

Université de Montréal

**Ciblage exosomal et effet de HLA-DM sur la présentation antigénique par le complexe
majeur d'histocompatibilité de classe II**

par

Marie-Hélène Côté

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

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

Avril 2008

© Marie-Hélène Côté, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Ciblage exosomal et effet de HLA-DM sur la présentation antigénique par le complexe
majeur d'histocompatibilité de classe II

présenté par :

Marie-Hélène Côté

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Walid Mourad, président-rapporteur
Dr Jacques Thibodeau, directeur de recherche
Dr Guy Lemay, membre du jury

Résumé

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) sont exprimées exclusivement à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et servent à stimuler les cellules CD4⁺ initiant une réponse immunitaire. Le chargement peptidique sur HLA-DR se produit dans les endosomes tardifs et les lysosomes sous l'action de HLA-DM. Cette molécule de classe II non-classique enlève les fragments peptidiques de la chaîne invariante (Ii) restés associés aux molécules de classe II (CLIP) et édite leur répertoire d'antigènes présentés. En utilisant une forme mutante de HLA-DM (HLA-DMy) qui s'accumule à la surface plasmique, nous avons observé que HLA-DMy augmente les chargements de peptides exogènes et aussi la réponse des cellules T en comparaison avec HLA-DM sauvage. Il a été démontré que des molécules chimiques, comme le n-propanol, pouvait avoir le même effet que HLA-DM en remplaçant les peptides associés aux molécules de classe II de la surface cellulaire. De plus, HLA-DMy et le n-propanol ont présenté un effet additif sur la présentation de peptides exogènes.

Certaines protéines de la voie endocytaire, comme HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO et Ii sont ciblés aux compartiments multivésiculaires (MVB) et peuvent être ciblées aux exosomes. Suite à une fusion entre les MVB et la membrane plasmique, les exosomes sont relâchés dans le milieu extracellulaire. Nous avons déterminé que le motif tyrosine de HLA-DM β et son interaction avec HLA-DR n'affectaient pas le ciblage aux exosomes, sauf la molécule HLA-DO.

Cette étude nous a permis de démontrer que HLA-DMy augmente la quantité de peptides exogènes chargés sur les CPA et que HLA-DM et HLA-DMy sont incorporés dans les exosomes.

Mots clés : HLA-DM, HLA-DMy, CMH, présentation d'antigènes, peptides exogènes, exosomes, ciblage endosomal

Abstract

Major histocompatibility class II (MHC II) molecules are expressed exclusively on the surface of antigen presenting cells and serve to stimulate CD4⁺ cells to initiate an immune response. Peptide loading on MHC II molecules occurs in late endosomal and lysosomal compartments by the catalytic action of HLA-DM. This non-classical class II molecule removes class-II-associated invariant-chain peptide (CLIP) from class II molecules and edits their repertoire of antigenic peptides loaded. Using a mutant form of HLA-DM (HLA-DM_y) that is targeted to the plasma membrane, we observed in the case of HLA-DM_y, there is an increase of the loading of exogenous peptides and also significantly increased T cell response in comparison with HLA-DM wild-type. It was found that some chemical molecules, like n-propanol, could mimic the effect of HLA-DM by removing peptides from cell surface class II molecules. Interestingly, HLA-DM_y and n-propanol seem to have an additive effect on the exogenous peptide loading.

Some proteins of the endosomal pathway, like HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO and Ii are targeted to microvesicles-containing compartments called MVB and they can be introduced into exosomes. Following the fusion between MVB and plasma membrane, exosomes are released in extracellular environment. We have determined that tyrosine motif of HLA-DM β and interaction with HLA-DR does not affect HLA-DM targeting to exosomes, except for the HLA-DO molecule.

In conclusion, we showed that HLA-DM_y increases the quantity and the quality of exogenous peptides loading on APC and HLA-DM and HLA-DM_y are incorporated to exosomes.

Keywords: HLA-DM, HLA-DM_y, MHC, antigen presentation, exogenous peptides, exosomes, endosomal targeting

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xi
Chapitre 1 Revue de littérature	12
1.1 Système immunitaire	12
1.2 La présentation antigénique	12
1.2.1 Antigènes des leucocytes humains (HLA)	12
1.2.2 Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II)	14
1.2.2.1 Molécules classiques	14
1.2.2.2 Chaîne Invariante	16
1.2.2.3 Molécules non-classiques	17
1.2.2.3.1 HLA-DM	17
1.2.2.3.2 HLA-DO	20
1.2.3 Antigènes	21
1.2.3.1 Cellules présentatrices d'antigènes	21
1.2.3.2 Antigènes exogènes	22
1.2.4 Complexe CMH/peptide	23
1.2.5 Relâche peptidique	25
1.2.5.1 Action de HLA-DM	25
1.2.5.2 Analogues chimiques de HLA-DM	26
1.2.6 Complexe TCR/peptide/CMH	27
1.2.7 Immunodominance	27
1.2.8 Cancers et Immunothérapies	28
1.3 Exosomes	30
1.3.1 Compartiments enrichis en molécules de classe II	30
1.3.2 Caractéristiques	32
1.3.2.1 Caractéristiques exosomales	32
1.3.2.2 Compositions protéique et lipidique	33
1.3.3 Ciblage aux MVB	35
1.3.3.1 Ubiquitination et système ESCRT	35
1.3.3.2 ESCRT-indépendant	36
1.3.3.3 Radeaux lipidiques	36

1.3.4 Fonctions	37
1.4.1 Volet 1	39
1.4.2 Volet 2	40
Chapitre 2 Procédures expérimentales	42
2.1.1 Plasmides	42
2.1.2 Anticorps	42
2.1.3 Lignées cellulaires et transfections	43
2.1.4 Cytométrie en flux et microscopie confocale à fluorescence	44
2.1.5 Peptides	44
2.1.6 Chargement peptidique à la surface cellulaire	45
2.1.7 Essai fonctionnel de stimulation de cellules T	45
2.1.8 Extraction et purification d'exosomes	46
2.1.9 Immunobuvardage	46
2.1.10 Analyses d'exosomes en cytométrie en flux	47
2.1.11 Microscopie électronique	47
Chapitre 3 Résultats	49
3.1 Effet du ciblage de HLA-DM à la surface cellulaire sur la présentation d'antigènes par les molécules de classe	49
3.1.1 HLA-DM γ et le n-propanol augmentent la présentation d'antigènes	49
3.1.2 Spécificité d'action de HLA-DM	51
3.1.3 L'efficacité de chargement peptidique par les cellules B est augmenté par le n-propanol	53
3.1.4 Le pH et la concentration de sérum affectent l'effet du n-propanol sur le chargement peptidique	56
3.1.5 Effet de la chaîne invariante sur le chargement peptidique	59
3.1.6 HLA-DO diminue le chargement peptidique dans les cellules HeLa CIITA DO60	62
3.1.7 Le chargement du peptide gp100 est influencé par HLA-DM et HLA-DM γ	62
3.2 Présence de HLA-DM dans les exosomes	64
3.2.1 Accumulation de HLA-DM γ à la surface cellulaire	64
3.2.2 Les cellules HeLa sécrètent des exosomes	65
3.2.3 Les exosomes sont enrichis en HLA-DM, HLA-DM γ et CD9	67
3.2.4 HLA-DR n'augmente pas l'intégration de HLA-DM dans les exosomes	69
3.2.5 Effet de la présence de HLA-DR tronquée dans l'intégration de HLA-DM dans les exosomes	70
3.2.6 HLA-DO empêche l'intégration exosomale de HLA-DM	73
3.2.7 Présence de la chaîne invariante dans les exosomes	77

Chapitre 4 Discussion	80
4.1 Effet de HLA-DM à la surface cellulaire sur la présentation antigénique par les molécules de classe II	81
4.1.1 L'importance de HLA-DM dans la présentation antigénique	81
4.1.2 HLA-DM α augmente la présentation antigénique	82
4.1.3 La chaîne invariante réduit le chargement peptidique en présence de HLA-DM β	85
4.1.4 Effet variable de HLA-DO sur la présentation antigénique	86
4.1.5 L'effet additif du n-propanol et de HLA-DM α sur la présentation antigénique	88
4.2 Ciblage exosomal de HLA-DM	90
4.2.1 Les molécules HLA-DM et HLA-DM α sont présentes dans les exosomes des cellules HeLa DM.5 et HeLa DM α	90
4.2.2 HLA-DM accède aux exosomes indépendamment de la présence de HLA-DR	92
4.2.3 Les molécules HLA-DO réduisent l'entrée de HLA-DM et Ii aux exosomes	93
Chapitre 5 Conclusions et perspectives	97
Bibliographie	101

Liste des figures

Figure 1-1.	Structures des molécules du CMH de classe I et de classe II.....	14
Figure 1-2.	Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe II.....	17
Figure 1-3.	Modèle cinétique hypothétique de l'effet catalytique de HLA-DM sur les molécules de classe II.....	19
Figure 1-4.	Représentation schématique du réseau des ponts hydrogènes entre HLA-DR1 et le peptide HA ₃₀₆₋₃₁₈	24
Figure 1-5.	Formation des exosomes dans la voie endocytyque.....	31
Figure 1-6.	Biogenèse des exosomes dans les cellules et dans les compartiments multivésiculaires (MVB).....	34
Figure 3-1.	HLA-DMy et le n-propanol augmentent la réponse des cellules T CD4 ⁺ aux cellules stables 293TDRI.....	50
Figure 3-2.	L'effet de HLA-DMy est spécifique aux peptides de haute affinité pour les molécules de classe II.....	52
Figure 3-3.	Le chargement peptidique et la stimulation des cellules T par les cellules B sont augmentés en présence du n-propanol	54
Figure 3-4.	Le n-propanol n'augmente pas la relâche de CLIP des molécules de classe II.....	56
Figure 3-5.	Effet du pH et du sérum sur le chargement peptidique sur la lignée cellulaire stable 293TDRI.....	58
Figure 3-6.	Effet de la chaîne invariante sur le chargement peptidique.....	60
Figure 3-7.	HLA-DO réduit le chargement peptidique des cellules HeLa CIITA...	61
Figure 3-8.	HLA-DMy et le n-propanol augmentent le chargement peptidique de gp100.....	63
Figure 3-9.	Ciblage exosomal de HLA-DM et HLA-DMy.....	66
Figure 3-10.	HLA-DR n'augmente pas le ciblage exosomal de HLA-DM.....	70
Figure 3-11.	HLA-DM est ciblé aux exosomes même en présence de HLA-DR tronquée.....	72

Figure 3-12.	Ratios de HLA-DM et HLA-DR dans les exosomes de cellules HeLa DM.5 avec HLA-DR ou HLA-DR tronquée.....	73
Figure 3-13.	HLA-DO réduit l'accumulation de HLA-DM dans les exosomes.....	74
Figure 3-14.	Absence de HLA-DM et Ii en présence de HLA-DO.....	75
Figure 3-15.	HLA-DO réduit l'accumulation de Ii dans les exosomes.....	78

Liste des abréviations

aa.....	acide aminé
CDR.....	« <i>complementarity determining regions</i> »
CMH.....	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA.....	cellules présentatrices d'antigènes
DC.....	cellules dendritiques
FBSi.....	sérum de veau foetal décomplémenté
HA.....	hémagglutinine du virus influenza
HLA.....	antigène des leucocytes humains
hsp.....	protéine de choc thermique
Ii.....	chaîne invariante
kb.....	kilo base
kDa.....	kilo dalton
LBPA.....	acide lyso-(bis)-phosphatidique
MIIC.....	compartiment riche en CMH de classe II
MVB.....	compartiment multivésiculaire
RE.....	réticulum endoplasmique
TAA.....	antigènes associés aux tumeurs
TCR.....	récepteur de cellule T
TNG.....	réseau <i>trans</i> -golgien
t _{1/2}	demi-vie
VIH.....	virus de l'immunodéficience humaine

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Dr. Jacques Thibodeau pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche et m'avoir permis de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire, ainsi que pour son suivi scientifique. Je remercie également le Canadian Cancer Society et le Canadian Institutes of Health Research pour leur support financier aux projets du laboratoire du Dr. Jacques Thibodeau.

Je désire spécialement remercier Mathieu, car sans lui, je n'aurais pas entrepris ce laborieux projet. Dans mes moments de découragement, il a toujours été très disponible et m'a prodigué de judicieux conseils.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance envers Mammad Pezeshki et Dr. Georges Azar qui ont su encadrer mes recherches et répondre à mes questions durant ma maîtrise. Je remercie tous les membres du laboratoire et du département qui m'ont apporté leur aide et support de près ou de loin tout au long de ce projet, Laetitia, Jean-Simon, Marie-Claude, Alexandre B., Marie-Elaine, Maryse, Julie, Alexandre O., Djibril, Jessy et Annie. Je remercie aussi M. Serge Sénéchal pour ses conseils et son aide pour les analyses en cytométrie en flux.

Merci à mes parents qui m'ont toujours encouragé dans mes projets. Merci à toute ma famille et à tous mes amis pour s'être adaptés à mes horaires chargés et irréguliers. Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement mon conjoint Louis-Philippe qui m'a soutenu dans mon projet de retour aux études. Il m'a accordé tout le long de ma maîtrise le support moral et les encouragements dont j'ai eu besoin pour réaliser ce projet.

Chapitre 1 Revue de littérature

1.1 SYSTÈME IMMUNITAIRE

Un organisme vivant se défend contre les agressions grâce au système immunitaire. Celui-ci correspond à un ensemble coordonné d'éléments qui permet de discriminer le soi du non-soi. Des réponses immunitaires très diversifiées sont nécessaires pour pouvoir lutter contre tous les agents infectieux. C'est par la localisation de l'infection et la nature de l'agent infectieux que le type de réponse immunitaire le plus efficace peut être déterminé.

Les réponses immunitaires peuvent être classées en deux grandes catégories ; les réponses naturelles ou non spécifiques et les réponses adaptatives ou spécifiques. Les mécanismes de défense non spécifiques ne peuvent pas distinguer les agents infectieux les uns des autres. Ils comprennent par exemple la barrière externe, telle la peau, ainsi que les réactions inflammatoires. Par contre, une réponse immunitaire adaptative est hautement spécifique à un pathogène particulier et celle-ci s'améliore à chaque nouveau contact avec ce même pathogène. Le mécanisme de défense spécifique comprend le système immunitaire humoral qui s'attaque aux bactéries et aux virus par des anticorps sécrétés par les cellules B, et le système immunitaire à médiation cellulaire qui s'occupe, via les cellules T, des cellules infectées ou cancéreuses.

Toute réponse immunitaire implique une reconnaissance du pathogène, puis le développement d'une réaction destinée à l'éliminer. On doit retenir que ce sont les antigènes, marqueurs des agents étrangers à l'organisme, qui sont à l'origine de toute réponse immunitaire adaptative. Celle-ci s'arrête seulement lorsque l'antigène a été éliminé.

1.2 LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE

1.2.1 Antigènes des leucocytes humains (HLA)

La reconnaissance des antigènes par les cellules T est une étape importante dans le processus de déclenchement d'une réponse immunitaire. Contrairement aux cellules B, les

cellules T ne lient pas directement les antigènes, mais reconnaissent l'association de l'antigène avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) que l'on retrouve à la surface de certaines cellules, soient les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). En effet, ces molécules servent de présentoirs d'antigènes aux cellules T [1].

Le complexe majeur d'histocompatibilité est l'ensemble des antigènes exprimés des leucocytes humains chez l'homme (HLA) qui regroupe trois classes de gènes. Il comporte plus de 200 gènes que l'on retrouve sur le chromosome 6. Il y a plus d'une quarantaine de ces gènes qui codent pour les antigènes des leucocytes, alors que plusieurs d'entre eux ne sont pas reliés à l'immunité [2].

Les gènes de classe I codent la chaîne lourde de polypeptides α des molécules d'histocompatibilité de classe I. La chaîne β de ces molécules de classe I, le gène de la β 2-microglobuline, se situe sur le chromosome 15. Il y a quelque 20 gènes de classe I dans la région du HLA, mais trois d'entre eux sont considérés comme molécules de classe I classiques. En effet, les produits des loci HLA-A, HLA-B et HLA-C se différencient des autres par leur grand polymorphisme allélique et leur expression ubiquitaire [1]. Les molécules du CMH de classe I intégrée à la membrane présentent les antigènes peptidiques de source intracellulaire dans leur niche peptidique formée par les domaines α 1 et α 2 aux

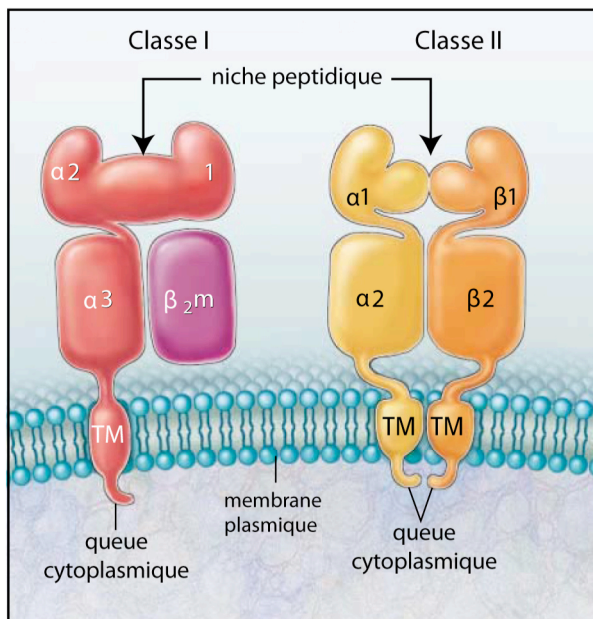


Figure 1-1. Structures des molécules du CMH de classe I et de classe II

Les molécules de classe I sont constituées de la chaîne légère β 2-microglobuline et d'une chaîne lourde α . Celle-ci comporte deux domaines de liaisons au peptide (α 1 et α 2), d'un domaine constant d'immunoglobuline α 3, d'une région transmembranaire (TM) et d'une queue cytoplasmique. Les molécules de classe II sont constituées de deux chaînes (α et β) à 4 domaines : la niche peptidique (α 1 et β 1), un domaine constant d'immunoglobuline (α 2 et β 2), d'une région transmembranaire et d'une queue cytoplasmique. Traduit de [1].

cellules T CD8⁺ cytotoxiques (Figure 1-1) [1]. Elles représentent ainsi des éléments essentiels dans les réponses immunitaires.

La présentation aux cellules T CD4⁺ d'antigènes d'origine extracellulaire dépend des molécules de classe II hétérodimériques. Ce sont les gènes de classe II qui encodent les chaînes polypeptidiques α et β des molécules de classe II. Ces molécules sont exprimées de façon constitutive uniquement par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui comprend les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules B et les cellules épithéliales thymiques [3]. Dans de nombreux types de cellules, les molécules de classe II sont induites par certaines cytokines dont le principal, l'interféron- γ [4]. Ce sont les domaines extracellulaires $\alpha 1$ et $\beta 1$ qui forme la niche peptidique de la molécule de classe II (Figure 1-1). Ces molécules de classe II ont un rôle central dans l'exécution de la réponse immunitaire adaptative.

Finalement, les gènes de classe III forment quant à eux un ensemble hétérogène comportant des gènes sans intérêt immunologique [3].

1.2.2 Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II)

1.2.2.1 Molécules classiques

Les molécules de classe II sont exprimées à la surface cellulaire et leur expression est confinée aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui excellent dans l'endocytose d'antigènes extracellulaires.

La région de classe II, d'environ 1000 Kb, peut se diviser en trois sous régions appelées locus DP, DQ et DR. Chacun des trois locus de classe II porte deux gènes encodant respectivement une chaîne lourde α de 31-34 kDa et une chaîne légère β de 26-29 kDa qui vont s'associer de façon non-covalente pour former les hétérodimères classiques de classe II HLA-DP, -DQ et -DR. Les gènes qui codent les molécules HLA sont les plus polymorphiques du génome humain [1]. Les molécules HLA sont des glycoprotéines

transmembranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Ces trois types de molécules ont une structure biochimique comparable.

Les molécules HLA sont organisées en domaines. Chaque chaîne présente deux domaines extra-membranaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$) associés par une courte séquence à une région transmembranaire d'environ 30 aa et à un domaine cytoplasmique de 10 à 15 aa [5]. Les domaines près de la membrane sont conservés. Ce sont les domaines les plus éloignés de la membrane qui portent le polymorphisme. Ces derniers s'associent étroitement pour former un sillon qui reste ouvert aux deux extrémités où l'antigène de longueur variable, de 11-20 aa, peut s'insérer.

Les molécules du CMH de classe II sont traduites dans le réticulum endoplasmique (RE) et glycosylées de façon co-translationnelle [6]. C'est grâce aux chaperons Erp57 et calnexine que les chaînes sont assemblées. C'est à cette étape qu'une troisième glycoprotéine transmembranaire, la chaîne invariante (Ii), est introduite et forme un hétérotrimère avec les chaînes de classe II. La chaîne invariante lie la niche peptidique des molécules de classe II prévenant ainsi la liaison de peptides intracellulaires destinés aux molécules de classe I [7]. Une fois relâché par la calnexine, cet hétérotrimère ($\alpha/\beta/Ii$) forme un complexe nonamérique ($\alpha/\beta/Ii$)₃. C'est ce nonamère qui quitte le RE pour aller vers les compartiments de la voie endocytyque (Figure 1-2) [8]. De plus, la queue cytoplasmique de α et β de HLA-DR semble réguler l'internalisation des molécules HLA-DR libérées de Ii de la surface de cellule vers les endosomes de recyclage [9]. On retrouve une accumulation de molécules de classe II associées à Ii dans des structures endosomales ou multivésiculaires ou multilamellaires qui comportent toutes des caractéristiques lysosmales: on les appelle les compartiments enrichis de CMH de classe II (MIIC) [10]. C'est là que se produit le chargement peptidique des molécules de classe II par des peptides provenant de protéines dégradées dans ces structures. La plupart du temps, le chargement peptidique n'implique pas les molécules de classe II recyclées de la surface, mais requiert plutôt des molécules de classe II néo-synthétisées associées à la chaîne invariante [11, 12].

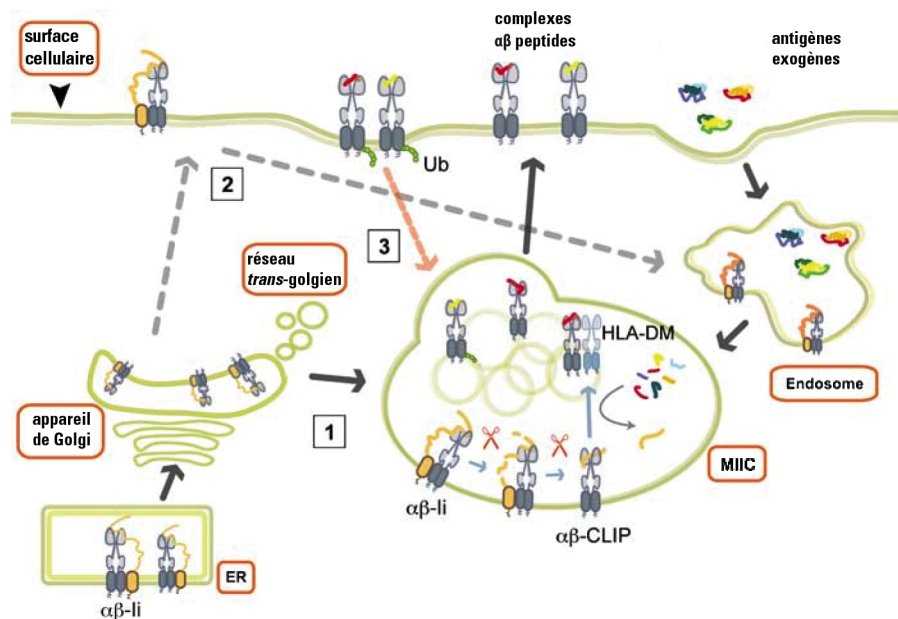


Figure 1-2. Schématisation de la présentation antigénique par le CMH de classe II

Voie de présentation antigénique qui implique l'entrée des antigènes par endocytose. Les molécules hétérodimériques sont assemblées dans le réticulum endoplasmique (RE) et forment une niche peptidique occupée par la chaîne invariante (Ii). Les complexes HLA-DR/Ii voyagent à travers l'appareil de Golgi pour ensuite être dirigés dans les compartiments riches en CMH de classe II (MIIC). La plupart du temps, les complexes passent directement du Golgi vers les MIIC (*voie 1; flèches pleines noires*) et parfois indirectement, c'est-à-dire du Golgi à la surface cellulaire puis aux MIIC (*voie 2; flèches pointillées grises*). Ensuite, dû à l'acidification des compartiments, Ii est dégradée par une série de protéases endosomales et seulement la portion CLIP de Ii reste associée aux molécules de classe II (*orange*). HLA-DM module l'échange de CLIP pour des fragments antigéniques de plus grande affinité (*rouge ou jaune*). Ensuite, les molécules de classe II chargées d'un peptide sont transportées à la membrane plasmique (*flèches bleues*). Traduit de [8].

1.2.2.2 Chaîne Invariante

La chaîne invariante (Ii) est une protéine chaperon non-polymorphique qui exerce plusieurs fonctions auprès des molécules de classe II. Elle est une protéine intégrale membranaire de type II et il en existe 4 isoformes chez l'homme; p33, p35, p41 et p43 [7]. Une fois associée aux chaînes $\alpha\beta$ des molécules de classe II, Ii forme alors un complexe nonamérique. Sa région C-terminale lui permet de trimériser et d'interagir avec les dimères de classe II. La

région cytoplasmique N-terminale du domaine luminal de Ii qui est étendue permet à la portion CLIP d'interagir avec la niche peptidique des chaînes $\alpha\beta$ de classe II inhibant, de ce fait, les liaisons peptidiques [9].

Une autre fonction Ii est d'assurer le transport du complexe nonamérique du RE à travers l'appareil de Golgi vers les compartiments endosomaux. Pour quitter la voie de sécrétion constitutive, un motif structural doit être présent. Un signal de ciblage endosomal composé de 2 motifs de type di-leucine a été identifié sur la queue cytoplasmique de Ii [13, 14]. Ce sont dans les compartiments endosomaux que Ii va être dégradée progressivement à partir du C-terminal due au bas pH et à l'action de différentes protéases dont les cathepsines S, L et F [9]. Ainsi, on retrouvera dans la niche peptidique des molécules de classe II qu'un petit fragment de Ii qu'on appelle CLIP qui inclue les résidus 81 à 104 [15]. C'est par une molécule dont la structure est similaire aux molécules de classe II, HLA-DM, que la relâche du peptide CLIP de la niche peptidique sera catalysée.

La dégradation et la relâche de la chaîne invariante sont nécessaires pour libérer la niche peptidique des molécules de classe II pour en permettre le chargement par des peptides antigéniques présents dans les compartiments endosomaux.

1.2.2.3 Molécules non-classiques

Deux molécules complémentaires dans leur fonction et répondant à une structure protéique hétérodimérique sont également codées par des gènes HLA de classe II. Il s'agit des molécules appelées HLA-DM et HLA-DO. Contrairement aux molécules de classe II classiques, les deux structures moléculaires sont non-polymorphiques et leur expression cellulaire de surface est restreinte. De plus, toutes deux interviennent dans la présentation des peptides par les molécules HLA de classe II classiques.

1.2.2.3.1 HLA-DM

Les gènes des chaînes α et β de HLA-DM (DM) sont donc encodés dans la région des molécules de classe II classiques. Par contre, la structure primaire de HLA-DM possède

une homologie de seulement de 30% avec les molécules de classe II classiques. De plus, son faible polymorphisme classe HLA-DM dans les molécules de classe II dites non-classiques [16]. Le niveau d'expression des molécules HLA-DM dans les CPA est généralement inférieur aux molécules de classe II. Le promoteur de ces gènes comporte des caractéristiques similaires que l'on retrouve chez les molécules de classe II: induction par le facteur de transcription CIITA et par l'interféron- γ [10].

Les chaînes α et β de la protéine HLA-DM sont synthétisées dans le RE avec un poids d'environ 33-35 kDa pour α puis 30-31 kDa pour β et forment un hétérodimère stable. Ce complexe se suffit à lui-même pour son repliement et pour son transport intracellulaire [17]; il n'a pas besoin d'une association avec Ii contrairement aux molécules de classe II classiques.

La structure en trois dimensions de HLA-DM a une homologie avec les molécules de classe II classiques, mais ne contient pas de niche peptidique fonctionnelle. En effet, la niche peptidique est réduite et est trop petite pour permettre à des peptides d'interagir [18].

La protéine HLA-DM est peu retrouvée à la surface cellulaire des CPA, mais plutôt retenue dans les compartiments intracellulaires MIIC. Il n'est pas clairement établi comment HLA-DM atteint les compartiments endosomaux. On sait que la présence d'un motif de type tyrosine (aa YTPL) dans la queue cytoplasmique de HLA-DM β [19, 20] et d'un espacement de ce motif avec le domaine transmembranaire [21] sont responsables du ciblage endosomal. En effet, la mutation de ce motif de type tyrosine entraîne une modification de la distribution cellulaire de HLA-DM associée à une accumulation à la surface cellulaire [22].

Malgré le fait que la protéine HLA-DM ne peut pas fixer de peptides dans sa niche peptidique, celle-ci possède un rôle important dans la formation de complexes stables entre les peptides et les molécules de classe II classiques. Ainsi, HLA-DM agit au niveau du chargement peptidique et de l'édition du répertoire peptidique en catalysant le relâchement du peptide CLIP des molécules de classe II nouvellement synthétisées [23]. Cette fonction n'est pas uniquement réservée au peptide CLIP, HLA-DM peut aussi accélérer la dissociation de peptides de faible affinité ce qui promeut la liaison de peptides de meilleure affinité (Figure 1-3) [24, 25]. De plus, l'activité des molécules HLA-DM est optimale dans

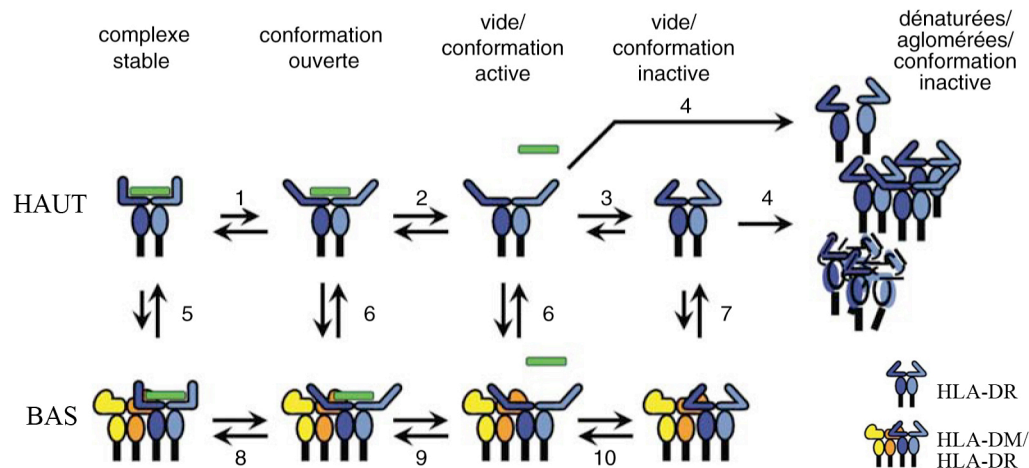


Figure 1-3. Modèle cinétique hypothétique de l'effet catalytique de HLA-DM sur les molécules de classe II

HAUT: Réactions non catalysées par HLA-DM. Le peptide lié est relâché des molécules de classe II, HLA-DR, (1, 2) en passant par une conformation ouverte, créant des molécules de classe II vides réceptives aux peptides mais instables, avant d'être rapidement converties dans un état inactif (3). Les molécules vides actives et inactives semblent être dans un état irréversible puisqu'elles se dénaturent, s'agglomèrent et subissent une protéolyse (4). *BAS*: HLA-DM peut lier toutes les formes intermédiaires des molécules de classe II produites lors de la relâche peptidique, mais semble les préférer sous leur forme active et réceptive (6). Ceci accélère la relâche et la liaison de peptide (8 et 9). HLA-DM peut lier et réactiver les molécules de classe II vides et inactives (7 et 10) empêchant leur dégradation. Traduit de [25].

un environnement acide (pH 5) correspondant au pH des vésicules tardives ou lysosomales de la cellule, où sont générés les peptides antigéniques. La protéine HLA-DM possède aussi une fonction de chaperon moléculaire pour les molécules de classe II classiques. En effet, HLA-DM stabilise des molécules de classe II vides dans une forme réceptive pour des peptides et restaure la forme active de HLA-DR. Autrement les molécules de classe II seraient dénaturées et s'agrégeraient vu le pH acide des MIIC et à l'absence d'association à un peptide [26]. Il a été montré que les complexes CMH/peptide peuvent exister sous plus d'une conformation et ainsi générer différents types de cellules T pour un même peptide. Il a été proposé plus récemment que ce phénomène soit causé par HLA-DM [27]. Ainsi, une forme de complexe CMH/peptide serait sensible à l'action de HLA-DM et une autre

insensible, déterminée par les résidus N-terminaux flanquants. Toutefois, on ne comprend pas encore les implications physiologiques de cette fonction de HLA-DM [28].

Les complexes CMH-peptide stables formés sont finalement transportés à la surface cellulaire des CPA où ils servent de ligands pour les récepteurs des cellules T CD4+ (TCR).

1.2.2.3.2 HLA-DO

Les gènes des chaînes α et β de HLA-DO (DO) sont encodés dans le loci des molécules de classe II, mais ceux-ci sont séparés par 200 kb qui comprennent plusieurs autres gènes. Contrairement à HLA-DM, HLA-DO possède une homologie de structure d'environ 60% avec les produits des gènes des molécules de classe II classiques. Tout comme la molécule HLA-DM, HLA-DO fait partie des molécules de classe II non classiques dû à son faible niveau de polymorphisme [10].

Le patron d'expression de cette molécule est restreint aux cellules B et à certaines cellules épithéliales thymiques bien qu'une faible expression est aussi retrouvée dans certaines cellules dendritiques [29-31]. Le contrôle de la transcription de la chaîne α est similaire à celui des gènes des molécules de classe II classiques, mais celui de la chaîne β est différent. Dans la plupart des types cellulaires, la transcription basale de HLA-DO β est indépendante de l'interféron- γ et du facteur de transcription CIITA [32].

On retrouve les hétérodimères HLA-DO dans les compartiments endosomaux, mais HLA-DO nouvellement synthétisé est instable et requiert l'association avec HLA-DM pour sortir du RE [30]. Dans les cellules B, contrairement aux autres CPA, la majorité des molécules HLA-DO se retrouvent associées à HLA-DM par une liaison avec HLA-DO α et ces complexes HLA-DM/DO représentent 50-70 % de HLA-DM total [16, 33]. La longue queue cytoplasmique de HLA-DO β contient deux signaux de ciblage potentiel pour les endosomes, mais leur nécessité pour la fonction et la localisation du complexe HLA-DM/DO dans les MIIC n'est pas connue [16, 34].

Bien que la fonction de HLA-DO n'est toujours pas claire, il est connu que les complexes HLA-DM/DO sont moins efficaces que HLA-DM seul pour faciliter le chargement

peptidique. Ainsi, HLA-DO inhiberait la fonction catalytique de HLA-DM sur le chargement peptidique et cette influence serait pH dépendante [35]. L'effet inhibiteur de HLA-DO commence à pH 5,5 dans les endosomes précoces et il perd de son effet avec l'acidification des compartiments de la voie endosomale, soit en bas du pH 5,0. Son action se traduit par une augmentation de HLA-DR/CLIP intracellulaire et à la surface des cellules. La présence de HLA-DO dans les cellules B semble promouvoir la présentation aux cellules T CD4+ des peptides de protéines internalisées via le récepteur des cellules B (BCR) au lieu de peptides exogènes provenant de l'endocytose de la phase liquide [16]. Ainsi, le répertoire de peptides présentés par les molécules de classe II est modifié par les molécules HLA-DO.

1.2.3 Antigènes

L'apprêtement et la présentation d'antigènes sont affectés par différents facteurs dont la nature de la CPA, la forme de l'antigène, la localisation et la méthode de contact de l'antigène avec la cellule.

1.2.3.1 Cellules présentatrices d'antigènes

Les différents types cellulaires appréhendent et présentent les antigènes avec une efficacité variable. Parmi les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), on retrouve les cellules B. Elles expriment un très haut niveau de molécules de classe II, de molécules de co-stimulation et d'adhésion aux cellules T, en plus des molécules HLA-DM et HLA-DO [36]. Les cellules B internalisent très peu d'antigènes excepté par leurs immunoglobulines de surface. Ces récepteurs d'antigènes peuvent être très spécifiques et sélectifs pour des antigènes uniques. Ainsi, le chargement peptidique des molécules de classe II est possible grâce au récepteur des cellules B et s'effectue non pas à la surface cellulaire, mais dans les compartiments endosomaux. De plus, il semble que l'affinité des immunoglobulines liées affecte la relâche dans les endosomes et sculpe l'action des protéases lysosomales afin de promouvoir la formation des complexes CMH-antigène et d'activer la réponse humorale ainsi que celle des cellules T.

Les macrophages sont moins efficaces pour présenter les antigènes étant donné leur niveau de molécules de classe II plus bas. L'endocytose et la capture de la phase liquide sont les principaux rôles des macrophages. C'est pourquoi leurs compartiments lysosomaux sont mieux adaptés et digèrent mieux le matériel internalisé [37]. Ainsi, les macrophages aident à éliminer le non-soi accomplissant ainsi leur rôle dans l'immunité innée.

Les cellules dendritiques (DC) sont les plus professionnelles des cellules présentatrices d'antigènes. La présentation antigénique par les DC est une étape essentielle pour générer la tolérance et l'immunité. Les DC à l'état immature ont une grande aptitude pour internaliser des antigènes. Par contre, cette capacité se perd suite à une maturation des DC causée par la reconnaissance directe ou indirecte de pathogènes. Ce phénomène se traduit par une diminution de la capacité à internaliser les antigènes au profit d'une meilleure efficacité de présentation d'antigènes. Celle-ci est causée par une augmentation du niveau d'expression à la surface cellulaire de molécules de classe I et II du CMH et de molécules de co-stimulation [38].

1.2.3.2 Antigènes exogènes

Les différentes CPA peuvent capter de différentes façons les antigènes exogènes contribuant à l'hétérogénéité des peptides présentés.

Le chargement peptidique extracellulaire est la façon la plus directe de lier les peptides aux molécules de classe II. Certaines conditions sont nécessaires *in vivo*, par exemple que l'antigène soit présent à la surface cellulaire en concentration suffisante ou qu'il y ait des molécules de classe II dans leur forme réceptive. Par contre, les proportions de ce phénomène *in vivo* dans l'échange de peptides ne sont pas connues. L'abondance de CLIP et la faible présence de HLA-DM à la surface cellulaire *in vivo* suggèrent que ce phénomène soit peu répandu [36].

Les molécules de classe II présentent des peptides d'origine exogène qui ont été internalisés dans les CPA par le phénomène d'endocytose. Différents types d'endocytose permettent d'accumuler les antigènes. À l'inverse des cellules B, le type d'endocytose le plus commun caractérisé *ex vivo* chez les macrophages et les DC, est la macropinocytose [39]. C'est un mécanisme indépendant du réseau d'actine qui permet de capter une grande quantité de

liquide contenant les antigènes solubles. Il existe aussi les types d'endocytose facilités par la clathrine ou la calvéoline qui impliquent un large éventail de récepteurs de surface, comme les BCR des cellules B. Par contre, la phagocytose est le mécanisme le plus fréquent *in vivo* pour internaliser des particules de grosse taille et est surtout utilisée par les DC et les macrophages.

Les protéines internalisées intègrent successivement les différents compartiments endosomaux et lysosomaux. Elles y seront dénaturées et dégradées par les protéases résidentes et par l'environnement acide variant entre les pH 4,5 et pH 5,5. Ce processus engendre donc des peptides capables de s'associer aux molécules de classe II de façon efficace dans les MIIC [40].

1.2.4 Complexe CMH/peptide

L'apprêtement des peptides peut générer une vaste population hétérogène de peptides d'une taille allant de 7 à 20 aa et chaque allèle de molécules de classe II peut interagir avec des milliers de ligands. Il existe donc une infinité de possibilités d'association entre ces peptides et les molécules de classe II. Des règles communes régissant ces interactions ont été établies par des études de cristallographie aux rayons X ainsi que par l'analyse des séquences peptidiques par dégradation d'Edman et spectrométrie de masse [41].

L'association CMH/peptide est régie par un réseau de ponts hydrogènes entre le squelette du peptide et des résidus non polymorphiques de la niche peptidique de HLA-DR et est influencé par la longueur du peptide. La contribution énergétique de l'interaction des peptides aux molécules de classe II confère l'aspect universel au mode de liaison. Le second type d'interaction sont les chaînes latérales des résidus des peptides ancrées dans les cavités de la niche peptidique. Ces chaînes latérales forment des interactions électrostatiques avec des cavités polymorphiques de la niche peptidique [42]. Ce sont ces poches polymorphiques qui sont responsables de la spécificité de peptides des différentes molécules de classe II. L'étude des molécules de classe II de souris I-A^d propose la présence d'une coopération entre les interactions des résidus ancrés et les ponts hydrogènes lorsqu'ils sont directement adjacents [43].

Le premier cristal de l'interaction de HLA-DR1 et le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈, provenant de l'hémagglutinine du virus influenza (HA), réalisé par l'équipe de Wiley a permis de montrer la présence de 15 ponts hydrogènes entre des résidus du CMH II et le squelette du peptide. Parmi ces ponts hydrogènes, 12 impliquent des résidus conservés dans la majorité des molécules de classe II (Figure 1-4) [44]. Le peptide HA possède des chaînes latérales pointant vers l'extérieur du site de liaison presque tous les 3 résidus. Ces derniers correspondent environ à 35% de la surface du peptide et sont impliqués dans l'interaction avec le récepteur des cellules T (TCR) [44].

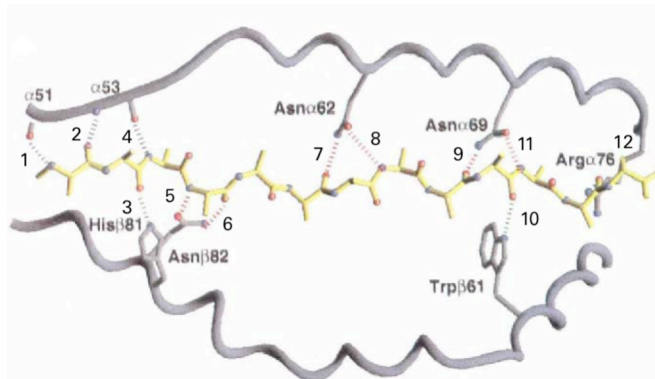


Figure 1-4. Représentation schématique du réseau des ponts hydrogènes entre HLA-DR1 et le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈

Arrangement dans l'espace des ponts hydrogènes entre les résidus des molécules de classe II et le squelette du peptide. Les ponts hydrogènes sont représentés par les lignes pointillées et sont numérotés 1 à 12 à partir du N-terminal. Tiré de [44].

Les autres résidus latéraux pointent vers le site de liaison et sont majoritairement retrouvés dans les cavités de la niche peptidique. Les cavités P1, P4, P6 et P9 contribuent à l'interaction HLA-DR1/HA, mais leur importance est variable selon les différents allèles des molécules de classe II. Par contre, la cavité P1 reste conservée chez les différents allèles. Puisque c'est la plus large, la plus profonde et la plus hydrophobe des poches de la niche peptidique, cela lui permet d'accueillir la chaîne latérale tyrosine 308 du peptide HA et d'être un point d'ancrage majeur dans cette interaction [44].

La plupart des cavités accommodent un éventail de chaînes latérales et l'interaction CMH/peptide impliquent des interactions séquence indépendantes avec le squelette des peptides. Ainsi, un grand nombre peptide à séquence variable peuvent lier HLA-DR avec une haute affinité.

1.2.5 Relâche peptidique

1.2.5.1 Action de HLA-DM

Le peptide CLIP peut soit se dissocier spontanément de la niche peptidique des molécules de classe II ou, dans le cas de certains allèles qui s'associent plus fortement avec CLIP, être relâché avec l'aide de HLA-DM (Figure 1-3). Le cristal du complexe HLA-DM/DR permettrait de mieux comprendre l'action de HLA-DM sur la relâche peptidique, mais il n'a pas encore été réalisé à ce jour.

La relâche de peptides implique l'ouverture de la niche peptidique et, conséquemment, le bris de ponts hydrogènes entre le squelette du peptide et des résidus des molécules de classe II. Plusieurs évidences ont montré que HLA-DM agirait au niveau de la cavité P1 de HLA-DR. La mutation de l'histidine 81 sur la chaîne β de HLA-DR formant un pont hydrogène court et fort avec la cavité P1 entraîne une perte de sa capacité à lier tout peptide [45]. HLA-DM catalyse aussi préférentiellement la dissociation de peptides HA n'ayant pas la capacité de former des ponts hydrogènes avec la niche peptidique. Par exemple, il est fortement probable que le bris des ponts hydrogènes 1, 2 et 4 entre HA₃₀₆₋₃₁₈ et HLA-DR1 soient les cibles de l'action catalytique de HLA-DM (Figure 1-4) [46]. Ainsi, le réseau de ponts hydrogènes est un élément critique pour la liaison de peptides et une cible potentielle pour HLA-DM.

Deux hypothèses majeures expliquant le mécanisme d'action catalytique de HLA-DM. L'une est que HLA-DM s'associerait préférentiellement à une conformation transitoire et instable des molécules de classe II avec les peptides [47]. Des études de co-immunoprécipitation spécifique ont montré que HLA-DM a une grande affinité pour les molécules de classe II vides ou liées faiblement à des peptides [48]. La liaison aux molécules de classe II vides par HLA-DM empêcherait ainsi la perte de leur capacité à lier les peptides [49]. L'autre mécanisme est que HLA-DM interagirait de façon transitoire au complexe CMH/peptide causant un changement conformationnel de niche peptidique de HLA-DR. Ceci menant au bris d'un ou plusieurs ponts hydrogènes importants, dont celui de l'histidine β 81, et qui finalement déstabiliserait le peptide lié [50]. La fonction de HLA-DM

est optimal à un pH acide (pH 4.5 à 5.5) tout comme la liaison de HLA-DM avec HLA-DR. Cette caractéristique semble être associée aux résidus chargés et hydrophobiques entre HLA-DR et HLA-DM. D'un autre côté, la susceptibilité d'édition du peptide par HLA-DM corrèle avec la nature et l'orientation du peptide. En effet, une augmentation de la longueur du peptide et une meilleure combinaison entre les résidus du peptide et les cavités de la niche peptidique sont associés à une résistance de l'activité de HLA-DM [51]. De plus, le manque de glycines et prolines au cœur même du peptide, c'est-à-dire aux positions d'ancrage des peptides, confère une sensibilité à l'action de HLA-DM [52]. Bref, tous les complexes avec une longue demi-vie sont résistants à HLA-DM, et les complexes instables sont susceptibles à l'action de HLA-DM.

1.2.5.2 Analogues chimiques de HLA-DM

Des études ont été réalisées sur la possibilité que certaines molécules chimiques puissent affecter les ponts hydrogènes du complexe CMH/peptide et ainsi altérer la stabilité des peptides associés à la niche peptidique des molécules de classe II [53-56].

Les ponts hydrogènes requièrent un donneur d'hydrogène et un groupe accepteur, lequel fournit une paire d'électrons libres. Strominger *et al.* ont montré que des groupes fonctionnels, tels les groupes hydroxyles ou amines, ont la capacité de briser ces liens hydrogènes catalysant ainsi la réaction de dissociation du peptide associé aux molécules HLA-DR [54]. Ces molécules parviennent à augmenter le nombre de molécules de classe II sous leur forme réceptive aux peptides comme le ferait HLA-DM, facilitant de ce fait le chargement de peptides exogènes à la surface cellulaire [55].

D'après ces études, la principale différence entre HLA-DM et les molécules imitant HLA-DM serait l'influence du pH sur leur activité catalytique. HLA-DM serait actif à pH acide et son activité serait diminuée à pH neutre. Tandis que les molécules imitatrices de HLA-DM seraient actives dans les deux situations. Une caractéristique potentiellement utile en immunothérapie [54].

1.2.6 Complexe TCR/peptide/CMH

La réponse immunitaire des cellules T CD4⁺ est déclenchée par la reconnaissance d'antigènes seulement sous la forme de peptides associés et présentés par les molécules de classe II à la surface cellulaire.

Le récepteur des cellules T (TCR) présente un mode de liaison similaire sans toutefois avoir de contacts conservés à travers les différents complexes TCR/peptide/CMH II [57]. Ce sont les régions déterminant la complémentarité CDR2 des chaînes α et β du TCR qui reconnaissent les résidus polymorphiques des molécules de classe II. Tandis que la région CDR1 et la région la plus variable CDR3 contactent les résidus du peptide antigénique présenté et la molécule de classe II [57]. La réponse des cellules T suite à la reconnaissance d'un complexe CMH/peptide consiste en une sécrétion de cytokines, une prolifération et une différenciation cellulaire. La principale cytokine produite par les cellules T naïves est l'interleukine -2 (IL-2) qui agit comme facteur de croissance pour les cellules T.

Un complexe TCR/HA/DR1 stabilisé de façon covalente a déjà été cristallisé et a permis d'établir que l'interaction TCR/HA est constituée de liaisons chargées qui sont conservées dans la reconnaissance du peptide HA par d'autres TCRs [58]. De plus, comme les différences dans la séquence des allèles des molécules de classe II se retrouvent dans le creux de la niche peptidique, elles ne sont pas directement accessibles au TCR. Il y aurait plutôt des changements de conformation du peptide lié qui seraient parfois tolérés par d'autres TCR spécifiques [59].

1.2.7 Immunodominance

L'immunogénicité des antigènes protéiques est déterminée par les molécules du CMH sur différents points. D'abord génétiquement par l'expression de certains allèles des molécules de classe II chez un individu. En effet, puisque les différents allèles des molécules de classe II diffèrent dans leur habileté à lier les peptides antigéniques et à stimuler les cellules T auxiliaires spécifiques, la réponse immunitaire varie d'un individu à l'autre. D'autre part, les épitopes présentés par les molécules du CMH qui provoquent une meilleure réponse des

cellules T sont souvent les peptides générés par protéolyses des CPA et ceux qui lient les molécules de classe II avec la plus grande avidité. La dégradation protéolytique endosomale, l'assemblage des complexes CMH/peptide, l'abondance de cellules T spécifiques et la compétition entre cellules T pour interagir avec les CPA sont tous des facteurs influençant l'immunodominance. Toutefois, la stabilité cinétique des complexes CMH/peptide est le plus grand facteur qui détermine l'immunogénicité des peptides. La stabilité cinétique se traduit par la demi-vie ($t_{1/2}$) de l'interaction des peptides avec les molécules de classe II. Ainsi, ce sont les peptides possédant une très grande demi-vie avec les molécules de classe II ($t_{1/2} > 150$ heures) qui confèrent une immunodominance [60]. De plus, il a été démontré que ces complexes stables immunodominants sont dus à l'activité éditrice de HLA-DM dans les compartiments endosomaux des CPA et non pas à la maturation du complexe [61]. C'est un facteur important dans le recrutement des cellules T CD4⁺ spécifiques pour les peptides sélectionnés durant la réponse immunitaire. Il est donc important de considérer cet élément dans le développement de vaccins contre le cancer.

1.2.8 Cancers et Immunothérapies

Depuis plus de 20 ans, il y a une grande controverse, à savoir si le système immunitaire combat naturellement le cancer. Plusieurs s'entendent pour dire que le système maintient une surveillance minimale. Effectivement, on observe que l'incidence de certains cancers augmente chez des patients immunodéficients et que dû à l'immunosénescence, elle augmente avec l'âge [62]. Ainsi, certains suggèrent que les cancers se développent parce que le système immunitaire de l'hôte a failli dans sa tâche, alors que d'autres parlent plutôt d'échappement tumoral à l'immunosurveillance [63].

Le concept de l'immunosurveillance du cancer propose que le système immunitaire est capable de reconnaître les cellules précurseurs de cancers et, dans la plupart des cas, de les détruire avant qu'ils ne deviennent cliniquement apparents. Puisque l'immunosurveillance a un rôle important dans l'élimination des tumeurs, les patients présentant des lésions cancéreuses devraient présenter une réponse immunitaire vigoureuse. Des études antérieures l'ont souvent démontré, mais le cancer s'est quand même développé [63]. Ainsi,

la réponse immunitaire n'aurait pas été assez efficace pour prévenir le développement du cancer ce qui a aussi eu pour effet de sélectionner les cellules tumorales capables d'échapper à la réponse immunitaire, un phénomène mieux connu sous le nom d'immunosélection.

L'identification de protéines normales autant que d'antigènes associés aux tumeurs est nécessaire à la recherche et le développement de vaccins thérapeutiques contre le cancer [64]. Les vaccins ciblant les antigènes tumoraux pourraient être utilisés sur une vaste population de patients, contrairement à d'autres vaccins qui ne ciblent qu'un faible pourcentage de patients. Le but principal du développement de vaccins thérapeutiques contre le cancer est de rendre le système immunitaire de l'hôte réactif aux antigènes caractéristiques des cellules cancéreuses. Les réponses immunitaires cellulaires jouent un rôle important dans le rejet immunitaire. C'est pourquoi la plupart des immunothérapies contre le cancer sont basées sur la stimulation de la réponse immune cellulaire contre les cancers [64]. On sait que les cellules T CD8+ endogènes apportent des effets protecteurs et thérapeutiques anti-tumoraux. L'induction des cellules T CD8+ avec une réactivité immunitaire spécifique peut dépendre de certaines interactions avec d'autres types de cellules. Cependant, il reste que l'effecteur final dans la réaction immunitaire dans la plupart des modèles est le lymphocyte T CD8+ [65].

Il faut tenir compte de l'importance qu'ont les cellules T CD4+ dans le déclenchement de réactions anti-tumorales et dans le maintien de l'activation et de la survie des cellules effectrices T CD8+ [66]. Certains chercheurs, dont Rosenberg et al, ont suggéré de concentrer nos efforts vers la production de cellules T CD4+ anti-tumorales qui reconnaissent les antigènes liés aux CMH de classe II [64]. De plus, ils exposent le besoin *in vivo* d'augmenter le nombre de cellules T ayant une plus grande avidité et d'explorer les nouveaux adjuvants améliorés.

Les cellules dendritiques représentent une cible et un outil fondamental pour la vaccination thérapeutique contre le cancer. En effet, elles induisent, coordonnent et régulent les

réponses immunitaires adaptatives et agissent aussi au niveau de l'activation de la réponse immunitaire cellulaire et humorale [62].

Une des stratégies les plus communes utilisée avec les cellules dendritiques est le chargement peptidique des molécules du complexe d'histocompatibilité majeur de classe I et de classe II à la surface cellulaire. En utilisant des peptides, on fait face à certaines limites qui peuvent faire varier l'effet immunogène de cette stratégie de vaccination. Ces limites sont, par exemple, la restriction d'un peptide à un haplotype de HLA-DR, le nombre limité de peptides caractérisés comme TAA («*tumor associated antigens*»), la vitesse de renouvellement du complexe CMH-peptide, de même que l'induction d'un répertoire clonal restreint de cellules T [62]. Les cellules dendritiques chargées d'antigènes générés *ex-vivo* peuvent induire une immunité anti-tumorale thérapeutique et de protection [64]. Les vaccins basés sur les DC peuvent fonctionner. Mais le faible pourcentage de régression de tumeurs cancéreuses *in vivo* remet en question l'efficacité de ce type de vaccination. Il s'agit donc de raffiner les paramètres immunologiques afin d'augmenter l'efficacité de la méthode de vaccination.

1.3 EXOSOMES

1.3.1 Compartiments enrichis en molécules de classe II

Dans la voie endocytique, les endosomes permettent de séparer les protéines qui vont être recyclées de celles qui vont être dégradées dans les lysosomes. La maturation des endosomes précoces se traduit par une protonation progressive ATPase-dépendante (acidification) des compartiments [67]. Les complexes MIIC sont des compartiments endosomaux tardifs qui accumulent des molécules de classe II et contiennent des enzymes lysosomales, des marqueurs lysosomaux et du matériel endocyté, en plus de Ii, HLA-DM et HLA-DO. La morphologie de ce type de compartiments de 400-500nm peut varier soit en présentant plusieurs vésicules d'inclusion libres de 40-90nm (MVB) [68], ou plusieurs anneaux de membranes concentriques (multilamellaire) ou les deux à la fois.

Les compartiments multivésiculaires peuvent être convertis en structures multilamellaires. Ces structures semblent refléter différents stades de maturation et diffèrent dans leurs compositions protéiques et lipidiques de la membrane limitante et des vésicules internes (section 1.3.2.2). Dans les MVB, les molécules de classe II et HLA-DM se retrouvent sur la membrane limitante et la membrane des vésicules internes [22, 69] , mais il semblerait que l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM se produirait dans les structures internes de MIIC. Ainsi, l'absence d'interaction entre HLA-DR et HLA-DM sur la membrane limitante des

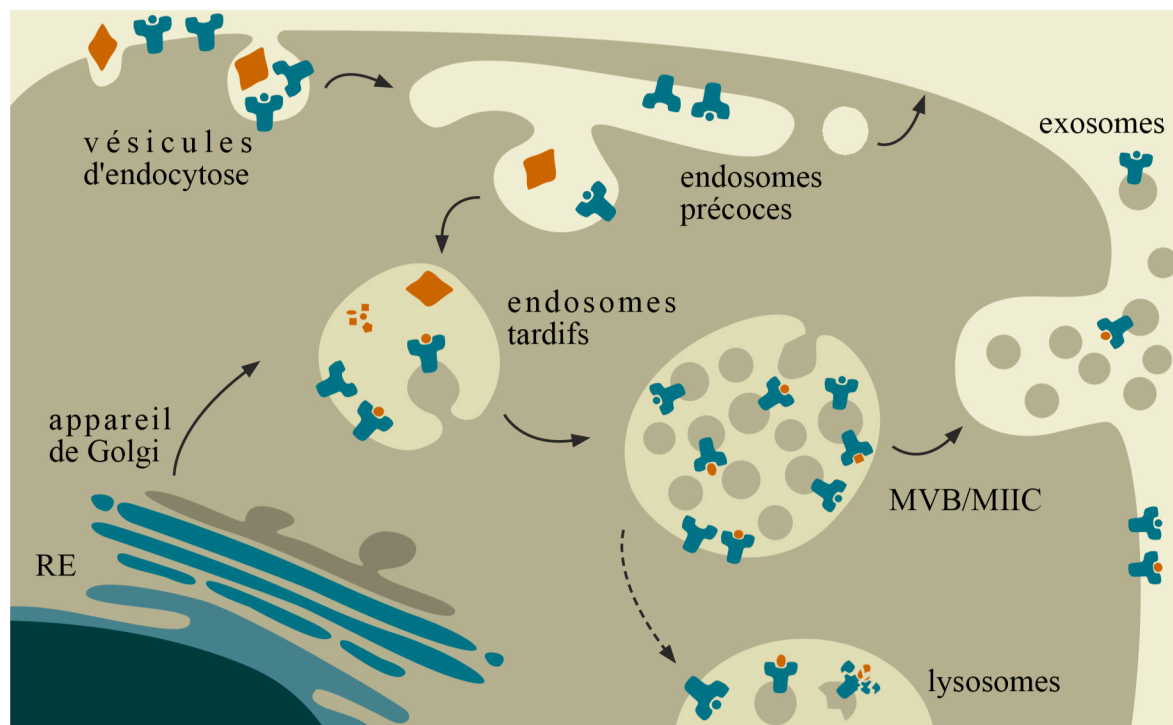


Figure 1-5. Formation des exosomes dans la voie endocytique

Les molécules de classe II sont synthétisées dans le réticulum plasmique (*gris*), passent dans l'appareil de Golgi (*bleu*) avant d'être transportées dans les endosomes (*jaune*). Elles sont concentrées dans les compartiments endosomaux (MIIC) et chargées de peptides pour ensuite être présentées à la surface cellulaire. Lors de l'internalisation des protéines exogènes (*rouge*) vers les endosomes précoces, des molécules de classes II sont incorporées dans les vésicules d'endocytose. Ces derniers mûrissent en endosomes tardifs puis des vésicules internes sont générées transformant ainsi les compartiments en MVB (compartiments multivésiculaires). Ceux-ci peuvent fusionner avec les lysosomes, détruisant les vésicules internes, ou fusionner avec la membrane plasmique, libérant les vésicules internes (exosomes) dans le milieu extracellulaire.

endosomes ne permettrait pas le chargement de peptides [70]. De plus, les complexes HLA-DM/DO sont recyclés entre la membrane plasmique et celle des MIIC dû au signal lysosomal de la chaîne β de HLA-DM [71].

La formation des MIIC semble dépendre de la présence des molécules de classe II et de Ii [72]. Il est possible qu'elle soit déclenchée par la présence de HLA-DR et Ii nouvellement synthétisés. Comme pour les MVB, il y a une différence de composition des membranes internes et externes du MIIC. Les molécules HLA-DR et HLA-DM sont sur les deux types de membranes, mais certaines tétraspanines semblent se relocaliser préférentiellement sur les membranes internes [73].

Jusqu'à ce jour, aucun mécanisme connu n'a été associé à la fusion de la membrane limitante des MVB avec la membrane plasmique [74]. Cette fusion permet la libération des microvésicules internes des MVB et ce sont ces microvésicules relâchées que l'on nomme des exosomes (Figure 1-5) [75].

1.3.2 Caractéristiques

1.3.2.1 Caractéristiques exosomales

Les exosomes sont de microvésicules présentes dans les endosomes multivésiculaires et dont la taille varie entre 30 et 100nm. Ils sont formés par un bourgeonnement inverse de la membrane limitante des endosomes tardifs [68]. Ainsi, il y a formation de vésicules entourées d'une double couche lipidique qui contient du cytosol et qui expose les domaines extracellulaires des protéines transmembranaires. Les MVB fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule et libèrent ces microvésicules dans le milieu environnant. On peut purifier ces vésicules par des centrifugations séquentielles et une ultracentrifugation sur un gradient continu de saccharose. Les exosomes ont une densité de flottaison en saccharose se situant entre 1,13 g/mL et 1,19 g/mL. Le phénomène de sécrétion de microvésicules a été observé dans plusieurs cellules d'origine hématopoïétique tel les lymphocytes T

cytotoxiques, les cellules B transformées par le virus d'Epstein-Barr, les mastocytes, les DC et les plaquettes [74-76].

1.3.2.2 Compositions protéique et lipidique

La plupart des protéines composant les exosomes dérivés de DC sont reliées aux compartiments endocytiques, telles les molécules du CMH de classe I et II. De plus, les exosomes sont aussi composés de protéines impliquées dans la fusion membranaire, la stimulation de cellules T, la transduction de signal, le transport membranaire et dans l'apoptose. Une étude avait aussi permis de faire la distinction biochimique et morphologique entre les exosomes et les microvésicules relâchées par les cellules apoptotiques [77].

L'éventail de protéines retrouvées dans les exosomes est varié. Par contre, l'origine de ces protéines reste assez restreinte. En effet, on retrouve des protéines typiques venant de la membrane des compartiments endosomaux, du cytosquelette, du cytosol et de la membrane plasmique. Alors qu'aucune protéine nucléaire, mitochondriale, du RE et ni de l'appareil de Golgi n'y sont retrouvée [74]. Les exosomes provenant de DC matures et immatures se ressemblent biochimiquement. Par contre les exosomes de DC matures sont enrichies en molécules de classe II, B7.2 et ICAM-1 comparés aux exosomes provenant de DC immatures [78].

Une des plus abondantes familles de protéines retrouvées dans les exosomes sont les tétraspanines, comme CD9, CD63, CD81 et CD82. Ce sont des protéines à quatre domaines transmembranaires impliquées dans plusieurs fonctions biologiques comme la fusion, mobilité, stimulation immunitaire, adhésion et ciblage de protéines. Elles forment un réseau avec des intégrines où des molécules de signalisation et CMH de classe II peuvent être incorporées [69, 76, 79, 80].

Le métabolisme des phospholipides représente un élément critique à la biogenèse des MVB. La composition lipidique des exosomes dérivés de mastocytes et de DC (dexosomes) diffère de celle de la membrane plasmique des cellules parentes. Leur proportion de sphingomyéline est deux fois plus forte que dans les cellules correspondantes, et celle de la phosphatidylcholine est beaucoup plus faible dans les exosomes que dans les cellules. La répartition de la phosphatidyléthanolamine (PE) est symétrique dans les exosomes, alors

qu'habituellement dans la plupart des membranes, elle est asymétrique [81]. Cela pouvant s'expliquer par une augmentation des mouvements " flip-flop" des phospholipides entre les feuillettes des membranes exosomales. Cette perte d'asymétrie combinée une augmentation du pH lors du relâchement des exosomes dans le milieu extracellulaire affecterait l'habileté des exosomes à fusionner avec les autres membranes [82]. Ainsi, cela pourrait faciliter l'adsorption des exosomes et non pas la fusion à d'autres cellules.

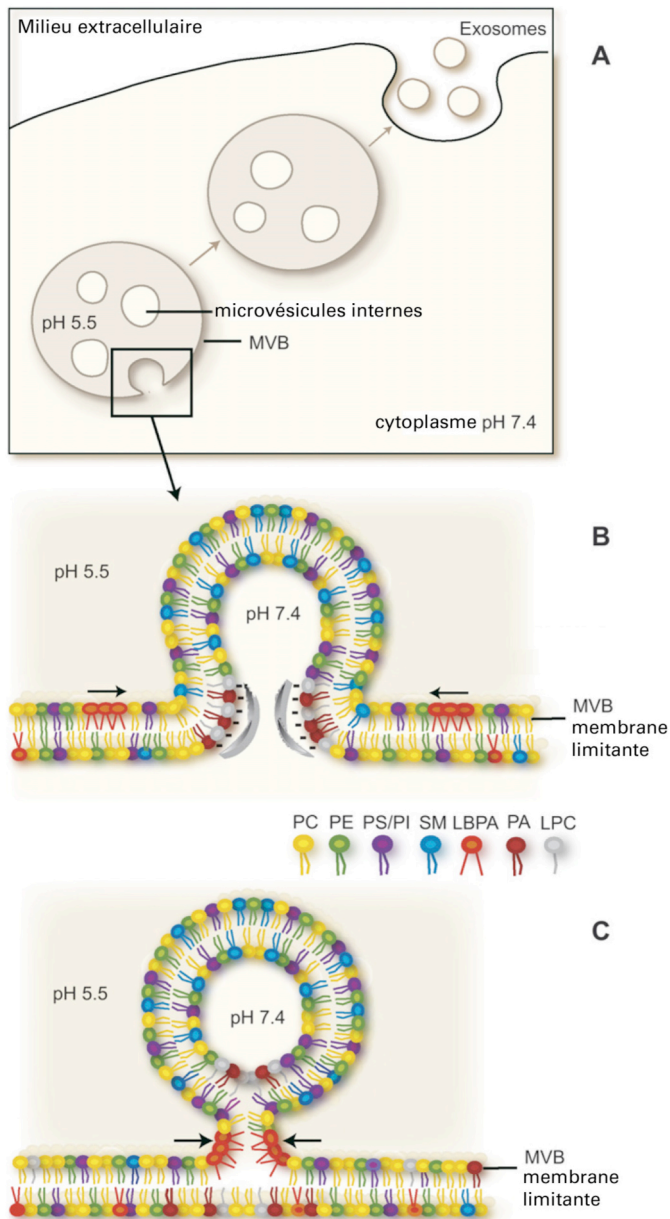


Figure 1-6. Biogenèse des exosomes dans les cellules et dans les compartiments multivésiculaires (MVB)

(A) Les vésicules internes, précurseurs d'exosomes, sont générés dans les compartiments endosomaux tardifs. Le bourgeonnement membranaire des vésicules est basé sur la composition lipidique des exosomes et de l'absence d'asymétrie transmembranaire des phospholipides dans les exosomes. **(B)** La membrane impliquée dans le bourgeonnement est la membrane des MVB qui ne possède pas d'asymétrie des phospholipides. Le phénomène est déclenché par une concentration des molécules LBPA, lesquelles forment des agrégats à pH acide (*flèches*) créant ainsi un excès des lipides sur la membrane limitante des MVB. Le ciblage des lipides durant le processus sélectionne plus de SM, moins de PC. Ce sont les LPC et PA chargés négativement qui déclenche une flexion du feuillet de la vésicule. **(C)** Le détachement de la vésicule se produit lorsque les lipides se répartissent de façon égale sur les deux feuillettes. Tiré de [95].

Selon des études, les membranes internes des MVB sont enrichies en tétraspanines, cholestérol et en LBPA suggérant que les microvésicules l'étaient aussi [83]. Mais d'autres études ont montré avec des exosomes purifiés qu'il y a bien un enrichissement en tétraspanines, mais pas en cholestérol ni en LBPA [81, 84]. Ces différentes conclusions portent à croire qu'il existe des sous populations distinctes de microvésicules de MVB ou de MIIC [73].

1.3.3 Ciblage aux MVB

Bien qu'un signal de ciblage est généralement nécessaire pour cibler les protéines à un compartiment en particulier, aucun signal de ciblage commun des protéines vers les vésicules internes des MVB n'a été identifié. Les MVB reçoivent des cargos provenant du réseau *trans*-golgien (TNG) aussi bien que des molécules été internalisées par endocytose. Toutefois, quelques signaux ont été identifiés pour l'internalisation et l'acheminement de certaines protéines aux MVB et exosomes [67, 85].

1.3.3.1 Ubiquitination et système ESCRT

Le mécanisme de mono-ubiquitination du domaine cytosolique de protéines membranaires et les éléments du complexe endosomal requis pour le transport (ESCRT) sont possiblement impliqués puisqu'on les retrouve dans les exosomes [86]. Les polypeptides hautement conservés sont obtenus par une cascade d'enzymes et sont ainsi liés de façon covalente par leur glycine C-terminale aux résidus lysines de la protéine cible. C'est ESCRT-0 qui reconnaît le cargo mono-ubiquitiné via la protéine Hrs. Cette dernière recrute ESCRT-I et Tsg-101, lequel recrute ESCRT-III via ESCRT-II ou AIP-1/Alix. Ce dernier complexe conduit le cargo dans les vésicules de bourgeonnement des MVB, alors que le complexe ESCRT est recyclé [87]. Par exemple, une mutation ponctuelle du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) a permis de montrer que EGF était toujours acheminé vers la membrane limitante des MVB, mais n'était pas introduit dans les vésicules internes [88]. Toutefois, les protéines intégrées aux MVB et aux exosomes ne sont pas

toutes ubiquitinées [89, 90] et il a été démontré dans notre laboratoire que le ciblage exosomal des molécules HLA-DR est ubiquitine-indépendant (résultats non publiés).

1.3.3.2 ESCRT-indépendant

Il existe d'autres mécanismes d'incorporation aux MVB indépendant de l'ubiquitination et de la machinerie ESCRT [89, 90]. Un autre mécanisme est utilisé pour le ciblage de la protéine Pmel17, un constituant des mélanosomes. Des déterminants cytoplasmiques et transmembranaires de ciblage de Pmel17 dans les vésicules des MVB semblent être dispensables [91, 92]. En effet, le ciblage de cette protéine n'est pas affecté par la mutation des résidus lysine ou cystéine, ni par le remplacement de son domaine cytoplasmique. Même l'inhibition de la machinerie ESCRT n'affecte en rien le ciblage de Pmel17. C'est la première fois que l'on démontre l'importance d'un domaine luminal dans le ciblage de cargo dans les microvésicules de MVB.

1.3.3.3 Radeaux lipidiques

Un mécanisme passif permet aussi le ciblage de protéines aux MVB. Il nécessite la présence de microdomaines de la membrane riches en tétraspanines ou en cholestérol, connus sous le nom de radeaux lipidiques [93]. Ces régions grandement hydrophobes recrutent des protéines hydrophobes par exemple les protéines ancrées avec GPI comme CD55, ganglioside G_{M1} ou lyn. Ces marqueurs typiques des radeaux lipidiques se retrouvent dans les exosomes [93]. Les lipides de ces microdomaines et leurs composantes sont impliqués dans la génération des vésicules internes des MVB ou en concert avec les protéines de haute affinité avec les radeaux lipidiques comme les tétraspanines [81, 94].

Le bourgeonnement dépend aussi des propriétés de fusion d'un lipide de forme conique, l'acide lyso (bis) phosphatidique (LBPA)[94], bien que celui-ci ne soit pas retrouvé dans les exosomes de sources tels que les cellules B, les mastocytes et les DC. En fait, le LBPA semble s'accumuler dans les membranes de MVB tout comme le cholestérol, mais aucun enrichissement de ces composantes n'est détectable dans les exosomes. Il n'est pas impossible qu'ils représentent des pré-requis pour la formation des bourgeons, mais qu'ils restent sur la membrane limitante des MVB lors du détachement des microvésicules à

l'intérieur des MVB [95]. Une hypothèse veut que la surface moléculaire du LBPA augmente à pH acide et qu'il forme des agrégats qui induiraient un excès de lipides sur le feuillet interne créant un bourgeonnement (Figure 1-6). Dans les cellules, ce genre de processus est contrôlé par des protéine telles que Alix et Saposin C qui agissent comme régulateurs de la formation des microvésicules des MVB [95].

1.3.4 Fonctions

Les exosomes représentent un moyen de communication intracellulaire. Les exosomes sécrétés fusionnent avec d'autres cellules, transférant ainsi du matériel entre celles-ci. Ainsi, tout dépendant du type de cellules qui sécrètent les exosomes, ces derniers porteront différentes protéines affectant leurs fonctions respectives. Ce phénomène d'échanges avec et sans contact entre les cellules est largement documenté [74].

Il est connu que les rétrovirus détournent la machinerie intracellulaire des MVB pour leur propre bourgeonnement à la surface cellulaire [96]. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) s'accumule dans les MVB de macrophages et les virions relâchés ont des marqueurs communs avec ceux qui sont retrouvés sur les exosomes. Même si les particules virales et les exosomes partagent la même biogenèse, leur origine diffère [97]. Un rôle des exosomes est aussi connu dans la propagation de prions, une protéine infectieuse neurodégénérative. En effet, la protéine est ciblée aux MVB et relâchés dans les exosomes pouvant alors infecter des cellules saines avoisinantes [98].

Une fonction biologique importante des exosomes dérivés des CPA est la stimulation des cellules T. Les exosomes sont capables d'enclencher une réponse des cellules T, car ils portent des molécules du CMH et de co-stimulation. Sur une période de 24 heures, environ 12% des complexes de surface CMH/peptide sont endocytosés, ciblés aux MVB puis relâchés dans les exosomes [99]. La réponse immunitaire des exosomes est moins efficace

que celles des CPA mêmes, puisque les exosomes ont moins de molécules de classe II chargées de peptides antigéniques. Par contre, la présence des exosomes combinée à celle des DC qui les prennent en charge provoque une meilleure efficacité de stimulation des cellules T [100]. Des tests fonctionnels de stimulation de cellules T ont montré que les exosomes sécrétés par les DC matures sont de 50 à 100 fois plus efficaces que ceux qui sont sécrétés par les DC immatures [78]. Ils peuvent être utilisés comme vecteurs en vaccination, car ils expriment un haut niveau de complexes CMH I ou II / peptide [101] en plus de CD86. Il a été démontré que des exosomes dérivés de DC sont capables de stimuler une réponse anti-tumorale et permettent la régression de tumeurs établies [102]. Cette activité est aussi produite par une protéine exosomale de choc thermique (hsp) cytosolique hsc73 [76] qu'on retrouve aussi dans les compartiments endosomaux des DC et qui induit une réponse immunitaire anti-tumorale *in vivo* [103].

La protéine MFG-E8 est aussi retrouvée dans les exosomes dérivés de DC en abondance. C'est une protéine qui lie les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ exprimées sur les DC et les macrophages et pouvant cibler les exosomes aux autres CPA [76]. De plus, les exosomes de DC peuvent aussi transférer des antigènes provenant de cellules cancéreuses à d'autres DC, amplifiant ainsi la surveillance et potentiellement la défense immunitaire [66, 104].

1.4 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Dans de nombreux cas, les cellules cancéreuses peuvent échapper à la surveillance du système immunitaire grâce à une diminution de la présentation d'antigène tumoraux par des mécanismes restant à être élucidés. L'immunothérapie anticancéreuse a pour objectif d'augmenter la faible réponse immunitaire de l'hôte aux antigènes caractéristiques des cellules cancéreuses. Plusieurs immunothérapies sont basées sur l'injection de DC chargées d'antigènes ou d'exosomes délivrant certains épitopes. Leur but principal est de délivrer une grande quantité de peptides antigéniques immunogènes dérivés de tumeurs ou de protéines associées aux tumeurs.

L'augmentation du niveau de chargement peptidique des molécules de classe II est facilitée par l'activité catalytique des molécules HLA-DM produisant un répertoire de cellules T plus efficace [27, 54]. Le but principal de nos recherches est d'augmenter la spécificité et l'efficacité de la présentation antigénique des molécules de classe II afin d'activer la réponse des cellules T CD4+ dans un contexte de vaccination contre le cancer.

1.4.1 Volet 1

La molécule HLA-DM possède un motif de type tyrosine dans la queue cytoplasmique de HLA-DM β le ciblant à la membrane limitante des MIIC et lui permettant d'être recyclé de la surface cellulaire. En introduisant une mutation dans le motif de type tyrosine (HLA-DM γ), on modifie la distribution du chaperon moléculaire HLA-DM et provoque son accumulation à la surface cellulaire [19].

On connaît aussi une variété de molécules naturelles ou synthétiques, comme le n-propanol, qui ont la capacité d'imiter l'effet catalytique de HLA-DM [54, 55]. Elles brisent les ponts hydrogènes entre les peptides et les molécules de classe II HLA-DR. Il a été démontré que le n-propanol augmenterait le nombre de molécules de classe II dans leur forme réceptive

aux peptides et serait plus efficace à pH physiologique contrairement à des molécules solubles HLA-DM.

Hypothèse : Dans les cellules présentatrices d'antigènes, la forme mutante HLA-DM γ permettrait un meilleur chargement de peptides exogènes sur les molécules d'histocompatibilité de classe II et que par le fait même, cette molécule augmenterait l'activation des cellules T CD4 $^{+}$.

Objectif 1 : Évaluer l'impact sur la présentation de peptides exogènes des molécules chaperonnes telle que HLA-DM, HLA-DM γ , Ii et HLA-DO. Le niveau de présentation antigénique sera mesuré par des essais cytofluométriques sur différents type cellulaire et parallèlement la capacité de ces cellules à stimuler les cellules T CD4 $^{+}$ sera déterminée par essai fonctionnel.

Objectif 2 : Comparer l'effet de HLA-DM, de HLA-DM γ avec celui d'un chaperon chimique à pH acide et physiologique. Les mêmes méthodes de l'objectif 1 seront utilisées pour atteindre l'objectif 2.

1.4.2 Volet 2

Il a été démontré que des exosomes dérivés de cellules dendritiques peuvent stimuler de façon spécifique la réponse des cellules T. Il serait intéressant de pouvoir charger directement des antigènes sur des exosomes dans le contexte de HLA-DM afin d'activer les cellules T. Par contre, les exosomes de cellules B et de DC sont enrichies en molécules HLA-DR, mais pas en molécules chaperonnes HLA-DM [69, 77, 84]. Le mécanisme d'incorporation des molécules de classe II dans les exosomes reste inconnu. Par contre, l'inactivation par mutagenèse du motif de type tyrosine de HLA-DM β pourrait être impliqué dans l'entrée de HLA-DM dans les exosomes et la co-expression de HLA-DR causerait une accumulation de HLA-DM dans les exosomes (résultats non publiés).

Hypothèse : HLA-DR masquerait le motif de type tyrosine de HLA-DM par une interaction protéine-protéine entraînant ainsi HLA-DM dans les exosomes.

Objectif 1 : Évaluer et comparer la distribution de HLA-DM et HLA-DM γ dans les exosomes dérivés de cellules transfectées de type HeLa. Des analyses de cytométrie en flux, d'immunobuvardage, de microscopie électronique et de microscopie à fluorescence seront effectuées.

Objectif 2 : Comparer la distribution de HLA-DM dans les exosomes en présence des molécules HLA-DR de type sauvage et HLA-DR privé de sa queue cytoplasmique.

Objectif 3 : Évaluer la distribution de HLA-DM dans un contexte plus proche de son contexte physiologique en utilisant des exosomes dérivés de cellules exprimant le facteur de transcription CIITA.

Chapitre 2 Procédures expérimentales

2.1.1 Plasmides

Le plasmide RSV.5DMY-A est généré dans le laboratoire par la méthode de PCR chevauchante (overlap PCR) pour modifier le motif 230-YTPL de la queue cytoplasmique. Une première réaction de PCR est effectuée sur pBS1-DM β .1 en utilisant l'amorce inverse et mutagène (DM β Y230A*Eco*47IIIb: 5'-AGG AGG AGG AGT AGC GCT AGA GTG GCC AGC-3'). Un second fragment est amplifié du pBS1-DM β .1 en utilisant une amorce mutagène complémentaire (DM β Y230A*Eco*47IIIc: 5'-GCT GGC CAC TCT AGC GCT ACT CCT CTT CCT-3') et l'amorce universelle. Les deux produits de PCR chevauchants sont mélangés et une réaction de PCR est complétée avec les amorces flanquantes. Le produit de PCR est ensuite digéré avec *SacI* et *HindIII*, cloné dans pBS1DM β .1 et séquencé (pBSDM β Y230A). Finalement, le fragment *Sall*-*XbaI* est cloné dans le plasmide RSV.5 neo. Les plasmides suivants ont déjà été décrits auparavant, pBudDM [105], pBudDR α / β [106], pREP4 Iip35 [107], pREP4 Iip33, RSV.5neoDR α , RSV.3DR β .008 et RSV.3DR β TM [107], RSV.5neoDR α TM [108].

2.1.2 Anticorps

Les anticorps suivants ont été utilisés: XD5.117 (mIgG₁) reconnaît une épitope linéaire dans le domaine β 1 des molécules de classe II [109]. L243 (mIgG_{2a}) (ATCC HB-55) reconnaît un épitope conformationnel de HLA-DR α [110]. BU45 (mIgG₁) reconnaît la portion C-terminal de la Ii humaine [111]. CerCLIP.1 (mIgG₁) est dirigé contre le segment N-terminal de CLIP et Mags.DO5 (mIgG₁) reconnaît la chaîne β de HLA-DO (obtenus du Dr. L. Denzin, USA) [112, 113]. Map.DM1 (mIgG₁) est dirigé contre la portion luminal de HLA-DM (PharMingen International, Oakville, Canada). DA6.147 (mIgG₁) est un anticorps monoclonal dirigé contre la queue cytoplasmique de HLA-DR α [114]. L'anticorps monoclonal 50H19 (mIgG₂) reconnaît CD9 humain [115]. Le sérum polyclonal de lapin contre la queue cytoplasmique de HLA-DM β a déjà été décrit [34]. Le sérum

polyclonal de lapin contre les molécules de classe II reconnaît la chaîne α (obtenu du Dr. Neefjes, Netherlands cancer Institute) [116].

2.1.3 Lignées cellulaires et transfections

Les cellules HEK 293T (obtenues du Dr. E. Cohen, Université de Montréal, Canada) et les cellules épithéliales HeLa (ATCC CCL-2) sont cultivées dans du milieu DMEM (Wisent, Canada) avec 5% sérum de veau foetal décomplémenté (FBSi) (Wisent, Canada).

Les cellules B lymphoblastoïdes transformées par le virus Epstein-Barr 721.45, 721.61 et 721.174 (obtenues du Dr. R. DeMars) [117] ainsi que les cellules Jurkat T HA 1.7 gardées sous sélection avec 1mg/mL de néomycine (G418 sulfate, Wisent, Canada) (obtenues du Dr. P. Benaroch, Institut Curie, France) [118] sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Wisent, Canada) avec 10% FBS décomplémenté et 4 μ M de β -mercaptoethanol. Les cellules CTLL-2 (ATCC TIB-214) sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Wisent, Canada) avec 10% FBS décomplémenté, 4 μ M de β -mercaptoethanol et avec 15 unités/mL d'IL-2 humaine recombinante (rhIL-2).

Les cellules HeLa DM.5 proviennent d'un clone de cellules HeLa DM⁺ (obtenus du Dr. R.P. Sékaly, Université de Montréal, Canada) gardées sous sélection avec 500 μ g/mL de néomycine. Les cellules HeLa DMy ont été préparées auparavant par transfections de DM α et DM β Y-A avec le Fugène 6 (Roche Diagnostic, Canada). Les cellules HEK 293TDR11i ont été transfectées avec l'ADNc de HLA-DR1 et Iip35 et triées par CerCLIP.1 avec des billes magnétiques (Dynal Inc., USA). Les cellules HEK 293T CIITADR7 ont été obtenues du Dr. R. Lapointe (CHUM, Canada). Les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO ont déjà été décrites [119]

Les cellules HEK 293T, HEK 293TDR1, HEK 293TDRIi et HEK 293T CIITA DR7 ont été transfectées de façon transitoire en utilisant la méthode de co-précipitation au phosphate de calcium. Les cellules sont lavées et on laisse adhérer 1 million de cellules pendant 24 heures. 3 μ g de chaque ADN est mis en contact avec une solution de calcium et ensuite déposé sur les cellules à transfecter. Les cellules ont été analysées 48 heures après la transfection.

Les cellules HeLa DM.5 ont été transfectées de façon stable avec DR α et DR β sauvages (HeLa DM.5+DR) et DR α TM et DR β TM (HeLa DM.5+DRTMTM) en utilisant le Fugene 6 et la sélection (néomycine 500 μ g/mL, puromycine 400 μ g/mL et hygromycine 50 unités/mL) été appliquée 48 heures après les transfections. Les cellules ont été triées en suivant la procédure décrite précédemment avec l'anticorps L243.

2.1.4 Cytométrie en flux et microscopie confocale à fluorescence

Les cellules ont été lavées au PBS et incubées avec les premiers anticorps dans du milieu de culture complet ou PBS sur glace pendant 30 minutes. Ensuite, elles ont été lavées deux fois au PBS et incubées un autre 30 minutes sur glace avec un anticorps secondaire de chèvre contre les anticorps de souris conjugués à Alexa-488 (Invitrogen, Canada). Les cellules ont été lavées deux fois au PBS et analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur®, Becton Dickson, Canada). Les marquages intracellulaires ont été effectués sur des cellules lavées, fixées à la paraformaldéhyde 4% et perméabilisées avec une solution de saponine (0.05% saponine, 1% BSA dilué dans le PBS).

Pour les analyses en microscopie confocale, on a fait croître des cellules HeLa DM.5+DRTMTM sur des lamelles dans une plaque à 24 puits et on les a cultivées 3 jours [34]. Pour le marquage intracellulaire, les cellules ont été fixées à la paraformaldéhyde 4% et perméabilisées à la saponine. On a marqué en premier avec l'anticorps MapDM.1, suivi d'un anticorps de chèvre contre les anticorps de souris IgG₁ conjugués à Alexa-488. On a incubé ensuite avec l'anticorps L243 conjugué à la biotine, et l'on a lavé de nouveau pour ensuite terminer avec la streptavidine-594. Les cellules ont ensuite été lavées et fixées à nouveau avec la paraformaldéhyde 4%. Les cellules ont été examinées ensuite au microscope confocal LSM 510 META Zeiss.

2.1.5 Peptides

Tous les peptides utilisés ont été synthétisés par l'utilisation de la chimie de phase solide standard FastMoc (N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl), soit HA₃₀₆₋₃₁₈-PKY (PKYLVKQNTLKLAT), HA₃₀₆₋₃₁₈-PKL (PKLVQNTLKLAT) et gp100 174-190

(TGRAMLGHTHTMEVTVYH). Pour les peptides biotinylés, la biotine a été attachée par l'acide epsilon aminocaproïque et l'ester N-succinimidyl. Tous les peptides ont été produits par le service de synthèse de peptides de l'est du Québec (CHUL, Québec).

2.1.6 Chargement peptidique à la surface cellulaire

Les cellules ont été lavées et comptées. 300 000 cellules ont été incubées avec les peptides dans un volume de total de 100µL de milieu de culture contenant 2% de FBSi en présence ou non de 2% de n-propanol à pH physiologiques. Elles ont été incubées 5 heures à 37°C, puis lavées deux fois avec du milieu complet de culture. Les cellules ont été resuspendues dans 100mL de milieu de culture complet, comptées et la viabilité a été déterminée au bleu de trypan. Les cellules ont été utilisées pour un essai fonctionnel de stimulation de cellules T ou dans le cas d'une utilisation de peptides biotinylés, les cellules ont été incubées avec la streptavidine-phycoérythrine pour être ensuite analysées en cytométrie en flux.

2.1.7 Essai fonctionnel de stimulation de cellules T

Dans une plaque à 96 puits, 50 000 cellules présentatrices viables et chargées de peptides (préparation décrite dans la section 2.1.6) ont été mises en co-culture avec 50 000 hybridomes de cellules T pendant 18 - 22 heures à 37°C. La production d'IL-2 a été déterminée par la capacité du surnageant de la co-culture à faire proliférer la lignée cellulaire dépendante d'IL-2, les CTLL-2 (ATCC TIB-214). Ainsi, dans des plaques à 96 puits, les surnageant des co-cultures ont été dilués en série soit 1/4, 1/16 et 1/64 en présence de 5000 cellules CTLL-2. Une courbe de calibration a été produite en parallèle en trois exemplaires avec de la rhIL-2. Les plaques ont été incubées au moins 18 heures à 37°C, 5% CO₂. Chaque condition expérimentale a été faite en trois exemplaires. La prolifération des cellules CTLL-2 a été mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée [120]. C'est-à-dire qu'il y a eut un ajout de 0,5µCi de thymidine tritiée (Amersham, Canada) par puit, suivi d'une incubation de 14 à 18 heures à 37°C, 5% CO₂. Les cellules ont été récoltées sur des filtres en fibres de verre et l'incorporation de la thymidine tritiée a été déterminée par un compteur beta de scintillation liquide (TopCount Microplate, Packard).

2.1.8 Extraction et purification d'exosomes

Les cellules ont été cultivées dans des flacons de 175 cm² dans du milieu contenant du FBS sans exosome, c'est-à-dire qui a été centrifugé à 100 000g pendant 60 minutes afin d'enlever toutes traces d'exosomes bovins. Quand les cellules ont atteint la confluence, on a changé le milieu pour du milieu frais sans exosome et les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Le milieu de culture a été récolté et centrifugé deux fois à 3000g pendant 10 minutes, puis le surnageant a été centrifugé à 10 000g pendant 30 minutes à 4°C afin d'enlever les cellules et les débris cellulaires. Le surnageant a ensuite été filtré avec un filtre de .22µm (stericup, Qiagen, Canada). Ensuite, le surnageant a été ultracentrifugé à 100 000g à 4°C pour 60 minutes avec le rotor SW28 et lavé une fois au PBS. Le culot a été resuspendu dans 300µL de PBS pour faire un gradient de saccharose ou de 300µL de tampon MES 0.025M pH 6.5 pour l'analyse des complexes billes-exosomes en cytométrie en flux.

Le culot d'exosomes dans le PBS a ensuite été resuspendu dans 5 mL de saccharose 2.5M, 20mM Tris/HCl pH 7.2. On a recouvert ce 5 mL par un gradient de densité linéaire qui va de 2.0 - 0.25 M saccharose, 20mM Tris/HCl pH 7.2. On a ultracentrifugé le gradient dans un rotor SW41Ti pour 18 heures à 27 000g à 4°C. Des fractions de 1 mL ont été récoltées et la densité de saccharose de chaque fraction a été mesurée au réfractomètre. Chaque fraction a été précipitée au TCA (20% TCA w/v, 30 min sur glace), centrifugée, lavée 2 fois avec de l'acétone glacée. Le surnageant est enlevé et les fractions séchées pendant 1 heure au Speedvac (Speed Vac Plus, Savant) à basse température.

2.1.9 Immunobuvardage

Les échantillons ont été préparés comme décrit précédemment. Ils ont été réduits et bouillis 5 min à 95°C dans un tampon réducteur (50mM Tris-HCl pH6.8, 1% de β-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% de bleu de bromophénol, 10% glycérol), puis chargés sur un gel SDS-PAGE 12%. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Amersham, Canada). La membrane est ensuite bloquée avec

du TTBS-lait (TBS (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl pH 7,5 contenant 5% (w/v) lait en poudre écrémé et 0.1% de Tween 20) pendant 30 minutes. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire dans le TTBS-lait. L'anticorps primaire a ensuite été reconnu avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (Cedarlane, Canada) et a été révélé par chimiluminescence ECL (Amersham, Canada) sur des films Kodak XAR-5.

2.1.10 Analyses d'exosomes en cytométrie en flux

Les exosomes ont été extraits comme décrit dans la section 2.1.8 et la concentration de protéines exosomales a été déterminée par un essai Bradford (Bio-Rad, Canada). Les exosomes ont ensuite été incubés pendant 2 heures à la température de la pièce avec des billes de latex activées à l'aldéhyde sulfate dont la taille est 3.5 μm (Interfacial Dynamics corp, Portland, USA) dans un tampon MES 0.025M pH6.5 dans un volume final de 300 μL [121]. Pour chaque μg de protéines exosomales, on a utilisé 25 000 billes de latex. Ensuite, on a ajouté 200 μL d'une solution de 25% de poudre de lait écrémé (w/v) dans le tampon MES 0.025M pH 6.5, on a complété ensuite à 1mL avec le tampon MES 0.025M pH 6.5 avant d'incuber toute la nuit sous rotation à 4°C. La réaction a ensuite été arrêtée par trois lavages avec une solution de glycine 0.1% dans du PBS. On a séparé la préparation de billes-exosomes en partie égales pour faire les marquages pendant 30 minutes avec les anticorps spécifiques, ceux-ci étant révélés avec un anticorps secondaire conjugué à Alexa-488. Un minimum de 10^4 complexes billes-exosomes ont pu alors être analysés au cytomètre en flux (FACSCalibur®, Becton Dickson, Canada).

2.1.11 Microscopie électronique

On a dilué la préparation d'exosomes pour obtenir une concentration de 500ng/mL. On a centrifugé 50 μL cette préparation sur une grille de nickel placée au fond d'un tube d'une micro-ultracentrifuge [122]. Les exosomes ont été centrifugés à 120 000g (20psig) pour 5 minutes dans une ultracentrifuge Airfuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Les marquages des exosomes ont été effectués directement sur les grilles. Les exosomes ont été incubés dans 1% glycine PBS pendant 10 minutes pour bloquer les sites non spécifiques. Ensuite,

ils ont été incubés avec le premier anticorps (Map.DM1) pendant 2 heures à la température de la pièce suivi de 3 lavages au PBS de 10 minutes chacun. Ensuite, les exosomes ont été incubés avec les anticorps secondaires liés aux billes d'or pour 1 heure à la température de la pièce (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvanie, USA). Après trois lavages au PBS de 10 minutes et 1 lavage à l'eau de 10 minutes, les échantillons ont été colorés avec 1 % d'acide phosphotungstique pour 5 minutes. Les grilles ont été lavées à l'eau, puis séchées et finalement examinées au microscope électronique à transmission Philips 410 (Philips, Montréal, Canada).

Chapitre 3 Résultats

3.1 EFFET DU CIBLAGE DE HLA-DM À LA SURFACE CELLULAIRE SUR LA PRÉSENTATION D'ANTIGÈNES PAR LES MOLÉCULES DE CLASSE

3.1.1 HLA-DM_Y et le n-propanol augmentent la présentation d'antigènes

La molécule de classe II non classique HLA-DM a pour rôle de catalyser l'échange peptidique sur les molécules de classe II. Afin d'évaluer son utilisation potentielle dans la présentation de peptides exogènes, nous avons travaillé avec une forme mutante de HLA-DM. Un motif de type tyrosine YTPL situé dans sa queue cytoplasmique prévient son expression à la surface cellulaire et cible HLA-DM dans la voie endosomale [20-22]. Ainsi, nous travaillons avec HLA-DM_Y, une molécule HLA-DM dont le motif de type tyrosine est inactivé et qui s'accumule à la membrane plasmique. Tout d'abord, nous avons utilisé une lignée cellulaire humaine de fibroblastes ; les HEK 293T, une lignée hautement transfectable. Au laboratoire, nous avons développé une lignée cellulaire qui exprime de façon stable HLA-DR1 et Ii (293T DR1 Ii) et nous l'avons transfectée de façon transitoire avec l'ADN complémentaire de HLA-DM ou HLA-DM_Y. Des analyses en cytométrie en flux de l'expression cellulaire de HLA-DM 48 heures post-transfection nous permettent de voir qu'il y a une quantité totale équivalente de HLA-DM et HLA-DM_Y (Figure 3-1 A). De plus, l'expression de HLA-DR et de Ii reste constante dans chacun des transfectants. Comme attendu, il y a une accumulation de HLA-DM_Y à la surface cellulaire par rapport à l'expression de HLA-DM en surface. Dans les deux cas, on voit aussi une diminution de CLIP associé à HLA-DR à la surface cellulaire, témoignant de l'activité de HLA-DM et de HLA-DM_Y.

Nous voulions vérifier le rôle de HLA-DM_Y dans le chargement de peptides. Nous avons en premier lieu utilisé un test fonctionnel basé sur la stimulation des cellules T. Les cellules

transfectées sont chargées avec un peptide de haute affinité (HA₃₀₆₋₃₁₈), puis incubées avec les cellules T Jurkat HA1.7. La quantité d'interleukine-2 (IL-2) produite par les cellules T a été déterminée par incorporation de thymidine tritiée d'une lignée cellulaire dépendante de IL-2 (CTLL-2) cultivée avec le surnageant de la co-culture (Figure 3-1 B). Comme prévu, la présence de HLA-DMy dans les cellules a permis d'activer fortement les cellules T avec un effet dépendant de la dose. Tandis que pour un même niveau d'expression de HLA-DM sauvage dans les cellules transfectées, l'activation des cellules T est grandement moins

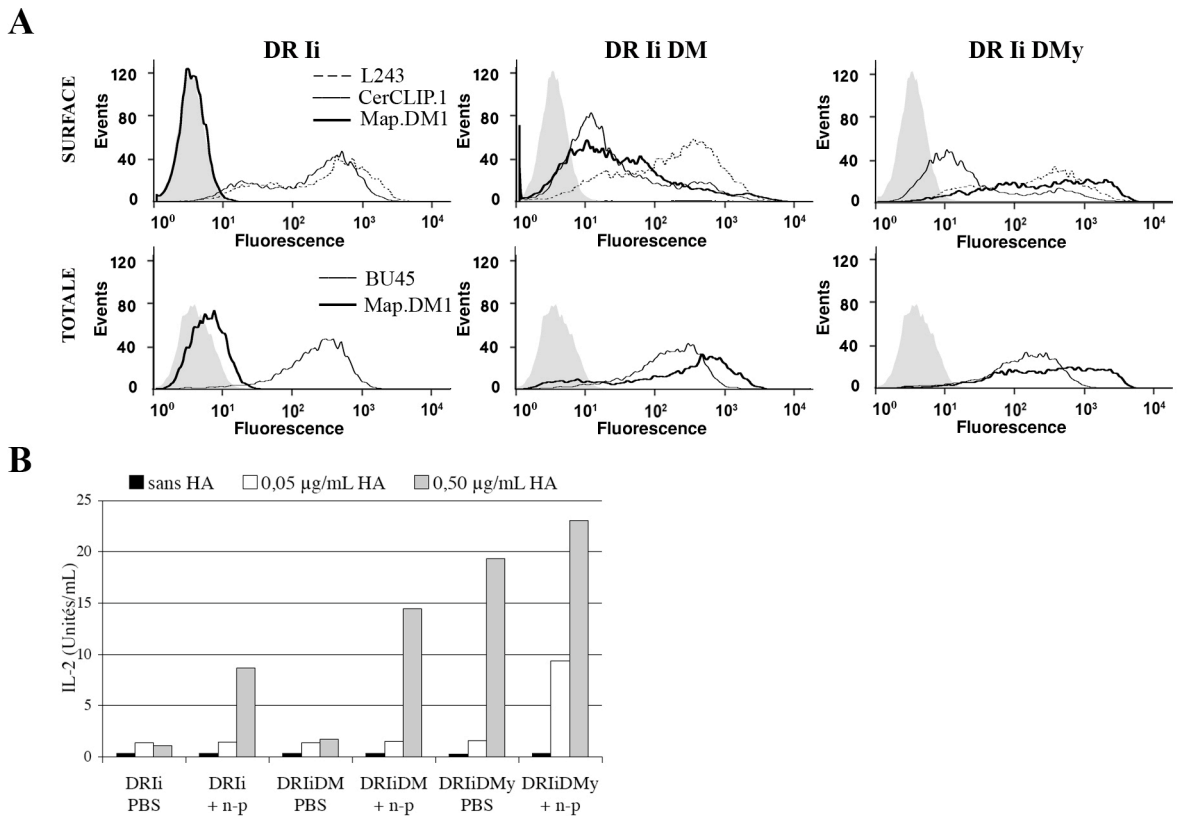


Figure 3-1. HLA-DMy et le n-propanol augmentent la réponse des cellules T CD4⁺ aux cellules stables 293TDRi.

(A) Expression cellulaire de surface de HLA-DR, CLIP et HLA-DM (*haut*) et expression totale de Ii et HLA-DM (*bas*) dans la lignée cellulaire stable 293TDRi transfectée avec HLA-DM ou HLA-DMy. (B) Essai fonctionnel avec la lignée cellulaire stable 293TDRi transfectée avec HLA-DM ou HLA-DMy. Les cellules ont été incubées avec le peptide HA et les cellules T Jurkart HA 1.7, puis le niveau de IL-2 a été déterminé avec la lignée cellulaire CTLL-2 par incorporation de thymidine [3H].

significative. Par contre, cette augmentation de la présentation antigénique par HLA-DM reflète celles obtenues dans la littérature avec des conditions équivalentes, c'est-à-dire avec une faible concentration de peptides exogènes et en utilisant des lignées cellulaires et non pas des molécules solubles HLA-DR et HLA-DM [123, 124]. Ces résultats ont montré que HLA-DMy augmente l'association entre les peptides exogènes HA₃₀₆₋₃₁₈ et les molécules HLA-DR1 à la surface cellulaire.

L'efficacité de HLA-DMy a aussi été comparée à celle du n-propanol, une molécule chimique dont l'action imite celle de HLA-DM sans toutefois être dépendante de la séquence des peptides associés à HLA-DR [54]. Contrairement aux travaux de Falk *et al* effectués avec des molécules solubles de HLA-DR et de HLA-DM, nous travaillons avec des cellules en culture. Il a donc fallu évaluer l'effet qu'ont différentes concentrations de n-propanol sur la viabilité des cellules et les essais fonctionnels décrits précédemment (Figure 3-1 C). Ainsi, un pourcentage de 2% de n-propanol s'est avéré viable pour les cellules avec le moins de variations dans nos essais fonctionnels. Donc, dans les mêmes conditions décrites auparavant, nous avons pu constater que le n-propanol avait un effet aussi important que HLA-DMy dans le chargement des peptides HA₃₀₆₋₃₁₈ (Figure 3-1 B). Fait intéressant, l'effet de HLA-DM ou HLA-DMy et celui du n-propanol semblent être additifs.

3.1.2 Spécificité d'action de HLA-DM

L'augmentation du chargement peptidique exogène à la surface cellulaire par HLA-DMy confirmée, nous avons voulu vérifier la spécificité de notre essai et si l'action de HLA-DM est aussi efficace avec un peptide de faible affinité. Donc, nous avons travaillé avec les peptides HA₃₀₆₋₃₁₈ (HA-PKY : PKYVKQNTLKLAT) et une forme modifiée, HA-PKL (PKLVKQNTLKLAT). La tyrosine, correspondant à l'ancrage de la cavité P1 dans la niche peptidique de HLA-DR1, est changée par une leucine entraînant un changement d'affinité du peptide aux molécules de classe II. Ces peptides ont une restriction allélique inversée; au lieu d'avoir une forte affinité pour l'haplotype DRB1*0101 et une faible affinité pour DRB1*0102 comme c'est le cas de HA-PKY, le peptide HA-PKL interagit faiblement avec DRB1*0101 et avec une forte affinité avec l'haplotype DRB1*0102 [125]. Les cellules

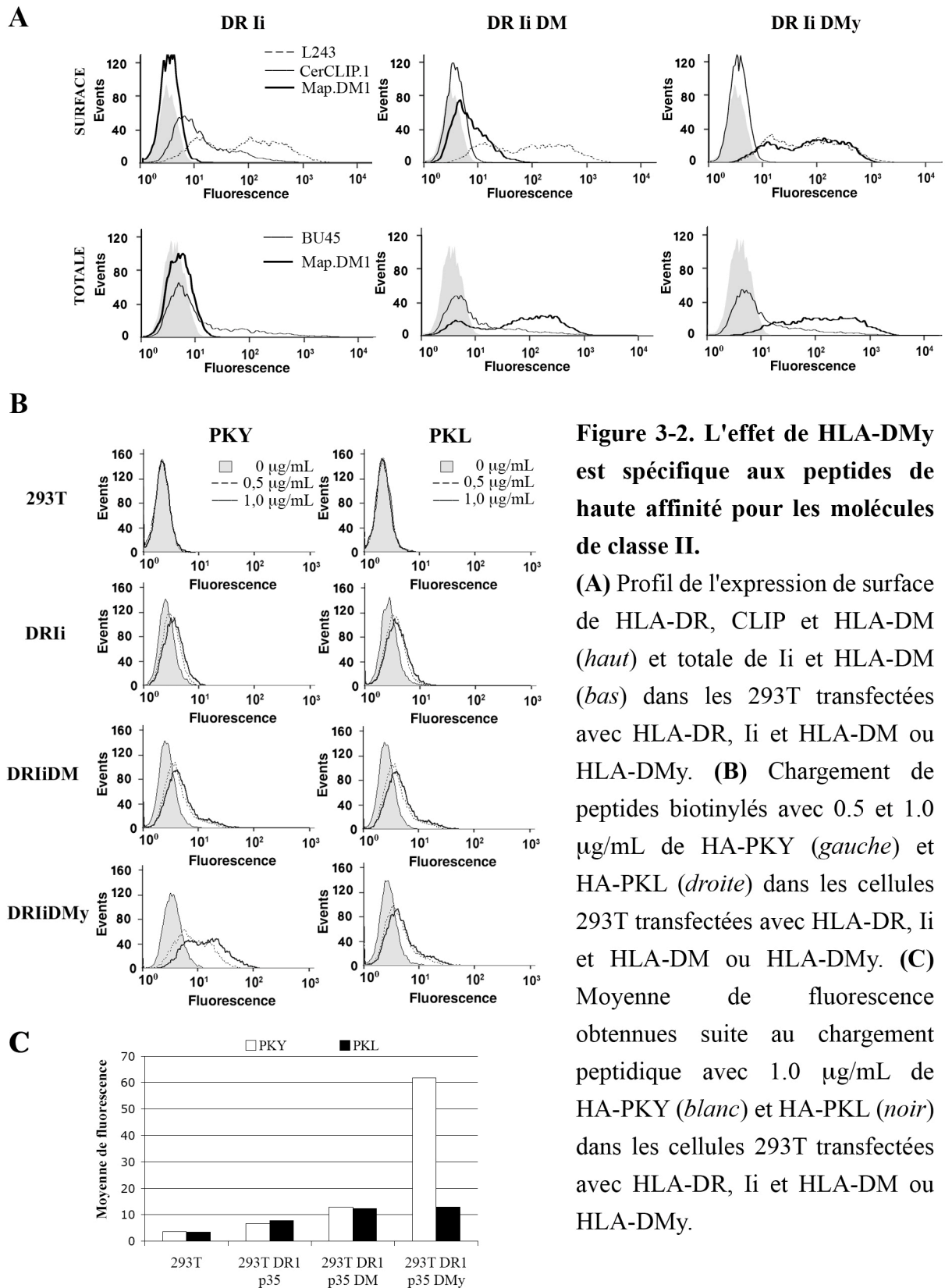


Figure 3-2. L'effet de HLA-DMMy est spécifique aux peptides de haute affinité pour les molécules de classe II.

(A) Profil de l'expression de surface de HLA-DR, CLIP et HLA-DM (*haut*) et totale de Ii et HLA-DM (*bas*) dans les 293T transfectées avec HLA-DR, Ii et HLA-DM ou HLA-DMMy. (B) Chargement de peptides biotinylés avec 0.5 et 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HA-PKY (*gauche*) et HA-PKL (*droite*) dans les cellules 293T transfectées avec HLA-DR, Ii et HLA-DM ou HLA-DMMy. (C) Moyenne de fluorescence obtenues suite au chargement peptidique avec 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HA-PKY (*blanc*) et HA-PKL (*noir*) dans les cellules 293T transfectées avec HLA-DR, Ii et HLA-DM ou HLA-DMMy.

293T ont été transfectées avec DRB1*0101, Ii et HLA-DM ou HLA-DMy. Tout comme dans l'expérience précédente, il y a une expression totale constante des molécules dans les différents transfectants de même qu'une diminution de CLIP à la surface cellulaire en présence de HLA-DM ou HLA-DMy (Figure 3-2 A). Cette fois, le chargement peptidique a été réalisé avec des peptides biotinylés (Figure 3-2 B). Le marquage avec la phycoérythrine-streptavidine permet une détermination directe de la quantité de peptides liés à la surface cellulaire par une analyse en cytométrie en flux. On peut constater que sans molécule HLA-DR, il y a aucune liaison non spécifique de peptides avec les cellules. On peut déduire que ce sont effectivement les molécules de classe II qui sont chargées de peptides. Les analyses montrent qu'il y a un chargement négligeable des peptides HA-PKY et HA-PKL sur les cellules 293TDRIi. Le chargement peptidique est haussé en présence de HLA-DM et cela se traduit par une moyenne de fluorescence passant de 6,7 à 12,9 pour le peptide PKY et de 7,7 à 12,4 pour le peptide PKL. Par contre, la présence de HLA-DMy provoque un chargement maximal des peptides HA-PKY avec DRB1*0101 avec une moyenne de fluorescence passant de 6,7 à 61,9. De plus, le patron de liaison HLA-DR/peptide a une forme bimodale comme le patron d'expression de HLA-DR dans ces mêmes cellules. Le chargement du peptide PKL en présence de HLA-DMy n'est pas plus considérable que celui en présence de HLA-DM avec une moyenne de fluorescence passant de 7,7 à 12,8. Ainsi, HLA-DM double le chargement peptidique de PKY et HLA-DMy augmente par un multiple de 6 le chargement de HA-PKY. Alors que le chargement de HA-PKL ne fait que doubler en présence de HLA-DM ou de HLA-DMy (Figure 3-2 C). Comme attendu, l'action catalytique de HLA-DMy est spécifique aux chargements de peptides exogènes en faveur des peptides de haute stabilité avec leur haplotype de HLA-DR correspondant.

3.1.3 L'efficacité de chargement peptidique par les cellules B est augmenté par le n-propanol

Nous avons voulu vérifier l'effet du n-propanol sur la présentation de peptides sur des lignées cellulaires B lymphoblastoïdes 721 mutées (Figure 3-3 A) [126]. Ces cellules ont été choisies parce qu'elles expriment un fort niveau d'antigènes HLA et qu'elles sont

hautement efficaces pour la présentation antigénique. Tout d'abord, nous avons vérifié l'expression de HLA-DR par les différentes lignées cellulaires (Figure 3-3 B). Comme prévu, on ne détecte pas de liaison de l'anticorps L243 pour les cellules B qui n'expriment pas HLA-DR (.174). De plus, les cellules B .45 et .61 expriment autant de HLA-DR à leur

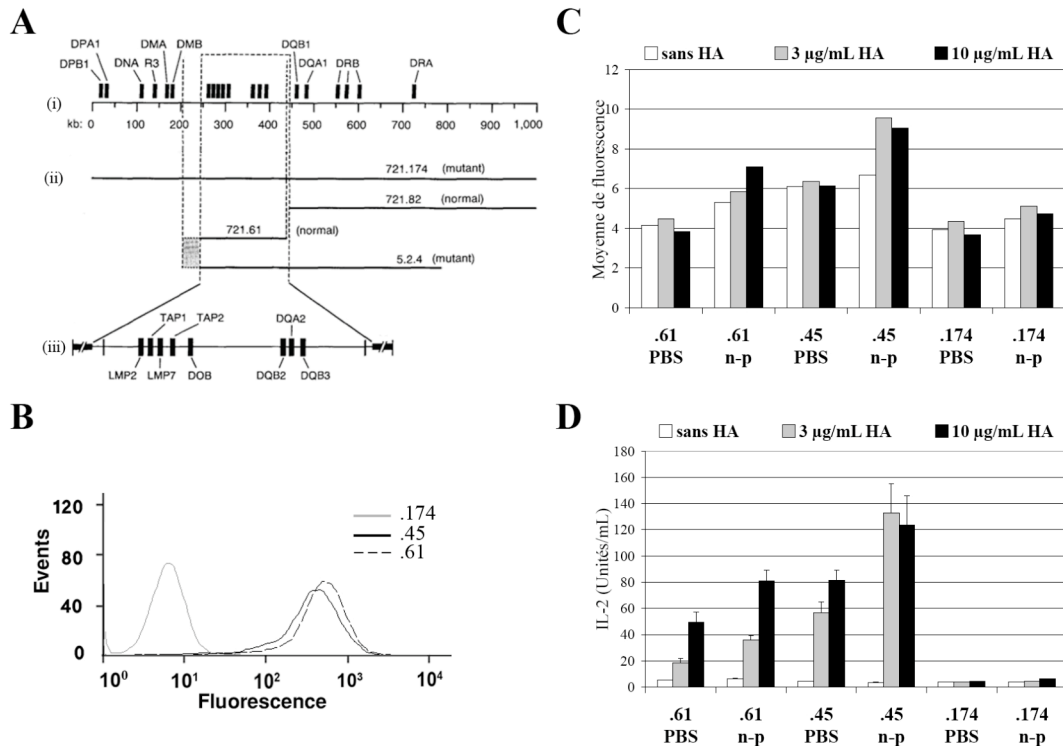


Figure 3-3. Le chargement peptidique et la stimulation des cellules T par les cellules B sont augmentés en présence du n-propanol.

(A) Gènes et délétions des lignées cellulaires B lymphoblastoïdes 721 mutées (tiré de Ceman *et al.* 1994). Les lignées cellulaires .61 et .174 sont dérivées de la lignée cellulaire .45 qui est hémizygote pour le CMH entier. (i) Région chromosomique 6p sur laquelle se retrouvent les délétions. (ii) Positions relatives des délétions des différentes lignées cellulaires. (iii) Gènes connus dans la région d'ADN qui est déletée dans la lignée cellulaire .61 (B) Profils d'expression de surface de HLA-DR (L243) des lignées cellulaires .45, .61 et .174. (C) Moyennes de fluorescence obtenues suite au chargement peptidique de HA biotinyllés à 0, 3 et 10 µg/mL avec ou sans n-propanol sur les lignées cellulaires .45, .61 et .174. (D) Essai fonctionnel avec les lignées cellulaires .45, .61 et .174. Après chargement des peptides HA biotinyllés avec ou sans n-propanol, les cellules ont été incubées avec les cellules T Jurkat HA1.7. Puis le niveau de IL-2 a été déterminé avec la lignée cellulaire CTLL-2 par incorporation de thymidine [3H].

surface cellulaire. Après avoir incubé les cellules avec les peptides HA₃₀₆₋₃₁₈ biotinylés, nous les avons marquées avec la phycoérythrine-streptavidine (Figure 3-3 C). Puisque les cellules B .45 et .61 exprimaient beaucoup de molécules HLA-DR à leur surface cellulaire, nous nous attendions à détecter une liaison importante à leur surface cellulaire. Curieusement, la liaison de peptides à ces cellules est faible par rapport aux cellules .174. même en incubant avec une plus grande quantité de peptides, soit de 10 µg/mL. Nous pouvons constater une légère augmentation du chargement peptidique par le n-propanol, autant sur les cellules .45 que les cellules .61. Nous remarquons aussi que les cellules .45 ont un plus grand niveau de chargement peptidique que les cellules B sans HLA-DO (.61). Les cellules .45 contiennent des molécules HLA-DO qui inhibent l'activité de HLA-DM augmentant ainsi le nombre de complexes HLA-DR/CLIP à la surface cellulaire. Ces derniers sont des complexes instables et les peptides HA peuvent remplacer plus facilement CLIP pour former des complexes stables avec HLA-DR. Étant donné que le niveau de détection de complexes HLA-DR/peptide est faible, l'effet net du n-propanol et de HLA-DO sur le chargement peptidique n'est pas clairement évident.

Avec ces mêmes cellules, nous avons effectué en parallèle un essai fonctionnel (Figure 3-3 D). Même si nous n'avons pas pu déceler de peptides à la surface cellulaire, les cellules B ont été en mesure d'activer les cellules T. En effet, leur réponse concorde parfaitement avec les résultats de la fixation des peptides en cytométrie en flux. Les réponses des cellules T sont spécifiques aux complexes HLA-DR/HA, puisqu'on ne détecte pas d'IL-2 avec les cellules B négatives pour l'expression de HLA-DR (.174). Nous n'avons pas été surpris de constater à nouveau que la présence de HLA-DO dans les cellules .45 permettait d'obtenir un chargement de peptide plus grand que dans les cellules .61. D'un autre côté, avec ces analyses, on peut maintenant avancer que le n-propanol provoque une augmentation de chargements de peptides aux molécules de classe II dans les cellules B. En effet, la réponse des cellules T est pratiquement doublée en présence de n-propanol.

3.1.4 Le pH et la concentration de sérum affectent l'effet du n-propanol sur le chargement peptidique

Nous avons voulu savoir si l'augmentation de chargements de peptides par le n-propanol était causée par augmentation de la relâche de CLIP. Nous avons donc vérifié la présence de CLIP à la surface cellulaire des cellules 293TDRi, .45 et .61 en présence ou non de peptides, avant et après incubation avec le n-propanol (Figure 3-4 A). On a pu déterminer que le n-propanol n'augmente pas de façon significative la relâche du fragment CLIP associé aux molécules de classe II. Ainsi, l'action additive du n-propanol (section 3.1.1) semble s'opérer différemment de celle de HLA-DM en agissant sur une population distincte

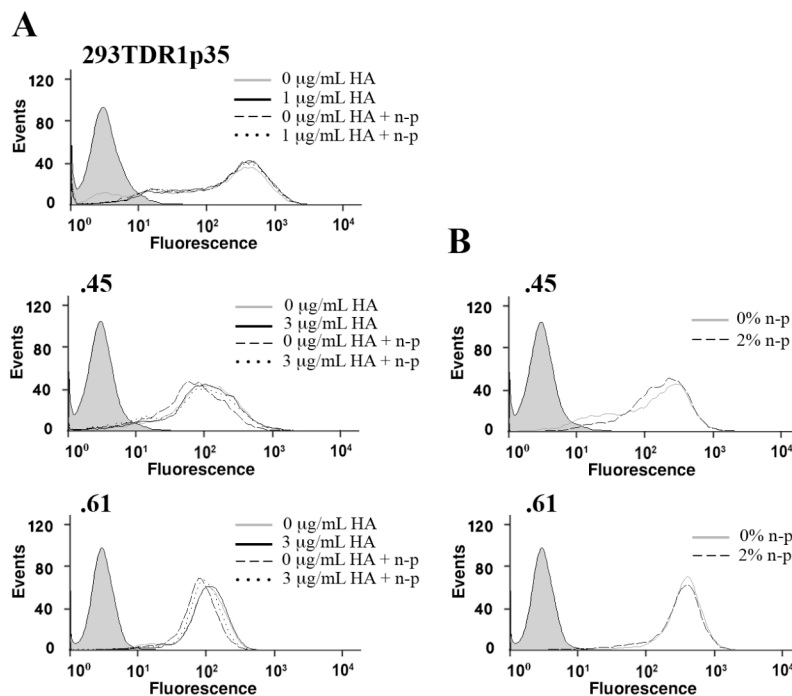


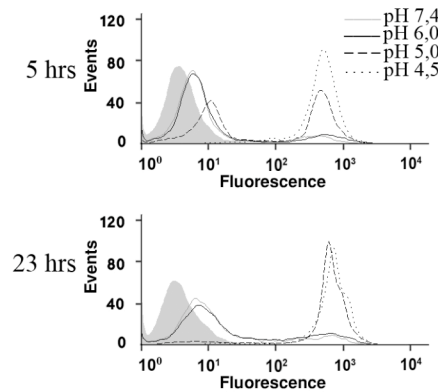
Figure 3-4. Le n-propanol n'augmente pas relâche de CLIP des molécules de classe II.

(A) Les profils d'expression de surface de CLIP de différents types cellulaires ont été vérifiés avant et après le chargement peptidique de 4 heures par un marquage avec l'anticorps CerCLIP.1. Les cellules ont été incubées en présence ou non de 2% n-propanol (n-p) avec 0 et 1.0 μg/mL de peptides HA pour les 293TDR1p35 puis de 0 et 3.0 μg/mL de peptide pour les cellules B .45 et .61. (B) Profil d'expression de surface de HLA-DR des lignées cellulaires B .45 et .61 avec l'anticorps contre HLA-DR (L243) après une incubation de 4 heures avec 0 et 2% de n-propanol.

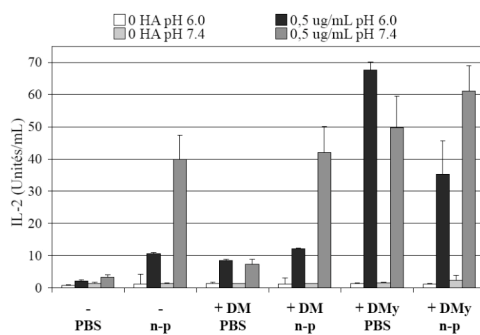
des molécules de classe II.

Comme nous avons eu une bonne stimulation des cellules T par les cellules B, mais que peu de complexes HLA-DR/HA ont été détectés, nous avons vérifié l'expression de HLA-DR à la surface cellulaire après l'incubation avec le n-propanol (Figure 3-4 B). Les résultats montrent que le n-propanol n'affecte pas l'expression de HLA-DR dans les cellules .45 et .61. Il n'y a qu'une faible baisse de HLA-DR pour les cellules .45 en présence de n-propanol. C'est d'ailleurs ce qui expliquerait la diminution de CLIP dans ces mêmes cellules en présence de 2% n-propanol. Parce qu'un pH endosomal (pH 4.5 à 5.5) serait nécessaire pour l'activité optimale de HLA-DM et que le n-propanol n'est pas affecté par le pH, nous avons testé l'efficacité du chargement peptidique sous différents pH [54]. Sous les conditions acides, la viabilité des cellules a grandement été affectée (Figures 3-5 A). Après une incubation de 5 heures avec le peptide sous un pH de 4.5 et 5.0, la viabilité des cellules a été déterminée par un marquage à l'iodure de propidium et n'était plus que de 50%. Ces mêmes cellules ont ensuite été incubées dans des conditions normales de culture cellulaire pendant 23 heures et présentaient alors un taux de mortalité de 100%. Ainsi, seulement deux pH différents ont pu être utilisés en test fonctionnel, soit le pH 6.0 et le pH 7.4 (Figure 3-5 B). Cette expérience nous a démontré qu'à pH 6.0, HLA-DM et HLA-DM γ sont plus efficaces pour charger les molécules de classe II qu'en présence du n-propanol. HLA-DM et HLA-DM γ ont montré un effet moins important à pH physiologique. Par contre, c'est à ce pH que l'effet additif du n-propanol avec celui de HLA-DM et HLA-DM γ est le plus important. L'activité de HLA-DM et HLA-DM γ est meilleure à pH acide, mais reste suffisamment fonctionnelle à pH physiologique où le n-propanol montre son plus grand effet additif sur le chargement peptidique. On a aussi évalué si l'augmentation de la concentration du sérum de veau foetal dans le milieu servant au chargement peptidique interférait avec le chargement du peptide HA. Avec l'aide des cellules 293TDR11i transfectées avec HLA-DM et 0.5 μ g/mL de peptide HA, nous avons testé différentes concentrations de sérum. Nous avons observé une corrélation inverse de la réduction du chargement de peptides et la concentration de sérum de veau foetal. Déjà à 4% de sérum, le chargement de peptide par HLA-DM était réduit au même niveau que celui des cellules

A



B



C

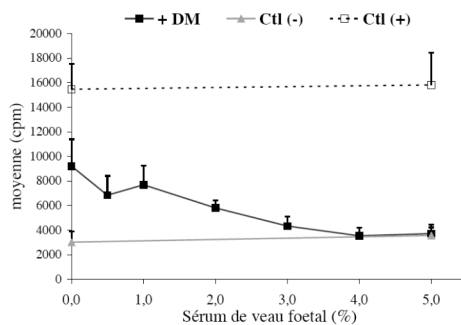


Figure 3-5. Effet du pH et du sérum sur le chargement peptidique sur la lignée cellulaire stable 293TDR1i.

(A) Viabilité des cellules de la lignée stable 293TDR1i en fonction du pH. Les cellules sont incubées aux pH 4.5, 5.0, 6.0 et 7.4. et après 5 heures, la viabilité cellulaire est déterminée avec l'iodure de propidium (*haut*). Après l'incubation de 5 heures, ces cellules sont lavées et resuspendues dans un milieu à pH 7,4 pour être incubées 18 heures avant d'évaluer à nouveau leur viabilité cellulaire (*bas*). (B) Essai fonctionnel en fonction du pH avec la lignée cellulaire stable 293TDR1i transfectée avec HLA-DM ou HLA-DMy. Les cellules ont été incubées avec 0 et 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de peptides HA biotinylés aux pH 6.0 et 7.4 avec ou sans n-propanol pendant 5 heures. Ensuite elles sont lavées et incubées avec les cellules T Jurkart HA 1.7. Le niveau de IL-2 produit a été déterminé avec la lignée cellulaire CTLL-2 par incorporation de thymidine $[3\text{H}]$. (C) Essai fonctionnel en fonction de la concentration de sérum de veau foetal inactivé (FBSi) présent dans le milieu lors du chargement peptidique. Les cellules stables 293TDR1i (Ctl-) ont été transfectées avec HLA-DM (+DM) et avec HLA-DR β HA (Ctl+) et incubées avec 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de peptides HA en présence de 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 et 5% de FBSi pendant 5 heures. Ensuite elles sont lavées et incubées avec les cellules T Jurkart HA 1.7. Le niveau de IL-2 produit a été déterminé avec la lignée cellulaire CTLL-2 par incorporation de thymidine $[3\text{H}]$.

293TDR1Ii sans HLA-DM. Ainsi, le chargement spécifique de HA peut être réduit en présence de sérum même si HA a une forte affinité pour les molécules HLA-DR1.

3.1.5 Effet de la chaîne invariante sur le chargement peptidique

Selon les travaux de Yan *et al.* et dépendant de l'isoforme de Ii présent dans les cellules, il y aurait une différence de stabilité des complexes HLA-DR/peptides à la surface cellulaire [127]. Nous avons donc vérifié s'il y avait une différence de présentation des peptides HA en présence des isoformes Iip33 et Iip35 en test fonctionnel avec HLA-DM (Figure 3-6 A). Contrairement aux travaux de Yan *et al.*, les résultats montrent que les cellules qui expriment Iip33 présentent un chargement peptidique légèrement inférieur à celles qui expriment Iip35. À plus faible concentration de peptides, la différence d'activation des cellules T est un peu plus grande qu'à concentrations plus élevées de peptides HA. En présence de n-propanol, on observe que son action est équivalente avec les deux isoformes de Ii.

Nous avons aussi vérifié si la présence de Ii affectait l'effet catalytique de HLA-DM et de HLA-DMy. Nous avons transfecté les cellules 293T avec HLA-DR, Ii et HLA-DM ou HLA-DMy et incubé pendant 5 heures avec 10µg/mL de peptides HA biotinylés en présence ou non de n-propanol. Les cellules ont ensuite été analysées au cytomètre en flux. Les valeurs représentées dans le graphique sont les ratios de la moyenne de fluorescence du chargement des peptides HA sur la moyenne de fluorescence de HLA-DR de chacun des transfectants (Figure 3-6 B). On observe que Ii permet une augmentation de chargements de peptides par les molécules HLA-DR par rapport aux cellules 293TDR1 quand les cellules n'expriment ni HLA-DM et ni HLA-DMy. Par contre, quand les cellules expriment HLA-DM ou HLA-DMy, Ii a l'effet inverse sur la présentation de HA ; elle diminue légèrement sa présentation par les molécules HLA-DR. De plus, le n-propanol augmente le chargement de peptide dans les cellules sans HLA-DM et avec HLA-DM. Par contre, on n'obtient pas l'effet additif du n-propanol avec HLA-DMy, comme ça été le cas dans les tests fonctionnels (Figure 3-1).

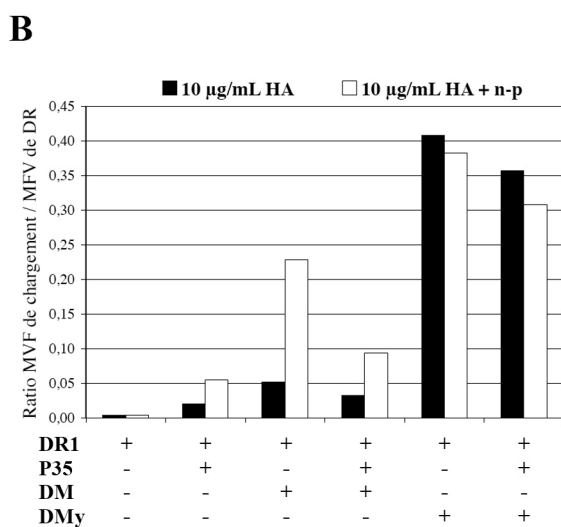
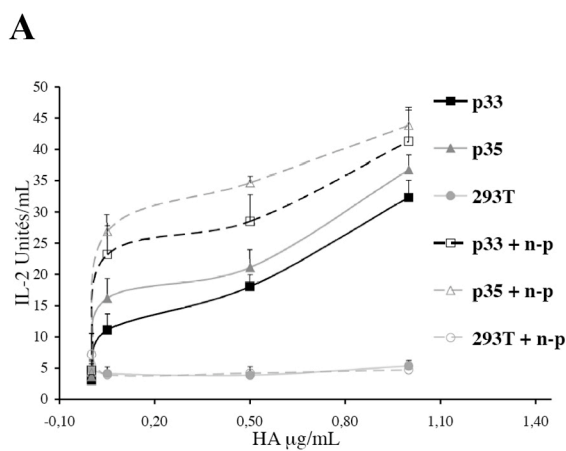


Figure 3-6. Effet de la chaîne invariante sur le chargement peptidique.

(A) Effet de différents isoformes de Ii sur le chargement de peptides. Essai fonctionnel des chargements peptidiques HA avec les isoformes de Ii, soit p33 ou p35. Les cellules 293T ont été transfectées avec HLA-DR, HLA-DM et p33 ou p35. Les cellules ont été incubées avec 0, 0.05, 0.5 et 1.0 µg/mL de peptides HA avec ou sans n-propanol pendant 5 heures. Ensuite elles sont incubées avec les cellules T Jurkart HA 1.7, puis le niveau de IL-2 a été déterminé avec la lignée cellulaire CTLL-2 par incorporation de thymidine [3H]. (B) Effet de la présence de Ii sur la présentation des peptides HA. Les cellules 293T ont été transfectées avec HLA-DR, Ii (p35), HLA-DM ou HLA-DMy selon le cas. Incubation des cellules transfectées avec 10 µg/mL de peptides HA biotinylés pendant 5 heures en présence ou non de 2% n-propanol. Le ratio sur l'axe des y est la moyenne de fluorescence obtenue suite au chargement peptidique moins la moyenne de fluorescence sans peptide, le tout divisé par la moyenne de fluorescence de HLA-DR des cellules correspondantes.

3.1.6 HLA-DO diminue le chargement peptidique dans les cellules HeLa CIITA DO

Pour étudier l'effet de HLA-DO sur la présentation antigénique dans ce système, nous avons utilisé une lignée cellulaire HeLa transfectée de façon stable avec le facteur de transcription CIITA qui induit l'expression de gènes requis pour la présentation antigénique

par les molécules de classe II. Les cellules HeLa CIITA expriment HLA-DR, HLA-DM et Ii fortement, mais faiblement HLA-DO [119]. Ainsi, pour étudier l'effet de HLA-DO, on utilise la lignée cellulaire HeLa CIITA transfectée de façon stable avec l'ADN complémentaire de HLA-DO β [119]. On a tout d'abord confirmé que l'expression des molécules HLA-DR est identique dans les deux types de cellules (Figure 3-7 A). Les

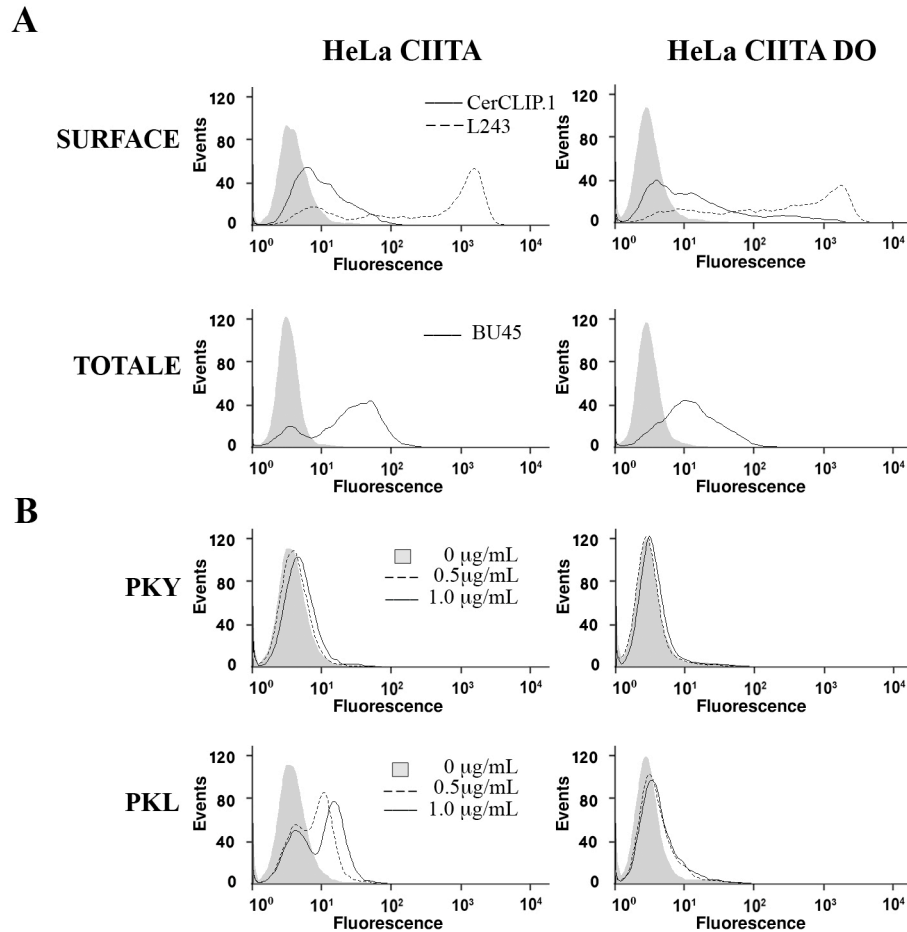


Figure 3-7. HLA-DO réduit le chargement peptidique par les cellules HeLa CIITA
(A) Accumulation de CLIP en surface lorsque HLA-DO est présent. Profil d'expression de surface de HLA-DR et CLIP (haut) et expression totale de Ii (bas) dans les lignées cellulaires stables HeLa CIITA et HeLa CIITA DO. **(B)** Chargement de peptides biotinylés avec 0.5 et 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HA-PKY (haut) et HA-PKL (bas) dans les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO. Incubation des cellules avec les peptides pendant 5 heures. Les cellules sont lavées deux fois avant d'être marquées en surface avec de l'avidine couplée à la R-phycoérythrine.

niveaux de Ii sont également comparables bien que les cellules HeLa CIITA DO présentent une accumulation de CLIP associé à HLA-DR à la surface cellulaire causée par l'inhibition de l'action de HLA-DM par HLA-DO [35].

Ces deux populations cellulaires ont été ensuite testées pour leur capacité de présenter les peptides biotinylés HA-PKY et HA-PKL. Les lignées cellulaires HeLa CIITA et HeLa CIITA DO sont homozygotes pour HLA-DR*0102 et donc ne sont pas efficaces pour présenter les peptides HA-PKY. On a donc aucune liaison du peptide HA-PKY avec les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO (Figure 3-7 B). À notre surprise, on a obtenu une liaison des peptides HA-PKL avec les cellules HeLa CIITA qui augmente avec la concentration de peptides. Le chargement de peptide HA-PKL est très faible avec les cellules HeLa CIITA DO. Autant avec les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO, la présence de CLIP à la surface cellulaire reste la même avant et après le chargement peptidique (résultats non montrés). Ainsi, le chargement de peptides est spécifique à l'allèle de HLA-DR et semble être inhibé par la présence de HLA-DO.

3.1.7 Le chargement du peptide gp100 est influencé par HLA-DM et HLA-DMy

La molécule HLA-DM active la dissociation de peptides et cet effet peut être observé sur tous les complexes CMH II/peptide avec une efficacité différente pour chacun [51]. Nous avons voulu étendre nos conclusions sur l'impact de HLA-DM, HLA-DMy et du n-propanol en utilisant un autre complexe différent de HLA-DR/HA. Nous avons utilisé avec des cellules stables 293T CIITA exprimant HLA-DR β 1*0701. Le peptide gp100 a un épitope restreint aux molécules HLA-DR β 1*0701, soit gp100174-190 [128] et la formation HLA-DR7-gp100 plus lente et moins efficace que le complexe HLA-DR1/HA [129]. Dans une première expérience, nous avons tout d'abord vérifié le chargement peptidique de gp100 pendant plus de 22 heures avec les cellules 293TCITADR7 (Figure 3-8 A). Cela nous a permis de constater que le peptide est chargé faiblement sur les molécules HLA-DR7 des cellules. Dans une deuxième expérience, afin de connaître l'effet de HLA-DM et de HLA-DMy sur ce nouveau complexe HLA-DR/peptide, nous avons transfecté de façon

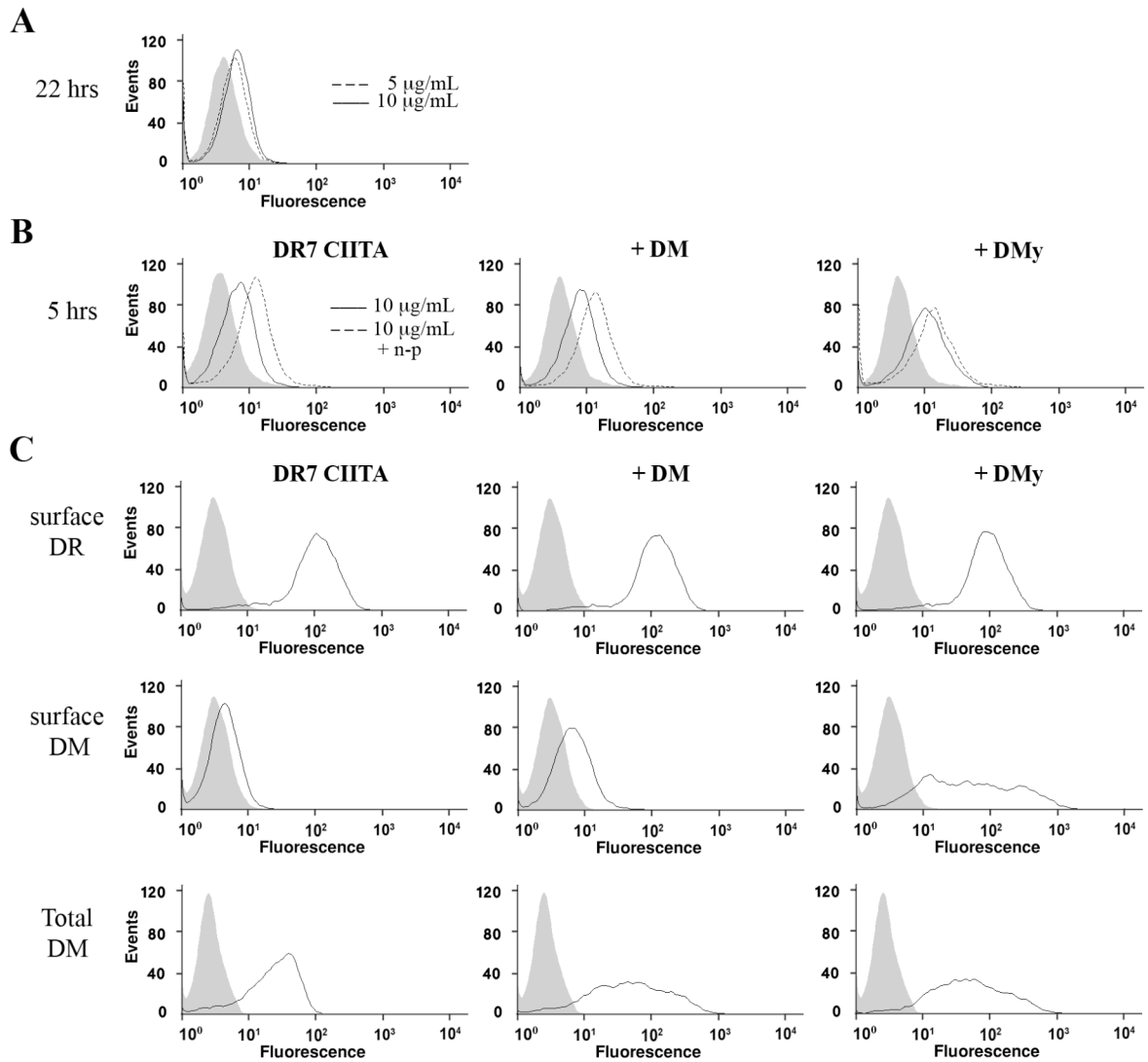


Figure 3-8. HLA-DMy et n-propanol augmentent le chargement peptidique de gp100. (A) Chargement des peptides gp100 biotinylés sur la lignée cellulaire stable 293T CIITA DR7. Les cellules ont été incubées avec 0, 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$ de peptides gp100 pendant 22 heures. (B) Effet de HLA-DMy et du n-propanol sur le chargement peptidique. La lignée cellulaire stable 293T CIITA DR7 a été transfectée avec HLA-DM ou HLA-DMy. Ces cellules ont été incubées avec 0 et 10 $\mu\text{g/mL}$ de peptides gp100 biotinylés avec ou sans n-propanol pendant 5 heures. (C) Profils d'expression cellulaire des cellules utilisées pour le chargement peptidique en (B). Marquages de surface avec L243 (HLA-DR) et Map.DM1 (HLA-DM), puis marquages des cellules perméabilisées avec Map.DM1 pour les cellules 293TCIITA DR7 transfectées et non transfectées.

transitoire les cellules 293TCITADR7 avec HLA-DM ou HLA-DM γ (Figure 3-8 C). L'expression de HLA-DR1 est similaire pour chacun des transfectants et l'on retrouve un peu plus de HLA-DM total et en surface suite à la transfection. Bien que l'expression en surface de HLA-DM γ soit augmentée considérablement, les expressions totales de HLA-DM et de HLA-DM γ sont équivalentes. Afin de déterminer si HLA-DM et HLA-DM γ ont un effet important et rapide sur le chargement de peptide, les cellules ont été incubées avec les peptides gp100 seulement 5 heures. L'augmentation d'expression de HLA-DM dans les cellules 293TCITADR7 n'a pas eu d'effet notable sur le chargement du peptide, la moyenne de fluorescence a passé de 6,8 à 8,8. La présence de HLA-DM γ , c'est-à-dire l'accumulation de HLA-DM γ à la surface cellulaire, n'a pas eu une augmentation considérable sur le chargement de peptide soit une moyenne de fluorescence d'une valeur de 6,8 à 13,1. Mais compte tenu de la difficulté de présentation de ce peptide, c'est une augmentation appréciable du chargement du peptide gp100.

3.2 PRÉSENCE DE HLA-DM DANS LES EXOSOMES

3.2.1 Accumulation de HLA-DM γ à la surface cellulaire

Pour étudier l'importance du motif YTPL de HLA-DM dans son ciblage vers les exosomes, nous avons utilisé des transfectants stables de cellules HeLa, une lignée cellulaire provenant de cellules épithéliales humaines cancéreuses. Tel que décrit précédemment dans la section 1.2.2.3.1, c'est un motif de type tyrosine YTPL situé sur la queue cytoplasmique de la chaîne β de HLA-DM qui est responsable de sa localisation lysosomale [20-22]. Si le motif est muté ou substitué, les molécules HLA-DM s'accumulent à la membrane plasmique. On utilise des cellules qui expriment soit le complexe hétérodimérique HLA-DM α /DM β (HeLa DM.5) ou le complexe HLA-DM dépourvu de son motif de type tyrosine fonctionnel (HLA-DM α /Dm γ 230-a; HeLa DM γ). Les cellules ont été analysées par un anticorps dirigé contre la portion luminale de HLA-DM (Map.DM1) en cytométrie

en flux (Figure 3-9 A). Les niveaux d'expression totale de HLA-DM et HLA-DM α sont équivalents dans les cellules HeLa perméabilisées. La distribution cellulaire de chacune des deux molécules est très différente. La molécule HLA-DM sauvage est très peu retrouvée à la surface cellulaire, tandis que la molécule HLA-DM α s'accumule à la membrane plasmique.

Le marquage cellulaire avec un anticorps contre CD9 est constant dans chacun des types cellulaires utilisés pour la production d'exosomes. En effet, les tétraspanines sont des molécules composées de 4 domaines transmembranaires et sont exprimées dans tous les types cellulaires. On les retrouve à la surface cellulaire et aussi dans les compartiments intracellulaires tels les MVBs. La tétraspanine CD9 n'a pas de motif de type tyrosine contrairement à d'autres protéines ciblées aux exosomes. L'intégration exosomale de CD9 peut se produire lors du bourgeonnement interne des vésicules des MVB par une interaction avec des lipides [93]. Le ciblage exosomal de CD9 n'est pas non plus affecté par la palmylation contrairement à certaines protéines exosomales [130]. On retrouve aussi dans les exosomes plusieurs membres de la famille des tétraspanines tels CD9, CD63, CD81 et CD82. Cette dernière est la tétraspanine la plus abondante des exosomes provenant de cellules dendritiques [76]. Dans un contexte *in vivo*, il est probable que CD9 participe à l'interaction des exosomes avec les CPA ou même les cellules T. Ainsi, CD9 devient une cible de choix comme marqueur exosomal dans nos expériences.

3.2.2 Les cellules HeLa sécrètent des exosomes

Les exosomes sécrétés par les cellules HeLa DM.5 et HeLa DM α sont collectés à partir du milieu de culture des cellules par une série de centrifugations différentielles. L'intégrité de la préparation d'exosomes et la structure de ceux-ci ont été vérifiées par des analyses en microscopie électronique suite au marquage avec différents anticorps contre HLA-DM. La Figure 3-9 B présente des exosomes dont la taille varie de 60 à 100 nm. Cette population d'exosomes est semblable à celles déjà décrites dans la littérature [74, 75, 77]. Ceci valide notre méthode de purification d'exosomes. Nous avons utilisé un anticorps de sérum de lapin contre la queue cytoplasmique de la chaîne β de HLA-DM ou un anticorps contre la partie luminale de HLA-DM (Map.DM1). La présence de HLA-DM sur les exosomes est

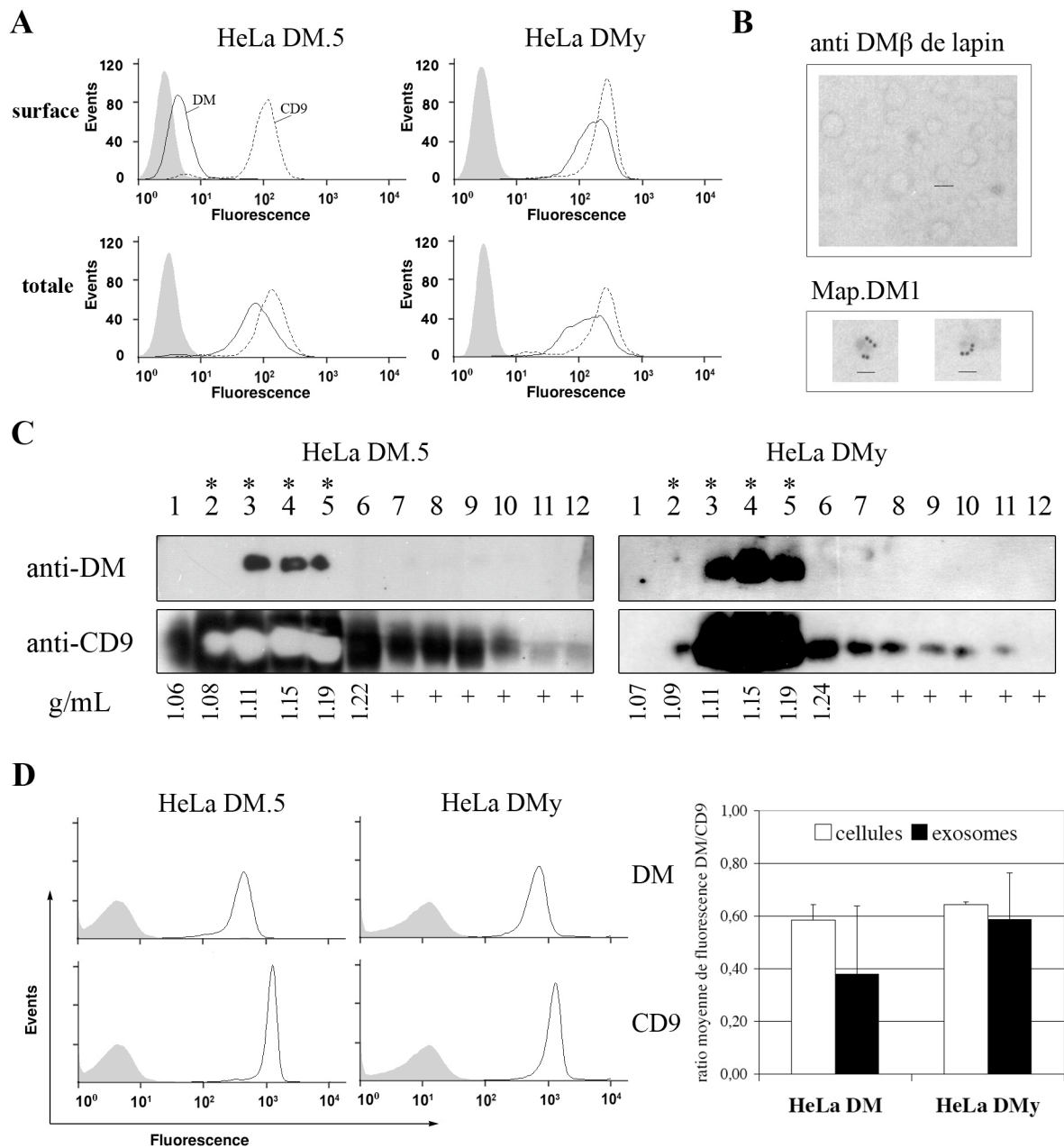


Figure 3-9. Ciblage exosomal de HLA-DM et HLA-DMMy.

(A) Expression cellulaire de surface (haut) et totale (bas) de HLA-DM et de CD9 dans les lignées cellulaires stables HeLa DM.5 et HeLa DMMy. (B) IEM effectué sur le culot d'exosomes provenant de cellules HeLa DMMy. Les exosomes sont marqués par l'anticorps de lapin anti-HLA-DM β cytoplasmique et l'anticorps de souris Map.DM1 (barre, 100nm). (C) Les exosomes des cellules HeLa DM.5 et HeLa DMMy ont été purifiés sur une gradient continu (0.25M-2M) de saccharose. Les fractions récoltées à partir du haut du gradient ont

été analysées par transfert de Western avec les anticorps contre HLA-DM (anti-DM β de lapin) et CD9 (50H.19). Les fractions exosomales (*) sont à une densité d'environ 1.08 à 1.18 g/mL. **(D)** Caractérisation d'exosomes provenant de HeLa DM.5 et HeLa DMy par cytométrie en flux. Les préparations d'exosomes sont couplées aux billes de latex puis incubées avec les anticorps contre HLA-DM (Map.DM1) et CD9 (50H.19). Les anticorps utilisés sont comparés à un anticorps contre HLA-DR (XD5.117). Un minimum de 10⁴ billes est analysé par cytométrie en flux. **(E)** Les moyennes de fluorescence de trois expériences indépendantes de caractérisation d'exosomes et de cellules ont servi à calculer les ratios HLA-DM/CD9. La moyenne d'expression totale a été utilisée dans le cas des cellules. La moyenne de fluorescence obtenue avec Map.DM1 est divisée par la moyenne de fluorescence obtenue avec 50H.19 .

révélée par le marquage avec l'anticorps Map.DM1. Ce dernier est très spécifique aux exosomes et montre plusieurs billes sur un même exosome. D'un autre côté, le marquage avec l'anticorps de lapin contre la queue cytoplasmique est très important puisqu'il détermine l'emplacement du domaine cytosolique de HLA-DM. En effet, le marquage par cet anticorps est négatif sur les exosomes et démontre que la partie cytosolique de la molécule HLA-DM est bien à l'intérieur des exosomes. Ceci est en accord avec les mécanismes établis de biogenèse des exosomes. En effet, les exosomes se forment à partir du bourgeonnement interne de la membrane limitante des MVB renfermant ainsi le cytosol de la cellule d'origine et exposant le domaine extracellulaire des protéines transmembranaires [68].

3.2.3 Les exosomes sont enrichis en HLA-DM, HLA-DMy et CD9

Pour vérifier et comparer la présence des molécules HLA-DM sauvages et HLA-DMy dans les exosomes, nous avons effectué des analyses d'immunobuvardage de western et de cytométrie en flux. Dans un premier temps, les exosomes ont été purifiés du milieu de culture des cellules HeLa DM.5 et HeLa DMy par filtration et une série de centrifugations différentielles. Puis la préparation d'exosomes a été resuspendue et fractionnée sur un gradient continu de saccharose. La densité de chacune des fractions est déterminée à l'aide

d'un réfractomètre et l'on a vérifié la présence des protéines HLA-DM et CD9 par immunobuvardage (Figure 3-9 C). CD9 est retrouvé majoritairement dans les fractions dont la densité varie entre 1.08 - 1.19 g/mL qui correspondent aux fractions exosomales. En effet, il a déjà été décrit que les fractions contenant les exosomes ont une densité se situant entre 1.08 -1.18 g/mL [75-77, 84]. On détecte aussi la présence de CD9 dans les fractions à plus haute densité. Ces fractions contiennent probablement des membranes provenant de cellules apoptotiques; des vésicules plus petites qui se distinguent des exosomes et que l'on retrouve dans les fractions d'une densité de 1.24 - 1.28 g/mL [77]. Les molécules HLA-DM et HLA-DMy sont détectées uniquement dans les fractions dont la densité se situe entre 1.11 - 1.19 g/mL. Contrairement à nos attentes, les molécules HLA-DMy sont retrouvées dans les fractions exosomales comme le sont les molécules HLA-DM et CD9. En effet, nous pensons que le motif de type tyrosine de HLA-DM β pourrait empêcher l'entrée de HLA-DM dans les exosomes.

Par l'intensité des bandes détectées sur l'immunobuvardage de western, on remarque que les bandes de HLA-DM sauvages ont une intensité moins fortes que celles de HLA-DMy. De plus le ratio des bandes de HLA-DM avec celles de CD9 semble plus petit dans le cas des exosomes provenant des cellules HeLa DM.5 que des cellules HeLa DMy. On peut suggérer que les deux types de molécules soient retrouvées dans les exosomes, mais que le motif de type tyrosine prévient l'accumulation dans les exosomes. Puisque les analyses par buvardage de western ne nous permettent pas d'être suffisamment quantitatif, nous avons mis au point une autre technique d'analyse des exosomes. Cette dernière nous permet de détecter de façon spécifique l'expression de différentes protéines de la composition des exosomes tout en étant sensible et quantitative [77, 100, 121]. Les exosomes sont liés de façon covalente à des billes de latex activées à l'aldéhyde sulfate et dont la taille est de 3.5 μ m. Ensuite, la présence des protéines membranaires est révélée par la cytométrie en flux. En utilisant cette technique, on peut faire une analyse plus quantitative de l'incorporation de HLA-DM et HLA-DMy dans les exosomes (Figure 3-9 D). Ainsi, on confirme les résultats des travaux de Neefjes en démontrant clairement la présence de HLA-DM dans les exosomes. Les analyses de nos résultats montrent des ratios de HLA-DM/CD9 équivalents

dans les cellules HeLa DM.5 ($0,58 \pm 0,06$) et HeLa DMy ($0,64 \pm 0,01$). Le ratio HLA-DM/CD9 dans les exosomes des cellules HeLa DM.5 ($0,38 \pm 0,28$) est légèrement inférieur à celui des exosomes des cellules HeLa DMy ($0,59 \pm 0,18$), mais la variation entre les expériences conduit à une équivalence des ratios HLA-DM/CD9 (Figure 3-9 E). Ainsi, contrairement à notre hypothèse de départ, il n'y a pas de différence entre la quantité de molécules HLA-DM et HLA-DMy retrouvées dans les exosomes.

3.2.4 HLA-DR n'augmente pas l'intégration de HLA-DM dans les exosomes

Nous avons émis l'hypothèse que HLA-DM est incorporé dans les exosomes lorsque le motif de type tyrosine est muté ou masqué par la protéine HLA-DR. Cependant, nous avons montré que HLA-DM est autant incorporé dans les exosomes que HLA-DMy dont le motif de type tyrosine de la chaîne β est inactivé. Sans toutefois masquer le motif de type tyrosine de HLA-DM, un modèle alternatif voudrait que la molécule HLA-DR entraîne de façon plus importante HLA-DM dans les exosomes. En effet, il est connu que HLA-DR est retrouvé en grande quantité dans les exosomes [75, 100, 131]. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons transfecté de façon stable les cellules HeLa DM.5 avec HLA-DR. Dans ces cellules, nous constatons une co-localisation de HLA-DM et HLA-DR dans les vésicules endocytiques (résultats non publiés). Ainsi, HLA-DR semble être un bon candidat pour introduire HLA-DM dans les exosomes. En interagissant avec HLA-DM dans les vésicules endocytiques, HLA-DR entraînerait HLA-DM dans les vésicules internes des MVB. Le profil d'expression cellulaire de HLA-DM et de HLA-DR dans les cellules HeLa DM.5+DR est montré dans la Figure 3-10 A qui montre des niveaux d'expression totale identiques. La majorité des molécules HLA-DR sont retrouvées à la surface cellulaire tandis que peu de molécules HLA-DM s'y retrouvent. Les exosomes relâchés par ces cellules ont été purifiés et analysés en cytométrie en flux à l'aide des billes de latex (Figure 3-10 B). L'absence de liaison aux complexes billes-exosomes par DA6.147, un anticorps dirigé contre la queue cytoplasmique de la chaîne α de HLA-DR, témoigne de la spécificité de liaison d'exosomes intacts par l'anticorps XD5.117. Même si les cellules expriment un

grand nombre de molécules HLA-DR, on retrouve peu de HLA-DR dans les exosomes (Figures 3-10B et 3-12). Les ratios des molécules contre CD9 montrent que HLA-DM est retrouvé en plus grand nombre que HLA-DR dans les exosomes (ratios : 1,03 et 0,05 respectivement, Figure 3-12 B). Ces analyses révèlent que la présence de HLA-DR ne cause pas une entrée plus importante de molécules HLA-DM dans les exosomes.

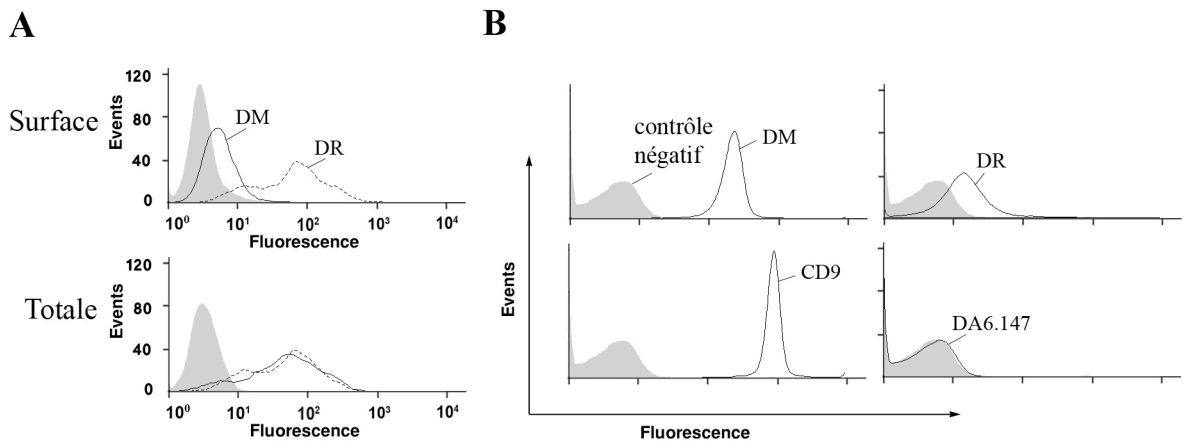


Figure 3-10. HLA-DR n'augmente pas le ciblage exosomal de HLA-DM.

(A) Expression cellulaire de surface (haut) et totale (bas) de HLA-DM et de HLA-DR dans la lignée cellulaire stable HeLa DM.5+DR. (B) Caractérisation d'exosomes provenant de HeLa DM.5+DR par cytométrie en flux. La préparation d'exosomes est couplée aux billes de latex puis incubée avec les anticorps contre HLA-DM (Map.DM1), CD9 (50H.19), HLA-DR β (XD5.117) et contre la queue cytoplasmique de HLA-DR α (DA6.147). Les anticorps utilisés sont comparés à un contrôle négatif isotypique contre HLA-DO (Mags.DO5). Un minimum de 10⁴ billes est analysé par cytométrie en flux.

3.2.5 Effet de la présence de HLA-DR tronquée dans l'intégration de HLA-DM dans les exosomes

Puisque les molécules HLA-DR ne semblent pas interagir directement avec les molécules HLA-DM, nous avons voulu vérifier la possibilité d'un effet indirect de HLA-DR sur la localisation de HLA-DM. En effet, il a été montré que HLA-DR provoquait la formation de compartiments tardifs et ceci par l'entremise des queues cytoplasmiques [132]. La chaîne β

de HLA-DR porte un motif de type di-leucine qui serait responsable de l'internalisation de HLA-DR et le ciblage de ce dernier vers les endosomes précoces [133]. Nous avons donc utilisé une protéine HLA-DR tronquée au niveau des queues cytoplasmiques des chaînes α et β de la molécule HLA-DR (DRTMTM, Figure 3-11 A). Nous avons transfecté les cellules HeLa DM.5 avec DRTMTM afin d'obtenir des transfectants stables. La caractérisation en cytométrie en flux montre une expression élevée de HLA-DR à la surface cellulaire (Figures 3-11 B et 3-12 A), tout comme la lignée cellulaire stable HeLa DM.5+DR. Nos analyses en microscopie confocale à fluorescence permettent de démontrer une co-localisation des deux molécules HLA-DR et HLA-DM dans les vésicules endocytiques (Figure 3-11 C) tel que démontré dans les cellules HeLa DM.5+DR (résultats non publiés).

Les exosomes sécrétés par la lignée stable HeLa DM.5+DRTMTM ont été purifiés et analysés par buvardage de western et par la cytométrie en flux à l'aide des billes de latex. Ces analyses montrent la présence de HLA-DM dans les fractions dont la densité de saccharose se situe entre 1.10 - 1.18 g/mL (Figure 3-11 D). La distribution de HLA-DR et de CD9 dans les fractions du gradient de saccharose concorde parfaitement avec celle de HLA-DM. Les analyses des complexes billes-exosomes montrent qu'il n'y a aucune différence dans la quantité de HLA-DM retrouvée dans les exosomes (Figures 3-11 E et 3-12 B). De plus, on retrouve un peu plus de DRTMTM que de HLA-DR sauvage dans les préparations d'exosomes (ratio HLA-DR/CD9 : $0,07 \pm 0,03$ et $0,05 \pm 0,01$), mais cette différence n'est pas significative (Figure 3-12 A). Ainsi, les molécules DRTMTM qui ne contiennent plus le motif de ciblage suite à l'élimination des queues cytoplasmiques des chaînes α et β , parviennent toujours à co-localiser avec les molécules HLA-DM et à être incorporées dans les exosomes. De plus, ces résultats nous permettent de conclure que les queues cytoplasmiques de HLA-DR n'affectent pas l'entrée de HLA-DM dans les exosomes.

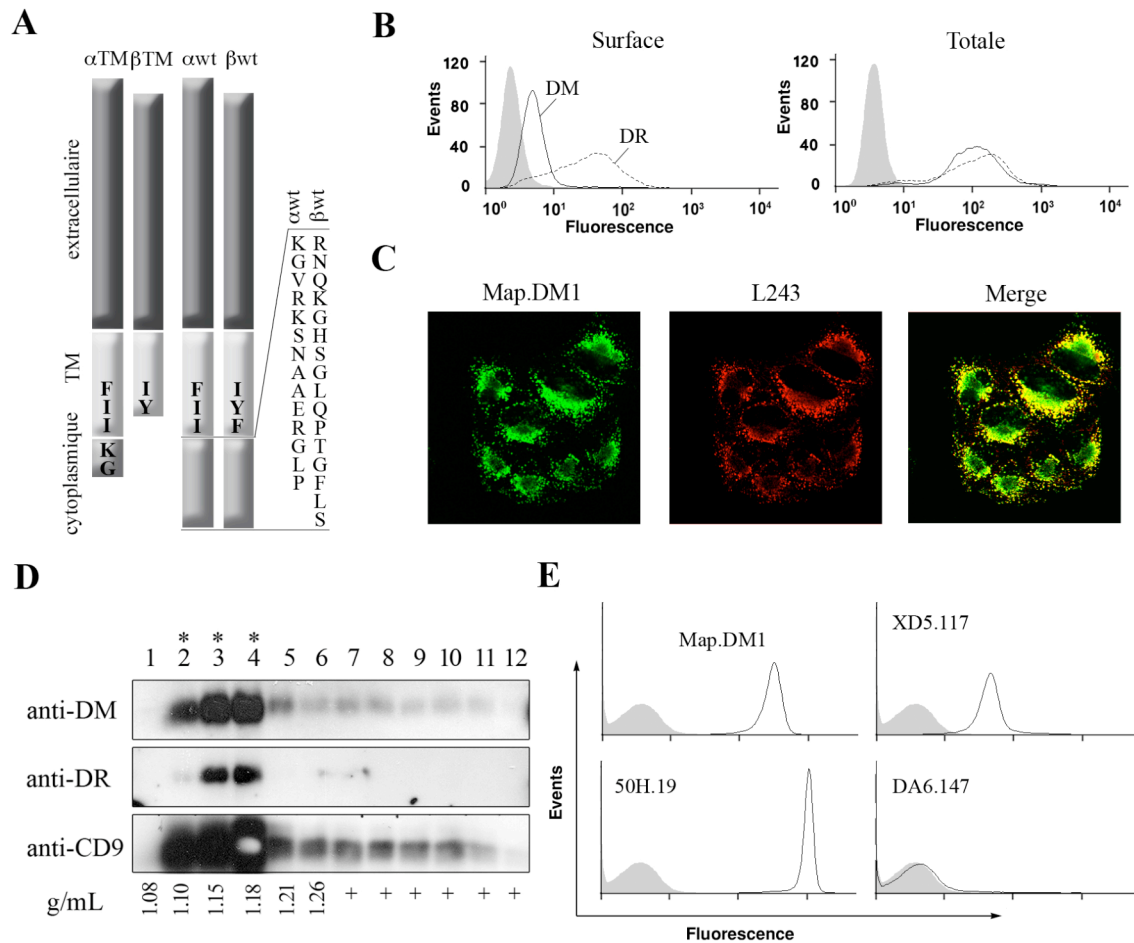


Figure 3-11. HLA-DM est ciblée aux exosomes en présence de HLA-DR tronquée.

(A) Représentation schématique de DR α /DR β sauvages (wt) et de DR α TM/DR β TM utilisés dans cette expérience. (B) Expression cellulaire de surface et totale de HLA-DM et de DRTMTM dans la lignée cellulaire stable HeLa DM.5+DRTMTM. (C) Co-localisation en microscopie confocale de HLA-DM et de DRTMTM dans les cellules HeLa perméabilisées. Les anticorps utilisés sont Map.DM1 en vert (HLA-DM) et L243 en rouge (HLA-DR). (D) Les exosomes des cellules HeLa DM.5+DRTMTM ont été analysés tel que décrit dans la Figure 3-9 avec les anticorps contre HLA-DM (anti-DM β de lapin), HLA-DR (anti-DR α de lapin) et CD9 (50H.19). (E) Caractérisation d'exosomes provenant des cellules HeLa DM.5+DRTMTM en cytométrie en flux. Les préparations d'exosomes sont couplées aux billes de latex puis incubées avec les anticorps contre HLA-DM (Map.DM1), CD9 (50H.19), HLA-DR β (XD5.117) et la queue cytoplasmique de HLA-DR α (DA6.147). Les anticorps utilisés sont comparés à un contrôle négatif contre HLA-DO (Mags.DO5; courbe pleine). Un minimum de 10⁴ billes est analysé par cytométrie en flux.

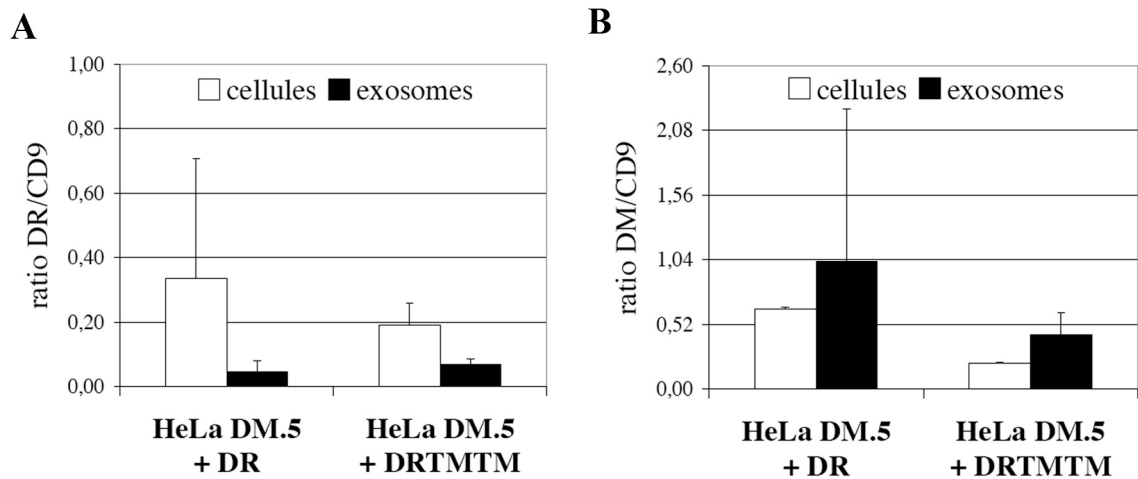


Figure 3-12. Ratios de HLA-DM et HLA-DR dans les exosomes de cellules HeLa DM.5 avec HLA-DR ou HLA-DR tronquée.

(A) Les moyennes de fluorescence de trois expériences indépendantes de caractérisation d'exosomes et de cellules ont servi à calculer les ratios HLA-DR/CD9. On a utilisé la moyenne de l'expression totale dans le cas des cellules. Moyenne de fluorescence obtenue avec XD5.117 est divisée par la moyenne de fluorescence obtenue avec 50H.19. (B) Les moyennes de fluorescence de trois expériences indépendantes de caractérisation d'exosomes et de cellules ont servi à calculer les ratios HLA-DM/CD9. On a utilisé la moyenne de l'expression totale dans le cas des cellules. Moyenne de fluorescence obtenue avec Map.DM1 est divisée par la moyenne de fluorescence obtenue avec 50H.19.

3.2.6 HLA-DO empêche l'intégration exosomale de HLA-DM

Sans toutefois travailler avec des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, nous avons voulu vérifier la présence de HLA-DM dans les exosomes dans un contexte plus physiologique. CIITA est un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes reliés aux CMH de classe II jouant ainsi un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. Nous avons utilisé les cellules HeLa transfectées de façon stable avec CIITA. L'expression cellulaire en surface et totale de HLA-DR, Ii, HLA-DM et HLA-DO a été analysée par cytométrie en flux (Figure 3-13 A). Une fois de plus, la présence de HLA-DM en concordance avec celles de HLA-DR et CD9 dans les exosomes est confirmée par les

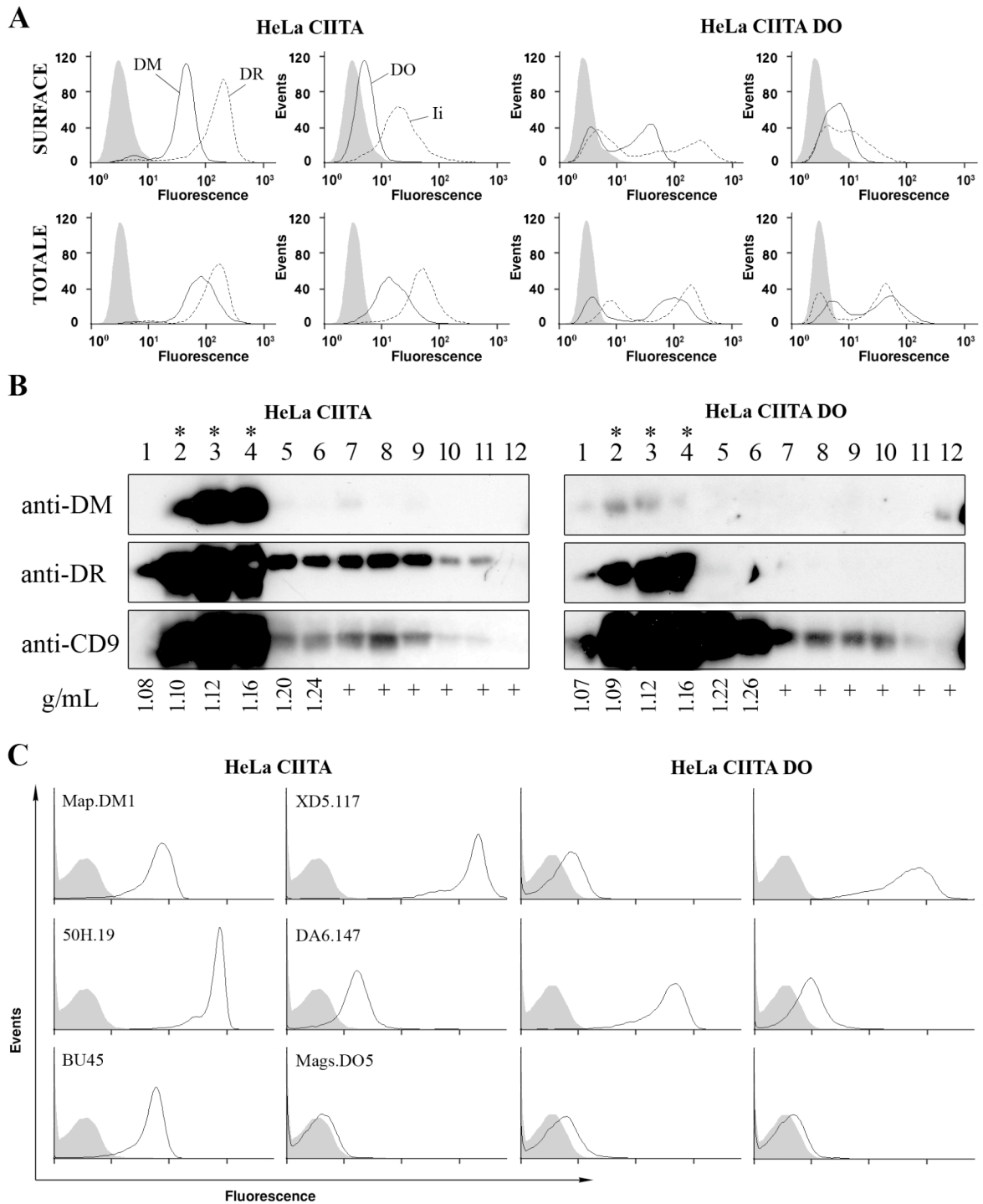


Figure 3-13. HLA-DO réduit l'accumulation de HLA-DM dans les exosomes.

(A) Expression cellulaire de surface (haut) et totale (bas) de HLA-DM, HLA-DR, HLA-DO et Ii dans les lignées cellulaires stables HeLa CIITA et HeLa CIITA DO. (B) Les exosomes des cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO ont été analysés tel que décrit dans la Figure

3-9 avec les anticorps contre HLA-DM (anti-DM β de lapin), HLA-DR (anti-DR α de lapin) et CD9 (50H.19). (C) Caractérisation d'exosomes provenant de HeLa CIITA et HeLa CIITA DO par cytométrie en flux. Les préparations d'exosomes sont couplées aux billes de latex puis incubées avec les anticorps MapDM1 (HLA-DM), 50H.19 (CD9), BU45 (Ii), XD5.117 (HLA-DR), DA6.147 (HLA-DR) et Mags.DO5 (HLA-DO). Un minimum de 10⁴ billes est analysé par la cytométrie en flux.

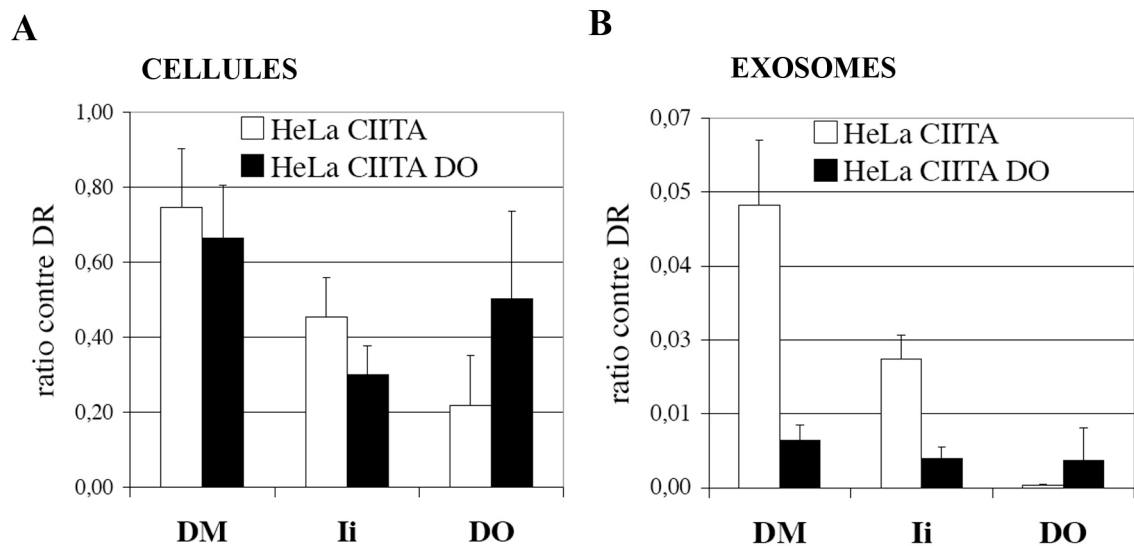


Figure 3-14. Absence de HLA-DM et de Ii en présence de HLA-DO.

(A) Les moyennes de fluorescence de trois expériences indépendantes de caractérisation de cellules ont servi à calculer les ratios HLA-DM/DR, Ii/DR, HLA-DO/DR. On a utilisé la moyenne de l'expression totale. Moyennes de fluorescence obtenues avec Map.DM1, BU45 et Mags.DO5 respectivement sont divisées par la moyenne de fluorescence obtenue avec XD5.117. (B) Les moyennes de fluorescence de trois expériences indépendantes de caractérisation d'exosomes ont servi à calculer les ratios HLA-DM/DR, Ii/DR, HLA-DO/DR. Moyennes de fluorescence obtenues avec Map.DM1, BU45 et Mags.DO5 respectivement sont divisées par la moyenne de fluorescence obtenue avec XD5.117.

analyses d'immunobuvardage et de cytométrie en flux (Figure 3-13 B et C). Si on compare la présence de HLA-DR et de HLA-DM avec celle de CD9 dans les exosomes, on note que HLA-DR et HLA-DM sont incorporés tout comme dans les expériences précédentes. En effet, on constate une accumulation très importante de HLA-DR dans les exosomes

sûrement due à une forte expression de HLA-DR dans les cellules. D'autre part on voit une incorporation de HLA-DM aux exosomes.

Il a été décrit que HLA-DO est totalement dépendant de son association à HLA-DM pour sa sortie du RE [134] et pour son transport vers les MIIC [34, 71]. On a donc voulu vérifier si HLA-DO se retrouve dans les exosomes et voir si son expression affecte l'entrée de HLA-DM dans ces microvésicules. Nous avons utilisé les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA transfectées de façon stable avec les ADN complémentaires de DO α et DO β . Afin de minimiser l'effet de l'expression de HLA-DR dans nos résultats, nous avons calculé les ratios de la moyenne de fluorescence de HLA-DM, HLA-DO ou Ii avec celle de HLA-DR (Figure 3-14). Les ratios HLA-DM/DR dans les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO sont 0.75 et 0.66 et ceux de HLA-DO/DR sont 0.22 et 0.50 respectivement. Ce qui nous permet de vérifier l'effet de HLA-DO sur l'entrée de HLA-DM dans les exosomes.

Tout comme les analyses d'exosomes des cellules HeLa CIITA, les expériences d'immunobuvardage nous indiquent qu'il y a une distribution similaire de HLA-DM, HLA-DR et CD9 dans les fractions du gradient de saccharose et qu'on les retrouve majoritairement dans les fractions exosomales (Figure 3-13 B). Par contre, les molécules HLA-DM sont moins incorporées dans les fractions exosomales provenant des cellules HeLa CIITA DO. Les résultats de cytométrie en flux des complexes billes-exosomes confirment ceux d'immunobuvardage (Figure 3-13 C). On retrouve HLA-DM dans les exosomes de cellules HeLa CIITA, mais sa présence est réduite de plus de 5X en présence du double de HLA-DO dans les cellules HeLa CIITA DO. Les travaux de Van Lith *et al* (Journal of Immunology, 2001) ont déjà montré qu'en présence de HLA-DO, les complexes HLA-DM/DO étaient retenus à la membrane limitante des MVBs plutôt que d'être incorporés aux vésicules internes [77]. En accord avec cette étude, nous n'avons décelé aucune trace de HLA-DO dans les exosomes provenant de cellules HeLa CIITA ni des cellules HeLa CIITA DO.

La présence de HLA-DO dans les cellules a pour effet d'inhiber l'activité de HLA-DM augmentant à la surface cellulaire des molécules HLA-DR associées au fragment CLIP (Figure 3-15 A) [32, 119, 135]. On a voulu vérifier la présence de CLIP dans les exosomes.

On s'aperçoit qu'en présence de HLA-DM on ne retrouve pas CLIP, mais lorsque HLA-DO empêche l'entrée de HLA-DM dans les exosomes, CLIP n'est pas relâché de la niche peptidique de HLA-DR (Figure 3-15 B). Nos résultats supportent l'hypothèse que HLA-DO retienne HLA-DM à la membrane limitante des MVBs et empêche ainsi son intégration aux exosomes.

3.2.7 Présence de la chaîne invariante dans les exosomes

Lors de l'analyse des cellules HeLa CIITA, nous avons noté la présence de la chaîne invariante sur les exosomes (Figures 3-13 C et 3-15 B). Nous avons utilisé l'anticorps BU45 qui reconnaît un épitope situé dans la partie luminale de Ii, plus exactement dans le domaine de trimérisation de Ii [111]. Ce qui signifie qu'on retrouve des trimères de Ii, intacts ou en association avec HLA-DR, dans les exosomes provenant de cellules HeLa CIITA. D'autre part, dans les exosomes des cellules HeLa CIITA DO, nous n'avons pas détecté Ii. Cette différence d'entrée de Ii dans les deux types cellulaires pourrait venir du fait que les cellules HeLa CIITA DO n'exprime pas autant de Ii que les HeLa CIITA. En effet, les ratios Ii/DR sont de $0,30 \pm 0,08$ et $0,45 \pm 0,10$ respectivement. D'ailleurs, une étude effectuée par Escola *et al* (1995) avait montré une très faible présence de Ii dans les exosomes de cellules B transformées par le virus Epstein-Barr [69, 136]. Mais cette étude portait sur les cellules B qui expriment HLA-DO [35]. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'absence de Ii dans les exosomes serait causée par la présence de HLA-DO dans les cellules.

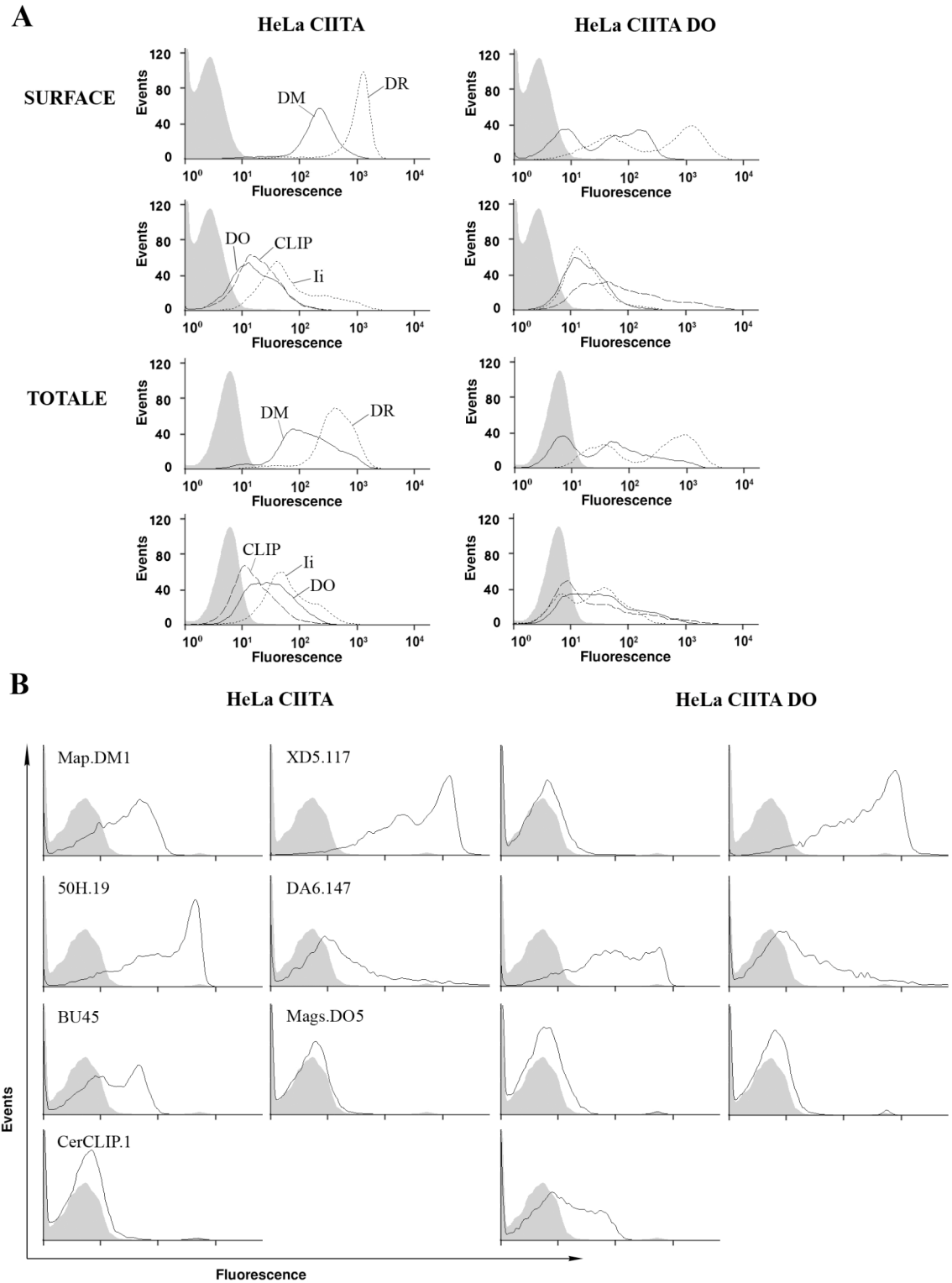


Figure 3-15. HLA-DO réduit l'accumulation de Ii dans les exosomes.

(A) Expression cellulaire de surface (haut) et totale (bas) de HLA-DM, HLA-DR, HLA-DO

Ii et CLIP dans les lignées cellulaires stables HeLa CIITA et HeLa CIITA DO. **(B)** Caractérisation d'exosomes provenant de HeLa CIITA et HeLa CIITA DO par cytométrie en flux. Les préparations d'exosomes sont couplées aux billes de latex puis incubées avec les anticorps MapDM1 (HLA-DM), 50H.19 (CD9), BU45 (Ii), CerCLIP.1 (CLIP), XD5.117 (HLA-DR), DA6.147 (HLA-DR) et Mags.DO5 (HLA-DODO). Un minimum de 10^4 billes est analysé par la cytométrie en flux.

Chapitre 4 Discussion

Les cellules T jouent un rôle essentiel pour la croissance de tumeurs et l'élimination de celles-ci. L'immunisation avec des antigènes ou des peptides tumoraux stimule la réponse des cellules T cytotoxiques. Par contre, les immunothérapies contre le cancer basées sur des peptides spécifiques aux molécules de classe I ne se sont pas avérées efficaces. Les cellules T CD4⁺ jouent un rôle central dans l'initiation et le maintien de la réponse immunitaire effectrice contre les cellules cancéreuses [137, 138]. Ainsi, des études récentes se sont penchées sur le développement de vaccins basés sur la réponse de cellules T aux antigènes associés aux tumeurs et spécifiques aux molécules de classe II [139, 140]. Les meilleurs candidats pour stimuler et maintenir cette réponse sont les CPA professionnelles chargées de peptides synthétiques. Les principaux inconvénients de cette approche sont la faible efficacité du chargement peptidique, la restriction des peptides au CMH et l'identification des antigènes associés aux tumeurs. Cette discussion abordera donc la possibilité d'augmenter le chargement peptidique en utilisant une forme mutante de HLA-DM (HLA-DMy) ciblée à la surface cellulaire des cellules présentatrices d'antigènes. L'activité de HLA-DMy sera aussi comparée à celle des molécules n-propanol dont on connaît déjà l'effet stimulateur sur le chargement peptidique [54].

Les exosomes représentent également un excellent outil pour le développement de vaccins basés sur des épitopes tumoraux [101]. Ces microvésicules sont relâchées par les MVB des cellules présentatrices d'antigènes et sont enrichies en molécules de classe II et en molécules de co-stimulation. Jusqu'à ce jour, il n'a pas été montré que HLA-DM est incorporé dans les exosomes. C'est dans cette optique que nous avons étudié le ciblage possible de HLA-DM aux exosomes.

Dans la présente étude, nous avons montré que HLA-DMy et le n-propanol ont un effet additif sur l'augmentation du chargement de peptides de haute affinité aux molécules de classe II et qu'ils haussent la stimulation des cellules T CD4⁺. L'augmentation du chargement peptidique par HLA-DMy peut s'appliquer à différents peptides et molécules HLA-DR. De plus, nous avons montré que HLA-DM et HLA-DMy sont tous les deux

incorporés aux exosomes sans être affectés par la présence de HLA-DR. Toutefois, l'entrée exosomale de HLA-DM est réduite par les molécules HLA-DO des cellules.

4.1 EFFET DE HLA-DM À LA SURFACE CELLULAIRE SUR LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE PAR LES MOLÉCULES DE CLASSE II

4.1.1 L'importance de HLA-DM dans la présentation antigénique

Chez les cellules présentatrices d'antigènes déficientes en HLA-DM, les molécules de classe II sont instables et majoritairement chargés du peptide CLIP [141]. HLA-DM joue un rôle critique dans la présentation d'antigènes entre autre en catalysant la relâche de CLIP des molécules de classe II et libérant ainsi la niche peptidique à d'autres peptides antigéniques [23]. L'équivalent de cette molécule HLA-DM a également été identifié chez la souris et est appelé H2-DM. Des cellules de souris négatives en H2-DM présentent aussi une diminution de la présentation antigénique par rapport à celles des souris de type sauvage [142]. Ceci démontre à nouveau le rôle de HLA-DM dans le chargement de peptides [24]. Selon la séquence des peptides, la présence de HLA-DM augmente leur vitesse de dissociation aux molécules HLA-DR [51]. Ceci est le cas du peptide CLIP, bien que sa vitesse de dissociation intrinsèque soit déjà rapide. Nos résultats ont confirmé ce rôle de HLA-DM puisque la présence de cette molécule a permis la relâche du CLIP et le chargement peptidique. De plus, nos analyses de la présentation antigénique par des essais fonctionnels ont montré qu'en absence de HLA-DM la réponse des cellules T est inférieure qu'en présence de HLA-DM (Figures 3-1 et 3-5).

Le rôle de HLA-DM a aussi été évalué chez les cellules dendritiques. Ces dernières sont des CPA professionnelles puisqu'elles sont les seules à induire la réponse immune primaire et puis de la réguler. Les DC immatures capturent efficacement les antigènes exogènes leur permettant de jouer une fonction essentielle de sentinelles. La majorité des molécules HLA-DM résident dans les compartiments MIIC [22] des DC immatures et environ 10-15 % de

la quantité totale de HLA-DM est à la surface cellulaire. Les molécules HLA-DM de surface forment des complexes avec HLA-DR et facilitent l'échange de peptides antigéniques aux molécules de classe II à la membrane plasmique [123].

Dans un milieu inflammatoire, les DC subissent un phénomène de maturation qui se traduit entre autres par une augmentation de l'acidification lysosomale et de l'activité des protéases. La maturation s'accompagne également d'une perte de HLA-DM à la surface cellulaire et d'une perte de sa capacité à internaliser des antigènes [123]. En fait, l'ensemble de la distribution des molécules HLA-DM est diminué [143] concordant avec la perte d'habileté des cellules à échanger les peptides antigéniques. Dans les DC matures, les molécules de classe II chargées en peptides s'accumulent à la membrane plasmique en grande quantité. Elles y demeurent de façon stable et prolongée permettant aux DC d'activer efficacement les lymphocytes T auxiliaires.

Ainsi, HLA-DM semble jouer un rôle chez les DC immatures dans un contexte d'inflammation où les peptides antigéniques sont générés de façon extracellulaire. Ainsi, ces antigènes peuvent être capturés du milieu extracellulaire par des molécules de classe II stabilisées par HLA-DM sous leur forme réceptive. Le processus de chargement peptidique extracellulaire facilité par les molécules HLA-DM de surface peut représenter un mécanisme permettant une meilleure efficacité de la réponse immunitaire [123]. Dans ce contexte, nous avons voulu forcer l'expression de HLA-DM à la surface des CPAs afin de favoriser le chargement de peptides tumoraux exogènes.

4.1.2 HLA-DM γ augmente la présentation antigénique

Le motif de type tyrosine dans la queue cytoplasmique de HLA-DM β est responsable de la localisation des molécules HLA-DM dans les compartiments lysosomaux et prévient son accumulation à la surface cellulaire. Le changement de la tyrosine 248 comprise dans le motif par une alanine (Y248A) produit une perte du signal d'internalisation des molécules HLA-DM et ces dernières s'accumulent à la membrane plasmique [19-21]. L'expression de HLA-DM γ dans la lignée cellulaire HEK 293T DR1 Ii réduit le nombre de CLIP associés aux molécules de classe II tout comme le fait HLA-DM (Figure 3-1). Ceci suggère que

HLA-DM γ est impliqué directement dans le chargement peptidique. Par contre, l'augmentation de l'expression de HLA-DM γ à la surface cellulaire permet une meilleure efficacité du chargement de peptides exogènes comparativement aux cellules HEK 293T DR1 Ii en présence de HLA-DM de type sauvage qui est retrouvé principalement dans les compartiments lysosomaux. Puisque HLA-DM γ ne libère pas davantage de CLIP des molécules de classe II, on peut se demander comment le chargement peptidique est augmenté.

On sait que l'activité de HLA-DM n'est pas seulement restreinte au relâchement de CLIP. HLA-DM possède une habileté générale d'édition du répertoire peptidique associé aux molécules de classe II [24, 51]. Ceci pourrait s'expliquer par un mécanisme dans lequel HLA-DM lierait préférentiellement des molécules de classe II sous une forme ressemblant à celle des molécules de classe II vides. Ainsi HLA-DM s'associerait à des molécules de classe II d'une conformation instable et capables de relâcher rapidement les peptides [144]. Étant donné que plus de la moitié des complexes CMH/peptides présents à la surface cellulaire des DC immatures sont instables et 7% sont vides [145, 146], ces dernières peuvent correspondre aux cibles de HLA-DM. De plus, à la surface des DC matures seulement 20% des molécules de classe II vides peuvent lier un peptide. Les autres 80% sont dans une forme non-stabilisée et non-réceptive aux peptides exogènes [145]. Il est donc possible que HLA-DM γ stabilise ce type de conformation de HLA-DR dans les cellules HEK 293T DR1 Ii, augmentant ainsi le chargement peptidique.

Les molécules HLA-DM de surface sont responsables de 30% à 80% de la capture de peptides exogènes [123]. Puisque HLA-DM γ s'accumule à la surface cellulaire, que le chargement de peptides extracellulaires est la voie la plus simple de l'échange peptidique et que la concentration de peptides dans le milieu est suffisante, l'importance de ce phénomène peut être amplifiée [146]. Dans ce contexte, il est donc important d'apporter une attention spéciale au milieu utilisé lors du chargement de peptides exogènes en présence de HLA-DM ou HLA-DM γ . En effet, notre étude a montré que l'augmentation de l'apport en peptides non-spécifiques diminuerait l'accessibilité des molécules de classe II aux peptides d'intérêt. Nous avons montré que la concentration du sérum de veau foetal dans le milieu d'incubation des cellules était critique et pouvait inhiber le chargement du peptide HA. Ceci

démontre que le chargement doit s'effectuer dans des conditions définies afin de minimiser les phénomènes de compétition.

L'augmentation de la présentation antigénique par HLA-DMy est suffisamment importante pour affecter la prolifération des cellules T spécifiques (Figure 3-1). En effet, on sait que seulement 100 à 300 molécules de classe II sont nécessaires pour activer les cellules T. Sachant qu'une seule molécule de HLA-DM est suffisante pour faciliter l'échange peptidique de plusieurs molécules de classe II [147], l'accumulation de HLA-DMy à la surface cellulaire permet d'augmenter le niveau d'échange peptidique. Les essais cellulaires basés sur l'activation des cellules T démontrent que les complexes HLA-DR/HA produits sont reconnus par les cellules T. Les molécules HLA-DMy sont donc pleinement fonctionnelles à la surface cellulaire. Ce système pourrait donc s'avérer utile dans un contexte thérapeutique.

Il a été établi que les DC peuvent charger les peptides antigéniques autant sur des molécules de classe II nouvellement synthétisées dans les MIIC que sur des molécules de classe II recyclées dans les endosomes précoces ou même à la surface cellulaire [148]. Mais il avait été assumé que les molécules HLA-DM seraient actives seulement dans les compartiments riches en HLA-DM (MIIC) à pH acide [148, 149]. Par contre, d'autres études ont démontré que HLA-DM est fonctionnelle à pH physiologique à la surface cellulaire [23] et qu'à pH neutre (6.5 - 7.5), HLA-DM conserverait environ 25-35 % de l'activité mesurée à pH 5.0 [123]. Nos résultats ont montré que HLA-DM et HLA-DMy augmentent le chargement peptidique à pH acide comparé à un pH physiologique. Par contre, la diminution de l'effet de HLA-DMy sur la réponse immune des cellules T ne dépasse pas 30%. Ainsi l'effet de HLA-DMy reste environ six fois plus élevé que celui de HLA-DM sur la présentation antigénique (Figure 3-5).

Arnt *et al.* ont fourni l'évidence que HLA-DM exprimée à la surface cellulaire joue aussi un rôle dans le contrôle de qualité du chargement peptidique [123]. En présence de HLA-DM exprimée à la surface cellulaire, un épitope de plus faible affinité comme le MPB₁₁₁₋₁₂₉ est

moins chargé sur les molécules de classe II HLA-DR4. Nos résultats sur le peptide HA portant sur la substitution **K** vers **L** en position 308 supportent ces travaux. Bien que l'accumulation de HLA-DMy à la surface cellulaire ait un effet positif sur la présentation antigénique, HLA-DMy n'augmente pas le chargement de peptide de faible affinité. Nos résultats ont démontré que seul le chargement du peptide de haute affinité pour DRB1*0101 était affecté par la présence de HLA-DMy (Figure 3-2). De plus, l'utilisation d'une autre combinaison de peptide et d'allèle de HLA-DR a permis de confirmer l'action catalytique générale de HLA-DMy. Nous avons utilisé le peptide gp-100 et la lignée cellulaire HEK 293T CIITA qui exprime HLA-DRB1*0107 (Figure 3-8). La présence de HLA-DMy à la surface cellulaire augmente le chargement peptidique de gp-100. Ces derniers résultats montrent la spécificité d'action et la fonction d'édition de peptides autres que CLIP de HLA-DMy à la surface cellulaire.

4.1.3 La chaîne invariante réduit le chargement peptidique en présence de HLA-DM

Il est important de vérifier le rôle de Ii dans le contexte de HLA-DMy, car on sait que les différents isoformes de Ii forment des complexes HLA-DR/peptides de stabilité variable [150]. Nous avons voulu savoir le rôle de Ii dans la présentation antigénique et nous avons testé deux isoformes. Nos résultats montrent que la présence de l'isoforme p35 de Ii est légèrement plus favorable au chargement peptidique que p33 (Figure 3-6 A). Le complexe nonamérique (HLA-DR)₃Ii₃ est exporté à travers l'appareil de Golgi et est ciblé dans la voie endocytaire. Les molécules de classe II humaines associées aux isoformes de Ii p35 et p43, lesquels comportent une extension de 16 aa dans la queue cytoplasmique, passent directement du réseau *trans*-golgien aux endosomes. La chaîne invariante est donc dégradée par l'effet des protéases lysosomales et endosomales avant de passer à la surface cellulaire. D'un autre côté, les isoformes de Ii plus courts p33 et p41 sont transportés à la surface cellulaire avant d'être internalisés [150]. Ces complexes à la surface cellulaire ne peuvent pas être chargés de peptides puisqu'on ne retrouve pas Ii sous des formes dégradées. Ceci empêche le chargement de peptides de ces molécules de classe II en présence de p33. C'est ce qui peut expliquer la différence d'efficacité de chargement

peptidique en présence de p35. Il reste toutefois que cette différence n'est pas très significative.

Nos résultats ont montré que la présence de Ii dans les cellules HEK 293T DR1 augmentait la présentation de peptides (Figure 3-6 B). Dû à sa fonction de chaperon moléculaire pour HLA-DR, Ii pourrait permettre une meilleure conformation de HLA-DR pour un plus grand nombre de HLA-DR par rapport aux cellules exprimant seulement HLA-DR. D'un autre côté, il est possible aussi que la stabilité des complexes HLA-DR/CLIP soit inférieure à celles des complexes HLA-DR/peptides formés en absence de Ii. Ainsi les peptides de forte affinité HA pourraient plus facilement être interchangeés avec CLIP sur les molécules de classe II.

Par contre, on a démontré l'activité de HLA-DM tout comme celle de HLA-DM α est plus efficace quand Ii est absente (Figure 3-6). Ce qui confirme que l'effet positif de HLA-DM α n'agit pas seulement sur les complexes CMH/CLIP ; HLA-DM α sont capables d'éditer des peptides autre que CLIP. La présentation antigénique diminuée en présence de Ii peut s'expliquer par le fait qu'il y a moins de molécules de classe II vides. Il a déjà été démontré que l'absence de p33 ou de p35 dans les splénocytes de souris permettait un meilleur chargement peptidique et qui serait causé par une augmentation de niches peptidiques vides des molécules de classe II [151]. Par contre, *in vivo* l'activité de H2-DM est essentiellement indépendante de la présence de Ii lors de l'apprêtement et de la présentation antigénique [142].

4.1.4 Effet variable de HLA-DO sur la présentation antigénique

L'activité de HLA-DM est régulée par une autre molécule de classe II non-classique appelée HLA-DO. L'effet de HLA-DO sur la présentation antigénique est variable et les raisons de ces différences ne sont pas claires. Nos résultats de chargement peptidique et de stimulation des cellules T avec des lignées cellulaires B lymphoblastoïdes .721 mutées nous ont permis de constater que la présence de HLA-DO dans les cellules .45 augmentait la présentation des peptides HA (Figure 3-3 D). Dans ces cellules, HLA-DO est concentré dans les endosomes. L'habileté de HLA-DO réside dans l'inhibition du relâchement de CLIP par HLA-DM accumulant les complexes HLA-DR/CLIP [32]. Ces complexes sont

plus instables et sont facilement déplacés par les peptides exogènes HA modifiant ainsi indirectement le répertoire peptidique présenté par les molécules de classe II des CPA humaines [119, 135]. Il a été proposé que H2-DO et HLA-DO présentent favorablement les antigènes internalisés par les immunoglobulines membranaires. Ainsi, H2-DM et HLA-DM seraient inhibés dans les compartiments riches en protéines internalisées. D'autre part, les cellules B de souris sauvage et H2-DO^{-/-} ne montrent pas de différence dans l'efficacité du chargement peptidique ou même dans la relâche de CLIP [152]. Ceci n'aidant pas à clarifier l'effet de HLA-DO sur les molécules HLA-DM.

Par contre, nous avons été surpris de constater les résultats obtenus avec les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO. D'une part, la présence de HLA-DO dans ces cellules permet une accumulation de CLIP à la surface cellulaire. Ayant davantage de complexes peu stables HLA-DR/CLIP à la surface cellulaire, on pensait obtenir un chargement peptidique plus élevé. Ce sont les cellules HeLa CIITA qui présentent le meilleur chargement de peptide HA. Contrairement aux lignées cellulaires B lymphoblastoïdes .721 mutées, les cellules HeLa CIITA DO présentent un haut niveau de molécules HLA-DM et HLA-DO à leur surface cellulaire. Ainsi, sans HLA-DO la grande quantité de HLA-DM à la membrane plasmique augmente le chargement peptidique. En présence de HLA-DO, ce dernier est retrouvé à la surface membranaire et aurait un effet négatif direct sur l'activité de HLA-DM réduisant alors le chargement peptidique.

Une étude avait déjà utilisé HLA-DO dans les DC de souris et avait aussi observé une augmentation de l'expression de surface de H2-Ab/CLIP alors que l'expression des complexes CMH/peptides diminuait [153]. Ce qui appuie l'idée que HLA-DO inhibe la fonction de HLA-DM. En présence de HLA-DO, il y a un ralentissement du nombre de molécules de classe II chargées par HLA-DM par minute. Ce qui indiquerait une longue et forte interaction entre les complexes HLA-DM/DO et les molécules de classe II inhibant de ce fait l'échange et le chargement peptidique. Le répertoire peptidique est donc édité par l'action de HLA-DO en diminuant la variété de peptides endogènes liés aux molécules de classe II [153]. Dans certains cas, les peptides sont chargés favorablement, mais ce n'est pas toujours le cas pour les peptides exogènes [35].

4.1.5 L'effet additif du n-propanol et de HLA-DMy sur la présentation antigénique

Il a été décrit que certaines petites molécules chimiques sont capables d'accélérer la réaction d'échange du peptide lié aux molécules de classe. Par leur groupe donneur d'hydrogène, ces petites molécules sont capables d'augmenter le chargement de peptides exogènes et d'induire une meilleure réponse des cellules T [54, 55]. Ces petites molécules chimiques ont la capacité de briser les ponts hydrogènes entre les peptides de faible affinité et HLA-DR. Nos résultats ont confirmé que le n-propanol augmentait de façon spécifique le chargement peptidique de HA dans le cas des cellules HEK 293T transfectées (Figure 3-1), des cellules B lymphoblastoïdes (Figure 3-3) et du peptide gp-100 avec les cellules HEK 293T CIITA DR7 (Figure 3-7). Par contre, la relâche de CLIP en présence de n-propanol n'a pas été augmentée ni sur les cellules 293T transfectées ni sur les cellules B. Ainsi, le mode d'action de ces molécules semble différent de celui de HLA-DM.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons vérifié si leur effet pouvait être additif. Nos résultats démontrent que le chargement est plus efficace en présence de HLA-DMy et du n-propanol suggérant que les deux catalyseurs ciblent chacun une population différente des molécules de classe II. L'activité de HLA-DM est dépendante du pH alors que ce n'est pas le cas pour le n-propanol [55]. Par contre, nos résultats ont montré que HLA-DM est plus active à pH acide tandis que le n-propanol a un effet plus important à pH physiologique. L'utilisation de HLA-DMy abolit cette différence majeure entre les deux molécules. Le grand nombre de molécules HLA-DMy à la surface cellulaire compense la perte d'activité causée par l'absence d'un pH optimal et permet aussi à HLA-DMy d'affecter le répertoire peptidique présenté à la surface cellulaire aux cellules T.

Ainsi, les petites molécules analogues de HLA-DM, comme le n-propanol, et HLA-DMy peuvent tous les deux jouer un rôle dans les développements de vaccins thérapeutiques en augmentant le chargement peptidique des CPA et favorisant les peptides de haute affinité.

Les petites molécules accélèrent le relâchement de peptides de faible affinité, génèrent des formes de HLA-DR réceptives aux peptides et permet l'échange des peptides [54]. Ainsi, elles augmentent la capacité intrinsèque du chargement de peptides aux molécules de classe II et stimulent hautement la réponse des cellules T [56]. Il existe beaucoup de molécules naturelles ou synthétiques déjà identifiées et il en existe sûrement d'autres non identifiées qui peuvent interagir avec la poche P1 beaucoup efficacement que celles déjà trouvées. La majeure différence entre les petites molécule et HLA-DMy est l'influence du pH sur leur activité catalytique. À pH physiologique, l'activité de HLA-DMy est diminuée et celle des petites molécules est augmentée. De plus, l'utilisation des molécules dans un contexte de vaccination serait beaucoup plus aisée que d'utiliser HLA-DMy. Il s'agirait de prendre les cellules DC du patient et de les charger du peptide d'intérêt en présence des petites molécules, puis de les ré-injecter chez le patient. Tandis que dans le cas de HLA-DMy, il faudrait contrôler tous les paramètres d'infection des cellules du patient par l'adénovirus HLA-DMy et charger les cellules des peptides d'intérêt et puis les ré-injecter chez le patient.

Les molécules HLA-DMy par contre sont beaucoup plus qualitatives dans leur mode d'action. Il a été démontré récemment qu'un peptide peut générer deux types de complexes HLA-DR/peptide (type A et B) dont chacun active des cellules T spécifiques [154]. Les cellules T de type B ne reconnaissent pas l'épitope provenant d'un antigène apprêté intracellulairement et chargé sous le contrôle de HLA-DM [154]. Ainsi, le chargement exogène de peptides dans le contexte de HLA-DMy à la surface cellulaire devrait produire un répertoire de cellules T plus efficace. Sachant cela, il serait préférable d'utiliser HLA-DMy, plutôt que des petites molécules, dans le processus de vaccination basé sur les lysats des cellules cancéreuses puisque certains peptides du soi peuvent induire une auto-immunité. Utiliser HLA-DMy sur les DC préviendrait la formation des conformères de type B auto-réactifs, ce qui n'est pas le cas des petites molécules qui augmentent de façon non sélective le chargement de peptides. Dans ce sens, il a été démontré que seulement les cellules T de type A pourraient combattre les tumeurs et que dans des conditions physiologiques les CPA présenteraient seulement les conformères de type A aux cellules T.

L'augmentation de la présentation antigénique ouvre de nouvelles voies pour l'activation des réponses immunitaires.

4.2 CIBLAGE EXOSOMAL DE HLA-DM

La présentation antigénique par les molécules de classe II comporte plusieurs étapes dont la dégradation endosomale de Ii et des antigènes, la régulation du pH et de la morphologie des endosomes tardifs et le transport intracellulaire des molécules impliquées. L'identification des molécules prenant part à ce processus pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes de réponses immunitaires par les molécules de classe II. Les principaux sites de chargements peptidiques sont les compartiments endosomaux tardifs riches en molécules de classe II mieux connus sous le nom de MIIC. Ces compartiments comprennent les lysosomes, les compartiments multilamellaires et les MVB. Ces derniers sont les principaux sites de ciblage et de réserves de protéines dans la voie endocytaire. On y retrouve des protéines reliées au CMH de classe II impliquées dans la présentation antigénique comme HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO et la chaîne invariante sous ses formes dégradées associées à HLA-DR. Les protéines retrouvées à la membrane limitante des MVB peuvent être incluses dans les vésicules internes. Ces microvésicules sont ensuite libérées dans le milieu extracellulaire suite à la fusion des MVB avec la membrane plasmique. Les échanges entre les membranes internes et limitantes des MVB sont continuels et le processus d'intégration de HLA-DM dans les exosomes reste à déterminer. Dans cette partie de la discussion, les hypothèses relatives à l'entrée des molécules HLA-DM dans les exosomes seront soulevées. Cet aspect est important dans le contexte où les exosomes sont utilisés en immunothérapie et peuvent être chargés avec les peptides exogènes [63].

4.2.1 Les molécules HLA-DM et HLA-DM α sont présentes dans les exosomes des cellules HeLa DM.5 et HeLa DM α

Il existe plusieurs signaux impliqués dans le ciblage de protéines dans la voie endocytaire. Jusqu'à maintenant aucun signal commun n'a été identifié pour le ciblage des protéines des

MVB vers les exosomes. On sait aussi que des motifs de type tyrosine, similaires à YXXØ, régulent le ciblage d'une variété de protéines vers différentes localisations cellulaires, comme par exemple l'internalisation du récepteur de la transferrine, la localisation de TGN38 au Golgi, le ciblage des récepteurs du mannose-6-phosphate et même HLA-DM dans les endosomes [21]. Ces protéines membranaires ciblées dans la voie endosomale peuvent emprunter deux principales directions. D'un côté, les protéines peuvent être directement dirigées aux endosomes à partir du réseau *trans*-golgien. D'un autre côté, les protéines peuvent émaner du réseau *trans*-golgien et rejoindre la membrane plasmique dans des vésicules tapissées de clathrine pour être ensuite rapidement internalisées dans les compartiments endosomaux. Puis, les protéines peuvent rester dans la voie endocytyque ou retourner à la membrane plasmique. Ce type de mécanisme est aussi utilisé par les protéines LAMPs. Elles accèdent aux compartiments lysosomaux par un signal de ciblage de type tyrosine qui agit en même temps comme signal d'internalisation [150].

Il a été démontré que HLA-DM est ciblé dans les compartiments endosomaux par le motif YTPL présent dans la queue cytoplasmique de la chaîne β de HLA-DM [19, 21]. Nos résultats ont montré que les molécules HLA-DM sont aussi incorporées dans les exosomes de cellules HeLa transfectées avec HLA-DM, sans autres molécules reliées au CMH. En analysant les exosomes provenant de cellules HeLa DMy, on n'a pas observé de différence entre les niveaux d'incorporation de HLA-DMy. Peu d'études ont pu déceler la présence de HLA-DM dans les exosomes de lignées cellulaires. H2-DM a été détecté dans les exosomes de DC de souris [87], mais jusqu'à ce jour il n'y a aucune détection de HLA-DM dans les autres types cellulaires [74]. Des études en microscopie électronique ont montré que les molécules HLA-DM étaient majoritairement localisées sur la membrane limitante des MVB et étaient pratiquement indétectables dans les vésicules internes des MVB et dans les exosomes de cellules B humaines [69]. Contrairement aux molécules de classe II matures, HLA-DM et Ii ne sont pas enrichis dans les exosomes. Par contre, il est important de noter que la distribution de HLA-DM dans les DC humaines est différente de celle de H2-DM dans les DC de souris. Dans ces dernières, H2-DM est enrichi sur les membranes limitantes des MVB alors que dans les DC humaines, HLA-DM est retrouvé autant sur la membrane

limitante que sur la membrane interne des MVB [143]. De plus, Van Lith *et al* estiment que dans les cellules B, on retrouve environ 50 molécules de HLA-DM par MVB, ainsi une petite partie des exosomes pourrait contenir ces molécules [71]. La différence entre cette étude et nos résultats peut s'expliquer par la différence du type cellulaire utilisé. Bien que la mutation du motif de type tyrosine n'affecte pas l'entrée exosomale de HLA-DM, nous avons montré que HLA-DM est introduit en grande quantité dans les exosomes de cellules HeLa par un mécanisme non élucidé. Ainsi, le motif YXXL est responsable de la localisation lysosomale de HLA-DM, mais n'affecte pas sa distribution au niveau des exosomes.

4.2.2 HLA-DM accède aux exosomes indépendamment de la présence de HLA-DR

Les exosomes sont composés d'une grande variété de protéines provenant des compartiments endocytiques, telles les molécules du CMH de classe I et II. Le mécanisme d'incorporation de HLA-DR aux exosomes n'est pas encore élucidé. On sait toutefois que les molécules de classe II néo-synthétisées vont à la surface cellulaire puis qu'un motif FL dans la queue cytoplasmique de HLA-DR β permet à HLA-DR d'accéder aux MIIC. Ce motif ressemble au motif de type di-leucine et agirait en signal d'endocytose et de ciblage aux endosomes [14]. Puisque les exosomes sont enrichis de HLA-DR et qu'il est connu que HLA-DM peut interagir avec HLA-DR [155], nous avons émis l'hypothèse que le contact de HLA-DR avec HLA-DM provoquait une incorporation accrue de celui-ci dans les exosomes. Cependant, la co-expression de HLA-DR et HLA-DM dans les cellules HeLa n'a pas eu pour effet d'augmenter la présence de HLA-DM sur les exosomes. Cela nous a permis toutefois de constater qu'il y a 2 fois plus de HLA-DR que de HLA-DM dans les cellules comparativement à 20 fois moins de HLA-DR que de HLA-DM dans les exosomes. moyenne, dans les CPA il y a 20 fois plus de HLA-DR que de HLA-DM [71], mais ce ratio change pour 5 fois plus de HLA-DR que de HLA-DM dans les compartiments MIIC [156]. Ainsi, l'entrée de HLA-DR dans les exosomes de cellules HeLa DM.5+DR n'entraîne pas une augmentation significative de molécules HLA-DM dans les exosomes

par rapport aux HeLa DM.5 (ratios HLA-DM/CD9: $0,39 \pm 0,3$ et $1,03 \pm 1,22$ respectivement). Par contre, nos résultats ne sont peut-être pas représentatifs de l'effet que peut avoir HLA-DR dans l'entrée exosomale étant donné un niveau de HLA-DR dans les cellules 10 fois plus faible que dans la majorité des CPA. Par contre, en utilisant des cellules HeLa transfectées avec le trans-activateur CIITA, on établit une grande expression de HLA-DR dans les cellules. Dans ces exosomes, on trouve 20 fois plus de HLA-DR que de HLA-DM, alors que les cellules ont près de 2 fois plus de HLA-DR que de HLA-DM. L'impact de la présence de HLA-DR sur l'entrée exosomale de HLA-DM est plus difficile à évaluer puisqu'il y a plus de 50 gènes activés par CIITA [157]. Par contre, si HLA-DR avait eu un effet direct sur HLA-DM, nous n'aurions pas obtenu une différence de 20 fois dans les exosomes. On sait aussi que HLA-DR provoque une accumulation des compartiments tardifs dans les cellules par l'entremise des queues cytoplasmiques [132]. En vérifiant l'effet indirect de HLA-DR sur la localisation de HLA-DM en utilisant une forme tronquée de HLA-DR (DRTMTM), on constate que même sans queue cytoplasmique et sans motif di-leucine DRTMTM parvient à aller à la surface membranaire, dans les vésicules de transport et dans les exosomes (Figure 3-11). Toutefois, il n'y a pas plus de HLA-DM dans les exosomes et l'on peut affirmer que HLA-DR n'influence pas directement ni indirectement l'entrée de HLA-DM dans les exosomes.

4.2.3 Les molécules HLA-DO réduisent l'entrée de HLA-DM et II aux exosomes

Certains types de cellules présentatrices d'antigènes ont un répertoire peptidique affecté par les molécules de classe II non-classiques HLA-DO [32]. Les molécules HLA-DO doivent être associées aux molécules HLA-DM pour sortir du réticulum endoplasmique et se loger aux MIIC. Les complexes HLA-DM/DO contiennent plusieurs signaux de ciblage. Premièrement, le motif de type tyrosine sur la queue cytoplasmique de HLA-DM β est suffisant pour diriger les complexes HLA-DM/DO dans la voie endocytique [34]. Deuxièmement, la queue cytoplasmique de la chaîne β de HLA-DO contient deux motifs de ciblage dont un motif de type di-leucine qui cible les complexes HLA-DM/DO dans les

MVB [34, 71]. Ce signal de HLA-DO β redistribue les molécules HLA-DM dans les MVB en diminuant sa présence dans les vésicules internes [34]. Nos résultats avec les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO ont montré que les molécules HLA-DO sont absentes des exosomes et qu'en leur présence, HLA-DM est retenu hors des exosomes. Ceci pourrait peut-être expliquer pourquoi le groupe d'Escola n'a pu détecter HLA-DM dans les exosomes, car ils ont travaillé avec des cellules B contenant HLA-DO [35]. Il serait donc intéressant éventuellement de comparer l'incorporation de HLA-DM dans les exosomes des lignées cellulaires B mutantes 721.45 (CMH^{+/-}) et 721.61 (HLA-DO^{-/-}). La redistribution des complexes HLA-DM/DO dans les MVB servirait à hausser les contacts avec les molécules HLA-DR augmentant ainsi l'efficacité d'échange des peptides des molécules de classe II [35]. Si tel est le cas, on devrait retrouver plus de complexes HLA-DR/CLIP à la membrane limitante et dans les membranes internes. Effectivement, on retrouve une accumulation des complexes HLA-DR/CLIP dans les exosomes des cellules HeLa CIITA DO. Puisque HLA-DO réduit l'entrée de HLA-DM dans les exosomes, la portion CLIP de Ii reste associée à la niche peptidique de HLA-DR puisque son relâchement doit être déclenché par HLA-DM.

Nous ne savons pas si les complexes HLA-DR/CLIP présents dans les exosomes proviennent des complexes HLA-DR/CLIP recyclés de la membrane plasmique et des endosomes ou alors de la dégradation des complexes HLA-DR/Ii dans les exosomes. La présence de deux motifs de type di-leucine dans le domaine cytoplasmique de Ii sont importants pour le ciblage des complexes nonamériques ($\alpha/\beta/Ii$)₃ aux MIIC [158]. Par contre, le mécanisme impliqué n'est pas clair. Il est probable que ces complexes atteignent les MIIC après être ciblés aux endosomes précoces ou tardifs ou même à la membrane plasmique. Une fois dans les compartiments acides, le domaine luminal de Ii est progressivement dégradé par différentes protéases. Une étude a montré que dans les cellules T2, des cellules déficientes en HLA-DM, et les lignées cellulaires lymphoblastoïdes, les molécules de classe II associées à Ii s'accumulent dans les MIIC [159]. Nos résultats ont montré que l'absence de HLA-DM causée par HLA-DO augmente le nombre de complexes HLA-DR/CLIP dans les exosomes. Toutefois, nous n'avons pas

déecté de forme de Ii intacte, c'est-à-dire sous forme de trimère, dans ces mêmes exosomes suggérant fortement que les complexes ne proviennent pas de la dégradation de HLA-DR/Ii dans les exosomes.

D'un autre côté, dans les cellules HeLa CIITA, nous avons décelé la présence de Ii intactes dans les exosomes. Nous n'avons pas déterminé si Ii était associée ou non à HLA-DR, ce qui pourrait être vérifié par une co-immunoprécipitation. Il a été proposé que HLA-DR/Ii était dirigé dans les compartiments ne contenant pas de HLA-DM pour dégrader d'abord Ii avant d'être ciblé vers les endosomes de chargement peptidique contenant HLA-DM [160]. De plus, l'efficacité du transport des nonamères ($\alpha/\beta/Ii$)₃ du réseau *trans*-golgien aux MIIC est dépendante du nombre de domaines cytoplasmiques de Ii intacts [14]. Sans cela, le nonamère parvient aux lysosomes en passant par la surface cellulaire [161]. Mais comment se fait-il que la dégradation de Ii soit affectée en présence de HLA-DO ? On sait que des inhibiteurs de protéases ont pour effet d'augmenter de 2 fois le nombre de MVB enrichis de Ii [162]. Peut-être que HLA-DO joue un rôle dans l'activité de protéases.

Il a aussi été démontré que Ii pouvait interagir avec HLA-DM et le dirigeait directement dans les compartiments contenant les molécules de classe II afin d'assurer un chargement peptidique efficace sur les molécules de classe II [19, 20, 163]. D'ailleurs, une lignée cellulaire exprimant le CMH de classe II et déficiente en HLA-DM, présentait une déficience de la protéolyse de Ii créant une accumulation des complexes HLA-DR/Ii dans des compartiments larges et acides autres que les MVB [159]. HLA-DM n'a pas besoin de Ii pour assurer sa présence dans les MIIC, mais ceci pourrait expliquer la présence de Ii seulement quand HLA-DM est présent dans les exosomes.

L'absence de Ii dans les splénocytes et les DC matures de souris corrèle avec une diminution de H2-DM [164]. Il est possible que Ii protège H2-DM de la dégradation par des protéases contribuant de ce fait à la régulation du chargement peptidique. Très peu d'informations sont disponibles à propos du mécanisme de protection de H2-DM par Ii et des enzymes impliquées.

Par une substitution du motif di-leucine dans la queue cytoplasmique de HLA-DO β (HLA-DO β_{LL-AA}) n'empêche pas HLA-DM de s'accumuler dans les vésicules [34]. À partir de ces résultats, on peut proposer que ce motif sert à transporter le complexe HLA-DM/DO dans des compartiments moins acides que les MIIC et ainsi présenter des peptides antigéniques qui ne sont pas dépendants de Ii [34]. Un autre rôle a déjà été proposé pour le motif di-leucine. Peut-être que HLA-DO ralentit la progression de HLA-DM à travers les endosomes précoces de la voie endocytique.

Il est possible que Ii n'atteigne pas les MIIC pas plus que HLA-DM par un mécanisme commun autre que par HLA-DO. Plusieurs protéines destinées aux exosomes comme HLA-DM, récepteur du mannose-6-phosphate, et LAMPs montrent une interaction avec la clathrine au niveau de l'appareil de Golgi et sont ensuite dirigés dans les lysosomes [165]. La clathrine est liée aux protéines cargo par des protéines adaptatrices comme AP-1 et AP-2. Il a été démontré *in vitro* que le domaine cytosolique de Ii interagit avec AP-1 et AP-2. Ainsi, peut-être que Ii et HLA-DM utilisent plutôt une voie commune de signalisation tel un processus dépendant de la clathrine.

Il serait intéressant de savoir si la présence de Ii et de HLA-DM dans les exosomes permet un meilleur chargement de peptides exogènes et de stimulation des cellules T CD4⁺.

Chapitre 5 Conclusions et perspectives

La présentation de peptides antigéniques par les molécules de classe II est une étape importante dans le processus de déclenchement d'une réponse immunitaire. En effet, c'est par ces molécules que les cellules présentatrices d'antigènes peuvent activer les cellules T. Ces dernières reconnaissent l'association de l'antigène avec des molécules du CMH de classe II puisqu'elles servent de présentoirs d'antigènes aux cellules T. Afin d'obtenir une meilleure efficacité de réponse, les molécules de classe II ont besoin de présenter des peptides d'une grande immunogénéicité et celle-ci est affecté grandement par la stabilité cinétique des complexes CMH/peptide. Le chaperon moléculaire HLA-DM est impliqué dans le choix des peptides présentés, en catalysant l'échange de peptide pour celui qui a une plus grande affinité pour les molécules de classe II.

Nos études sur l'utilisation d'une forme mutante de HLA-DM (HLA-DMy) ont montré une augmentation de l'expression de surface de HLA-DM. Nous avons démontré que HLA-DMy est capable d'augmenter le chargement peptidique de façon significative et par le fait même de développer une meilleure réponse des cellules T. De plus, HLA-DMy a démontré, tout comme le n-propanol, une activité catalytique, spécifique, et augmentée par rapport aux cellules exprimant ou non HLA-DM. De plus, leur activité semble additive. L'utilisation de systèmes différents de peptide et haplotype de HLA-DR ont montré que HLA-DMy catalyse l'échange peptidique pour un peptide de plus grande affinité. Les cellules B et les cellules HeLa CIITA et HeLa CIITA DO nous ont permis de confirmer la fonction de HLA-DO en tant qu'inhibiteur de HLA-DM en augmentant le nombre de complexes HLA-DR/CLIP. Par contre, son effet sur la présentation antigénique montre que l'activité modulatoire de HLA-DO sur HLA-DM dans les cellules HeLa n'est pas confinée seulement dans les MIIC, mais aussi à la surface cellulaire et dans la voie endocytaire.

D'autre part, notre étude du ciblage de HLA-DM nous a permis de démontrer que son motif tyrosine ne semble pas impliqué dans son transport aux exosomes. Nous avons déterminé

qu'il n'y a pas de différence des niveaux d'introduction aux exosomes des molécules HLA-DM sauvage et HLA-DM α . De plus, HLA-DM accède aux exosomes indépendamment de la présence de HLA-DR. Ceci montre que HLA-DR n'affecte pas ni directement ni indirectement l'entrée de HLA-DM aux exosomes. Par contre, les molécules HLA-DO empêchent HLA-DM d'accéder aux exosomes. Ces résultats soutiennent l'idée que HLA-DO agirait sur la présentation antigénique en retenant les complexes HLA-DM/DO dans des compartiments endosomaux précoces afin de présenter d'autres types de peptides que ceux normalement présentés en absence de HLA-DO.

L'utilisation de HLA-DM α , du n-propanol et des exosomes pourrait être bénéfiques en immunothérapie. En effet, des épitopes spécifiques pourraient être chargés sur les CPA soit en présence de HLA-DM α ou de n-propanol pour induire une réponse immune spécifique accrue des cellules T CD4 $^{+}$. Tandis que sur les exosomes, HLA-DM peut alors jouer son rôle d'édition de peptides sur les molécules de classe II pour ensuite activer les cellules T spécifiques.

L'identification de molécules impliquées dans ces différents processus pourrait nous aider à mieux comprendre les mécanismes de réponses immunitaires par les molécules de classe II. Ainsi, on serait plus en mesure de trouver une cible qui nous permettrait de moduler les réponses immunes dans un contexte thérapeutique.

En effet, des études ultérieures nous permettraient de déterminer la fonction des chaperonnes des molécules de classe II en plus d'approfondir leur rôle dans la présentation antigénique permettant ainsi de développer de nouvelles stratégies de vaccination dans la recherche contre le cancer. Nos résultats ont démontré que ni HLA-DR et ni le motif tyrosine de queue cytoplasmique de HLA-DM ne sont responsables de l'incorporation de HLA-DM aux exosomes. Ce mécanisme d'inclusion reste à élucider et son identité peut être multiple. Il peut s'agir d'un mécanisme basé sur une modification post-traductionnelle impliquant la machinerie ESCRT, d'un système d'ubiquitination ou même d'un mécanisme basé sur les radeaux lipidiques. Il serait intéressant par exemple de vérifier si la partie de la région

transmembranaire ou de la queue cytoplasmique de HLA-DM peut interagir directement avec une autre molécule de classe II ou un autre type de protéine. Plusieurs protéines sont envoyées aux compartiments multivésiculaires et introduites aux exosomes par un mécanisme ubiquitine-indépendant. Ceux-ci sont le résultat d'une ségrégation ou de l'action d'une protéine comme par exemple les tétraspanines. Il est donc nécessaire de faire une investigation pour expliquer l'entrée de HLA-DM aux exosomes, ce qui nous permettrait une meilleure compréhension des voies d'acheminement des protéines de la présentation antigénique aux exosomes et de leurs rôles immunologiques.

Un résultat inattendu dans ce mémoire a été l'importance de HLA-DO sur le ciblage exosomal de HLA-DM et sur le chargement peptidique. Il s'avère entre autre un candidat intéressant qui contrôlerait l'entrée de HLA-DM aux exosomes. Dans la littérature très peu de données sont disponibles sur la caractérisation de l'interaction entre HLA-DO et HLA-DM de même que sur le mécanisme d'action de HLA-DO sur HLA-DM. En répondant à ces questions, des travaux ultérieurs pourraient nous éclairer sur la réelle fonction de HLA-DO dans la présentation antigénique et de son rôle physiologique.

Un résultat important de ce mémoire est l'augmentation manifeste du chargement peptidique et de la réponse des cellules T CD4⁺ lorsque HLA-DM γ est introduit dans les lignées cellulaires exprimant les molécules de classe II. Les propriétés d'utilisation offertes par HLA-DM γ en font une application universelle dans le chargement de peptides exogènes. Il est donc important d'évaluer l'impact de HLA-DM γ dans un modèle plus physiologique. Au laboratoire, HLA-DM γ est introduit dans les cellules dendritiques humaines via un vecteur adénoviral. L'effet est identique que celui retrouvé dans les lignées cellulaires. Fait intéressant, en plus d'augmenter la réponse des cellules T CD4⁺, HLA-DM γ oriente la réponse des cellules T CD4⁺ auxiliaire (Th) vers une réponse Th1. Il est donc intéressant de poursuivre les expériences chez un modèle murin humanisé. Il serait intéressant par exemple d'évaluer le répertoire des cellules T suite à une injection de DC de moelle osseuse de souris DR1⁺ transduites par les adénovirus vides ou contenant HLA-DM γ pré-incubées avec des peptides. Il serait aussi très pertinent de vérifier l'activité anti-

tumorale de ces même DC de moelle osseuse transduites avec HLA-DMy que l'on injecte à des souris auxquelles nous avons préalablement établi des tumeurs. Toutes ces expériences peuvent nous aider à améliorer la compréhension de la formation des complexes de molécules de classe II avec les peptides et de leur impact sur le répertoire des cellules T. Cela permettra d'évaluer directement l'impact de HLA-DMy sur les vaccins basés sur les cellules dendritiques.

Bibliographie

1. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts.* N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.
2. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. Second of two parts.* N Engl J Med, 2000. **343**(11): p. 782-6.
3. Kumanovics, A., T. Takada, and K.F. Lindahl, *Genomic organization of the mammalian MHC.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 629-57.
4. van den Elsen, P.J., et al., *Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities.* Immunogenetics, 1998. **48**(3): p. 208-21.
5. Cresswell, P., *Assembly, transport, and function of MHC class II molecules.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 259-93.
6. Hudson, A.W. and H.L. Ploegh, *The cell biology of antigen presentation.* Exp Cell Res, 2002. **272**(1): p. 1-7.
7. Lamb, C.A. and P. Cresswell, *Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes.* J Immunol, 1992. **148**(11): p. 3478-82.
8. Rocha, N. and J. Neefjes, *MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation.* Embo J, 2008. **27**(1): p. 1-5.
9. Castellino, F., G. Zhong, and R.N. Germain, *Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture.* Hum Immunol, 1997. **54**(2): p. 159-69.
10. Alfonso, C. and L. Karlsson, *Nonclassical MHC class II molecules.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 113-42.
11. Watts, C., *Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.* Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 821-50.
12. Davidson, H.W., et al., *Processed antigen binds to newly synthesized MHC class II molecules in antigen-specific B lymphocytes.* Cell, 1991. **67**(1): p. 105-16.

13. Stumptner-Cuvelette, P. and P. Benaroch, *Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1542**(1-3): p. 1-13.
14. Cresswell, P., *Invariant chain structure and MHC class II function*. Cell, 1996. **84**(4): p. 505-7.
15. Riberdy, J.M., et al., *HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides*. Nature, 1992. **360**(6403): p. 474-7.
16. Denzin, L.K., et al., *Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 279-92.
17. van Lith, M. and A.M. Benham, *The DMalpha and DMbeta chain cooperate in the oxidation and folding of HLA-DM*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5430-9.
18. Mosyak, L., D.M. Zaller, and D.C. Wiley, *The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 377-83.
19. Marks, M.S., et al., *A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments*. J Cell Biol, 1995. **131**(2): p. 351-69.
20. Copier, J., et al., *Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB*. J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1017-27.
21. Potter, P.K., et al., *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**(12): p. 3936-44.
22. Sanderson, F., et al., *Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments*. Science, 1994. **266**(5190): p. 1566-9.
23. Denzin, L.K. and P. Cresswell, *HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading*. Cell, 1995. **82**(1): p. 155-65.
24. Sloan, V.S., et al., *Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 802-6.

25. Busch, R., et al., *Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 242-60.
26. Grotenbreg, G.M., et al., *Empty class II major histocompatibility complex created by peptide photolysis establishes the role of DM in peptide association*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21425-36.
27. Belmares, M.P., et al., *Formation of two peptide/MHC II isomers is catalyzed differentially by HLA-DM*. Biochemistry, 2003. **42**(3): p. 838-47.
28. Lovitch, S.B., Z. Pu, and E.R. Unanue, *Amino-terminal flanking residues determine the conformation of a peptide-class II MHC complex*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2958-68.
29. Brocke, P., et al., *HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 22-9.
30. Karlsson, L., *DM and DO shape the repertoire of peptide-MHC-class-II complexes*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(1): p. 65-70.
31. Karlsson, L., et al., *A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution*. Nature, 1991. **351**(6326): p. 485-8.
32. Denzin, L.K., et al., *Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing*. Science, 1997. **278**(5335): p. 106-9.
33. Deshaies, F., et al., *A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(18): p. 6443-8.
34. Brunet, A., et al., *Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 37062-71.
35. Kropshofer, H., et al., *A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules*. Embo J, 1998. **17**(11): p. 2971-81.
36. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
37. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.

38. Chow, A., et al., *Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane*. *Nature*, 2002. **418**(6901): p. 988-94.
39. Lennon-Dumenil, A.M., et al., *A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(1): p. 15-21.
40. Li, P., et al., *Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing*. *Immunol Rev*, 2005. **207**: p. 206-17.
41. Engelhard, V.H., *Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 181-207.
42. Unanue, E.R., *Perspective on antigen processing and presentation*. *Immunol Rev*, 2002. **185**: p. 86-102.
43. McFarland, B.J., et al., *Energetics and cooperativity of the hydrogen bonding and anchor interactions that bind peptides to MHC class II protein*. *J Mol Biol*, 2005. **350**(1): p. 170-83.
44. Stern, L.J., et al., *Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide*. *Nature*, 1994. **368**(6468): p. 215-21.
45. Ceman, S., et al., *Alteration of a single hydrogen bond between class II molecules and peptide results in rapid degradation of class II molecules after invariant chain removal*. *J Exp Med*, 1998. **188**(11): p. 2139-49.
46. Stratikos, E., D.C. Wiley, and L.J. Stern, *Enhanced catalytic action of HLA-DM on the exchange of peptides lacking backbone hydrogen bonds between their N-terminal region and the MHC class II alpha-chain*. *J Immunol*, 2004. **172**(2): p. 1109-17.
47. Busch, R., et al., *Accessory molecules for MHC class II peptide loading*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(1): p. 99-106.
48. Denzin, L.K., C. Hammond, and P. Cresswell, *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**(6): p. 2153-65.
49. Kropshofer, H., et al., *HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH*. *Immunity*, 1997. **6**(3): p. 293-302.

50. Narayan, K., et al., *HLA-DM targets the hydrogen bond between the histidine at position beta81 and peptide to dissociate HLA-DR-peptide complexes*. Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 92-100.
51. Weber, D.A., B.D. Evavold, and P.E. Jensen, *Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM*. Science, 1996. **274**(5287): p. 618-20.
52. Radrizzani, L., et al., *Identification of destabilizing residues in HLA class II-selected bacteriophage display libraries edited by HLA-DM*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 660-8.
53. Nicholson, M.J., et al., *Small molecules that enhance the catalytic efficiency of HLA-DM*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4208-20.
54. Falk, K., et al., *Ligand exchange of major histocompatibility complex class II proteins is triggered by H-bond donor groups of small molecules*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2709-15.
55. Marin-Esteban, V., K. Falk, and O. Rotzschke, *"Chemical analogues" of HLA-DM can induce a peptide-receptive state in HLA-DR molecules*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50684-90.
56. Hopner, S., et al., *Small organic compounds enhance antigen loading of class II major histocompatibility complex proteins by targeting the polymorphic P1 pocket*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38535-42.
57. Hennecke, J. and D.C. Wiley, *T cell receptor-MHC interactions up close*. Cell, 2001. **104**(1): p. 1-4.
58. Hennecke, J., A. Carfi, and D.C. Wiley, *Structure of a covalently stabilized complex of a human alphabeta T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1*. Embo J, 2000. **19**(21): p. 5611-24.
59. Hennecke, J. and D.C. Wiley, *Structure of a complex of the human alpha/beta T cell receptor (TCR) HA1.7, influenza hemagglutinin peptide, and major histocompatibility complex class II molecule, HLA-DR4 (DRA*0101 and DRB1*0401): insight into TCR cross-restriction and alloreactivity*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 571-81.

60. Lazarski, C.A., et al., *The kinetic stability of MHC class II:peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 29-40.
61. Lazarski, C.A., F.A. Chaves, and A.J. Sant, *The impact of DM on MHC class II-restricted antigen presentation can be altered by manipulation of MHC-peptide kinetic stability*. *J Exp Med*, 2006. **203**(5): p. 1319-28.
62. Banchereau, J. and A.K. Palucka, *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(4): p. 296-306.
63. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 715-27.
64. Rosenberg, S.A., J.C. Yang, and N.P. Restifo, *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines*. *Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 909-15.
65. Hao, S., et al., *Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8⁺ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes*. *Cell Mol Immunol*, 2006. **3**(3): p. 205-11.
66. They, C., et al., *Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(12): p. 1156-62.
67. Piper, R.C. and D.J. Katzmann, *Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007.
68. Murk, J.L., et al., *Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13332-7.
69. Escola, J.M., et al., *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**(32): p. 20121-7.
70. Zwart, W., et al., *Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape*. *Immunity*, 2005. **22**(2): p. 221-33.
71. van Lith, M., et al., *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**(2): p. 884-92.

72. Harding, C.V., *Intracellular organelles involved in antigen processing and the binding of peptides to class II MHC molecules*. Semin Immunol, 1995. **7**(6): p. 355-60.
73. Stern, L.J., I. Potolicchio, and L. Santambrogio, *MHC class II compartment subtypes: structure and function*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 64-9.
74. Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 569-79.
75. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
76. Thery, C., et al., *Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 599-610.
77. Thery, C., et al., *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7309-18.
78. Segura, E., S. Amigorena, and C. Thery, *Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 89-93.
79. Bard, M.P., et al., *Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 114-21.
80. Hammond, C., et al., *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**(7): p. 3282-91.
81. Laulagnier, K., et al., *Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 1): p. 161-71.
82. Chaput, N., et al., *Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(3): p. 471-8.
83. Gruenberg, J., *Lipids in endocytic membrane transport and sorting*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 382-8.

84. Wubbolts, R., et al., *Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation.* J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 10963-72.
85. Odorizzi, G., M. Babst, and S.D. Emr, *Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body.* Cell, 1998. **95**(6): p. 847-58.
86. Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr, *Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I.* Cell, 2001. **106**(2): p. 145-55.
87. Mignot, G., et al., *Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer.* J Cell Mol Med, 2006. **10**(2): p. 376-88.
88. Felder, S., et al., *Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body.* Cell, 1990. **61**(4): p. 623-34.
89. Reggiori, F. and H.R. Pelham, *Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting.* Embo J, 2001. **20**(18): p. 5176-86.
90. Vidal, M., P. Mangeat, and D. Hoekstra, *Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation.* J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 16)**: p. 1867-77.
91. Theos, A.C., et al., *A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis.* Dev Cell, 2006. **10**(3): p. 343-54.
92. Keller, S., et al., *Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function.* Immunol Lett, 2006. **107**(2): p. 102-8.
93. de Gassart, A., et al., *Lipid raft-associated protein sorting in exosomes.* Blood, 2003. **102**(13): p. 4336-44.
94. Matsuo, H., et al., *Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization.* Science, 2004. **303**(5657): p. 531-4.
95. Subra, C., et al., *Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies.* Biochimie, 2007. **89**(2): p. 205-12.
96. Jouve, M., et al., *HIV-1 buds and accumulates in "nonacidic" endosomes of macrophages.* Cell Host Microbe, 2007. **2**(2): p. 85-95.

97. Chen, B.J. and R.A. Lamb, *Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT?* Virology, 2008. **372**(2): p. 221-32.
98. Porto-Carreiro, I., et al., *Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation.* Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 143-8.
99. Muntasell, A., A.C. Berger, and P.A. Roche, *T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes.* Embo J, 2007. **26**(19): p. 4263-72.
100. Vincent-Schneider, H., et al., *Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells.* Int Immunol, 2002. **14**(7): p. 713-22.
101. Chaput, N., et al., *The potential of exosomes in immunotherapy of cancer.* Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 111-5.
102. Zitvogel, L., et al., *Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes.* Nat Med, 1998. **4**(5): p. 594-600.
103. Srivastava, P.K., et al., *Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world.* Immunity, 1998. **8**(6): p. 657-65.
104. Wolfers, J., et al., *Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming.* Nat Med, 2001. **7**(3): p. 297-303.
105. Faubert, A., A. Samaan, and J. Thibodeau, *Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM.* J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2750-5.
106. Finzi, A., et al., *Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments.* J Virol, 2006. **80**(19): p. 9789-97.
107. Khalil, H., et al., *The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal.* Int Immunol, 2003. **15**(10): p. 1249-63.
108. Robadey, C., et al., *The processing routes determined by negatively charged residues in DR1-restricted T cell determinants.* J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3238-46.
109. Radka, S.F., C.E. Machamer, and P. Cresswell, *Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and Western blotting.* Hum Immunol, 1984. **10**(3): p. 177-86.

110. Fu, X.T. and R.W. Karr, *HLA-DR alpha chain residues located on the outer loops are involved in nonpolymorphic and polymorphic antibody-binding epitopes*. Hum Immunol, 1994. **39**(4): p. 253-60.
111. Wraight, C.J., et al., *Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface*. J Biol Chem, 1990. **265**(10): p. 5787-92.
112. Denzin, L.K., et al., *Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells*. Immunity, 1994. **1**(7): p. 595-606.
113. Glazier, K.S., et al., *Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO*. J Exp Med, 2002. **195**(8): p. 1063-9.
114. Guy, K., et al., *Differential expression and serologically distinct subpopulations of human Ia antigens detected with monoclonal antibodies to Ia alpha and beta chains*. Eur J Immunol, 1982. **12**(11): p. 942-8.
115. Masellis-Smith, A. and A.R. Shaw, *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**(6): p. 2768-77.
116. Neefjes, J.J., et al., *The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route*. Cell, 1990. **61**(1): p. 171-83.
117. DeMars, R., et al., *Homozygous deletions that simultaneously eliminate expressions 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**(2): p. 77-97.
118. Wedderburn, L.R., et al., *Mapping T cell recognition: the identification of a T cell receptor residue critical to the specific interaction with an influenza hemagglutinin peptide*. Eur J Immunol, 1995. **25**(6): p. 1654-62.
119. Khalil, H., et al., *Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells*. Tissue Antigens, 2002. **60**(5): p. 372-82.

120. Azar, G.A., R.P. Sekaly, and J. Thibodeau, *A defective viral superantigen-presenting phenotype in HLA-DR transfectants is corrected by CIITA*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7548-57.
121. Clayton, A., et al., *Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry*. J Immunol Methods, 2001. **247**(1-2): p. 163-74.
122. Hammond, G.W., et al., *Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens*. J Clin Microbiol, 1981. **14**(2): p. 210-21.
123. Arndt, S.O., et al., *Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells*. Embo J, 2000. **19**(6): p. 1241-51.
124. Lightstone, L., et al., *In the absence of the invariant chain, HLA-DR molecules display a distinct array of peptides which is influenced by the presence or absence of HLA-DM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5772-7.
125. Newton-Nash, D.K. and D.D. Eckels, *Differential effect of polymorphism at HLA-DR1 beta-chain positions 85 and 86 on binding and recognition of DR1-restricted antigenic peptides*. J Immunol, 1993. **150**(5): p. 1813-21.
126. Ceman, S., et al., *Gene required for normal MHC class II expression and function is localized to approximately 45 kb of DNA in the class II region of the MHC*. J Immunol, 1994. **152**(6): p. 2865-73.
127. Yan, G., et al., *Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 620-7.
128. Lapointe, R., et al., *Retrovirally transduced human dendritic cells can generate T cells recognizing multiple MHC class I and class II epitopes from the melanoma antigen glycoprotein 100*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4758-64.
129. Lepage, S. and R. Lapointe, *Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2423-32.

130. Abache, T., et al., *The transferrin receptor and the tetraspanin web molecules CD9, CD81, and CD9P-1 are differentially sorted into exosomes after TPA treatment of K562 cells.* J Cell Biochem, 2007. **102**(3): p. 650-64.
131. Lamparski, H.G., et al., *Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells.* J Immunol Methods, 2002. **270**(2): p. 211-26.
132. Calafat, J., et al., *Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures.* J Cell Biol, 1994. **126**(4): p. 967-77.
133. Simonsen, A., et al., *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**(5): p. 2540-8.
134. Liljedahl, M., et al., *HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport.* Embo J, 1996. **15**(18): p. 4817-24.
135. Roucard, C., et al., *In vivo and in vitro modulation of HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation.* J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6849-58.
136. Amigorena, S., et al., *Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles.* J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1729-41.
137. Marzo, A.L., et al., *Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity.* J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6047-55.
138. Wang, R.F., *The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity.* Trends Immunol, 2001. **22**(5): p. 269-76.
139. Kobayashi, H., et al., *Defining MHC class II T helper epitopes for WT1 tumor antigen.* Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(7): p. 850-60.
140. Ohkuri, T., et al., *Identification of a novel NY-ESO-1 promiscuous helper epitope presented by multiple MHC class II molecules found frequently in the Japanese population.* Cancer Sci, 2007. **98**(7): p. 1092-8.
141. Morris, P., et al., *An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules.* Nature, 1994. **368**(6471): p. 551-4.

142. Tourne, S., et al., *Functionality of major histocompatibility complex class II molecules in mice doubly deficient for invariant chain and H-2M complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9255-60.
143. Barois, N., et al., *MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation*. Traffic, 2002. **3**(12): p. 894-905.
144. Natarajan, S.K., M. Assadi, and S. Sadegh-Nasseri, *Stable peptide binding to MHC class II molecule is rapid and is determined by a receptive conformation shaped by prior association with low affinity peptides*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 4030-6.
145. Potolicchio, I., et al., *Conformational variation of surface class II MHC proteins during myeloid dendritic cell differentiation accompanies structural changes in lysosomal MIIC*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 4935-47.
146. Santambrogio, L., et al., *Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15056-61.
147. Vogt, A.B., et al., *Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9724-9.
148. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 782-7.
149. Pinet, V., et al., *Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules*. Nature, 1995. **375**(6532): p. 603-6.
150. Warmerdam, P.A., E.O. Long, and P.A. Roche, *Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments*. J Cell Biol, 1996. **133**(2): p. 281-91.
151. Bikoff, E.K., et al., *Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1699-712.
152. Douek, D.C. and D.M. Altmann, *HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression*. Int Immunol, 1997. **9**(3): p. 355-64.
153. Fallas, J.L., et al., *Ectopic expression of HLA-DO in mouse dendritic cells diminishes MHC class II antigen presentation*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1549-60.

154. Lovitch, S.B. and E.R. Unanue, *Conformational isomers of a peptide-class II major histocompatibility complex*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 293-313.
155. Doebele, R.C., et al., *Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 517-27.
156. Schafer, P.H., et al., *HLA-DM is present in one-fifth the amount of HLA-DR in the class II peptide-loading compartment where it associates with leupeptin-induced peptide (LIP)-HLA-DR complexes*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5487-95.
157. Steimle, V., et al., *Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA*. Science, 1994. **265**(5168): p. 106-9.
158. Odorizzi, C.G., et al., *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**(2): p. 317-30.
159. Riberdy, J.M., et al., *Transport and intracellular distribution of MHC class II molecules and associated invariant chain in normal and antigen-processing mutant cell lines*. J Cell Biol, 1994. **125**(6): p. 1225-37.
160. Ferrari, G., et al., *Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules*. J Cell Biol, 1997. **139**(6): p. 1433-46.
161. Arneson, L.S. and J. Miller, *Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence*. J Cell Biol, 1995. **129**(5): p. 1217-28.
162. Zachgo, S., B. Dobberstein, and G. Griffiths, *A block in degradation of MHC class II-associated invariant chain correlates with a reduction in transport from endosome carrier vesicles to the prelysosome compartment*. J Cell Sci, 1992. **103** (Pt 3): p. 811-22.
163. Lindstedt, R., et al., *The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif*. Immunity, 1995. **3**(5): p. 561-72.
164. Pierre, P., et al., *Invariant chain controls H2-M proteolysis in mouse splenocytes and dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **191**(6): p. 1057-62.

165. Bonifacino, J.S. and E.C. Dell'Angelica, *Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals*. J Cell Biol, 1999. **145**(5): p. 923-6.