les résidus lysines sont essentiels à l'ubiquitination, mais il semblerait que dans certains cas la phosphorylation d'une sérine adjacente soit requise. Ceci a été démontré par des études d'internalisation du récepteur de la phéromone, Ste2p, chez la levure.

En effet, cette protéine présente un signal SINNDKSS dont l'ubiquitination de la lysine est dépendante de la phosphorylation des sérines voisines, influençant conséquemment l'internalisation ([108;109]).

1.3.3.3 Ciblage endosomal

Tel que mentionné ci-haut, une protéine membranaire nécessite parfois une ubiquitination afin d'être négativement régulée par endocytose et dégradée dans les lysosomes. Toutefois, avant de se rendre au lysosome, les protéines passent par les compartiments multivésiculaires (MVB) où leur destin est déterminé. Effectivement, les protéines de levures et humaines qui seront internalisées dans les vésicules du lumen seront dégradées ou sécrétées sous forme d'exosomes, tandis que celles qui demeurent à la membrane limitante du MVB pourront être recyclées (revue dans [110]).

Le ciblage vers les MVBs n'est pas seulement effectué sur les molécules provenant de la membrane, mais aussi sur celles ressortant du Golgi. Les protéines nouvellement synthétisées passent par l'appareil de Golgi, où elles peuvent être ubiquitinées afin d'être directement envoyée du Golgi aux endosomes (revue dans [111]). L'ubiquitination à titre de signal de la voie endosomiale a d'abord été envisagée par des observations faites sur le récepteur du facteur de croissance épidermal (EGFR). L'expression de surface de celui-ci était maintenue malgré la surexpression d'une ubiquitine ligase spécifique, et même si une augmentation de son entrée dans les lysosomes était notée [112]. La mono-ubiquitination est encore une fois responsable de ce type de ciblage. Lorsque l'ubiquitine lie la queue cytoplasmique d'une protéine transmembranaire, le signal est reconnu par les protéines de la famille des ESCRT (voir section 1.2.2 ci-dessus). Les protéines ESCRT portent toutes des domaines de liaison de l'ubiquitine (UBDs) leur permettant de reconnaître les cargos ubiquitinés. Les ESCRT-I, II et III, vont agir de façon séquentielle dans le but de déplacer le cargo vers les vésicules bourgeonnant dans le MVB. Ce système a d'abord été particulièrement bien établi chez la levure, mais est maintenant aussi bien connu chez l'humain (revue dans [97;102]) (voir Figure 10).

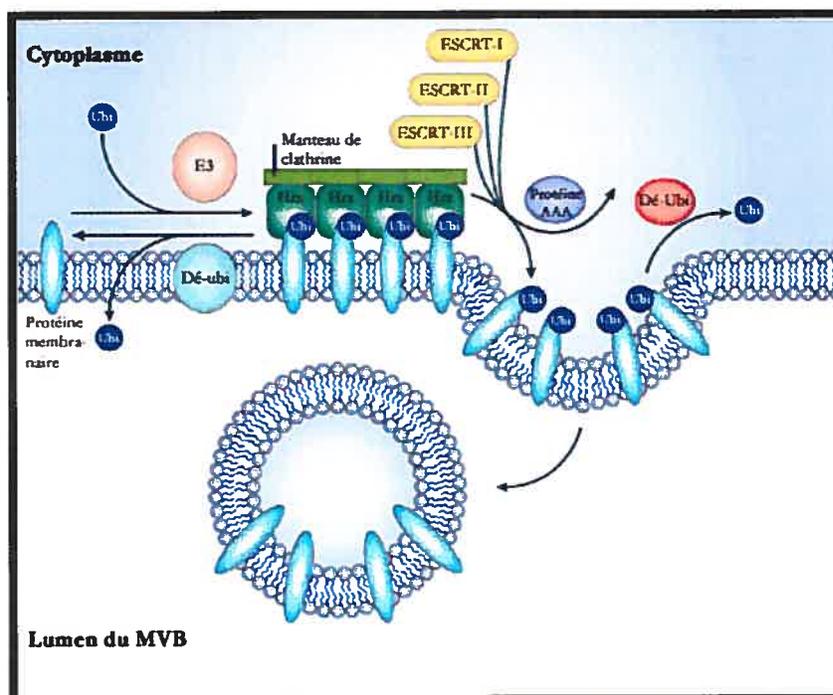


Figure 10. Ciblage de protéines membranaires ubiquitinées vers les MVBs

L'attachement d'une protéine portant un motif d'interaction d'ubiquitine telle que Hrs (hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine-kinase substrate) déclenche le processus d'entrée de la protéine membranaire dans les vésicules intraluminales. Un manteau de clathrine permettant la concentration de récepteurs ubiquitinés peut alors se former. Ensuite, Hrs recrute ESCRT-I par l'interaction avec l'une de ces sous-unités (TSG-101) qui pourra alors lier l'ubiquitine. Les ESCRT-II et III sont par la suite assemblées et la protéine est déplacée vers les vésicules du MVB. La protéine AAA (ATPases associated with various cellular activities) permet le désassemblage de la machinerie ESCRT, tandis que l'ubiquitine est recyclée grâce à l'enzyme de dé-ubiquitination (orange). Une autre enzyme de dé-ubiquitination (bleu) est parfois disposée à même la membrane limitante de l'endosome afin de contrer l'effet de l'ubiquitine ligase E3. Ubi, ubiquitine; MVB, compartiment multivésiculaire. Modifiée de l'original : [97].

Le ciblage vers les MVBs de protéines mono-ubiquitinées suggère leur incorporation possible dans les exosomes. Effectivement, l'équipe du Dr Stoorvogel a récemment démontré la présence de protéines ubiquitinées dans les exosomes. Ce phénomène est inattendu puisque les enzymes de déubiquitination détachent l'ubiquitine des protéines avant leur entrée dans les MVBs [113]. Pour démontrer leur hypothèse, ils ont traité les vésicules exosomales au carbonate alcalin afin de permettre l'ouverture des membranes et la relâche de leur contenu. Seules les protéines ancrées dans la membrane

restaient intactes. Ainsi, ils ont constaté que les molécules détectées dans les exosomes n'étaient pas membranaires, mais probablement solubles. De plus, l'emploi d'anticorps spécifiques aux protéines poly-ubiquitinées a permis de constater une majorité de ces dernières à l'intérieur des exosomes. Il a été proposé que la présence de protéines poly-ubiquitinées dans les exosomes résulte d'un phénomène de micro-autophagie. En effet, plusieurs protéines ubiquitinées sont retrouvées dans les lysosomes sécrétoires lors de la micro-autophagie d'une cellule [114]. Conséquemment aux découvertes du Dr Stoorvogel, les protéines ubiquitinées pourront maintenant servir de marqueurs pour les vésicules exosomales [115].

1.3.4 ASPECTS IMMUNOLOGIQUES

1.3.4.1 Apprêtement et présentation d'antigènes

La présentation antigénique reliée à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques nécessite l'apprêtement d'un peptide antigénique, généralement intracellulaire, et son exposition à la surface de la cellule sur une molécule du CMH-I (voir section 1.1) [5]. Ces différents peptides sont générés par le protéasome qui, comme mentionné plus haut, détruit les protéines qui y sont ciblées suite à une poly-ubiquitination. Par l'usage d'inhibiteurs du protéasome, il a été possible de démontrer que la présentation de plusieurs protéines était inhibée. En fait, cela résultait de l'échec dans l'assemblage en complexes stables des CMH-I dû à l'absence d'antigènes (revue dans [116]). Certains virus inhibent le protéasome dans le but d'éviter la réponse immunitaire. Le blocage n'est toutefois pas complet, puisque le protéasome est essentiel à la survie cellulaire [117].

1.3.4.2 Régulation négative du CMH de classe I

Les virus ont développé plusieurs tactiques leur permettant de ne pas être découverts lorsqu'ils infectent une cellule. Le blocage de la présentation antigénique en est une. Il est aussi possible de carrément empêcher le CMH-I de se rendre à la surface. C'est ce que réussit à faire le virus herpès causant le sarcome de Kaposi (KHSV). Deux des protéines qu'il encode, K5 et K3, vont agir comme ubiquitine ligases (E3) et réguler négativement l'expression de surface du CMH-I [118]. Le CMH-I ubiquitiné sera

conséquemment envoyé vers les lysosomes pour y être dégradé. Ces ligases sont principalement exprimées dans le réticulum endoplasmique, mais interagissent avec la molécule du CMH après son passage dans le Golgi. Puisque les ligases K3 et K5 requièrent l'action des enzymes de conjugaison (E2) présentes dans les endosomes tardifs, elles doivent être présentes dans ces compartiments (revue dans [117]).

1.4 Objectifs et hypothèses de travail

Les exosomes peuvent aujourd'hui être employés à des fins thérapeutiques et immunologiques. Une meilleure exploitation de ces outils commence par la compréhension de leur formation et de leur composition protéinique. L'objectif principal de nos recherches a été d'établir les mécanismes relatifs à l'intégration des protéines du CMH-II, plus particulièrement de la molécule classique HLA-DR et de la molécule non-classique HLA-DM, dans les exosomes. Pour ce faire, nous avons abordé le problème sous deux angles différents : l'ubiquitination et l'exploitation de motifs de ciblage.

En premier lieu, nous avons émis l'hypothèse que l'ubiquitination était responsable du ciblage de HLA-DR dans les membranes exosomales. Aucune étude n'a encore montré l'ubiquitination de DR, mais ce dernier possède dans sa queue cytoplasmique plusieurs résidus lysines susceptibles d'être ubiquitinés. On sait déjà que l'ubiquitination est impliquée dans le ciblage de protéines membranaires dans les MVBs (revue dans [119]). Les MVBs sont les compartiments qui, lorsqu'ils fusionnent avec la membrane plasmique, vont relâcher des exosomes. Ainsi, beaucoup de protéines ubiquitinées se retrouvant dans les MVBs seront reconnues par la machinerie responsable de l'invagination, du bourgeonnement et de la fission de la membrane limitante des MVBs et finiront dans les exosomes (revue dans [97;102]). Les objectifs de cette partie du travail sont : 1) établir un système avec les cellules HeLa pour approfondir nos études sur les exosomes; 2) tester l'effet direct de l'attachement de l'ubiquitine par l'usage de chimères DR β -ubiquitine sur l'incorporation du DR dans les exosomes; et 3) déterminer indirectement l'importance de l'ubiquitination dans le ciblage de DR aux exosomes par l'usage d'une molécule HLA-DR sans résidus lysines.

En second lieu, nous avons évoqué la possibilité d'un motif influençant l'entrée de HLA-DM dans les exosomes. HLA-DM possède un motif tyrosine dans sa queue cytoplasmique qui lui permet de se déplacer de l'appareil de Golgi vers les endosomes tardifs. Ce motif lui permet d'être rapidement internalisé de la surface cellulaire et d'être exprimé à la membrane limitante des MIICs [12;13]. Ces derniers peuvent aussi être

appelés MVB lorsqu'ils accumulent des vésicules internes. Récemment, il a été démontré que c'était au sein de ces vésicules internes que DM interagissait avec DR afin de moduler la présentation antigénique [120]. De plus, il a été montré que la mutation du motif tyrosine de HLA-DM provoquait son expression à la surface des cellules et donc probablement modifiait son ciblage dans la voie endocytaire [12]. Les objectifs alors poursuivis sont : 1) caractériser les exosomes sécrétés par les cellules HeLa et les lymphocytes B; 2) tester l'importance du motif YXXL dans le ciblage de DM aux exosomes; et 3) établir le rôle de DR dans l'inclusion de DM dans ces vésicules exosomales.

*Chapitre 2 Articles***2.1 EVIDENCE THAT INCORPORATION OF HLA-DR INTO EXOSOMES IS INDEPENDENT OF UBIQUITINATION OF ITS CYTOPLASMIC TAILS**

Marie-Élaine Gauvreau*, Alexandre Brunet* and Jacques Thibodeau*

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

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:** XXXXXXXXXX

2.1.1 CONTRIBUTION ET ACCORD DES AUTEURS

Marie-Elaine Gauvreau

Maîtrise en Microbiologie et Immunologie

Article par : Marie-Elaine Gauvreau, Alexandre Brunet et Jacques Thibodeau

Titre: Ubiquitination does not promote exosomal targeting of HLA-DR

Article en préparation

Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Elaine Gauvreau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Ubiquitination et ciblage des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe-II aux exosomes ».

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Contribution de l'étudiante à l'article

Ma participation à cet article est importante puisque j'ai fait une bonne partie des expériences. J'ai construit les chimères DR β -ubiquitines en designant les oligonucléotides, en effectuant les PCRs et en criblant les clones obtenus. J'ai de plus effectué les transfections stables de ces molécules dans les cellules HeLa, l'isolement des exosomes et les analyses par immunobuvardage. Certaines expériences de microscopie à fluorescence (figure 13b) ont été faites par moi de même que les tests de sensibilité à l'endoglycosydase H. D'autres expériences ont été réalisées à la fois par Alexandre et par moi afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

2.1.1 CONTRIBUTION ET ACCORD DES AUTEURS

Marie-Elaine Gauvreau

Maîtrise en Microbiologie et Immunologie

Article par : Marie-Elaine Gauvreau, Alexandre Brunet et Jacques Thibodeau

Titre: Ubiquitination does not promote exosomal targeting of HLA-DR

Article en préparation

Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Elaine Gauvreau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Ubiquitination et ciblage des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe-II aux exosomes ».

ALEXANDRE BRUNET

Coauteur

18/05/2006

Date

Coauteur

Signature

Date

Contribution de l'étudiante à l'article

Ma participation à cet article est importante puisque j'ai fait une bonne partie des expériences. J'ai construit les chimères DR β -ubiquitines en designant les oligonucléotides, en effectuant les PCRs et en criblant les clones obtenus. J'ai de plus effectué les transfections stables de ces molécules dans les cellules HeLa, l'isolement des exosomes et les analyses par immunobuvardage. Certaines expériences de microscopie à fluorescence (figure 13b) ont été faites par moi de même que les tests de sensibilité à l'endoglycosydase H. D'autres expériences ont été réalisées à la fois par Alexandre et par moi afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

2.1.2 RESUME

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle impliquée dans la dégradation protéasomale/lysosomale et le trafic intracellulaire des protéines. La mono-ubiquitination a été associée au ciblage protéique dans les membranes internes des compartiments multivésiculaires (MVBs). Les MVBs sont générés par l'invagination et la fission de la membrane limitante. Lors de la fusion des MVBs avec la membrane plasmique, leur contenu est relâché à l'extérieur de la cellule et les vésicules s'appellent alors des exosomes. Les cellules présentatrices d'antigènes, les réticulocytes et même les cellules HeLa sécrètent des exosomes. HLA-DR, une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, est accumulé dans ces vésicules membranaires. Toutefois, le mécanisme exact de cette inclusion n'est pas encore bien caractérisé.

Afin de déterminer le rôle de l'ubiquitination dans ce processus, nous avons transfecté de façon stable des cellules HeLa avec une molécule HLA-DR chimérique. La région transmembranaire de la chaîne bêta a été fusionnée à une molécule d'ubiquitine à l'emplacement de sa portion cytoplasmique. Dans le but de minimiser la poly-ubiquitination, nous avons employé une molécule ubiquitine dont la lysine 48 a été mutée pour une arginine (K48R). Cette chimère était faiblement exprimée à la surface cellulaire, mais s'accumulait dans la voie endocytaire. Les exosomes sécrétés par ces cellules ont été isolés et analysés par immunobuvardage.

Nos résultats n'ont révélé aucune inclusion sélective des chimères aux exosomes. Pour s'assurer du ciblage exosomal ubiquitine-indépendant de DR, nous avons répété ces expériences avec une molécule DR dépourvue de tous résidus lysines cytoplasmiques. Cette protéine mutante est bien exprimée à la membrane plasmique et se retrouve dans les compartiments portant des marqueurs lysosomiques. Curieusement, la mutation des lysines de cette molécule n'affecte pas son entrée dans les exosomes et nous oblige à conclure que ce ciblage est donc indépendant de l'ubiquitination.

2.1.3 ABSTRACT

Major histocompatibility complex class II molecules accumulate in exocytic membranes that are secreted from antigen presenting cells. Such vesicles are called exosomes and are released following the fusion of multivesicular bodies (MVBs) with the plasma membrane. The exact signals or molecules implicated in the selective incorporation of HLA-DR into the internal membranes of MVBs and exosomes have yet to be characterized. Mono-ubiquitination is a post-translational modification recently associated with internalization of receptors from the cell surface and with sorting of various cargo molecules into MVBs. To gain insight into the role of this post-translational modification in the trafficking of MHC class II, we stably transfected HeLa cells with an HLA-DR molecule where the beta chain cytoplasmic tail was replaced by ubiquitin. Although the steady-state expression of this chimera was low in transfected cells, Western blot analysis did not reveal a strong accumulation into exosomes purified from the culture medium. To further characterize the role of ubiquitination in sorting of class II molecules in exosomes, we generated by site-directed mutagenesis a DR molecule devoid of lysine residues in its α and β chain cytoplasmic tails. Expression level of this molecule in HeLa cells was very similar to that of the wild-type DR1 heterodimer. Both are well expressed at cell surface and immunofluorescence microscopy showed colocalization with late endosomes markers. However, elimination of the cytoplasmic lysines by site-directed mutagenesis did not preclude incorporation of HLA-DR into exosomes. Altogether, these results suggest that ubiquitination of MHC class II molecules is not a prerequisite for incorporation into exosomal membranes.

2.1.4 INTRODUCTION

Histocompatibility leukocyte antigens such as HLA-DR are MHC-II molecules required for peptide presentation to CD4+ T cells(1). HLA-DR molecules are formed following the association of α and β chains in the ER (2). Three alpha-beta heterodimers form a nonameric complex including three invariant chains (Ii) (3;4). The luminal part of Ii folds in the peptide groove to avoid binding of endogenous peptides in the ER (5) The complex ends-up in endosomes where the Ii is degraded, except for the residual class-II-associated Ii peptide (CLIP) in the class II groove. This fragment is removed by the non-classical MHC molecule, HLA-DM, which catalyzes peptide exchange in MHC class-II rich compartment (MIIC)(6;7).

MIICs include distinct types of vesicles of which multivesicular bodies (MVBs) are the most characteristic structurally(8). The accumulation of internal vesicles is due to the inward budding of endosomes microdomains (9) and these structures would play a crucial role in the loading of peptides on the major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecule (10). FRET experiments by Neefjes's group have recently demonstrated that DR and DM interact exclusively on the internal membranes of MVBs (11). When the limiting membrane of these vesicles fuses with lysosomes, the protein contents is most likely degraded by lysosomal hydrolases (reviewed in(12;13). However, when fusion occurs with the plasma membrane, microvesicles are released in the extracellular environment(14;15). Most cell types have been shown to secrete these 50-90 nm vesicles, which are then called exosomes. Exosomes from APCs would have immunomodulatory properties through their interaction with DCs (reviewed in(16;17).

Exosomes are enriched in tetraspanins, lipid rafts and immunostimulating molecules. MHC class I and class II, mostly HLA-DR, selectively accumulate in exosomes but the sorting means involved have yet to be characterized (17). Mono-ubiquitination is a likely mechanism as this post-translational modification was shown to regulate internalization and MVB entry of the stimulated EGF receptor (18-20). Moreover, studies in yeast

demonstrated the importance of ubiquitination reactions in the transport of cargo molecules into the vacuole (reviewed in (21)). This particular sorting requires also ESCRT-I (composed of Vps23, Vps28 and Vps37 in yeasts) function to recruit the ubiquitinated cargo and promote its sorting in MVBs. The internalization signal device of ubiquitin is encoded in the polypeptide itself: fusion in frame of ubiquitin to the cytoplasmic tail of a transmembrane protein induces its internalization even if the protein lacks lysines (22;23). By the fusion of ubiquitin in the cytoplasmic tail of the invariant chain, it was shown that the molecule was rapidly internalized and send to endosomes/lysosomes compartments. The ubiquitin di-leucine motif seemed responsible of this targeting (22).

To analyse the potential impact of ubiquitination on the sorting of HLA-DR to the internal membranes of MVBs, we created two different mutant class II molecules. First, we replaced the cytoplasmic tail of the DR β chain by the ubiquitin polypeptide. Also, to prevent any form of ubiquitination of the class II molecule, we generated lysine-less DR alpha and beta chains. Upon transfection of these constructs into HeLa cells, exosomes were purified to study their incorporation. Our results suggest that ubiquitination is not implicated in microvesicular sorting.

2.1.5 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids

HLA-DR β mutagenesis

The cytoplasmic tail of HLA-DR β was replaced by the ubiquitin polypeptide. To construct the SR α -puroDR β -ubi plasmid, we used the PCR overlap extension method (24). A first fragment was amplified from pBSDR β 008 using the universal primer and a mutagenic primer overlapping the end of the DR β transmembrane and the N-terminal region of the ubiquitin protein (oligonucleotide DR β 3'b: 5'-GAAGATTCTGCATTCGAAAGTAG ATGAAC-3'). A second reaction was made on the pCW8 plasmid, encoding a ubiquitin mutant with a lysine to arginine change at position 48 (25), using a complementary 5' primer (Ubi-DRb5'c: 5'-GTTTCATCTACTTTTCGAATGCAGATCT TC-3') and a 3' primer (Ubi3'*Bam*HI-*Cla*I.d: 5'-GGCCTTATCGATGGATCCTCAACCACCT CTTAGTCT-3'). Following the overlap reaction, the PCR product was subcloned into the *S*tyI and *C*laI sites of pBSDR β and then subcloned into the *B*amHI site of SR α puro. The DNA alignment was confirmed by sequencing.

In order to create truncated DR α KGRGstop lysine less mutant, a first fragment was amplified from pBS DR α Ori2 using the reverse primer and a mutagenic primer (DR α KG:RGstop.c 5'-TTC ATC ATC AGG GGT TAA CGC AAA AGC-3'). A second fragment was amplified from pBS DR α Ori2 using a complementary mutagenic primer (DR α KG:RGstop.b: 5'-GCT TTT GCG TTA ACC CCT GAT GAT GAA-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 *P*stI, cloned into RSV.5neo DR α and sequenced.

Cells lines and transfections

Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, Québec) and appropriate selective agents (see below). HeLa cells were transfected using Fugene6 (Roche Diagnosis, Canada). G-418 (Gibco-BRL, Burlington, ON) was added to a final concentration of 500 µg /ml. Cells were sorted using magnetic beads (Dynal Inc., NY, USA).

Antibodies

L243 mAb (IgG_{2a}) binds a specific DR α conformational determinant (26). The anti-Lamp-3 (CD63) monoclonal antibody H5C6 (IgG₁, κ) is from the Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa, IA. The 50H19 mAb reacts with the human CD9 (27). XD5.117 (IgG₁) is an anti-DR β mAb (28). The anti-Lamp-1 (CD107a) mAb H4A3 (IgG₁, κ) reacts with the 110 kDa lysosomal-associated membrane protein (Developmental Studies Hybridoma Bank).

Fluorescence microscopy

Cells were plated on cover slips in 24 well plates and cultured for 3 days before intracellular staining as described (29;30). Conventional epifluorescence micrographs were obtained on a Zeiss Cell Observer system equipped with an Axiovert 200M microscope. Images were digitally deconvoluted with the AxioVision 3.1 software using the nearest neighbor deconvolution method that uses Agard's formula (31).

Exosome extraction and purification

Cells were grown in ten 175-cm² flasks in medium supplemented with serum that was spun at 100000 g for 60 min to remove bovine exosomes. When cells reached confluence (3×10^8 cells), fresh exosome-free cell culture media was added to flasks and cells were incubated 24 hours. 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 0,22 µm Qiagen stericup. After a second centrifugation at 1200 g, the medium was centrifuged for 30 min at 10000 g and exosomes were collected following a spin for 60

min at 100000 g. The final pellets (approximately 60 µg of proteins for HeLa cells and 90 µg for B cells) were resuspended in 5 ml of 2.6 M Sucrose, 20 mM Tris/HCL, pH 7.2 and overlaid with a linear density gradient (2.0-0.25 M Sucrose in 20 mM Tris/HCL, pH 7.2). Exosomes were centrifuged in a SW41Ti rotor for 18 h at 270000 g. Fractions of 1 ml were collected and precipitated in 20% TCA for 30 min on ice. Exosomes were spun, washed with cold acetone and spun again. Supernatant was removed and pellets were dried.

Electron microscopy

HeLa CIITA exosomes analysis by negative staining

After flotation gradients, exosome fractions (about 10^7 particles per ml) were centrifuged on formvar-coated electron microscopy nickel grids using an airfuge (Airfuge, Beckman, Palo Alto, CA, USA) (32;33). Exosomes were centrifuged at 120 000 g (20 psig) for 5 minutes and staining was performed directly on grids fixed in PBS-PFA 4% and preincubated with PBS-ovalbumin 1% to prevent non-specific binding. Grids were then incubated in PBS-primary antibodies for 1 h at RT before three consecutive 5 min PBS washes. Exosomes were then incubated with 12 nm or 18 nm gold beads-coupled secondary antibodies for 1 h 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)

HeLa CIITA cells analysis in Epoxy-embedded sections

HeLa CIITA cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer. Post-fixation of cell pellets was performed using 2% OsO₄ in s-collidine buffer for 2 hours at 21°C. The cell pellet was dehydrated in acetone before embedding and polymerization. Epoxy (SPURR) sections were stained using lead citrate and uranyl acetate.

Western blotting

The exosome 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 peroxidase-coupled goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies were used (Bio/Can.

Scientific, Ont. Canada). After washings, the membrane was developed by chemiluminescence (Boehringer-Mannheim, Germany) on Kodak XAR-5 films.

2.1.6 RESULTS AND DISCUSSION

HeLa CIITA cells possess multivesicular bodies and secrete exosomes.

Although exosomes have been purified from a variety of cell types and lines, we ascertained that our HeLa cells used for protein expression could secrete such vesicles. First, we performed electronic microscopy on HeLa cells expressing the class II transactivator CIITA. Figure 11A shows the presence of a multitude of multivesicular bodies (MVBs) (*) close to the plasma membrane (PM). The small internal vesicles are likely to be shed as exosomes and we collected the culture medium from such cells for electron microscopy analyses. Exosomes were concentrated by ultracentrifugation and purified on a sucrose gradient. Material corresponding to a density of 1,08 to 1,18 g/ml was analyzed (Fig. 11B). The morphology, size (50-100nm) and the presence of molecules such as CD63, CD9 and HLA-DR (data not shown), allowed us to conclude that HeLa cells produce exosomes.

An HLA-DR β -ubiquitin chimera does not preferentially accumulate into exosomes

To assess the potential impact of ubiquitination of class II molecules on cell surface expression and incorporation into exosomes, we have used a system described previously for the invariant chain. Nakatsu et al. have shown that fusion of ubiquitin to this class II chaperone could mediate efficient endocytosis from the plasma membrane and deliver the chimera to the endocytic pathway (22). We have used a mutant form of the ubiquitin polypeptide where the lysine 48 was mutated to arginine in order to minimize the chances of getting polyubiquitin chains (Fig. 12A and B). This chimeric β chain was stably expressed into HeLa cells together with a truncated α chain devoid of lysine residues in its cytoplasmic region (Fig. 12C). Cells positive for DR at the plasma membrane were sorted with a DR-specific antibody. When compared to cells expressing

the wild-type DR molecule, the HeLa DR α KGRGstop/DR β -ubiK48R cells showed a reduced total expression as measured by flow cytometry on permeabilized cells (Fig. 13A). Moreover, plasma membrane expression was dramatically reduced for the chimeric molecule. Confocal microscopy revealed that the intracellular distribution of the chimeric molecule was very similar to the one observed for wild-type DR in as much as both accumulate in CD63+ punctuate vesicles of the endocytic pathway (Fig.13B). However, many cells displayed a diffuse staining reminiscent of an accumulation in the ER (not shown). This would be consistent with the fact that a substantial fraction of the β chain remains EndoH-sensitive in these cells (Fig.13C).

The reduced cell surface expression of the chimeric DR α KGRGstop/DR β -ubiK48R molecule could be explained by the dileucine-like motif found in the ubiquitin molecule, which acts as an internalization signal (22). Ubiquitin is known to influence targeting of many molecules from cell surface to MVBs (reviewed in (34)). We reasoned that the chimeric molecule would probably accumulate in these multivesicular compartments and be shed as part of exosomes. We used the stably transfected HeLa cells expressing DR α KGRG/DR β -ubiK48R and control DR1 to isolate exosomes. After ultracentrifugation of the culture medium, the exosomes were isolated by ultracentrifugation on a sucrose gradient. Fractions were collected and precipitated with TCA. Exosomes are mainly found between 1.08 and 1.18 g/ml (*) (35). Figure 14 shows the accumulation of wild-type DR β in exosomal vesicles as well as the presence of the chimera in the corresponding fractions. The tetraspan protein CD9 is enriched in exosomal fractions (36) and immunoblotting of this marker confirms the integrity of the preparations. The class II molecules that accumulate in the exosomes were all resistant to EndoH, suggesting a passage through the Golgi apparatus (not shown). Although difficult to ascertain quantitatively, these results suggest that the weak cellular expression of the chimeric DR-ubiquitin molecule cannot be explained by the selective shedding into exosomes. These experiments rely on a chimeric molecule which could exhibit a conformational defect or which could not reproduce the effect of ubiquitination in a specialized compartment. Moreover, by sorting cells expressing the chimera at the surface, we might have selected cells with defects in their endosomal pathway or in their

degradative machinery. Also, we could not rule out that some polyubiquitination events occurred. These caveats prompted us to study the role of class ubiquitination by a different approach.

A DR molecule devoid of lysine residues in its cytoplasmic tails accumulates in exosomes. Ubiquitin was shown to covalently bind target proteins through an isopeptide bond between its glycine⁷⁶ residue and a specific target's lysine residue (reviewed in (37)). As HLA-DR possesses one and two lysine residues in its β and α chain cytoplasmic tails, respectively. Thus, ubiquitination could be invoked as a regulatory post-translational modification. To rule out this possibility, we created lysine-less α (DR α KGRGstop) and β (DR β 5AAA) chains that were stably transfected together in HeLa cells. We also used a DR α TM molecule devoid of most of its cytoplasmic tail but retaining one lysine at the junction of the transmembrane (38). This last molecule was paired with a wild type DR β chain (DR α TM/DR β wt, fig. 12c). Surface and total stainings were performed using the L243 antibody specific for DR α /DR β heterodimers (fig. 15a). Both molecules had comparable expression levels and fluorescence microscopy showed co-localization of the modified DR molecules with a late endosome marker; Lamp-1.

Exosomes were prepared and the immunoblotting revealed the presence of class II molecules and CD9 to very comparable levels between the two transfectants. The molecules bearing lysines are not preferentially integrated in exosomes than those which cannot be ubiquitinated. Nevertheless, our results are, over all, supported by a recent study (39). In this paper, ubiquitinated proteins were demonstrated to be present in exosomes. Interestingly, proteins found in exosomes are not transmembrane proteins but seems to be soluble proteins. Their integration would come from the invagination of the limiting membrane of MVBs that will include cytoplasm (39). Normally, if a membrane protein is ubiquitinated and send to MVBs, its ubiquitin moiety will be recycled before the inclusion into vesicles; explaining the absence of ubiquitinated transmembrane protein in exosomes. Still, many proteins send in MVBs and integrated in exosomal vesicles are ubiquitin-independent and might depend on the action or segregation by other proteins like tetraspanins (40;41).

The de Gassart group has proposed that the entry of MHC class II into exosomes depends on their association with lipid raft domains(42). They support the idea that low recycling kinetic proteins accumulate in lipid rich microdomains for degradation or exosomal secretion. They also sustain that the rafts could constitute a platform for sorting of ubiquitinated cargoes into exosomes (42).

2.1.7 CONCLUSION

Many different mechanisms were exposed to explain how cargo molecules are sorted into exosomes but the issue is still a matter of debate. Here, we are excluding one of the hypotheses by demonstrating the lack of a role for ubiquitination in the incorporation of HLA-DR in exosomal vesicles. Indeed, the DR β -ubiquitin chimera and lysine-less DR molecules are found in exosomes to levels reflecting their total level of expression. Therefore, more studies are needed to determine or to explain the HLA-DR insertion in secreted microvesicles. For example, the importance of lipid rafts and/or the association with tetraspan molecules should be investigated, allowing a better understanding of the role of these antigen presenting proteins in adaptive immunity.

2.1.8 REFERENCES

1. Unanue, E. R. (1992) *Curr.Opin.Immunol.* 4, 63-69
2. Cresswell, P. (1994) *Annual Review of Immunology* 12, 259-293
3. Lamb, C. A. and Cresswell, P. (1992) *J.Immunol.* 148, 3478-3482
4. Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. (1991) *Nature* 354, 392-394
5. Roche, P. A. and Cresswell, P. (1990) *Nature* 345, 615-618
6. Sanderson, F., Kleijmeer, M. J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neefjes, J. J., Geuze, H. J., and Trowsdale, J. (1994) *Science* 266, 1566-1569
7. Sherman, M. A., Weber, D. A., and Jensen, P. E. (1995) *Immunity* 3, 197-205
8. Nijman, H. W., Kleijmeer, M. J., Ossevoort, M. A., Oorschot, V. M. J., Vierboom, M. P. M., Van de Keur, M., Kenemans, P., Kast, W. M., Geuze, H. J., and Melief, C. J. M. (1995) *J.Exp.Med.* 182, 163-174
9. 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
10. Murk, J. L., Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., and Geuze, H. J. (2002) *Semin.Cell Dev.Biol.* 13, 303-311
11. Zwart, W., Griekspoor, A., Kuijl, C., Marsman, M., van Rheenen, J., Janssen, H., Calafat, J., van Ham, M., Janssen, L., van Lith, M., Jalink, K., and Neefjes, J. (2005) *Immunity.* 22, 221-233

12. Blott, E. J. and Griffiths, G. M. (2002) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3, 122-131
13. Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3, 893-905
14. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., and Turbide, C. (1987) *J.Biol.Chem.* 262, 9412-9420
15. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R. M. (1985) *J.Cell Biol.* 101, 942-948
16. Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J., and Raposo, G. (2002) *Traffic.* 3, 321-330
17. Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002) *Nat.Rev.Immunol.* 2, 569-579
18. Carter, R. E. and Sorkin, A. (1998) *J.Biol.Chem.* 273, 35000-35007
19. Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001) *Cell* 106, 145-155
20. Urbanowski, J. L. and Piper, R. C. (2001) *Traffic.* 2, 622-630
21. Hicke, L. (1999) *Trends Cell Biol.* 9, 107-112
22. Nakatsu, F., Sakuma, M., Matsuo, Y., Arase, H., Yamasaki, S., Nakamura, N., Saito, T., and Ohno, H. (2000) *J.Biol.Chem.* 275, 26213-26219
23. Roth, A. F. and Davis, N. G. (2000) *J.Biol.Chem.* 275, 8143-8153
24. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene* 77, 51-59
25. Ward, C. L., Omura, S., and Kopito, R. R. (1995) *Cell* 83, 121-127
26. Lampson, L. A. and Levy, R. (1980) *J.Immunol.* 125, 293-299

27. Masellis-Smith, A. and Shaw, A. R. (1994) *J.Immunol.* 152, 2768-2777
28. Radka, S. F., Machamer, C. E., and Cresswell, P. (1984) *Hum.Immunol.* 10, 177-188
29. Brunet, A., Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. J., and Thibodeau, J. (2000) *J.Biol.Chem.* 275, 37062-37071
30. Faubert, A., Samaan, A., and Thibodeau, J. (2002) *J.Biol.Chem.* 277, 2750-2755
31. Agard, D. A., Hiraoka, Y., Shaw, P., and Sedat, J. W. (1989) *Methods Cell Biol.* 30, 353-377
32. Alain, R., Nadon, F., Seguin, C., Payment, P., and Trudel, M. (1987) *J.Virol.Methods* 16, 209-216
33. Hammond, G. W., Hazelton, P. R., Chuang, I., and Klisko, B. (1981) *J.Clin.Microbiol.* 14, 210-221
34. Hicke, L. and Dunn, R. (2003) *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 19, 141-172
35. Theyry, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001) *J.Immunol.* 166, 7309-7318
36. Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., and Geuze, H. J. (1998) *J.Biol.Chem.* 273, 20121-20127
37. Ciechanover, A. and Ben Saadon, R. (2004) *Trends Cell Biol.* 14, 103-106
38. Robadey, C., Ammerlaan, W., Muller, C., Cloutier, I., Sékaly, R. P., Haefliger, J. A., and Demotz, S. (1997) *J.Immunol.* 159, 3238-3246
39. Buschow, S. I., Liefhebber, J. M., Wubbolts, R., and Stoorvogel, W. (2005) *Blood Cells Mol.Dis.* 35, 398-403
40. Reggiori, F. and Pelham, H. R. (2001) *EMBO J.* 20, 5176-5186

41. Vidal, M., Mangeat, P., and Hoekstra, D. (1997) *J.Cell Sci.* 110 (Pt 16), 1867-1877
42. de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003) *Blood* 102, 4336-4344

2.1.9 FIGURES

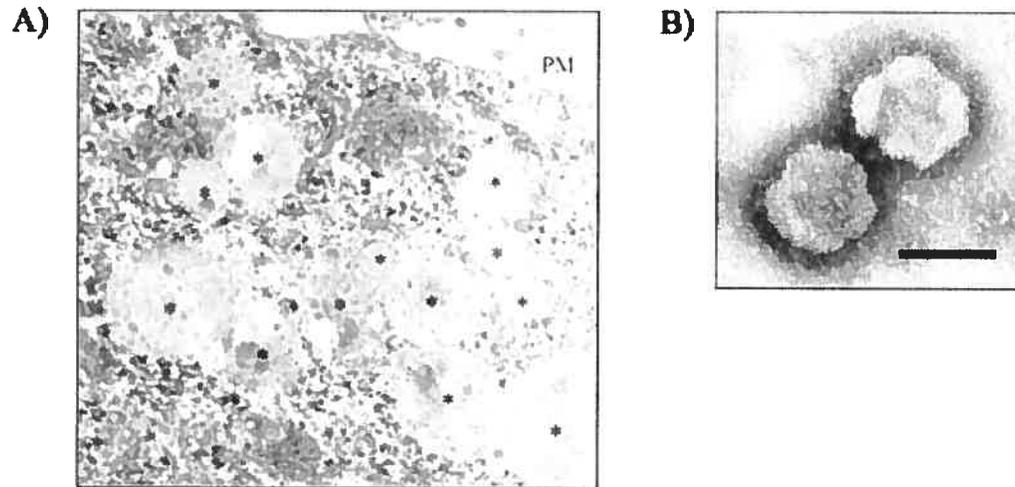


Figure 11. HeLa CIITA cells possess multivesicular bodies and secrete exosomes.

(A) HeLa CIITA cells were fixed, embedded and polymerized for electron microscopy observation of internal compartments. Multivesicular bodies are identified by an asterisk (*) and are shown near the plasma membrane (PM). (B) Exosomes from HeLa CIITA cells were purified on a continuous sucrose gradient (0.25 M-2 M sucrose). Fractions were collected and IEM was performed on whole-mounted exosomes from fraction 3. Bar, 100 nm.

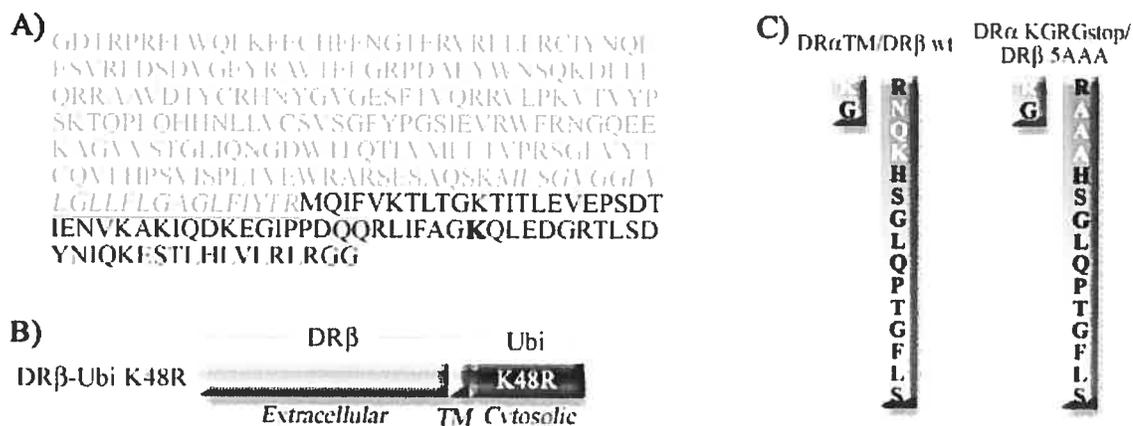


Figure 12. Molecules used in this study.

(A) Complete sequence of the DR β -ubiquitin chimera. Amino acids in grey are from the DR β chain. The underlined and *italic* are part of DR β transmembrane. The black amino acids are from ubiquitin polypeptide in which the bold lysine is the one mutated for an arginine (K). (B) Schematic representation of the DR β -ubiK48R chimera stably transfected in HeLa cells. (C) Schematic representation of DR α and DR β cytoplasmic tail modifications.

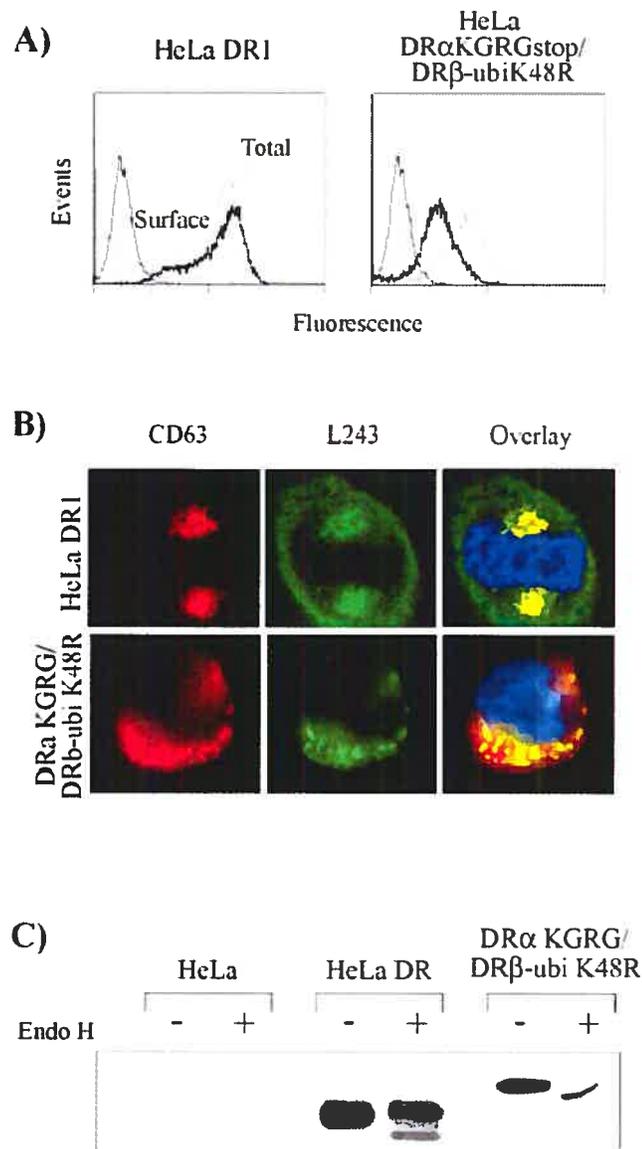


Figure 13. HLA-DR β -ubiquitin chimeras are endoH sensitive.

(A) Surface and total expression of HLA-DR wt and DR α KGRG/DR β -ubiK48R in stably transfected HeLa cells following staining with anti-DR antibody (L243) and FACS analysis. (B) HeLa DR1 and DR α KGRG/DR β -ubiK48R were permeabilized to analyze internal localization. Cells were stained for DR (L243, green) and for a specific late endosome marker (CD63, red). (C) Western blotting of total lysates exposed (+) or not (-) to Endo H, loaded on SDS-page gel, and revealed with DR β specific antibody (XD5).

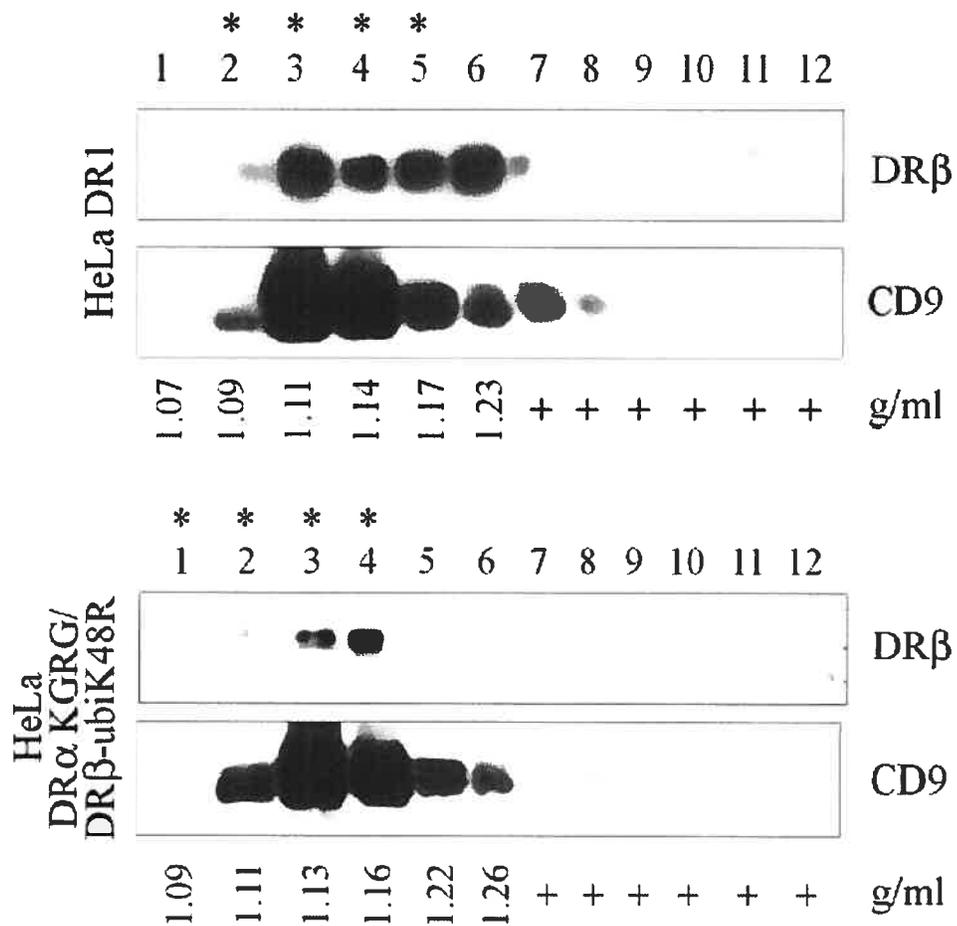


Figure 14. Ubiquitin does not positively affect HLA-DR exosomal targeting.

Exosomes from HeLa DR1 and HeLa DR α KGRG/DR β -ubiK48R were purified on a continuous sucrose gradient (0.25 M-2 M sucrose). Fractions were collected and blotted for expression of DR β (XD5) and CD9 (50H.19). Exosome-associated MHC class II molecules float at a density of about 1.08 to 1.18 g/ml. Asterisks (*) indicate exosomal fractions.

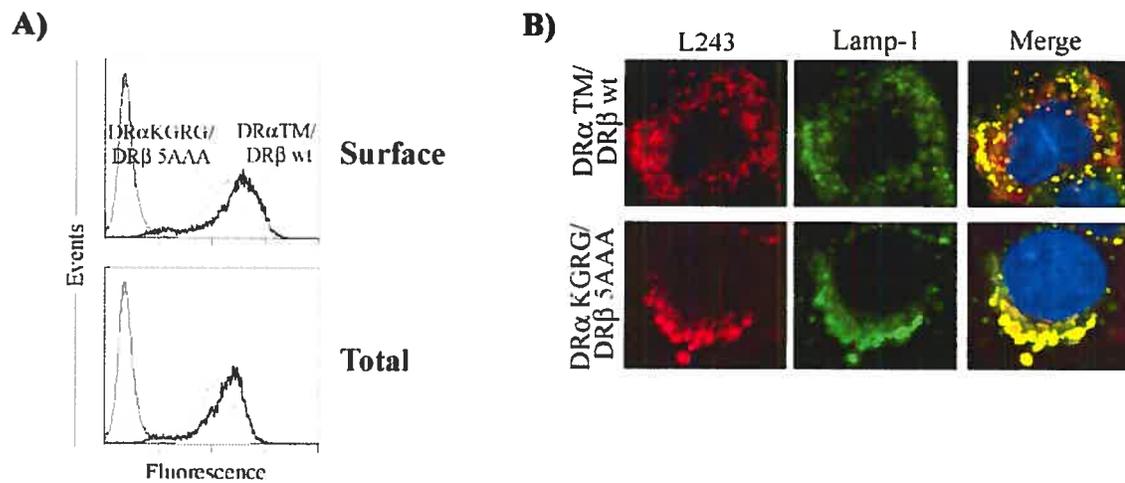


Figure 15. Lysine-less DR molecules accumulate in large compartments.

(A) Surface and total expression of DR α TM/DR β wt and DR α KGRG/DR β 5AAA in stably transfected HeLa cells following staining with anti-DR antibody (L243) and FACS analysis. (B) Cells were permeabilized to analyze internal localization. Cells were stained for DR (L243, red) and for specific late endosomal markers (Lamp-1, green).

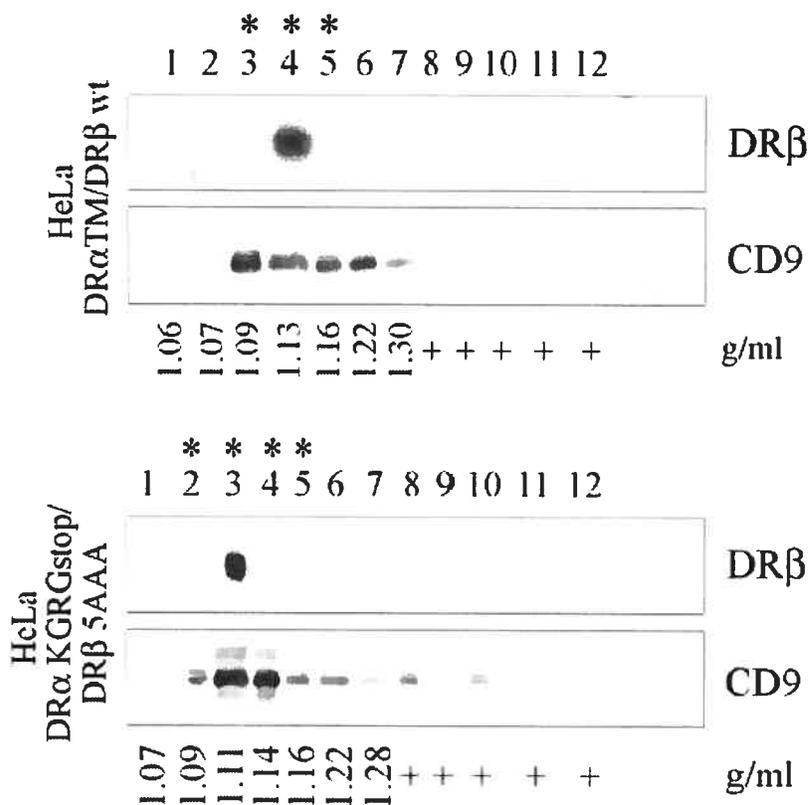


Figure 16. Lysine-less DR molecules have a normal level of expression in exosomal vesicles.

Exosomes from HeLa DRα TM/DRβ wt and HeLa DRα KGRG/DRβ 5AAA were obtained and analyzed as described in fig. 14. Asterisks (*) indicate exosomal fractions.

2.2 THE YXXL CYTOPLASMIC MOTIF OF HLA-DM PREVENTS SORTING INTO EXOSOMES

Alexandre Brunet*, Marie-Élaine Gauvreau*,
Andrew Shaw[‡] and Jacques Thibodeau*

* Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada. [‡] 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: 

2.2.1 CONTRIBUTION ET ACCORD DES AUTEURS

Marie-Elaine Gauvreau

Maîtrise en Microbiologie et Immunologie

Article par : Alexandre Brunet, Marie-Elaine Gauvreau, Andrew Shaw et Jacques Thibodeau

Titre: The YXXL sorting motif of HLA-DM prevents sorting into exosomes

Article à soumettre

Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Elaine Gauvreau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Ubiquitination et ciblage des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe-II aux exosomes ».

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Contribution de l'étudiante à l'article

Ma participation à cet article est aussi importante que celle d'Alexandre, mais davantage vers la fin du projet. Toutes les analyses par immunobuvardage des cellules HeLa utilisées dans ce papier ont été faites en parallèle par Alexandre et moi. J'ai de plus participé aux expériences et aux observations de microscopie électronique. Les expériences montrées dans la dernière figure de l'article ont entièrement été effectuées par moi. J'ai fait les transfections stables des molécules HLA-DR dans les cellules HeLa DM.5, les analyses de cytométrie en flux, l'isolement des exosomes et les analyses par immunobuvardage. J'ai de plus fait la microscopie à fluorescence et les immunoprécipitations.

2.1.1 CONTRIBUTION ET ACCORD DES AUTEURS

Marie-Elaine Gauvreau

Maîtrise en Microbiologie et Immunologie

Article par : Alexandre Brunet, Marie-Elaine Gauvreau, Andrew Shaw et Jacques Thibodeau

Titre: The YXXL sorting motif of HLA-DM prevents sorting into exosomes

Article à soumettre

Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Elaine Gauvreau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Ubiquitination et ciblage des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II aux exosomes ».

ALEXANDRE BRUNET
Coauteur

18/05/2006
Date

Coauteur

Signature

Date

Contribution de l'étudiante à l'article

Ma participation à cet article est aussi importante que celle d'Alexandre, mais davantage vers la fin du projet. Toutes les analyses par immunobuvardage des cellules HeLa utilisées dans ce papier ont été faites en parallèle par Alexandre et moi. J'ai de plus participé aux expériences et aux observations de microscopie électronique. Les expériences montrées dans la dernière figure de l'article ont entièrement été effectuées par moi. J'ai fait les transfections stables des molécules HLA-DR dans les cellules HeLa DM.5, les analyses de cytométrie en flux, l'isolement des exosomes et les analyses par immunobuvardage. J'ai de plus fait la microscopie à fluorescence et les immunoprécipitations.

2.1.1 CONTRIBUTION ET ACCORD DES AUTEURS

Marie-Elaine Gauvreau

Maîtrise en Microbiologie et Immunologie

Article par : Alexandre Brunet, Marie-Elaine Gauvreau, Andrew Shaw et Jacques Thibodeau

Titre: The YXXL sorting motif of HLA-DM prevents sorting into exosomes

Article à soumettre

Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Elaine Gauvreau inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Ubiquitination et ciblage des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe-II aux exosomes ».

ANDREW SHAW		19 May 06
Coauteur	Signature	Date

Coauteur	Signature	Date

Contribution de l'étudiante à l'article

Ma participation à cet article est aussi importante que celle d'Alexandre, mais davantage vers la fin du projet. Toutes les analyses par immunobuvardage des cellules HeLa utilisées dans ce papier ont été faites en parallèle par Alexandre et moi. J'ai de plus participé aux expériences et aux observations de microscopie électronique. Les expériences montrées dans la dernière figure de l'article ont entièrement été effectuées par moi. J'ai fait les transfections stables des molécules HLA-DR dans les cellules HeLa DM.5, les analyses de cytométrie en flux, l'isolement des exosomes et les analyses par immunobuvardage. J'ai de plus fait la microscopie à fluorescence et les immunoprécipitations.

2.2.2 RESUME

Le HLA-DM est une molécule non-classique du CMH de classe-II modulant la charge de peptides antigéniques sur des molécules telles que HLA-DR. L'échange peptidique s'effectue dans les compartiments riches en molécules du classe-II (MIICs). HLA-DM peut s'accumuler dans ces compartiments grâce à son signal de ciblage YTPL. Les MIICs regroupent des compartiments tels que les compartiments multivésiculaires (MVBs) contenant plusieurs vésicules internes dans lesquelles DR et DM interagissent. Les molécules HLA-DR matures chargées d'un peptide seront exprimées à la surface, mais s'accumulent aussi dans les exosomes. Ces nanovésicules sont relâchées par les cellules suite à la fusion des MVBs avec la membrane plasmique. Il est possible d'isoler les exosomes par l'ultracentrifugation du milieu de culture. Malgré la co-localisation de DR et DM dans les MIICs, la présence de DM sur les exosomes n'a pas encore été démontrée.

Dans l'article qui suit, nous montrons par immunoblot la présence de DM dans les exosomes sécrétés par les cellules B 721.45. De plus, nous avons obtenu des résultats semblables avec les cellules HeLa transfectées avec CIITA. Afin de mieux comprendre les mécanismes influençant l'inclusion exosomale, HLA-DM a été transfecté dans des cellules HeLa. Curieusement, dans ces conditions, HLA-DM n'était pas introduit dans les exosomes. Néanmoins, l'inactivation de son motif tyrosine YTPL par mutagenèse dirigée et la co-expression de HLA-DR provoquaient tous deux son expression dans les exosomes. Nous avons démontré l'interaction de DR et de DM par co-immunoprécipitation. Les résultats obtenus avec cette technique suggèrent aussi le masquage possible du motif tyrosine de DM par DR.

Ces résultats démontrent que les signaux de ciblage cytoplasmiques des protéines membranaires peuvent affecter leur inclusion aux exosomes et laissent présager la modulation probable de ces signaux par des interactions protéines-protéines.

2.2.3 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 accumulates due to its tyrosine-based targeting signal. These compartments include multivesicular bodies in which HLA-DR and -DM interact at the level of the internal membranes. 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 cell culture medium. Despite their co-localization with HLA-DR in MHC II-rich compartments, the presence of HLA-DM in exosomes remains to be demonstrated. Here, using the 721.45 B lymphoblastoid cell line, we showed by immunoblot that DM was present in exosomes. 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, under 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. Immunoprecipitation assay showed DR-DM interaction and the possible masking of the YXXL motif of DM by HLA-DR. Altogether, these results demonstrate that sorting signals in the cytoplasmic domains of transmembrane proteins can regulate exosome entry and raise the possibility that protein-protein interactions can modulate the activity of such signals.

2.2.4 INTRODUCTION

Multivesicular bodies (MVBs) of the endocytic pathway contain internal vesicles which are formed by inward budding of the outer membrane of the compartment [1]. They contain lipids and transmembrane proteins such as endocytosed activated receptors that will be degraded by 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 cells but there have 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 adjuvant 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 such sub-organelle structures are beginning to emerge. In yeast, monoubiquitination-dependent or -independent mechanisms have been described to explain sorting of proteins into the vacuoles [13]. The evidence that monoubiquitination could regulate entry into MVB vesicles of APCs is compelling. The group of Emr has shown that this post-translational modification can serve 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 not as 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, HRS proteins and the ESCRT complexes 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]). Contrary to classical MHC II molecules such as HLA-DR, DM contains a functional tyrosine-based lysosomal sorting motif and is found mostly inside late endosomes, referred to as MIICs (MHC class II compartments), and lysosomes [18-20]. Once thought of as specialized compartments, MIICs are now considered as regular endosomal structures 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 [23;24].

The exact sub-vesicular location of DM is not clear. IEM studies using various cell types suggest that DM mostly localized to the limiting membrane of MVBs [25-27]. Clearly however, some DM or reporter molecules fused to the cytoplasmic tail of DM β have been observed on internal membranes of MVBs or multilaminar compartments [18;19;28;29]. Very recently, the group of Neefjes has demonstrated using fluorescence resonance energy transfer (FRET) that DR-DM interactions occur solely in microdomains located at the level of the MVBs' internal membranes and which are sites of peptide editing [30]. The presence of DM in these vesicles should translate in its incorporation into exosomes. Given the functional importance surrounding the exact localization of DM, we sought to gain insights into its possible incorporation into exosomes and the molecular features regulating its localization. Our results suggest that the whereabouts of HLA-DM inside MVBs are influenced by the tyrosine-based sorting signal on its β chain and by other class II molecules.

2.2.5 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 β cytoplasmic region, a first PCR reaction was performed on pBS 1-DM β .1 using the reverse primer and a mutagenic primer (DM β Y230A Eco 47IIIb: 5'-AGG AAG AGG AGT AGC GCT AGA GTG GCC AGC-3'). A second fragment was amplified from pBS 1-DM β .1 using a complementary mutagenic primer (DM β 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 β .1 and sequenced (pBSDM β Y230A). Finally, a *Sal*I-*Xba*I fragment was cloned into RSV.5 neo plasmid [31].

Antibodies

L243 mAb (IgG_{2a}) binds a specific DR α conformational determinant [32]. The anti-Lamp-3 (CD63) monoclonal antibody H5C6 (IgG₁, κ) is from the Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa, IA. The 50H19 antibody mAb reacts with the human CD9 [33]. XD5.117 is an anti-DR β (IgG₁) mAb [34]. MaP.DM1 against HLA-DM was from Pharmingen (Pharmingen, USA) [35]. The rabbit serum against the cytoplasmic tail of DM β has been previously described [36]. 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 AlexaTMFluor 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 [37]. HeLa DR α TM +DR β (here called DR) and HeLa DM.5 cells were obtained from Dr. R.P Sékaly [35]. HeLa DM.5 is a clone from HeLa DM⁺ cells (a gift from Dr. R.P. Sékaly) obtained after transfection of the DM α and DM β cDNAs [35]. HeLa CIITA cells were previously described [10;38]. 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 α and Dm β Y-A using Fugene6 (Roche Diagnosis, Canada). Selective agents were added to a final concentration of 500 μ g /ml of G-418 (Gibco-BRL, Burlington, ON). Cells were sorted using magnetic beads (Dynal Inc., NY, USA). HeLa DM.5 were transfected with wild type DR α / β (HeLa DM.5+DR) also using Fugene6 and selected by adding neomycin (500ug/ml), puromycin(400ug/ml) (Sigma) and hygromycin (50 units/ml) (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada). They were sorted as described earlier.

Flow Cytometric 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[®]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 [36].

Fluorescence microscopy

Cells were plated on cover slips in 24 well plates and cultivated for 3 days before intracellular staining as described [36;39]. 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 Agard's formula.

Exosome extraction and purification

Cells were grown in ten 175-cm² flasks in medium supplemented with serum that was spun at 100000g for 60 min to remove bovine exosomes. When cells reached confluence (3×10^8 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 0.22 μ m Qiagen stericup. After a second centrifugation at 1200 g, the medium was centrifuged for 30 min at 10000 g and 60min at 100000 g (2X). Approximately 60 μ g of exosomal proteins were used for HeLa cell gradients. B-cell experiments were done with 90 μ g 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, 20 mM Tris/HCL, pH 7.2) in a SW41Ti tube for 18 h at 270000 g. Gradient fractions of 1 ml 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.

Immunoprecipitation

HeLa DM.5, DR1 and DM.5+DR cells were lysed into CHAPS 1% pH 5.5. After centrifugation, supernatants were harvested and washed with 10 μ l of magnetic beads ((Dyna) Inc., NY, USA) for 1h at 4°C with agitation. Cell lysates were transferred into new microtubes containing 20 μ l of magnetic beads coupled to MaP.DM1 (MapDM) antibody or to rabbit serum against DM β cytoplasmic tail (Rabbit DM). Samples were incubated 4 hours at 4°C with agitation. Beads were centrifuged and washed three times with lysate buffer containing CHAPS 0,5% before resuspension in 6X Blue Dye buffer (Biorad) for western blotting analysis.

Western blotting

The exosomes fractions and immunoprecipitation samples 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) (32;33). Formvar coated electron microscopy grid were placed into the bottom of the tube. Exosomes were centrifuged 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)

2.2.6 RESULTS

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

Cell-derived exosomes have been biochemically defined by their protein composition, their density on sucrose gradients (1.15-1.18g/ml) and their dimension in EM (35;36;46;65). Classical MHC class II molecules are ubiquitously enriched in exosome vesicles produced by most class II positive cells (45-48). It was suggested that HLA-DM molecule was excluded from these vesicles in human B cells (36). However, while attempting to confirm the impact of HLA-DO on the exclusion of DM from internal membranes of MVBs in B cells (61), we found that a significant amount of DM was incorporated into exosomes. These were extracted from the cell culture media of 721.45 B cells and purified by sucrose density gradients, as described (46). 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 exosome membranes (35;66). This tetraspanin is highly enriched in murine DC-derived exosomes (65). Therefore, CD9 was 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.17A). This is similar to D1-derived exosomes which migrate on a continuous sucrose gradient at densities of 1.14-1.20 g/ml (65). Exosomes isolated from tissue culture supernatants from various cell types typically have a sucrose buoyancy of 1.13g/ml (67). 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 (36;42;65;68). Here, only membranes with a sucrose density of 1.08-1.18 g/ml were considered exosomal membranes and were 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 in fractions 3 and 4 (F3-F4) corresponding to exosomes (Fig. 17A). 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 (35).

To confirm that HLA-DM was 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. 17B). Staining for DR was very strong with formation of 12 nm 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 (61). 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 (69). 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 18A). Sucrose gradient

experiments show that DR molecules can be found in light density exosomal fractions, 1.09-1.15 g/ml (Figure 18B). 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 β and HLA-DM β chains encode a functional tyrosine-based sorting motif (YXXL) responsible for their lysosomal localization (52-54). Such motif is also found in the cytoplasmic tail of many proteins such as Lamp-1, the transferrin receptor and the mannose 6-phosphate receptor (70). 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 α -DM β molecules (DM) or the DM α DM β Y-A mutant (DMY-A). Flow cytometric analysis of permeabilized cells confirmed the high and comparable levels of expression for both molecules (Fig. 19A). As expected, DM is expressed at very low levels 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. 19B). On the other hand, as previously described, the DMY-A mutant was redistributed at the plasma membrane and did not seem to accumulate in defined intracellular structures (52-54).

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 19C). 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 IEM the presence of DM on exosomes. The exosomal fraction were spun on grids and stained for DM, CD9 and CD63. Fig. 19D 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 (36;71). 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 β 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.

HLA-DR expression results in the inclusion of HLA-DM into exosomes.

The fact that DM was incorporated into exosomes secreted from a B cell line and CIITA-expressing HeLa cells suggested that other components of the class II antigen presentation machinery might play a role in the trafficking of DM. An obvious candidate was HLA-DR, which was found associated to DM on the internal membranes of MVBs (11). DM-expressing HeLa cells were stably transfected with HLA-DR (Fig. 20A) and the two molecules were shown to co-localize in cytoplasmic vesicles (Fig. 20B). Then, the exosomes secreted from these cells were purified and the Western blot analysis revealed that DR expression triggered the accumulation of DM molecules into the exosomal fractions of the sucrose gradient (Fig. 20C). Further investigations using immunoprecipitation showed the actual interaction between HLA-DR and HLA-DM in HeLa DM.5+DR cells. Interestingly, only MaP.DM1 antibody was capable of DR precipitation (Fig 20D). The rabbit serum seems unable to recognize its DM β cytoplasmic epitope when HLA-DR is co-expressed with HLA-DM. This result suggests the masking of the YTPL motif of HLA-DM by HLA-DR.

2.2.7 DISCUSSION

The means by which DM is excluded from exosomes in transfected HeLa cells remains to be determined. Membrane exchange between the internal and limiting membranes of MVBs is a continuous process (59;72). 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 (73). 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 (74). 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 (75). 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 (76). Additionally, Alix interacts with the ESCRT-I 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 hypothesize that unless its motif is somehow masked, HLA-DM will bind Alix through its tyrosine motif and will be relocated at the limiting membrane. Interestingly, truncated forms of DM arising from differential splicing have been suggested to encode molecules devoid of their YXXL motif (77). According to our results, such molecules would likely be included into exosomes.

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 (78). Our results show that MHC class II molecules are likely candidates. Transfection of DR in DM⁺ HeLa cells was sufficient to redistribute a fraction of the DM pool into exosomes. 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 (36).

The mechanism by which DR overcomes DM exclusion from exosomes is still a matter of speculation. First, the effect could be direct. The close proximity between DR and DM cytoplasmic tails might create steric hindrance, preventing adaptor molecules to interact with DM and keep it on the limiting membrane. Thus, the complex would be free to access regions of invagination and inward budding. Once on the internal membranes, DM would edit peptides on MHC class II molecules before dissociation of the complex and fusion of the internal vesicles with the limiting membrane of the MIICs. Inevitably, such turnover between the internal and external membranes will result in the secretion of DM⁺ exosomes upon fusion of the whole compartment with the plasma membrane (79). Alternatively, the interaction with DR may drag DM into lipid rafts that will be incorporated into internal vesicles to allow peptide exchange. It has been shown that DR is incorporated inside Triton-insoluble lipid rafts along the intracellular transport route and at the plasma membrane (80;81). These membrane microdomains have been found in exosomes and account for the sorting of raft resident proteins within exosomal membrane (42). The fact that DR enters lipid rafts suggests that this pathway may allow its incorporation 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 (50). Interestingly, HLA-DM is not particularly enriched in these membrane entities but rather accumulate in supramolecular tetraspanin membrane complexes (82). The possibility remains that DR is sorted to exosomes through mono-ubiquitination of its cytoplasmic lysine residues. However, our results show that mutation of all K residues in these domains does not prevent exosomal sorting (Gauvreau, Brunet and Thibodeau, manuscript in preparation).

A second possibility is that the effect of DR is indirect and does not necessitate an interaction with DM. This hypothesis comes from early studies by the group of Neefjes showing that DR expression in HEK 293 fibroblasts triggers the formation and

accumulation of MVBs and multilamellar compartments (83). The mechanism by which DR can affect the organization of the endocytic pathway has not been characterized but the effect necessitates the presence of intact transmembrane and/or cytoplasmic regions of the heterodimer (83). How this effect of DR can alter the function of some proteins with tyrosine-based sorting signals remains to be determined. Still, the use of DR and DM mutants that are unable to interact with one another (84) could shed some light on the need for a physical interaction in the incorporation of DM into exosomes.

In conclusion, our results shed some light on the mechanism allowing DM accession to the internal vesicles of MVBs where its peptide editing activity can manifest. We are presently testing the impact of the DR-bound peptide and of invariant chain in the recruitment of DM into exosomes. The role of the cytoplasmic tails of DR in masking the tyrosine-based motif of DM is also under investigation.

2.2.8 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.,** Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003. **100**: 13332-13337.
2. **Blott,E.J. and Griffiths,G.M.,** Secretory lysosomes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002. **3**: 122-131.
3. **Katzmann,D.J., Odorizzi,G., and Emr,S.D.,** Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002. **3**: 893-905.
4. **Johnstone,R.M., Adam,M., Hammond,J.R., Orr,L., and Turbide,C.,** Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J.Biol.Chem.* 1987. **262**: 9412-9420.
5. **Pan,B.T., Teng,K., Wu,C., Adam,M., and Johnstone,R.M.,** Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J.Cell Biol.* 1985. **101**: 942-948.
6. **Thery,C., Zitvogel,L., and Amigorena,S.,** Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat.Rev.Immunol.* 2002. **2**: 569-579.
7. **Thery,C., Duban,L., Segura,E., Veron,P., Lantz,O., and Amigorena,S.,** Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat.Immunol.* 2002. **3**: 1156-1162.
8. **Zitvogel,L., Regnault,A., Lozier,A., Wolfers,J., Flament,C., Tenza,D., Ricciardi-Castagnoli,P., Raposo,G., and Amigorena,S.,** Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat.Med.* 1998. **4**: 594-600.

9. **Lamparski,H.G., Metha-Damani,A., Yao,J.Y., Patel,S., Hsu,D.H., Rugg,C., and Le Pecq,J.B.**, Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J.Immunol.Methods* 2002. **270**: 211-226.
10. **Raposo,G., Nijman,H.W., Stoorvogel,W., Leijendekker,R., Harding,C.V., Melief,C.J.M., and Geuze,H.J.**, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J.Exp.Med.* 1996. **183**: 1161-1172.
11. **Van Niel,G., Mallegol,J., Bevilacqua,C., Candalh,C., Brugiere,S., Tomaskovic-Crook,E., Heath,J.K., Cerf-Bensussan,N., and Heyman,M.**, Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* 2003. **52**: 1690-1697.
12. **Vincent-Schneider,H., They,C., Mazzeo,D., Tenza,D., Raposo,G., and Bonnerot,C.**, Secretory granules of mast cells accumulate mature and immature MHC class II molecules. *J.Cell Sci.* 2001. **114**: 323-334.
13. **Reggiori,F. and Pelham,H.R.**, Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J.* 2001. **20**: 5176-5186.
14. **Haglund,K., Di Fiore,P.P., and Dikic,I.**, Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem.Sci.* 2003. **28**: 598-603.
15. **de Gassart,A., Geminard,C., Fevrier,B., Raposo,G., and Vidal,M.**, Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 2003. **102**: 4336-4344.
16. **de Gassart,A., Geminard,C., Hoekstra,D., and Vidal,M.**, Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? *Traffic.* 2004. **5**: 896-903.
17. **Vogt,A.B. and Kropshofer,H.**, HLA-DM - an endosomal and lysosomal chaperone for the immune system. *Trends Biochem.Sci.* 1999. **24**: 150-154.
18. **Marks,M.S., Roche,P.A., van Donselaar,E., Woodruff,L., Peters,P.J., and Bonifacino,J.S.**, A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J.Cell Biol.* 1995. **131**: 351-369.
19. **Copier,J., Kleijmeer,M.J., Ponnambalam,S., Oorschot,V., Potter,P., Trowsdale,J., and Kelly,A.**, Targeting signal and subcellular compartments

- involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J.Immunol.* 1996. **157**: 1017-1027.
20. **Lindstedt,R., Liljedahl,M., Peleraux,A., Peterson,P.A., and Karlsson,L.,** The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* 1995. **3**: 561-572.
 21. **Geuze,H.J.,** The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol.Today* 1998. **19**: 282-287.
 22. **Pierre,P. and Mellman,I.,** Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation. *Curr.Opin.Immunol.* 1998. **10**: 145-153.
 23. **Murk,J.L., Stoorvogel,W., Kleijmeer,M.J., and Geuze,H.J.,** The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2002. **13**: 303-311.
 24. **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.,** 3-D Structure of multilaminar lysosomes in antigen presenting cells reveals trapping of MHC II on the internal membranes. *Traffic.* 2004. **5**: 936-945.
 25. **Escola,J.M., Kleijmeer,M.J., Stoorvogel,W., Griffith,J.M., Yoshie,O., and Geuze,H.J.,** Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 20121-20127.
 26. **Hammond,C., Denzin,L.K., Pan,M., Griffith,J.M., Geuze,H.J., and Cresswell,P.,** The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J.Immunol.* 1998. **161**: 3282-3291.
 27. **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.,** Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J.Cell Biol.* 2001. **155**: 53-63.

28. Barois,N., Saint-Vis,B., Lebecque,S., Geuze,H.J., and Kleijmeer,M.J., MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic*. 2002. **3**: 894-905.
29. van Lith,M., van Ham,M., Griekspoor,A., Tjin,E., Verwoerd,D., Calafat,J., Janssen,H., Reits,E., Pastoors,L., and Neefjes,J., Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J.Immunol*. 2001. **167**: 884-892.
30. Zwart,W., Griekspoor,A., Kuijl,C., Marsman,M., van Rheenen,J., Janssen,H., Calafat,J., van Ham,M., Janssen,L., van Lith,M., Jalink,K., and Neefjes,J., Spatial Separation of HLA-DM/HLA-DR Interactions within MIIC and Phagosome-Induced Immune Escape. *Immunity*. 2005. **22**: 221-233.
31. Robadey,C., Ammerlaan,W., Muller,C., Cloutier,I., Sékaly,R.P., Haefliger,J.A., and Demotz,S., The processing routes determined by negatively charged residues in DR1-restricted T cell determinants. *J.Immunol*. 1997. **159**: 3238-3246.
32. Lampson,L.A. and Levy,R., Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J.Immunol*. 1980. **125**: 293-299.
33. Masellis-Smith,A. and Shaw,A.R., CD9-regulated adhesion. Anti-CD9 monoclonal antibody induce pre-B cell adhesion to bone marrow fibroblasts through de novo recognition of fibronectin. *J.Immunol*. 1994. **152**: 2768-2777.
34. Radka,S.F., Machamer,C.E., and Cresswell,P., Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and western blotting. *Hum.Immunol*. 1984. **10**: 177-188.
35. Denzin,L.K., Robbins,N.F., Carboy-Newcomb,C., and Cresswell,P., Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1994. **1**: 595-606.
36. Brunet,A., Samaan,A., Deshaies,F., Kindt,T.J., and Thibodeau,J., Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DO β . *J.Biol.Chem*. 2000. **275**: 37062-37071.
37. DeMars,R., Chang,C.C., Shaw,S., Reitnauer,P.J., and Sondel,P.M., Homozygous deletions that simultaneously eliminate expression of class I and

- class II antigens of EBV-transformed B-lymphoblastoid cells. I. Reduced proliferative responses of autologous and allogeneic T cells to mutant cells that have decreased expression of class II antigens. *Hum.Immunol.* 1984. **11**: 77-97.
38. **Khalil,H., Deshaies,F., Bellemare-Pelletier,A., Brunet,A., Faubert,A., Azar,G.A., and Thibodeau,J.,** Class II transactivator-induced expression of HLA-DO β in HeLa cells. *Tissue Antigens* 2002. **60**: 372-382.
 39. **Faubert,A., Samaan,A., and Thibodeau,J.,** Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J.Biol.Chem.* 2002. **277**: 2750-2755.
 40. **Alain,R., Nadon,F., Seguin,C., Payment,P., and Trudel,M.,** Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. *J.Virol.Methods* 1987. **16**: 209-216.
 41. **Hammond,G.W., Hazelton,P.R., Chuang,I., and Klisko,B.,** Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. *J.Clin.Microbiol.* 1981. **14**: 210-221.
 42. **Thery,C., Regnault,A., Garin,J., Wolfers,J., Zitvogel,L., Ricciardi-Castagnoli,P., Raposo,G., and Amigorena,S.,** Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J.Cell Biol.* 1999. **147**: 599-610.
 43. **Thery,C., Boussac,M., Veron,P., Ricciardi-Castagnoli,P., Raposo,G., Garin,J., and Amigorena,S.,** Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J.Immunol.* 2001. **166**: 7309-7318.
 44. **Wright,M.D. and Tomlinson,M.G.,** The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol.Today* 1994. **15**: 588-594.
 45. **Fevrier,B. and Raposo,G.,** Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2004. **16**: 415-421.
 46. **Wubbolts,R., Leckie,R.S., Veenhuizen,P.T., Schwarzmann,G., Mobius,W., Hoernschemeyer,J., Slot,J.W., Geuze,H.J., and Stoorvogel,W.,** Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 10963-10972.

47. **Steimle,V., Siegrist,C.-A., Mottet,A., Lisowska-Groszpiere,B., and Mach,B.,** Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994. **265**: 106-109.
48. **Bonifacino,J.S. and Traub,L.M.,** Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu.Rev.Biochem.* 2003. **72**: 395-447.
49. **Metzelaar,M.J., Wijngaard,P.L., Peters,P.J., Sixma,J.J., Nieuwenhuis,H.K., and Clevers,H.C.,** CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J.Biol.Chem.* 1991. **266**: 3239-3245.
50. **Gruenberg,J. and Stenmark,H.,** The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2004. **5**: 317-323.
51. **Dikic,I.,** ALIX-ing phospholipids with endosome biogenesis. *Bioessays* 2004. **26**: 604-607.
52. **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.,** Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 2004. **303**: 531-534.
53. **Vincent,O., Rainbow,L., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., and Penalva,M.A.,** YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol.Cell Biol.* 2003. **23**: 1647-1655.
54. **Strack,B., Calistri,A., Craig,S., Popova,E., and Gottlinger,H.G.,** AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and ELAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 2003. **114**: 689-699.
55. **Modrek,B., Resch,A., Grasso,C., and Lee,C.,** Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res.* 2001. **29**: 2850-2859.
56. **Nagarajan,U.M., Bushey,A., and Boss,J.M.,** Modulation of gene expression by the MHC class II transactivator. *J.Immunol.* 2002. **169**: 5078-5088.
57. **Wubbolts,R., Fernandez-Borja,M., Oomen,L., Verwoerd,D., Janssen,H., Calafat,J., Tulp,A., Dusseljee,S., and Neefjes,J.,** Direct vesicular transport of

MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J.Cell Biol.* 1996. **135**: 611-622.

58. **Huby,R.D., Dearman,R.J., and Kimber,I.**, Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts. *J.Biol.Chem.* 1999. **274**: 22591-22596.
59. **Poloso,N.J., Muntasell,A., and Roche,P.A.**, MHC class II molecules traffic into lipid rafts during intracellular transport. *J.Immunol.* 2004. **173**: 4539-4546.
60. **Kropshofer,H., Spindeldreher,S., Rohn,T.A., Platania,N., Grygar,C., Daniel,N., Wolpl,A., Langen,H., Horejsi,V., and Vogt,A.B.**, Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide- MHC class II complexes. *Nat.Immunol.* 2002. **3**: 61-68.
61. **Calafat,J., Nijenhuis,M., Janssen,H., Tulp,A., Dusseljee,S., Wubbolts,R., and Neefjes,J.**, Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures. *J.Cell Biol.* 1994. **126**: 967-978.
62. **Doebele,R.C., Busch,R., Scott,H.M., Pashine,A., and Mellins,E.D.**, Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* 2000. **13**: 517-527.

2.2.9 FOOTNOTES

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.

2.2.10 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Eric O. Long, Robert DeMars and Rafick Sékaly for providing cDNAs and cell lines. We thank Jacques Neefjes for the rabbit anti-DR serum. We are grateful to Angela Samaan for the gift of DM β - specific antisera. We also thank Eric Cohen for the use of the fluorescent microscopy facility and Robert Alain for EM experiments (INRS-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.

2.2.11 FIGURES

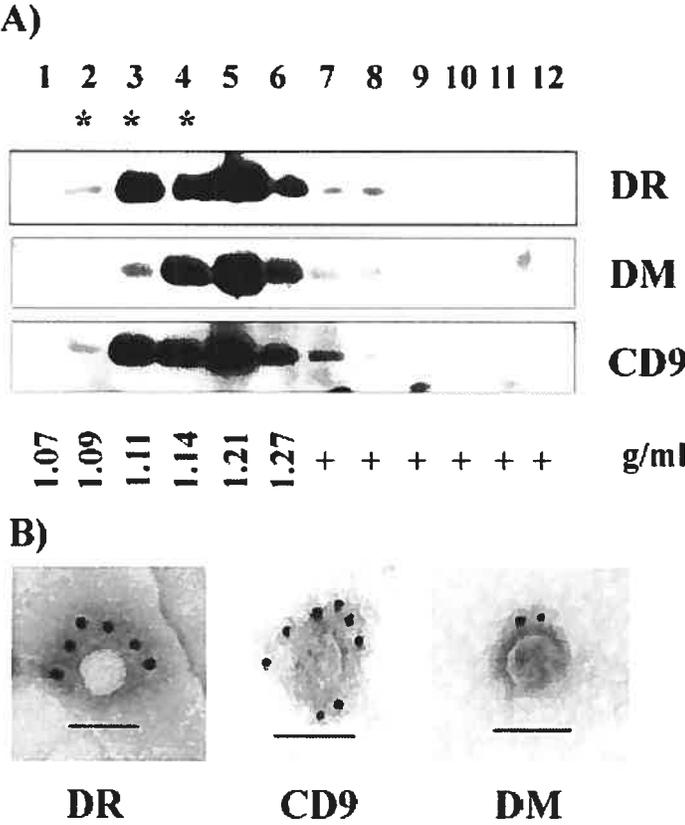


Figure 17. HLA-DM is present in exosomes secreted from the B-lymphoblastoid cell line 721.45.

(A) Exosomes from 721.45 were purified on a continuous sucrose gradient (.25M-2M sucrose). Fractions were collected and blotted for expression of DRβ (XD5), CD9 (50H.19) and DMβ (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 12 nm bead-coupled goat anti-mouse and 18 nm bead-coupled goat anti-rabbit antibodies. Bar, 100 nm.

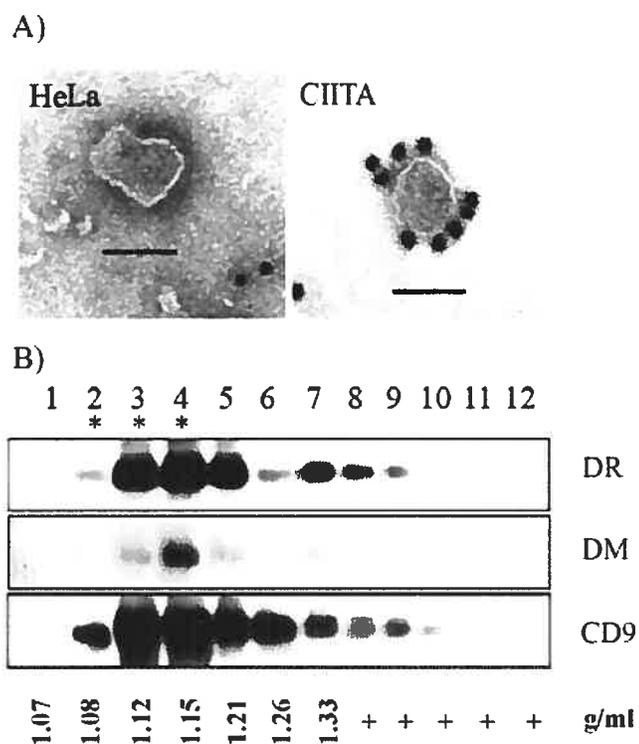


Figure 18. HeLa CIITA exosomes accumulate HLA-DM.

(A) Whole-mount IEM using rabbit the anti-DR serum was performed on exosomes from untransfected HeLa or HeLa CIITA cells as in Fig.17. Bar, 100nm. (B) Exosomes purified from HeLa CIITA culture medium were analyzed for DR, DM and CD9 as in Fig.17.

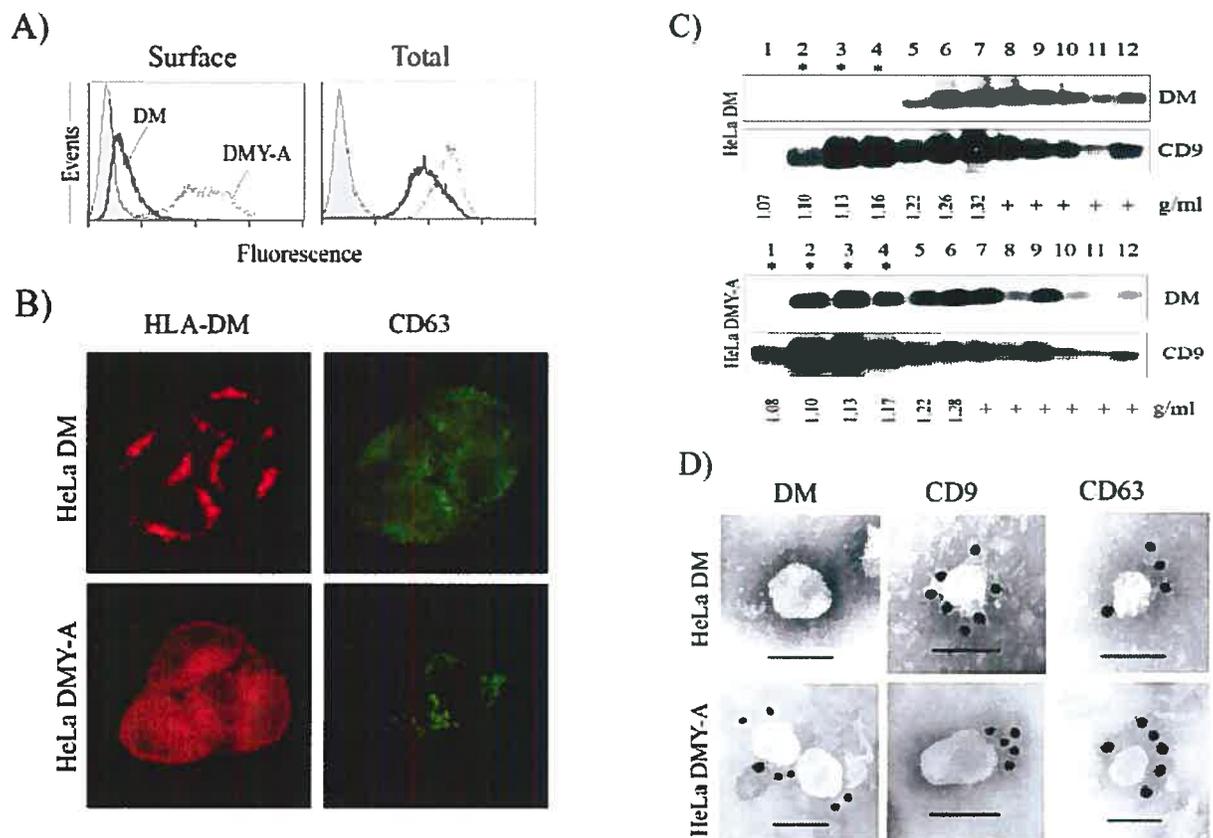


Figure 19. HLA-DM's tyrosine motif prevents entry into exosomes.

(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 β 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, 100 nm.

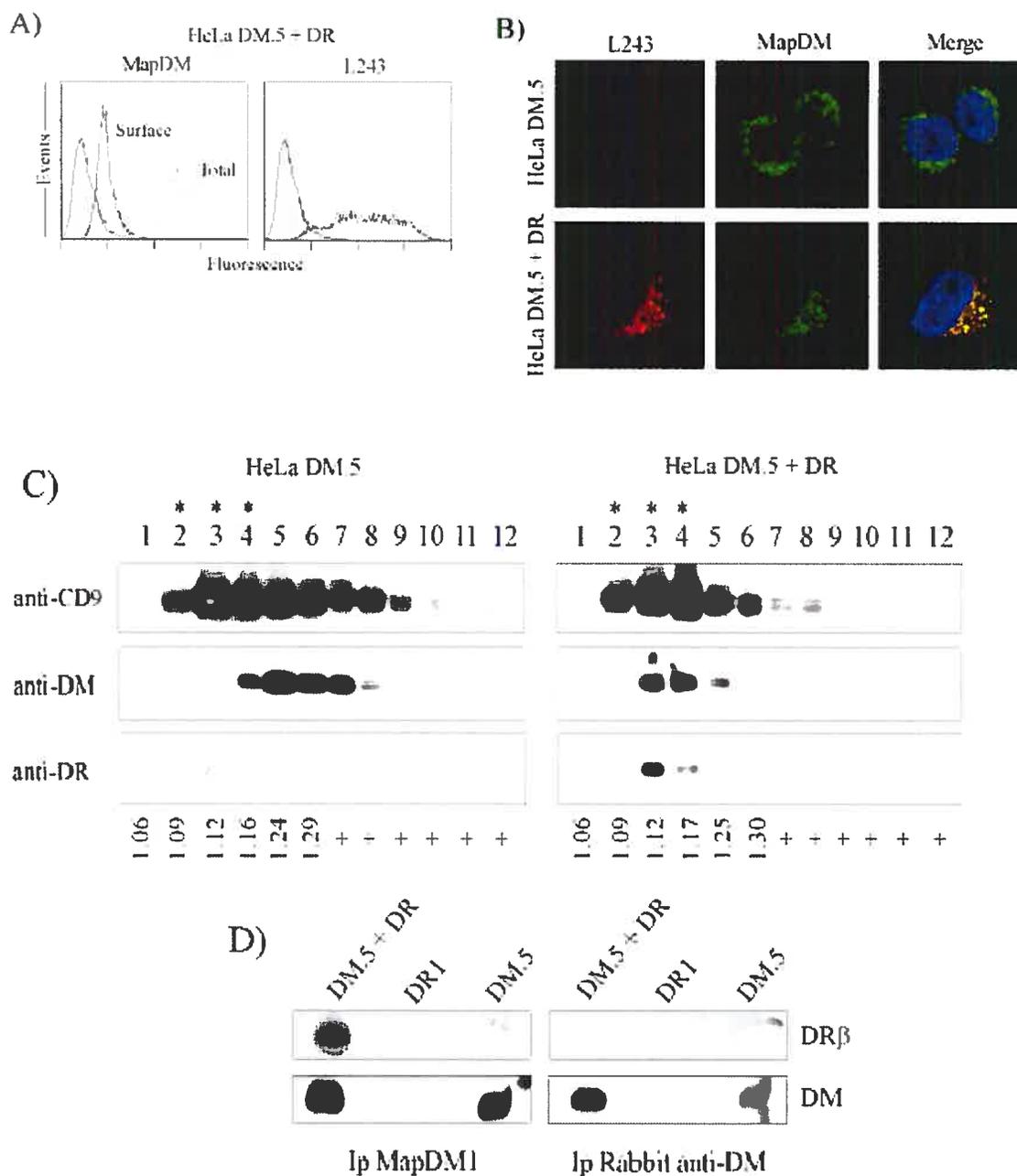


Figure 20. HLA-DM is found in exosomes upon co-expression of HLA-DR.

HeLa DM cells were supertransfected with DR α and DR β cDNAs and sorted for high DR expression. **(A)** Cells were stained at the cell surface for DR expression and upon permeabilization to measure DM expression. **(B)** Co-localization of DR and DM was performed following permeabilization of HeLa cells and intracellular staining. Cells were

stained with IgG₁ MaP.DM1 antibody (green) (HLA-DM) and with IgG_{2a} monoclonal antibody L243 (HLA-DR) (red). **(C)** Exosomes from HeLa DM and HeLa DM-DR were analyzed as in Fig.1. **(D)** DM interaction with DR was evaluated by immunoprecipitation.. Cells were lysed into Chaps 1% pH 5.5 buffer and supernatants were incubate with magnetic beads coated with MaP.DM1 antibody and rabbit anti-DM β specific serum. The blots were carry out with XD5 (DR β) and the anti-DM rabbit serum (DM).

Chapitre 3 Discussion

La présentation antigénique est largement dépendante du bon fonctionnement de la voie endocytaire. Chacune des molécules ayant un rôle à jouer dans celle-ci sera ciblée vers les différents compartiments endosomiaux. Par exemple, le chargement du peptide dans la niche peptidique des molécules du CMH de classe-II se fera dans les endosomes tardifs MIIC. Ainsi, c'est à cet endroit que les molécules non-classiques du CMH-II, HLA-DM et HLA-DO, se retrouveront afin de moduler la présentation antigénique des molécules classiques HLA-DR. Les MIICs en maturation adoptent graduellement la morphologie d'un compartiment multivesiculaire (MVB). Celui-ci contient dans sa lumière interne plusieurs microvésicules pouvant être sécrétées à l'extérieur de la cellule lors de sa fusion avec la membrane plasmique. Les exosomes de cellules présentatrices d'antigènes sont reconnus comme enrichis en HLA-DR, mais ne contenaient, jusqu'à maintenant, pas de HLA-DM. Ainsi, cette discussion abordera les hypothèses relatives à l'entrée du HLA-DR et du HLA-DM dans les membranes exosomales et l'impact de ce ciblage dans la présentation antigénique.

3.1 L'ubiquitination et le ciblage exosomal de HLA-DR

3.1.1 L'UBIQUITINE EST IMPORTANTE POUR L'INTEGRATION DE PROTEINES DANS LES MVBS

Les MVBS sont formés suite à l'invagination de certaines régions de leur membrane limitante permettant la libération de microvésicules dans leur lumen. La fusion de ces MVBS avec les lysosomes permet la dégradation de leur contenu, tandis que la fusion avec la membrane plasmique résultera en la libération extracellulaire des vésicules internes sous forme d'exosomes. Ainsi, les protéines qui sont envoyées vers les MVBS, et qui sont internalisées dans les vésicules, peuvent être détruites ou sécrétées (Revue dans [121]). La majorité des protéines qui seront ciblées vers les endosomes tardifs possèdent dans leur séquence l'information nécessaire pour un tel déplacement. Il est possible toutefois que le ciblage soit le résultat de l'action d'une molécule intermédiaire telle que l'ubiquitine. L'ubiquitine est grandement

impliquée au niveau de la dégradation protéasomale, mais aussi dans le trafic endocytique et la destruction lysosomale.

Ce sont des études sur une protéine de levure, la carboxypeptidase S (CPS), qui ont démontré l'implication de l'ubiquitination dans l'intégration de protéines au sein des MVBs. Cette protéine est directement envoyée de l'appareil de Golgi vers les endosomes avant d'être incluse dans les MVBs. La mutation d'une lysine contenue dans la CPS induira sa rétention au niveau de la membrane limitante du MVB. Cela suggère donc une grande importance de l'ubiquitination dans l'internalisation de cette protéine dans les vésicules intraluminales des MVBs. Par la suite, de nombreuses publications ont démontré un phénomène semblable, plaçant l'ubiquitination au rang des voies majeures de l'entrée aux MVBs (revue dans [119;122;123]).

3.1.2 LES CHIMERES UBIQUITINE

L'ubiquitine est impliquée au niveau de l'internalisation, de même que du ciblage intracellulaire de plusieurs protéines suite à sa liaison sous forme mono ou poly-ubiquitinée. Dans le but d'évaluer l'implication physiologique de la mono-ubiquitination des récepteurs de tyrosine kinase, certains groupes ont remplacé la queue cytoplasmique du récepteur du facteur de croissance épidermal (EGFR) par une molécule d'ubiquitine [124]. L'absence des signaux natifs de la protéine permet d'étudier l'effet direct de l'ubiquitination, quel qu'il soit. Afin d'étudier les différents types de modifications post-traductionnelles, ils ont muté l'une des lysines contenue dans la molécule d'ubiquitine; la Lys48. De cette façon, il est possible de passer outre la poly-ubiquitination et donc la dégradation potentielle par le protéasome. De plus, la mutation des glycines C-terminales permet l'observation d'une mono-ubiquitination particulière, puisqu'elle permet d'éviter tout attachement des molécules d'ubiquitine du pool intracellulaire. Il a été possible d'observer ces différentes chimères à la surface de la cellule, ce qui diffère des résultats que nous avons observés.

Nos chimères ont été construites de façon à remplacer la queue cytoplasmique de la chaîne bêta de HLA-DR par un polypeptide d'ubiquitine. Les molécules d'ubiquitines

employées étaient soit de type sauvage ou de type mutant (ubiK48R) (Figure 12). Ces chimères avaient la particularité de n'être que faiblement exprimées en surface autant en transfections transitoires que stables (Figure 13a). C'est en fait la présence d'un motif di-leucine contenu dans l'ubiquitine qui serait responsable de l'internalisation des chimères [108]. Nous n'avons toutefois pas testé la vitesse d'internalisation de la chimère, ce qui nous aurait permis de déterminer si les molécules se présentent à la surface et sont promptement internalisées ou si elles ne font qu'être envoyées plus rapidement dans la voie endocytaire. Le faible niveau d'expression de nos chimères nous empêchait, effectivement, d'effectuer des essais d'internalisation. Nous avons aussi noté la sensibilité de nos chimères à l'endoglycosidase H (Figure 13c), excluant probablement la possibilité d'une endocytose rapide des molécules. Puisque les chimères n'acquièrent pas des oligosaccharides complexes, leur expression de surface est probablement plus faible. Pourtant, des études portant sur la maturation de HLA-DR semblaient montrées que l'acquisition d'oligosaccharides N-glycosylés n'était pas nécessaire à l'expression de surface ni à l'association des chaînes du complexe [125]. Néanmoins, la glycosylation est parfois essentielle pour la solubilité et la liaison des chaînes de certaines protéines transportées vers la surface [126]. Bref, l'hypothèse du ciblage vers les endosomes est probablement plus crédible.

Il est aussi possible que nos molécules aient été victimes d'une inhibition du recyclage. Il a déjà été noté qu'une ubiquitine remplaçant la portion cytoplasmique du récepteur de la transferrine (TfR) empêchait tout recyclage de la protéine et provoquait sa rétention dans les vésicules endosomales [127]. La surexpression de protéines Hrs accentuait davantage cet effet probablement en reconnaissant le récepteur et en assurant son ciblage vers les manteaux de clathrines. Ce phénomène favorise à la fois l'endocytose et la destruction dans les compartiments lysosomaux. Néanmoins, dans notre cas, nous n'avons observé aucune destruction de nos molécules chimériques. Il nous a été possible d'obtenir leur expression dans des lignées HeLa stables et leur expression en transfections transitoires ne semblait pas diminuer dans une période de 72 heures (résultats non montrés). Soit que la destruction est relativement lente ou soit que les molécules ne sont qu'accumulées dans des compartiments endosomaux pour finalement se retrouver à l'intérieur des MVBs. Conséquemment, il serait possible d'en

apercevoir une quantité importante à la surface des exosomes. Pour avoir une réponse plus précise sur le niveau de dégradation de nos chimères, il aurait été intéressant de faire des essais de « pulse chase ». En effet, l'usage d'un précurseur radioactif pour une période précise nous aurait permis de déterminer le temps exact requis à l'élimination des chimères. Toutefois, l'expression relativement faible en transfections transitoires rendait ces études peu envisageables dans l'immédiat. Néanmoins, cette technique permettrait probablement une meilleure compréhension de l'expression de nos molécules chimériques.

Nos expériences ont démontré que les chimères sont effectivement retrouvées à la surface des exosomes. L'accumulation endosomiale est donc probable. Par contre, le niveau d'expression exosomale des chimères est plus faible que celui d'une molécule HLA-DR sauvage (Figure 13). S'il y avait eu réelle accumulation, la quantité de DR mutants aurait été plus grande. Peut-être qu'une trop grande quantité de protéines ubiquitinées provoque une saturation de la machinerie de ciblage aux MVBs [128], empêchant une plus grande inclusion dans les exosomes. Ainsi, les molécules chimériques seraient vouées à rester à la membrane limitante des MVBs. Il est aussi possible que le transmembrane de DR ait un rôle important dans l'entrée des vésicules exosomales et que sa présence contrecarre l'effet de l'ubiquitination. Il a déjà été montré que le transmembrane des molécules du CMH de classe-II murin placé dans une immunoglobuline M induisait son ciblage vers des compartiments endosomiaux précis [129]. De plus, il a été démontré que la substitution du transmembrane de la chaîne bêta pour celui de la chaîne alpha modifiait le parcours endocytaire employé par les CMHs, de même que la présentation antigénique [130]. Ces études permettent d'évaluer l'importance du transmembrane au sein du ciblage endocytaire et pourraient expliquer les résultats obtenus avec nos molécules HLA-DR α/β -ubi. Ainsi, le comportement difficilement caractérisable de nos molécules chimériques ne nous offrait aucune conclusion convaincante. Nous avons donc décidé de pousser plus loin l'investigation de l'ubiquitination de DR en créant des protéines HLA-DR dépourvues de lysines cytoplasmiques.

3.1.3 HLA-DR POSSÈDE PLUSIEURS RÉSIDUS LYSINES DANS SA QUEUE CYTOPLASMIQUE

HLA-DR est une molécule hétérodimérique classique du CMH de classe-II. Elle possède une queue cytoplasmique encodant généralement les signaux nécessaires à ces déplacements vers les différents compartiments cellulaires. HLA-DR se déplace habituellement dans la voie endocytaire grâce à la chaîne invariante. En effet, celle-ci possède dans sa portion cytoplasmique deux motifs de ciblage di-leucine de format LI-ML. Néanmoins, HLA-DR possède plusieurs résidus lysines qui pourraient être des sites potentiels d'ubiquitination. La portion cytoplasmique de la chaîne alpha contient deux lysines dont l'une près du transmembrane et l'autre trois acides aminés plus loin. La queue cytoplasmique de la chaîne bêta ne contient qu'une seule lysine à six acides aminés du transmembrane. En mutant ces différentes lysines, nous avons tenté de démontrer l'implication de l'ubiquitination dans le ciblage de HLA-DR aux exosomes. Si l'ubiquitination est une modification importante pour l'entrée de HLA-DR dans les exosomes, la mutation des lysines devrait drastiquement diminuer la quantité de DR dans ces vésicules. Dans les cellules HeLa transfectées, nous avons noté une expression comparable des molécules ne contenant aucune lysine (DR α KGRG/ DR β 5AAA) et des molécules DR sauvages (Figure 15a). Leur ciblage endosomal ne semblait pas non plus dénoté de particularité puisque les deux se retrouvaient dans les compartiments tardifs marqués par LAMP-1. Seule l'accumulation de grosses vésicules dans les cellules exprimant DR α KGRG/ DR β 5AAA était notoire (Figure 15b). Peut-être que ces endosomes élargis sont la conséquence de l'entassement des protéines mutantes à la membrane limitante des compartiments multivésiculaires. Conséquemment, très peu de DR α KGRG/ DR β 5AAA serait détecté dans les exosomes isolées des cellules transfectées. Toutefois, l'expression exosomale de ces molécules mutantes est aussi importante que celle des protéines sauvages (Figure 16). Il semblerait que l'absence de lysines ne modifie pas l'intégration des molécules du CMH de classe-II dans les membranes exosomales.

Cependant, ce ne sont pas toutes les protéines possédant une lysine ou plusieurs lysines dans leur domaine cytoplasmique qui sont ubiquitinées. Il a été publié que la présence de

plusieurs lysines dans une protéine de levure n'introduisait pas celle-ci dans les MVBs ni ne provoquait son ubiquitination. En effet, la protéine membranaire DPAP B contient 4 lysines dans sa portion cytoplasmique et n'est présente qu'à la membrane limitante des MVBs [131]. Cette particularité laisse suggérer la nécessité de résidus spécifiques à proximité des lysines. C'est en fait ce qui s'est produit lorsque le signal d'ubiquitination contenu dans la queue cytoplasmique d'une protéine ubiquitinée (CPS) a été introduit dans celle de DPAP B. Il semblerait que non seulement la lysine de la séquence introduite « PVEKAPR » soit essentielle à l'ubiquitination, mais que d'autres résidus soient primordiaux à l'interaction avec l'ubiquitine ligase [132]. De plus, il a été mentionné que l'ubiquitine ligase est, dans plusieurs cas, primordiale à l'intégration de protéines dans les MVBs [133].

Tout récemment, le groupe de Le Pecq a développé une méthode permettant de contrôler ou de manipuler le contenu des exosomes. Ils ont identifié des domaines d'adressage qui provoquent le ciblage spécifique des protéines aux exosomes. Le domaine C1C2 de la lactadhérine semble lier spécifiquement les lipides des exosomes. Conséquemment, la lactadhérine n'est retrouvée que dans les exosomes. Ce domaine C1C2 appartient à une famille de domaines qui médie la liaison des surfaces lipidiques. Certaines protéines comme les facteurs de coagulation V et VIII portent aussi ce domaine. Il semblerait que l'espace prévu pour enchâsser les têtes des lipides dans les domaines C1 et C2 favoriserait la liaison avec des membranes lipidiques spécifiques. Ils ont donc fusionné ce domaine avec certaines protéines solubles résultant en leur présence à la surface des exosomes. Il aurait été possible de penser que l'expression de HLA-DR pourrait être contrôlée de la même façon, ce qui permettrait d'augmenter l'efficacité de la présentation antigénique. On pourrait introduire une quantité saturante de DR afin que les exosomes porteurs puissent présenter un maximum de peptides. Toutefois, cette technique n'a pas encore été testée sur les protéines membranaires, mais ne doit pas être sous-estimée. Évidemment, cette manipulation est principalement utilisée à des fins thérapeutiques et diagnostiques. Par exemple, les exosomes exprimant une protéine de choix sont injectés dans un organisme afin de provoquer la production d'anticorps. Cette application est particulièrement intéressante lorsque l'on veut monter une réponse immunologique contre

un pathogène difficile à combattre [134]. Cette technique permettrait de contrôler encore mieux le contenu protéique des exosomes déjà utilisés en thérapie anti-tumorale.

Finalement, une autre hypothèse pouvant expliquer la présence de DR dans les exosomes est l'interaction protéine-protéine avec les tétraspanines. Comme déjà décrit dans la section 1.2.5.2, les tétraspanines ont la tendance à se regrouper afin de former un filet. Elles peuvent interagir entre elles ou avec une protéine partenaire. Il a été démontré, entre autres, que certaines tétraspanines pouvaient lier les IgM et donc possiblement les domaines immunoglobulines de protéines telles que DR [135]. De plus, une autre étude a montré que HLA-DR se retrouvait dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique avec les tétraspanines CD38 et CD9 [135;136]. Puisque les exosomes possèdent aussi ces domaines lipidiques, l'interaction de DR avec les tétraspanines est alors envisageable. Peut-être que les radeaux lipidiques jouent aussi un rôle dans la présence de DR aux exosomes. Bien avant toutes ces découvertes, le groupe de Cresswell avait publié que HLA-DR, -DM et -DO s'associaient à la protéine tétraspanine CD82 dans les compartiments MIIC [54]. Ces derniers acquièrent la morphologie des MVBs lors de leur maturation. Il est donc probable que cette interaction favorise l'entrée de DR dans les vésicules exosomales. Ainsi, peut-être que les domaines lipidiques et les tétraspanines forcent l'expression de DR par un retardement de son recyclage.

Pour en savoir davantage, il faudrait déterminer les domaines d'interactions des tétraspanines avec DR pour pouvoir les muter. Il serait donc possible de voir l'impact sur le ciblage exosomal de DR par le blocage de l'association tétraspanine-HLA-DR. En interrompant la formation des radeaux lipidiques à l'aide, par exemple, de méthyl- β -cyclodextrine, un détergent qui diminue la présence de cholestérol dans les doubles couches lipidiques, on pourrait déterminer le rôle de ces domaines lipidiques dans l'entrée de DR aux membranes exosomales.

3.1.4 POURQUOI RETROUVE-T-ON DR DANS LES EXOSOMES?

Le mode de formation et de sécrétion des exosomes est de mieux en mieux cerné. Par contre, leur utilité n'est pas encore totalement établie. Certains groupes ont démontré que les exosomes pouvaient agir en tant que messenger (voir section 1.2.4.1), tandis qu'une d'autre équipe décrivait les exosomes comme des véhicules servant à l'élimination des particules rendues inutiles [29]. Les deux fonctions sont plausibles. Les protéines en route vers la dégradation lysosomale sont majoritairement retrouvées dans la lumière des MVBs. La fusion avec la membrane plasmique peut donc provoquer la sécrétion extracellulaire de ces protéines inutiles. D'autre part, la présence importante de molécules présentatrices d'antigènes, d'adhésion et de co-stimulation à la surface des exosomes, peut très bien expliquer la fonction de messenger.

Les exosomes peuvent activer les cellules T afin d'accentuer ou d'accélérer la réponse immunitaire contre un pathogène, de même qu'ils peuvent présenter des peptides particuliers pour induire une réponse spécifique. En effet, le chargement d'un peptide tumoral à la surface d'exosomes exprimant le CMH de classe-I leur octroiera la capacité d'activer les cellules T cytotoxiques spécialisées afin qu'elles détruisent la tumeur [44]. Est-il alors possible de dire que la cellule présentatrice d'antigènes sécrétant des exosomes portant du DR est « consciente » de son action? Ou est-ce seulement un hasard que ces protéines se retrouvent dans un endroit précis à un moment précis? Existe-t-il une signalisation intracellulaire indiquant aux cellules qu'elles doivent sécréter des membranes exosomales? Peut-être que l'internalisation d'un peptide antigénique par les immunoglobulines de surface des lymphocytes B provoque une cascade signalétique aboutissant à la fusion des MVBs avec la membrane plasmique? Peut-être est-ce la dégradation de l'antigène dans les endosomes tardifs qui donne le signal? En fait, il a déjà été décrit que le changement de la concentration en calcium intracellulaire favoriserait la formation de très gros MVBs et donc une plus grande sécrétion d'exosomes [30]. Il est donc possible qu'une voie de signalisation affectant les canaux potassiques et sodiques permettent une relâche contrôlée d'exosomes. Si tel est le cas, il est possible de croire que les exosomes ont une véritable fonction *in vivo*.

Néanmoins, les exosomes sont aujourd'hui testé afin de servir de vecteur immunologique grâce à la présence de certaines protéines dont HLA-DR (revue dans [64]). Ainsi, il est important de comprendre les facteurs influençant l'entrée de DR dans les vésicules exosomales. S'il est si difficile de comprendre le mécanisme exact contrôlant le ciblage de DR vers les exosomes, c'est principalement dû à sa présence à plusieurs endroits différents dans la cellule. DR ne possède aucun motif restreignant son expression aux vésicules exosomales ou aux MVBs. Il est exprimé à la surface des cellules autant que dans les compartiments intracellulaires. L'expression cellulaire de HLA-DM est quant à elle plus limitée. Il n'est que très peu exprimé en surface, dû à son motif tyrosine, mais est retrouvé en grande quantité à la membrane limitante des MVBs. On sait toutefois que cette molécule n'est pas préférentiellement exprimée dans les exosomes (voir section suivante).

3.2 L'implication de HLA-DR dans l'entrée du HLA-DM aux exosomes.

3.2.1 MOTIFS DE CIBLAGE DES MOLECULES DU CMH DE CLASSE-II

Pour circuler à travers la voie endo-lysosomique, il existe quelques signaux de ciblage dont les plus connus sont ceux contenus dans la queue cytoplasmique de protéines transmembranaires (revue dans [77]). En général, ce sont des motifs dégénérés formés de courtes séquences linéaires d'acides aminés dans lesquelles deux ou trois résidus hydrophobes sont primordiaux à la fonction. Les deux grandes classes de signaux regroupent les motifs « tyrosine » et « di-leucine ». Leur nom reflète la nature des résidus critiques qu'ils contiennent. Le ciblage aux endosomes et lysosomes se fait principalement dans les portions membranaires recouvertes d'un manteau de clathrine et requiert l'interaction entre les protéines membranaires et celles composant le manteau. Ces manteaux de clathrines contiennent aussi des protéines adaptatrices qui varient selon l'emplacement intracellulaire du manteau (revue dans [137]). La membrane plasmique contient, dans ces domaines, la protéine adaptatrice AP-2, tandis que dans

le réseau du Golgi et les endosomes on retrouve la AP-1. Les endosomes peuvent aussi contenir des protéines Hrs, mais dans un tout autre type de manteau de clathrine. Ces protéines sont ainsi les éléments nécessaires à la reconnaissance des signaux de ciblage.

Les motifs « tyrosine » sont pour la plupart de format NPXY ou YXXØ, où le X représente n'importe quel acide aminé, tandis que le symbole Ø, signifie l'emplacement de tout acide aminé avec une chaîne latérale encombrante ou dite « bulky » et hydrophobe. Le NPXY provoque normalement l'internalisation rapide des protéines membranaires tout comme pourrait faire le YXXØ. Par contre, ce dernier peut aussi induire le trafic d'une protéine dans les lysosomes et les compartiments apparentés, de même que faciliter l'inclusion de certaines protéines dans la membrane plasmique basolatérale des cellules polarisées (revue dans [77]). Plusieurs protéines sont reconnues comme portant le signal YXXØ telles : le récepteur de la transferrine, les protéines lysosomiques LAMP-1 et LAMP-2, et même le HLA-DM. Le motif tyrosine de la queue cytoplasmique de HLA-DM, YTPL, est maintenant relativement bien décrit et est responsable de la présence de cette protéine dans les compartiments endosomaux riches en classe-II (MIIC) [12;138]. Les MIICs sont l'endroit préférentiel pour le chargement de peptides sur une molécule classique du CMH-II comme HLA-DR. Il est donc important que le HLA-DM s'y retrouve afin de faciliter l'échange du CLIP pour un peptide de meilleure affinité. Le motif YTPL de DM serait aussi impliqué dans le transport de HLA-DO vers les endosomes tardifs. Malgré la présence d'un signal de ciblage fonctionnel de type di-leucine dans la queue cytoplasmique de la chaîne bêta de HLA-DO, il a été démontré que le signal de DM était suffisant pour transporter le complexe aux MIICs [22]. Par ailleurs, il nous a été permis d'établir l'importance du motif YTPL de DM lors d'études portant sur l'inclusion des molécules du CMH de classe-II dans les vésicules exosomales. Il semblerait que celui-ci serait responsable de l'expression stable à la membrane limitante des compartiments multivésiculaires et non pas dans les microvésicules internes qu'ils contiennent (discuté dans la section plus basse). Nous avons aussi établi que la mutation du résidu tyrosine contenu dans le motif provoquait non seulement l'accumulation de protéines HLA-DM à la surface des cellules mais aussi sa présence dans les membranes exosomales (discuté plus bas).

Les motifs de ciblage di-leucine sont aussi présents dans la queue cytoplasmique de plusieurs protéines transmembranaires et possèdent autant de fonctions variées que les signaux « tyrosines ». Les deux classes de di-leucines sont représentées par les séquences [DE]XXXL[LI] et DXXLL, et peuvent provoquer l'internalisation, le ciblage endo-lysosomal et le trafic endocytaire. La chaîne invariante (Ii), grandement impliquée dans la sortie des molécules HLA-DR du réticulum endoplasmique et de leur ciblage vers les endosomes tardifs, possède dans sa partie cytoplasmique deux motifs di-leucine. Le premier, Leu⁷-Ile⁸, se situe près du transmembrane tandis que le second, Met¹⁶-Leu¹⁷, est plus loin dans la séquence, près du C-terminal. Chacun est suffisant au ciblage du complexe Ii-CMH [139;140]. La chaîne invariante permet effectivement au HLA-DR de se rendre dans les compartiments appropriés pour recevoir son peptide antigénique juste avant que la queue cytoplasmique de Ii ne soit dégradé par des enzymes.

Les motifs di-leucines interagissent aussi avec les protéines contenues dans les manteaux de clathrine, comme les protéines adaptatrices AP. Cette interaction favorise l'internalisation à la membrane ou dans les différents compartiments de la voie endocytaire (revue dans [77]).

La chaîne bêta de HLA-DR semblerait aussi porter un signal de ciblage. Il a été établi que le motif FL, contenu dans les derniers acides aminés de la queue cytoplasmique de la chaîne bêta de DR, serait responsable de son internalisation et de son ciblage vers les endosomes précoces dans les cellules polarisées [141]. Cette séquence agirait comme un motif di-leucine. L'importance de ce signal au niveau des cellules présentatrices d'antigènes a été notée par des essais de délétion et de mutations du domaine cytoplasmique de HLA-DR, permettant d'observer une déficience dans le signalage intracellulaire et la présentation antigénique lors de l'absence du signal di-leucine [142;143]. Il a été montré que les peptides présentés sont alors indépendants de l'action de DM. En effet, les cellules employées n'expriment ni DM, ni chaîne invariante. Conséquemment, peut-être que la liaison du peptide se fait alors dans un compartiment différent des MIICs. En fait, ce phénomène est fort probable puisque la niche peptidique de DR est inoccupée. Cela lui permet donc d'acquérir des peptides dans les endosomes précoces [143]. Ainsi, DR n'est sans doute plus exprimé dans les endosomes tardifs ou les MVBs et, par conséquent, les molécules DR, dont le motif di-leucine est muté, ne

devraient pas être détectées dans les exosomes. Cependant, des observations de notre laboratoire semblent indiquer l'opposé. En effet, il nous a été possible de noter la présence de molécules DR tronquées dans les vésicules exosomales isolées de cellules transfectées. L'emploi d'une molécule DR ne possédant pas de queue cytoplasmique (TM/TM) et par le fait même, ne contenant plus de motif di-leucine, ne semble pas modifier l'entrée de DR aux exosomes (résultats non montrés). Peut-être que le ciblage endosomal de DR est dépendant du type de cellules utilisées. Les études de Zhong ont principalement été faites dans des lymphoblastes, tandis que nous avons travaillé avec des cellules HeLa.

D'un autre côté, le motif di-leucine ne semble pas toujours reconnu par la machinerie d'endocytose puisqu'il est possible d'observer une quantité stable de HLA-DR à la surface des cellules transfectées. Effectivement, la transfection transitoire ou stable de la molécule HLA-DR seule dans des lignées cellulaires de type 293T ou HeLa, démontre une expression constante et élevée à la membrane plasmique [144]. De nos observations en microscopie à fluorescence et en cytométrie en flux, il ne semble pas y avoir une accumulation dans les compartiments précoces ni une plus grande internalisation (résultats non montrés).

3.2.2 HLA-DM EST PRESENT DANS LES EXOSOMES DE CELLULES B

Les lymphocytes B sont des cellules spécialisées dans la présentation antigénique. Elles expriment à leur surface les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité telles que le HLA-DR. Afin de procéder à l'apprêtement d'un antigène sur HLA-DR, la molécule HLA-DM est nécessaire. Cette dernière agit en catalysant l'échange peptidique. Seulement les antigènes présentant une très forte affinité pour les molécules DR seront alors présentés à la surface des cellules. Ce phénomène se déroule dans les compartiments tardifs portant le nom de MIIC. Ceux-ci se transformeront, au fil de leur maturation, en MVB. Les cellules B possèdent plusieurs de ces compartiments multivésiculaires où il est possible de retrouver les molécules HLA-DR et HLA-DM. Celles-ci ne sont toutefois pas exprimées au même endroit dans les MVBs. En effet, HLA-DR est principalement présent à l'intérieur des MVBs, à la surface des vésicules

intraluminales. Conséquemment, on le retrouve à la surface des exosomes sécrétés par les lymphocytes B. La molécule HLA-DM est, quant à elle, maintenue à la membrane limitante des compartiments [28]. Donc, elle ne devrait pas être exprimée dans les vésicules exosomales. Nonobstant, les exosomes que nous avons isolés du milieu de culture des cellules B 721.45 contiennent du HLA-DM (Figure 17 a). Comment se fait-il que nous ayons détecté du DM sur les exosomes et pas l'équipe d'Escola? Afin de quantifier les protéines présentes sur les exosomes, le groupe d'Escola a comparé l'expression des protéines avec le rapport d'expression cellules/exosomes du récepteur de la transferrine (TfR). Ce dernier n'est que très faiblement introduit dans les membranes exosomales. Ainsi, DM ne serait que deux fois plus présent dans les exosomes que le TfR. Ils en ont conclu que DM n'était pas enrichi dans les exosomes contrairement au HLA-DR. Tout comme nous, ils ont travaillé avec des cellules B. Toutefois, leurs cellules exprimaient le HLA-DR15 et nos cellules B possèdent un HLA-DR1. Peut-être que le différent haplotype pourrait expliquer la divergence des résultats obtenus. Dans certains cas de maladies auto-immunes, une plus faible affinité de DR15 pour les peptides a été montrée [145]. Il est probable que DR15 interagisse moins bien avec DM, ce qui pourrait expliquer la faible présentation antigénique et peut-être l'absence de DM dans les exosomes obtenus des cellules B DR15+.

Le groupe de Neefjes a récemment publié des résultats qui supportent nos conclusions [120]. En effet, ils ont démontré la présence d'une interaction entre DM et DR à l'intérieur même des MVBs. Il leur a été possible de montrer leur interaction exclusive dans les structures internes des MIICs par l'emploi de FRET (fluorescence resonance energy transfer). Les deux molécules se retrouvent à la membrane limitante des MVBs, mais l'association, ou la production de FRET, n'était observable que dans les vésicules intraluminales. Ainsi, si la formation des structures internes des MVBs est inhibée, DR et DM aboutissent à la membrane limitante et n'interagissent plus. Il est donc probable que l'interaction entre DR et DM dans les microvésicules internes soit responsable de la présence de DM dans les exosomes provenant des lymphocytes B. De plus, puisque l'interaction semble exclusive aux membranes internes, cela permet d'affirmer que les exosomes que nous avons obtenus ne sont pas des artéfacts de membrane plasmique, mais bien des vésicules provenant de l'intérieur de la cellule.

3.2.3 HLA-DM POSSEDE UN MOTIF QUI LE RETIENT A LA MEMBRANE LIMITANTE DES MVBS

Tel que mentionné dans le paragraphe précédent, la molécule HLA-DM est retrouvée dans les membranes exosomales sécrétées par les lymphocytes B. Il est possible de croire que toutes les cellules exprimant la protéine HLA-DM relâcheront des exosomes portant DM. Toutefois, ce n'est pas le cas. Les exosomes libérés par les cellules HeLa DM.5 ne contiennent pas de DM (Figure 19c). Malgré la surexpression de cette molécule, il semblerait que HLA-DM n'est pas intégré à l'intérieur des MVBS. En comparant ces résultats avec les exosomes provenant de cellules n'exprimant que HLA-DR, nous avons constaté que la principale différence résidait dans la capacité de DR à être exprimée à la surface des cellules. Donc nous avons tenté les mêmes analyses sur des cellules transfectées avec la molécule DMY. Le résidu tyrosine contenu dans le motif de ciblage YTPL de cette molécule, a été remplacé par une alanine et permet d'observer du DM à la surface des cellules [12] (Figure 19). Cette modification du ciblage pourrait indiquer que les déplacements de DM dans la voie endocytaire sont différents. Effectivement, il a été possible de détecter du HLA-DM sur les exosomes sécrétés par les cellules HeLa DMY. Toutefois, l'expression inhabituelle de DM à la surface des cellules pourrait nous laisser croire que les exosomes sont en fait des fragments de membrane plasmique. Cependant, la densité des vésicules isolées se situe bien dans la portion exosomale. En effet, il semblerait que les vésicules apoptotiques aient une densité plus élevée que les exosomes, de même qu'une morphologie qui leur est particulière [43]. De plus, nous avons observé les fractions exosomales des cellules DMY par microscopie électronique. La morphologie s'est avérée comparable aux autres exosomes obtenus (Figure 17 & Figure 19). Les exosomes avaient une taille semblable et exprimaient les mêmes protéines contrôles.

Il semblerait donc que le rôle du motif tyrosine serait de s'assurer du maintien du HLA-DM à la membrane limitante des MVBS. Ce phénomène pourrait être expliqué par la liaison de protéines adaptatrices. En effet, certaines protéines contenues dans les manteaux de clathrines peuvent reconnaître les motifs tyrosine et ainsi assurer la localisation des protéines aux

membranes. Par exemple, il a été suggéré que la protéine Alix serait impliquée dans la fusion des vésicules internes avec la membrane limitante des MVBs [146]. Son interaction avec DM pourrait donc assurer sa relocalisation à la membrane du MVB. Mais alors, comment se fait-il que nous ayons retrouvé DM dans les exosomes des cellules B alors que le motif tyrosine est toujours fonctionnel ? Nous avons émis l'hypothèse que le phénomène était dû à la présence d'autres molécules du CMH de classe-II.

3.2.4 MASQUAGE DU MOTIF YXXL PAR HLA-DR

Pour que HLA-DM puisse catalyser l'échange du peptide contenu dans la niche de HLA-DR, les deux molécules doivent tôt ou tard interagir dans la voie endocytyque. HLA-DM possède une interface relativement conservée entre différentes espèces et qui pourrait contenir les résidus interagissant avec DR. Effectivement, un résidu cystéine sur la chaîne bêta de DM semble être impliqué dans ce lien. De plus, DM interagirait avec la face latérale de DR où l'on retrouve la terminaison N-terminale du peptide lié et impliquerait des résidus précis sur les chaînes alpha et bêta [147;148]. Puisqu'il y a interaction entre les deux molécules du CMH de classe-II, il est possible que cette association soit responsable de la présence de DM dans les exosomes provenant des lymphocytes B. Pour valider cette hypothèse, nous avons généré des cellules exprimant à la fois DM et DR. Ainsi, les cellules HeLa DM.5 ont été transfectées de façon stable avec un plasmide encodant HLA-DR. Ces cellules expriment des hauts niveaux de DR et il est possible d'observer DR dans les mêmes compartiments que DM (Figure 20b). Comme mentionné plus haut, les exosomes sécrétés par les cellules HeLa DM.5 ne contiennent pas de DM. Curieusement, lorsque la molécule HLA-DR est exprimée par transfection dans ces mêmes cellules, on peut détecter la présence de DM dans les exosomes (Figure 20c). Il semblerait donc que l'interaction entre les molécules se fait effectivement dans les vésicules internes des MVBs [120] et pourrait expliquer l'expression de DM sur les exosomes provenant de cellules B. Cependant, ces résultats ne démontrent pas que DR et DM interagissent dans ces conditions et qu'il en résulte un ciblage différentiel de DM. En effet, les cellules DM.5+DR n'expriment pas la chaîne invariante et conséquemment pas de CLIP. HLA-DM interagit avec DR afin d'échanger le CLIP pour un peptide antigénique, il est possible que sans CLIP, DM ne

s'associe plus avec DR. Pour démontrer une interaction entre DR et DM, nous avons effectué des co-immunoprécipitations. Pour ce faire, nous avons employé des billes magnétiques sur lesquelles nous avons couplé l'anticorps monoclonal MaP.DM1, qui reconnaît HLA-DM. L'immunoblot nous a permis de détecter la présence de DR lors d'une co-immunoprécipitation de DM effectuée sur les cellules HeLa DM.5 +DR (Figure 20). Cette association semble indiquer un effet direct de DR sur le ciblage de DM.

Les observations faites sur le ciblage de la molécule DMY nous intriguaient toujours. Nous avons donc décidé de pousser plus loin nos investigations afin d'évaluer les implications de l'interaction de DR avec DM. Notre hypothèse était que l'association de DR avec DM masquait le motif tyrosine provoquant l'inclusion de DM dans les exosomes. Certaines protéines détentrices d'un signal de ciblage « tyrosine » sont retrouvées dans les exosomes. La tétraspanine CD63, par exemple, contient un motif de format YXXØ qui est reconnu par la protéine adaptatrice AP-3. Cette dernière permet l'expression de CD63 aux lysosomes [78]. La protéine CD63 a été retrouvée dans beaucoup d'exosomes caractérisés. La majorité des tétraspanines forment entre elles des microdomaines dans lesquels elles interagissent (voir section 1.2.5.2.2). Peut-être que l'intégration de CD63 dans les exosomes est le résultat du masquage de son motif tyrosine par les autres tétraspanines présentes et pourrait supporter notre hypothèse.

Ainsi, nous avons cette fois couplé nos billes avec un sérum de lapin reconnaissant une portion de la queue cytoplasmique de DM β . Les immunoblots n'ont révélé aucune molécule de DR lorsque DM était co-immunoprécipité (Figure 20d). Dans les cellules contrôles, autant que dans les cellules DM.5+DR, DM était détecté, mais DR n'apparaissait nulle part. En fait, il est possible que l'anti-sérum anti-DM β ne reconnaisse pas le DM lorsque le DR est présent. Donc, l'interaction de DR avec DM empêcherait la reconnaissance de l'épitope par l'anti-sérum. Puisque ces cellules sécrètent des exosomes portant du DM, tout comme les exosomes provenant des cellules DMY, il est possible que l'interaction de DR avec la molécule DM masque le motif YTPL de cette dernière. Le motif de rétention à la membrane limitante des MVBs serait ainsi non-fonctionnel, ce qui permettrait au DM d'accéder aux vésicules internes et d'être relâché à la surface d'exosomes. Toutefois, il se peut que l'expression de DM dans les

exosomes soit la conséquence d'une modification morphologique des compartiments endosomiaux tardifs par l'expression de DR.

Il serait néanmoins important de vérifier que les exosomes sont porteurs des deux molécules à la fois. Il serait possible que les exosomes que nous avons isolés n'expriment qu'une seule des deux molécules. Nous pourrions s'assurer de cette co-expression par des doubles marquages en microscopie électronique ou encore par co-immunoprécipitation des exosomes. Il faut aussi noter que nous n'avons pas évalué la quantité de DM se retrouvant dans les exosomes sécrétés. Peut-être que certaines cellules relâchent des exosomes bourrés de DM et que d'autres cellules n'expriment que très peu de DM exosomal. Il faudrait donc quantifier les exosomes chargés sur les gels de polyacrylamide pour les analyses par immunoblot. La majorité des groupes utilise la méthode Bradford pour déterminer la quantité de protéines isolées. Tout récemment, l'équipe de Obregon a évalué la quantité d'exosomes sécrétés par les DCs par une méthode de microscopie à balayage au laser et de restitution d'image (Obregon C. *et al*, en préparation).

Il est aussi possible de croire que la queue cytoplasmique de DR ne joue aucun rôle dans le ciblage de DM vers les exosomes. Pour vérifier cette hypothèse, il serait très intéressant de transfecter dans les cellules DM.5, une molécule DR dont la queue cytoplasmique est tronquée. Ainsi, en l'absence de la portion cytoplasmique de DR, il serait possible d'en noter l'impact sur les déplacements de DM. Dans un cas où DM se rendrait toujours aux exosomes, on pourrait alors émettre l'hypothèse de l'interaction des parties transmembranaires. Tandis que si DM ne se présente plus aux exosomes lorsqu'exprimée avec le DR tronqué, l'hypothèse du masquage du motif tyrosine de DM par DR reste toujours plausible. (Voir figure Figure 21)

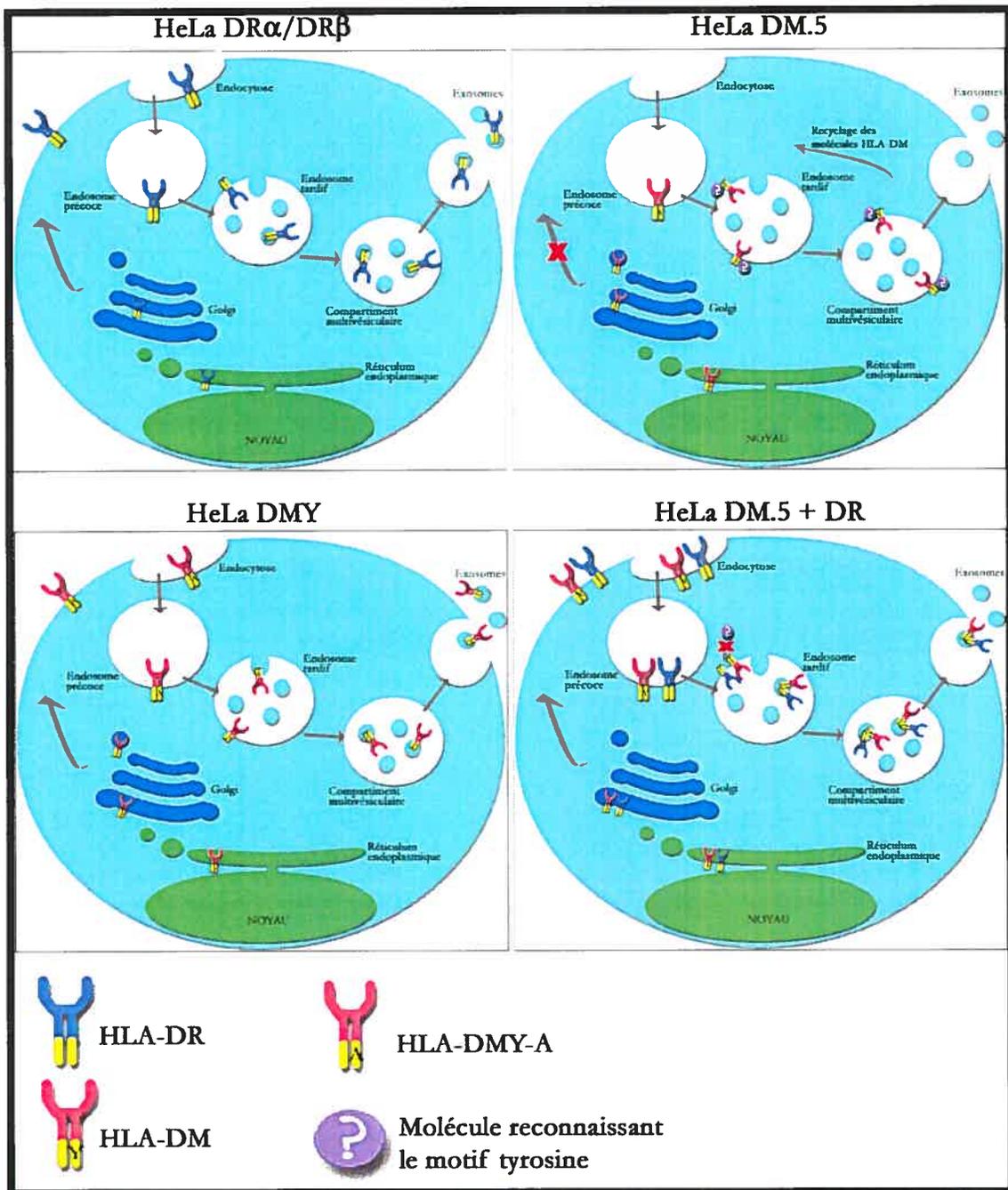


Figure 21. Modèle proposé du masquage du motif tyrosine de DM par DR et de l'impact sur le ciblage de DM.

Se référer au texte 3.2.4 ci-haut.

3.2.5 L'EXPRESSION DE HLA-DR FAVORISE LA FORMATION DE MIICS

Avant d'être exprimées à la surface des cellules, les molécules du CMH-II sont dirigées vers les endosomes tardifs où elles pourront fixer un peptide antigénique provenant de protéines ingérées. Dans les CPAs, ces endosomes ont en général l'apparence de compartiments multilamellaires ou multivésiculaires portant le nom de MIIC. L'enrichissement en molécules du CMH-II explique cette appellation [149]. Quelques années plus tard, le groupe de Neefjes a montré que la formation des MIIC pouvait être induite par l'expression du HLA-DR dans les cellules 293T transfectées[150]. La molécule DR se retrouverait dans les compartiments multilamellaires. Ces compartiments ne seraient pas présents dans les cellules transfectées avec des molécules contrôles. De cette façon, il est possible que le ciblage de DM soit modifié suite à l'expression des molécules de classe II classiques. Conséquemment, il sera possible d'observer du DM à l'intérieur des endosomes tardifs et probablement à la surface des exosomes relâchés. Toutefois, ce sont principalement des compartiments multilamellaires contenant très peu de vésicules qui sont formés en présence de DR. Ainsi, un rôle indirect de DR sur le ciblage de DM pouvant expliquer l'incorporation de cette dernière dans les exosomes semble improbable.

3.2.6 POURQUOI RETROUVE-T-ON LE HLA-DM DANS LES EXOSOMES?

La principale fonction de DM est de catalyser l'échange du peptide contenu dans la niche peptidique de DR et d'assurer la stabilité des molécules DR vides (revue dans [151]). Alors, quel serait l'avantage pour l'organisme à ce que les CPA sécrètent des exosomes portant du DM? Il a été montré que certains exosomes provenant de cellules présentatrices d'antigènes pouvaient transférer leur molécule du CMH de classe-II aux cellules T spécifiques. Pour ce faire, les cellules T devaient d'abord interagir avec le complexe CMH-peptide à la surface des exosomes avant que ceux-ci fusionnent avec la membrane plasmique des cellules T [152]. Ainsi, les cellules ne possédant pas de DM ou un DM non fonctionnel pourraient l'acquérir par l'endocytose des exosomes porteurs. DM pourrait par exemple favoriser, par son rôle d'édition des peptides, la présentation des antigènes rencontrés dans sa cellule d'origine ce qui pourrait

accélérer la réponse spécifique. Néanmoins, la présence de DM à la surface d'exosomes n'a pas été évaluée *in vivo*. Il faudrait donc tester les exosomes présents dans le sérum avant de tirer toutes conclusions sur le rôle potentiel de DM dans les exosomes. Il ne suffirait que de faire des analyses sur le sérum d'humains volontaires selon des procédés d'isolation exosomale semblables à ceux employés *in vitro*. Un groupe de chercheurs ont d'ailleurs réussi l'isolation de membranes exosomales à partir de plasma de donneurs, de même que par la mise en culture des cellules du sang [153].

Chapitre 4 Conclusion

Le système immunitaire constitue la principale barrière de protection des organismes complexes contre les envahisseurs étrangers. Le bon fonctionnement de ce système est hautement dépendant de l'efficacité des cellules lymphocytaires et présentatrices d'antigènes. Il est donc essentiel que les molécules portant les peptides antigéniques aient une forte affinité pour ces peptides. Pour ce faire, leurs peptides sont attentivement choisis. Dans la présentation antigénique assurée par les CMH de classe-II, les peptides à être présentés sont désignés par la molécule non-classique HLA-DM.

Nos premières études ont été faites suivant l'hypothèse d'un ciblage exosomal de DR dépendant de l'ubiquitination. La présence de résidus lysines dans la queue cytoplasmique de DR pouvait effectivement laisser croire à son ubiquitination. Toutefois, la fusion de l'ubiquitine à la suite du transmembrane de DR, de même que l'usage de protéines DR ne possédant aucune lysine, n'affecte pas le ciblage ni la quantité du CMH de classe-II HLA-DR dans les exosomes. Des études parallèles sur les exosomes sécrétés par les lymphocytes B ont permis de démontrer la présence de la molécule du CMH de classe-II non-classique HLA-DM. L'emploi de différentes lignées cellulaires n'exprimant que le DM sauvage ou le DM dont le motif tyrosine est muté, a démontré que le motif YTPL encodé dans la queue cytoplasmique de DM était impliqué dans son ciblage aux exosomes. HLA-DR serait aussi responsable du masquage de ce motif et expliquerait la présence de DM dans les membranes exosomales relâchées par les lymphocytes B et les cellules exprimant HLA-DM et HLA-DR en co-transfection.

Plusieurs fonctions sont maintenant rattachées aux vésicules exosomales : elles peuvent activer les lymphocytes T et donc être utiles en thérapie anti-cancéreuse par la charge de peptides tumoraux sur les molécules du CMH exprimées à leur surface. D'un autre côté, certains pathogènes réussissent à exploiter la machinerie de formation et de propagation des exosomes afin de compléter leur cycle de reproduction et de faciliter l'infection des cellules voisines. Conséquemment, pour développer de bonnes immunothérapies, il est important de bien comprendre la biogenèse des exosomes et les facteurs influençant l'entrée des molécules du

CMH. Il est aussi primordial de considérer la présence de ces vésicules dans l'organisme donc lors de toutes les études physiologiques et pathologiques.

Bibliographie

1. **Campbell,R.D. and Trowsdale,J.,** Map of the human MHC. *Immunol.Today* 1993. **14:** 349-352.
2. **Klein,J. and Sato,A.,** The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 2000. **343:** 702-709.
3. **Bjorkman,P.J., Saper,M.A., Samraoui,B., Bennett,W.S., Strominger,J.L., and Wiley,D.C.,** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987. **329:** 506-512.
4. **Rock,K.L. and Goldberg,A.L.,** Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu.Rev.Immunol.* 1999. **17:** 739-779.
5. **Engelhard,V.H.,** Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 1994. **12:** 181-207.
6. **Cresswell,P.,** Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 1994. **12:** 259-293.
7. **Lamb,C.A. and Cresswell,P.,** Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J.Immunol.* 1992. **148:** 3478-3482.
8. **Roche,P.A., Marks,M.S., and Cresswell,P.,** Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 1991. **354:** 392-394.
9. **Kelly,A.P., Monaco,J.J., Cho,S., and Trowsdale,J.,** A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 1991. **353:** 571-573.

10. **Carrington, M. and Harding, A.**, Sequence analysis of two novel *HLA-DMA* alleles. *Immunogenetics* 1994. **40**: 165.
11. **Mosyak, L., Zaller, D.M., and Wiley, D.C.**, The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 1998. **9**: 377-383.
12. **Marks, M.S., Roche, P.A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P.J., and Bonifacino, J.S.**, A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* 1995. **131**: 351-369.
13. **Sanderson, F., Kleijmeer, M.J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neefjes, J.J., Geuze, H.J., and Trowsdale, J.**, Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 1994. **266**: 1566-1569.
14. **Denzin, L.K. and Cresswell, P.**, HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995. **82**: 155-165.
15. **Sherman, M.A., Weber, D.A., and Jensen, P.E.**, DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 1995. **3**: 197-205.
16. **Denzin, L.K., Hammond, C., and Cresswell, P.**, HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 2153-2165.
17. **Kropshofer, H., Hammerling, G.J., and Vogt, A.B.**, How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: Survival of the fittest? *Immunol. Today* 1997. **18**: 77-82.
18. **Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D.M.**, Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 1995. **375**: 802-806.

19. **Douek,D.C. and Altmann,D.M.**, HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int.Immunol.* 1997. **9**: 355-364.
20. **Denzin,L.K., Sant'Angelo,D.B., Hammond,C., Surman,M.J., and Cresswell,P.**, Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 1997. **278**: 106-109.
21. **Liljedahl,M., Kuwana,T., Fung-Leung,W.P., Jackson,M., Peterson,P.A., and Karlsson,L.**, HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 1996. **15**: 4817-4824.
22. **Brunet,A., Samaan,A., Deshaies,F., Kindt,T.J., and Thibodeau,J.**, Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DO β . *J.Biol.Chem.* 2000. **275**: 37062-37071.
23. **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.**, Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J.Exp.Med.* 2000. **191**: 1127-1136.
24. **Mullock,B.M., Bright,N.A., Fearon,C.W., Gray,S.R., and Luzio,J.P.**, Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J.Cell Biol.* 1998. **140**: 591-601.
25. **Stoorvogel,W., Strous,G.J., Geuze,H.J., Oorschot,V., and Schwartz,A.L.**, Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 1991. **65**: 417-427.
26. **Mellman,I., Fuchs,R., and Helenius,A.**, Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu.Rev.Biochem.* 1986. **55**: 663-700.
27. **Piper,R.C. and Luzio,J.P.**, Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic.* 2001. **2**: 612-621.

28. **Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J.,** Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 20121-20127.
29. **Pan, B.T. and Johnstone, R.M.,** Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 1983. **33**: 967-978.
30. **Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., and Colombo, M.I.,** Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 20083-20090.
31. **Kleijmeer, M.J., Morkowski, S., Griffith, J.M., Rudensky, A.Y., and Geuze, H.J.,** Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J.Cell Biol.* 1997. **139**: 639-649.
32. **Griffiths, G.M.,** Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells. *Trends Cell Biol.* 1996. **6**: 329-332.
33. **Storrie, B. and Desjardins, M.,** The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* 1996. **18**: 895-903.
34. **Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M., and Piper, R.C.,** Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J.Cell Sci.* 2000. **113 (Pt 9)**: 1515-1524.
35. **Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Hopkins, C.R.,** Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* 1990. **61**: 623-634.
36. **Petiot, A., Faure, J., Stenmark, H., and Gruenberg, J.,** PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *J.Cell Biol.* 2003. **162**: 971-979.

37. **Babst,M.,** A protein's final ESCRT. *Traffic*. 2005. **6**: 2-9.
38. **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.,** Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 2004. **303**: 531-534.
39. **Pan,B.T., Teng,K., Wu,C., Adam,M., and Johnstone,R.M.,** Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J.Cell Biol.* 1985. **101**: 942-948.
40. **Peters,P.J., Geuze,H.J., van der Donk,H.A., Slot,J.W., Griffith,J.M., Stam,N.J., Clevers,H.C., and Borst,J.,** Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 1989. **19**: 1469-1475.
41. **Raposo,G., Nijman,H.W., Stoorvogel,W., Leijendekker,R., Harding,C.V., Melief,C.J.M., and Geuze,H.J.,** B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J.Exp.Med.* 1996. **183**: 1161-1172.
42. **Thery,C., Regnault,A., Garin,J., Wolfers,J., Zitvogel,L., Ricciardi-Castagnoli,P., Raposo,G., and Amigorena,S.,** Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J.Cell Biol.* 1999. **147**: 599-610.
43. **Thery,C., Boussac,M., Veron,P., Ricciardi-Castagnoli,P., Raposo,G., Garin,J., and Amigorena,S.,** Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J.Immunol.* 2001. **166**: 7309-7318.
44. **Zitvogel,L., Regnault,A., Lozier,A., Wolfers,J., Flament,C., Tenza,D., Ricciardi-Castagnoli,P., Raposo,G., and Amigorena,S.,** Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat.Med.* 1998. **4**: 594-600.

45. **Raposo,G., Tenza,D., Mecheri,S., Peronet,R., Bonnerot,C., and Desaynard,C.,** Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol.Biol.Cell* 1997. **8:** 2631-2645.
46. **Heijnen,H.F., Schiel,A.E., Fijnheer,R., Geuze,H.J., and Sixma,J.J.,** Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999. **94:** 3791-3799.
47. **Clayton,A., Court,J., Navabi,H., Adams,M., Mason,M.D., Hobot,J.A., Newman,G.R., and Jasani,B.,** Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 2001. **247:** 163-174.
48. **van Bockxmeer,F.M. and Morgan,E.H.,** Transferrin receptors during rabbit reticulocyte maturation. *Biochim.Biophys.Acta* 1979. **584:** 76-83.
49. **Harding,C., Heuser,J., and Stahl,P.,** Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J.Cell Biol.* 1983. **97:** 329-339.
50. **Johnstone,R.M., Adam,M., Hammond,J.R., Orr,L., and Turbide,C.,** Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J.Biol.Chem.* 1987. **262:** 9412-9420.
51. **Rieu,S., Geminard,C., Rabesandratana,H., Sainte-Marie,J., and Vidal,M.,** Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. *Eur.J.Biochem.* 2000. **267:** 583-590.
52. **Peters,P.J., Geuze,H.J., van der Donk,H.A., and Borst,J.,** A new model for lethal hit delivery by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol.Today* 1990. **11:** 28-32.

53. **Blanchard,N., Lankar,D., Faure,F., Regnault,A., Dumont,C., Raposo,G., and Hivroz,C.,** TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J.Immunol.* 2002. **168:** 3235-3241.
54. **Hammond,C., Denzin,L.K., Pan,M., Griffith,J.M., Geuze,H.J., and Cresswell,P.,** The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J.Immunol.* 1998. **161:** 3282-3291.
55. **Brown,D.A. and London,E.,** Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J.Biol.Chem.* 2000. **275:** 17221-17224.
56. **Ikonen,E.,** Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2001. **13:** 470-477.
57. **Laulagnier,K., Motta,C., Hamdi,S., Roy,S., Fauvelle,F., Pageaux,J.F., Kobayashi,T., Salles,J.P., Perret,B., Bonnerot,C., and Record,M.,** Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem.J.* 2004. **380:** 161-171.
58. **Fevrier,B. and Raposo,G.,** Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2004. **16:** 415-421.
59. **Liu,Y.J., Grouard,G., De Bouteiller,O., and Banchereau,J.,** Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int.Rev.Cytol.* 1996. **166:** 139-179.
60. **Schriever,F. and Nadler,L.M.,** The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv.Immunol.* 1992. **51:** 243-284.
61. **Tew,J.G., Thorbecke,G.J., and Steinman,R.M.,** Dendritic cells in the immune response: characteristics and recommended nomenclature (A report from the Reticuloendothelial Society Committee on Nomenclature). *J.Reticuloendothel.Soc.* 1982. **31:** 371-380.

62. **Gray,D., Kosco,M., and Stockinger,B.,** Novel pathways of antigen presentation for the maintenance of memory. *Int.Immunol.* 1991. **3**: 141-148.
63. **Denzer,K., van Eijk,M., Kleijmeer,M.J., Jakobson,E., De Groot,C., and Geuze,H.J.,** Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J.Immunol.* 2000. **165**: 1259-1265.
64. **Chaput,N., Taieb,J., Scharz,N., Flament,C., Novault,S., Andre,F., and Zitvogel,L.,** The potential of exosomes in immunotherapy of cancer. *Blood Cells Mol.Dis.* 2005. **35**: 111-115.
65. **Prusiner,S.B.,** The prion diseases. *Brain Pathol.* 1998. **8**: 499-513.
66. **Schatzl,H.M., Laszlo,L., Holtzman,D.M., Tatzelt,J., DeArmond,S.J., Weiner,R.I., Mobley,W.C., and Prusiner,S.B.,** A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J.Virol.* 1997. **71**: 8821-8831.
67. **Fevrier,B., Vilette,D., Archer,F., Loew,D., Faigle,W., Vidal,M., Laude,H., and Raposo,G.,** Cells release prions in association with exosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004. **101**: 9683-9688.
68. **Nguyen,D.H. and Hildreth,J.E.,** Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J.Virol.* 2000. **74**: 3264-3272.
69. **Orenstein,J.M., Meltzer,M.S., Phipps,T., and Gendelman,H.E.,** Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J.Virol.* 1988. **62**: 2578-2586.
70. **Nguyen,D.G., Booth,A., Gould,S.J., and Hildreth,J.E.,** Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 52347-52354.

71. **Gould,S.J., Booth,A.M., and Hildreth,J.E.,** The Trojan exosome hypothesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003. **100**: 10592-10597.

72. **Parolini,I., Sargiacomo,M., Lisanti,M.P., and Peschle,C.,** Signal transduction and glycoposphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood* 1996. **87**: 3783-3794.

73. **Clayton,A., Harris,C.L., Court,J., Mason,M.D., and Morgan,B.P.,** Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *Eur.J.Immunol.* 2003. **33**: 522-531.

74. **de Gassart,A., Geminard,C., Fevrier,B., Raposo,G., and Vidal,M.,** Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 2003. **102**: 4336-4344.

75. **Levy,S. and Shoham,T.,** Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology.(Bethesda.)* 2005. **20**: 218-224.

76. **Stipp,C.S., Kolesnikova,T.V., and Hemler,M.E.,** Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem.Sci.* 2003. **28**: 106-112.

77. **Bonifacino,J.S. and Traub,L.M.,** Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu.Rev.Biochem.* 2003. **72**: 395-447.

78. **Rous,B.A., Reaves,B.J., Ihrke,G., Briggs,J.A., Gray,S.R., Stephens,D.J., Banting,G., and Luzio,J.P.,** Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol.Biol.Cell* 2002. **13**: 1071-1082.

79. **Vidal,M., Mangeat,P., and Hoekstra,D.,** Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J.Cell Sci.* 1997. **110 (Pt 16)**: 1867-1877.

80. **Kovalenko,O.V., Metcalf,D.G., DeGrado,W.F., and Hemler,M.E.,** Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC.Struct.Biol.* 2005. **5**: 11.

81. **Mittelbrunn,M., Yanez-Mo,M., Sancho,D., Ursa,A., and Sanchez-Madrid,F.,** Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J.Immunol.* 2002. **169**: 6691-6695.

82. **Charrin,S., Manie,S., Oualid,M., Billard,M., Boucheix,C., and Rubinstein,E.,** Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett.* 2002. **516**: 139-144.

83. **Hemler,M.E.,** Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 2003. **19**: 397-422.

84. **Kropshofer,H., Spindeldreher,S., Rohn,T.A., Platania,N., Grygar,C., Daniel,N., Wolpl,A., Langen,H., Horejsi,V., and Vogt,A.B.,** Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide- MHC class II complexes. *Nat.Immunol.* 2002. **3**: 61-68.

85. **Drbal,K., Angelisova,P., Rasmussen,A.M., Hilgert,I., Funderud,S., and Horejsi,V.,** The nature of the subset of MHC class II molecules carrying the CDw78 epitopes. *Int.Immunol.* 1999. **11**: 491-498.

86. **Vogt,A.B., Spindeldreher,S., and Kropshofer,H.,** Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol.Rev.* 2002. **189**: 136-151.

87. **Goldstein,G., Scheid,M., Hammerling,U., Schlesinger,D.H., Niall,H.D., and Boyse,E.A.,** Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1975. **72**: 11-15.

88. **Goldknopf, I.L. and Busch, H.,** Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1977. **74:** 864-868.

89. **Hunt, L.T. and Dayhoff, M.O.,** Amino-terminal sequence identity of ubiquitin and the nonhistone component of nuclear protein A24. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1977. **74:** 650-655.

90. **Wilkinson, K.D.,** The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005. **102:** 15280-15282.

91. **Arnason, T. and Ellison, M.J.,** Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol.Cell Biol.* 1994. **14:** 7876-7883.

92. **Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M.,** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 2000. **19:** 94-102.

93. **Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E.H., Hayashi, H., Murata, S., Hiroaki, H., Sato, M., Tanaka, K., and Shirakawa, M.,** Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells* 2004. **9:** 865-875.

94. **Haglund, K., Di Fiore, P.P., and Dikic, I.,** Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem.Sci.* 2003. **28:** 598-603.

95. **Hershko, A. and Ciechanover, A.,** The ubiquitin system. *Annu.Rev.Biochem.* 1998. **67:** 425-479.

96. **Wilkinson, K.D.,** Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 1997. **11:** 1245-1256.

97. **Welchman, R.L., Gordon, C., and Mayer, R.J.,** Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2005. **6:** 599-609.

98. **Pines, J. and Lindon, C.,** Proteolysis: anytime, any place, anywhere? *Nat. Cell Biol.* 2005. **7**: 731-735.
99. **Hough, R., Pratt, G., and Rechsteiner, M.,** Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 1986. **261**: 2400-2408.
100. **Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R.,** Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997. **386**: 463-471.
101. **Ciechanover, A.,** The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 1998. **17**: 7151-7160.
102. **Hicke, L., Schubert, H.L., and Hill, C.P.,** Ubiquitin-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005. **6**: 610-621.
103. **Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Yokosawa, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Kato, K.,** Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep.* 2003. **4**: 301-306.
104. **Hoppe, T.,** Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem. Sci.* 2005. **30**: 183-187.
105. **Hicke, L. and Riezman, H.,** Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 1996. **84**: 277-287.
106. **Hicke, L.,** Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol.* 1999. **9**: 107-112.
107. **Hicke, L.,** Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. **2**: 195-201.

108. **Nakatsu,F., Sakuma,M., Matsuo,Y., Arase,H., Yamasaki,S., Nakamura,N., Saito,T., and Ohno,H.,** A Di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis. *J.Biol.Chem.* 2000. **275**: 26213-26219.

109. **Hicke,L., Zanolari,B., and Riezman,H.,** Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J.Cell Biol.* 1998. **141**: 349-358.

110. **Hicke,L. and Dunn,R.,** Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 2003. **19**: 141-172.

111. **Bonifacino,J.S.,** The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2004. **5**: 23-32.

112. **Levkowitz,G., Waterman,H., Zamir,E., Kam,Z., Oved,S., Langdon,W.Y., Beguinot,L., Geiger,B., and Yarden,Y.,** c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 1998. **12**: 3663-3674.

113. **Amerik,A.Y., Nowak,J., Swaminathan,S., and Hochstrasser,M.,** The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol.Biol.Cell* 2000. **11**: 3365-3380.

114. **Laszlo,L., Doherty,F.J., Watson,A., Self,T., Landon,M., Lowe,J., and Mayer,R.J.,** Immunogold localisation of ubiquitin-protein conjugates in primary (azurophilic) granules of polymorphonuclear neutrophils. *FEBS Lett.* 1991. **279**: 175-178.

115. **Buschow,S.I., Liefhebber,J.M., Wubbolts,R., and Stoorvogel,W.,** Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells Mol.Dis.* 2005. **35**: 398-403.

116. **Reinstein,E.,** Immunologic aspects of protein degradation by the ubiquitin-proteasome system. *Isr.Med.Assoc.J.* 2004. **6**: 420-424.

117. **Hewitt,E.W.**, The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 2003. **110**: 163-169.
118. **Coscoy,L., Sanchez,D.J., and Ganem,D.**, A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. *J.Cell Biol.* 2001. **155**: 1265-1273.
119. **Katzmann,D.J., Odorizzi,G., and Emr,S.D.**, Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002. **3**: 893-905.
120. **Zwart,W., Griekspoor,A., Kuijl,C., Marsman,M., van Rheenen,J., Janssen,H., Calafat,J., van Ham,M., Janssen,L., van Lith,M., Jalink,K., and Neefjes,J.**, Spatial Separation of HLA-DM/HLA-DR Interactions within MIIC and Phagosome-Induced Immune Escape. *Immunity.* 2005. **22**: 221-233.
121. **Hicke,L.**, A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 2001. **106**: 527-530.
122. **Reggiori,F. and Pelham,H.R.**, Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J.* 2001. **20**: 5176-5186.
123. **Urbe,S.**, Ubiquitin and endocytic protein sorting. *Essays Biochem.* 2005. **41**: 81-98.
124. **Haglund,K., Sigismund,S., Polo,S., Szymkiewicz,I., Di Fiore,P.P., and Dikic,I.**, Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat.Cell Biol.* 2003. **5**: 461-466.
125. **Shackelford,D.A. and Strominger,J.L.**, Analysis of the oligosaccharides on the HLA-DR and DC1 B cell antigens. *J.Immunol.* 1983. **130**: 274-282.

126. **Lodish,H.F., Braell,W.A., Schwartz,A.L., Strous,G.J., and Zilberstein,A.,** Synthesis and assembly of membrane and organelle proteins. *Int.Rev.Cytol.Suppl* 1981. **12:** 247-307.
127. **Raiborg,C., Bache,K.G., Gillooly,D.J., Madshus,I.H., Stang,E., and Stenmark,H.,** Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat.Cell Biol.* 2002. **4:** 394-398.
128. **Marks,M.S., Woodruff,L., Ohno,H., and Bonifacino,J.S.,** Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J.Cell Biol.* 1996. **135:** 341-354.
129. **Liu,K.J., Schwen,M., Tucker,P.W., and Kim,B.S.,** Hybrid membrane IgM with the transmembrane region of I-A alpha facilitates enhanced presentation of distinct epitopes to T cells. *J.Immunol.* 1998. **160:** 4161-4168.
130. **Barabanova,Y.A., Kang,H.K., Myoung,J., Kang,B., Bishop,G.A., and Kim,B.S.,** Role of the major histocompatibility complex class II transmembrane region in antigen presentation and intracellular trafficking. *Immunology* 2004. **111:** 165-172.
131. **Roberts,C.J., Pohlig,G., Rothman,J.H., and Stevens,T.H.,** Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J.Cell Biol.* 1989. **108:** 1363-1373.
132. **Katzmann,D.J., Babst,M., and Emr,S.D.,** Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 2001. **106:** 145-155.
133. **Katzmann,D.J., Sarkar,S., Chu,T., Audhya,A., and Emr,S.D.,** Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S. *Mol.Biol.Cell* 2004. **15:** 468-480.
134. **Delcayre,A., Estelles,A., Sperinde,J., Roulon,T., Paz,P., Aguilar,B., Villanueva,J., Khine,S., and Le Pecq,J.B.,** Exosome Display technology:

applications to the development of new diagnostics and therapeutics. *Blood Cells Mol.Dis.* 2005. **35**: 158-168.

135. **Le Naour,F., Charrin,S., Labas,V., Le Caer,J.P., Boucheix,C., and Rubinstein,E.,** Tetraspanins connect several types of Ig proteins: IgM is a novel component of the tetraspanin web on B-lymphoid cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 2004. **53**: 148-152.
136. **Zilber,M.T., Setterblad,N., Vasselon,T., Doliger,C., Charron,D., Mooney,N., and Gelin,C.,** MHC class II/CD38/CD9: a lipid-raft-dependent signaling complex in human monocytes. *Blood* 2005. **106**: 3074-3081.
137. **Kirchhausen,T.,** Clathrin. *Annu.Rev.Biochem.* 2000. **69**: 699-727.
138. **Potter,P.K., Copier,J., Sacks,S.H., Calafat,J., Janssen,H., Neefjes,J.J., and Kelly,A.P.,** Accurate intracellular localization of HLA-DM requires correct spacing of a cytoplasmic YTPL targeting motif relative to the transmembrane domain. *Eur.J.Immunol.* 1999. **29**: 3936-3944.
139. **Odorizzi,C.G., Trowbridge,I.S., Xue,L., Hopkins,C.R., Davis,C.D., and Collawn,J.F.,** Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J.Cell Biol.* 1994. **126**: 317-330.
140. **Pieters,J., Bakke,O., and Dobberstein,B.,** The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J.Cell.Sci.* 1993. **106**: 831-846.
141. **Simonsen,A., Pedersen,K.W., Nordeng,T.W., von der,L.A., Stang,E., Long,E.O., and Bakke,O.,** Polarized transport of MHC class II molecules in Madin-Darby canine kidney cells is directed by a leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the beta-chain. *J.Immunol.* 1999. **163**: 2540-2548.
142. **Laufer,T.M., Smiley,S.T., Ranger,A., Clements,V.K., Ostrand-Rosenberg,S., and Glimcher,L.H.,** Single amino acid mutations in the murine

MHC class II A beta cytoplasmic domain abrogate antigen presentation. *J.Immunol.* 1997. **159**: 5914-5920.

143. **Zhong,G., Romagnoli,P., and Germain,R.N.,** 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.* 1997. **185**: 429-438.

144. **Sekaly,R.P., Jacobson,S., Richert,J.R., Tonnelle,C., McFarland,H.F., and Long,E.O.,** Antigen presentation to HLA class II-restricted measles virus-specific T-cell clones can occur in the absence of the invariant chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1988. **85**: 1209-1212.

145. **Phelps,R.G. and Rees,A.J.,** The HLA complex in Goodpasture's disease: a model for analyzing susceptibility to autoimmunity. *Kidney Int.* 1999. **56**: 1638-1653.

146. **Dikic,I.,** ALIX-ing phospholipids with endosome biogenesis. *Bioessays* 2004. **26**: 604-607.

147. **Doebele,R.C., Busch,R., Scott,H.M., Pashine,A., and Mellins,E.D.,** Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* 2000. **13**: 517-527.

148. **Stratikos,E., Mosyak,L., Zaller,D.M., and Wiley,D.C.,** Identification of the lateral interaction surfaces of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM with HLA-DR1 by formation of tethered complexes that present enhanced HLA-DM catalysis. *J.Exp.Med.* 2002. **196**: 173-183.

149. **Peters,P.J., Neefjes,J.J., Oorschot,V., Ploegh,H.L., and Geuze,H.J.,** Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991. **349**: 669-676.

150. **Calafat,J., Nijenhuis,M., Janssen,H., Tulp,A., Dusseljee,S., Wubbolts,R., and Neefjes,J.,** Major histocompatibility complex class II molecules

induce the formation of endocytic MIIC-like structures. *J.Cell Biol.* 1994. **126**: 967-978.

151. **Busch,R., Rinderknecht,C.H., Roh,S., Lee,A.W., Harding,J.J., Burster,T., Hornell,T.M., and Mellins,E.D.,** Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol.Rev.* 2005. **207**: 242-260.

152. **Arnold,P.Y. and Mannie,M.D.,** Vesicles bearing MHC class II molecules mediate transfer of antigen from antigen-presenting cells to CD4+ T cells. *Eur.J.Immunol.* 1999. **29**: 1363-1373.

153. **Caby,M.P., Lankar,D., Vincendeau-Scherrer,C., Raposo,G., and Bonnerot,C.,** Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int.Immunol.* 2005. **17**: 879-887.