

Université de Montréal

Étude des voies d'apprêtement des antigènes viraux menant à la présentation
antigénique par les CMH de classe I

par

Luc English

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en pathologie et biologie cellulaire

Juin 2009

© Luc English, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude des voies d'apprêtement des antigènes viraux menant à la présentation
antigénique par les CMH de classe I

présentée par :

Luc English

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jaques Thibodeau
président-rapporteur

Dr Michel Desjardins
directeur de recherche

Dr Guy Lemay
membre du jury

Dre Christine Lavoie
examineur externe

Dre Nicole Leclerc
représentante du doyen

Résumé

Le contrôle immunitaire des infections virales est effectué, en grande partie, par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Pour y parvenir, les lymphocytes T CD8⁺ doivent être en mesure de reconnaître les cellules infectées et de les éliminer. Cette reconnaissance des cellules infectées s'effectue par l'interaction du récepteur T (TCR) des lymphocytes T CD8⁺ et des peptides viraux associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface des cellules hôtes. Cette interaction constitue l'élément déclencheur permettant l'élimination de la cellule infectée. On comprend donc toute l'importance des mécanismes cellulaires menant à la génération des peptides antigéniques à partir des protéines virales produites au cours d'une infection.

La vision traditionnelle de cet apprêtement protéique menant à la présentation d'antigènes par les molécules du CMH propose deux voies cataboliques distinctes. En effet, il est largement admis que les antigènes endogènes sont apprêtés par la voie dite "classique" de présentation antigénique par les CMH de classe I. Cette voie implique la dégradation des antigènes intracellulaires par le protéasome dans le cytoplasme, le transport des peptides résultant de cette dégradation à l'intérieur du réticulum endoplasmique, leur chargement sur les molécules du CMH de classe I et finalement le transport des complexes peptide-CMH à la surface de la cellule où ils pourront activer les lymphocytes T CD8⁺. Dans la seconde voie impliquant des antigènes exogènes, le dogme veut que ceux-ci soient apprêtés par les protéases du compartiment endovacuolaire. Les peptides ainsi générés sont directement chargés sur les molécules de CMH de classe II à l'intérieur de ce compartiment. Par la suite, des mécanismes de recyclage vésiculaire assurent le transport des complexes peptide-CMH de classe II à la surface de la cellule afin de stimuler les lymphocytes T CD4⁺. Cependant, cette stricte ségrégation des voies d'apprêtement antigénique a été durement éprouvée par la capacité des cellules présentatrices d'antigènes à effectuer l'apprêtement d'antigènes exogènes et permettre leur présentation sur des molécules de CMH de classe I. De plus,

l'identification récente de peptides d'origine intracellulaire associés à des molécules de CMH de classe II a clairement indiqué la présence d'interactions entre les deux voies d'apprêtement antigénique permettant de transgresser le dogme préalablement établi.

L'objectif du travail présenté ici était de caractériser les voies d'apprêtement antigénique menant à la présentation d'antigènes viraux par les molécules du CMH de classe I lors d'une infection par le virus de l'*Herpès simplex* de type I (HSV-1). Dans les résultats rapportés ici, nous décrivons une nouvelle voie d'apprêtement antigénique résultant de la formation d'autophagosomes dans les cellules infectées. Cette nouvelle voie permet le transfert d'antigènes viraux vers un compartiment vacuolaire dégradatif dans la phase tardive de l'infection par le virus HSV-1. Cette mise en branle d'une seconde voie d'apprêtement antigénique permet d'augmenter le niveau de présentation de la glycoprotéine B (gB) virale utilisée comme modèle dans cette étude. De plus, nos résultats décrivent la formation d'une nouvelle forme d'autophagosomes dérivés de l'enveloppe nucléaire en réponse à l'infection par le virus HSV-1. Ces nouveaux autophagosomes permettent le transfert d'antigènes viraux vers un compartiment vacuolaire lytique, action également assurée par les autophagosomes dits classiques. Dans la deuxième partie du travail présenté ici, nous utilisons l'infection par le virus HSV-1 et la production de la gB qui en résulte pour étudier le trafic membranaire permettant le transfert de la gB vers un compartiment vacuolaire dégradatif. Nos résultats mettent en valeur l'importance du réticulum endoplasmique, et des compartiments autophagiques qui en dérivent, dans ces mécanismes de transfert antigénique permettant d'amplifier la présentation antigénique de la protéine virale gB sur des CMH de classe I via une voie vacuolaire. L'ensemble de nos résultats démontrent également une étroite collaboration entre la voie classique de présentation antigénique par les CMH de classe I et la voie vacuolaire soulignant, encore une fois, la présence d'interaction entre les deux voies.

Mots-clés : Autophagie, présentation antigénique, phagosomes, virus, apprêtement antigénique, herpès, lymphocyte T CD8⁺, CMH, macrophage, réticulum endoplasmique.

Abstract

Immune control of viral infections is mainly carried out by cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes. To achieve this, CD8⁺ T lymphocytes must be able to recognize infected cells and eliminate them. This recognition of infected cells occurs by the interaction of the T cell receptor (TCR) of CD8⁺ T lymphocytes and viral peptides associated with major histocompatibility complex (MHC) class I on the surface of host cells. This interaction is the key element triggering the elimination of infected cells. This emphasizes the major role of cellular mechanisms leading to the generation of antigenic peptides from viral proteins.

The traditional view of antigen presentation by MHC molecules proposes two segregated pathways. Indeed, it is widely accepted that endogenous antigens are processed by the "classical" MHC class I presentation pathway. This pathway involves the degradation of intracellular antigens by the proteasome complex in the cytoplasm of the cell, the resulting peptides are then translocated in the endoplasmic reticulum where they are loaded on MHC class I molecules, and finally peptide-MHC complex are exported at the cell surface to activate CD8⁺ T lymphocytes. In contrast, exogenous antigens internalized by endocytosis or phagocytosis are processed by hydrolases in the lytic endovacuolar compartment and the resulting peptides are loaded on MHC class II molecules. Thereafter, vesicle recycling mechanisms transport the peptide-MHC class II complex on the cell surface where they can stimulate CD4⁺ T lymphocytes.

However, the strict segregation of these two pathways has been revisited to account for the ability of antigen presenting cells to present exogenous antigens on MHC class I molecules by a process called cross-presentation. Moreover, the recent finding that intracellular peptides might also be presented by MHC class II molecules clearly emphasized the presence of interactions between these two antigen processing pathways that transgress the previously established dogma.

The objective of the work presented here was to characterize the antigen processing pathways leading to antigen MHC class I presentation during herpes simplex type I (HSV-1) infection. In the results reported here, we describe a new antigen processing pathway resulting from the formation of autophagosomes in HSV-1 infected cells. This new pathway allows the transfer of viral antigens in a lytic vacuolar compartment during the late phase of infection. The development and activation of this second pathway of antigen processing leads to an increased MHC class I presentation of the viral glycoprotein B (gB) used as a model in this study. Moreover, our results describe the establishment of a new form of autophagosomes derived from the nuclear envelope in response to HSV-1 infection. This new form of autophagosomes also contributes to viral antigen transfer to lytic vacuolar compartment in parallel to the action of classical autophagy. Our results also show a close collaboration between the classical MHC class I presentation pathway and vacuolar pathway induced by the formation of autophagosomes, still reinforcing the idea that these two pathways interact together to ensure optimal antigens processing during viral infection. In the second part of the work presented here, we use HSV-1 infection and the resulting viral glycoprotein B to study membrane trafficking allowing the transfer of gB to degradative vacuolar compartments. Our results highlight the role of the endoplasmic reticulum in antigen transfer mechanisms that induce an amplified MHC class I presentation of the viral glycoprotein B.

Keywords: autophagy, antigen presentation, herpes, virus, CD8⁺ T lymphocyte, MHC, antigen processing, macrophage, endoplasmic reticulum, phagosome

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>v</i>
<i>Table des matières</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xi</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>xiii</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xvi</i>
CHAPITRE I : Introduction	17
1. L'immunologie	18
1.1 Historique	18
2. Le système immunitaire	20
2.1 L'immunité innée	20
2.2 L'immunité acquise	21
2.2.1 Les cellules de la réponse à médiation cellulaire.....	21
3. La dégradation des protéines	25
3.1 Le protéasome	26
3.2 Ubiquitinylation des protéines	29
3.3 L'autophagie	30
3.3.1 Biogenèse des autophagosomes	32
3.3.2 Autophagie et immunité innée	36
3.3.3 Autophagie et pathogènes intracellulaires	37
3.3.4 Autophagie et signalisation cellulaire	40
3.4 La phagocytose	41
3.4.1 Biogenèse et maturation des phagosomes	42
3.4.2 L'origine de la membrane phagosomale.....	43
4. La présentation antigénique	43
4.1 La présentation antigénique par les CMH de classe I	44
4.1.1 Structure des CMH de classe I.....	45
4.1.2 L'apprêtement de peptides antigéniques.....	45
4.1.3 Le répertoire peptidique	48
4.3 La présentation d'antigènes par les CMH de classe II	49
4.3.1 Structure des CMH de classe II	50
4.3.2 Apprêtement et présentation des antigènes par les CMH de classe II	50
4.4 Voies alternatives menant à la présentation antigénique	53

4.4.1 La présentation croisée d'antigènes exogènes	53
4.5 Autophagie et immunité acquise	58
4.5.1 Autophagie et présentation par les CMH de classe I	60
4.6 Autres voies alternatives de présentation antigénique	63
5. Caractéristiques du virus Herpès simplex de type I.....	64
5.1 Morphologie du virus HSV-1.....	65
5.2 Les glycoprotéines virales	65
5.3 Cycle de l'infection par HSV-1.....	66
5.4. Latence et persistance du virus HSV-1.....	67
5.5 Contrôle de l'infection virale	68
6. Introduction au projet et objectifs du travail.....	69
6.1 But et méthodologie	71
Chapitre II: Résultats	73
7. Article I.....	74
<i>Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection.....</i>	74
<i>Résumé</i>	75
7.1 Abstract	77
7.2 Introduction	78
7.3 Results.....	80
7.3.1 Two phases of MHC class I presentation	80
7.3.2 Late-stage autophagy involving the nuclear envelope.....	82
7.3.3 Cytokines engage classical and vacuolar responses	85
7.4 Discussion	87
7.5 Methods	91
7.5.1 Cells, viruses, antibodies and reagents.	91
7.5.2 Heat shock, cytokine treatment and infection.....	92
7.5.3 CD8 ⁺ T cell hybridoma assay.	92
7.5.4 Immunofluorescence and dansylcadaverin labeling.	93
7.5.5 Electron microscopy	93
7.5.6 Analysis with siRNA.	94
7.6 Acknowledgments.....	95
7.7 Author Contributions.....	96
7.8 References.....	97

7.9 Figure legend.....	101
8. Article II.....	119
<i>Trafficking of endogenous viral antigens from endoplasmic reticulum-derived compartments to phagosomes contributes to MHC class I presentation.....</i>	<i>119</i>
<i>Résumé.....</i>	<i>120</i>
8.1 Abstract	122
8.2 Introduction	123
8.3 Results and discussion	125
8.4 Materials and methods.....	131
8.4.1 Cells, virus and reagents	131
8.4.2 Heat shock treatment, infection and phagosome formation.....	131
8.4.3 CD8 ⁺ T cell hybridoma assay	132
8.4.4 Immunofluorescence and flow cytometry	132
8.4.5 Electron microscopy	132
8.5 Acknowledgments.....	133
8.6 Author Contributions.....	133
8.7 Reference list.....	134
8.8 Figure legends	138
<i>CHAPITRE III : Discussion.....</i>	<i>148</i>
9. Discussion	149
9.1 L'autophagie, un processus ubiquitaire	149
9.2 L'autophagie et la phagocytose, deux mécanismes ayant beaucoup en commun.....	151
9.3 L'autophagie, une aide essentielle à la voie classique de présentation des CMH de classe I.....	154
9.4 Rôle prépondérant du réticulum endoplasmique dans la contribution vacuolaire menant à la présentation antigénique.....	157
9.5 Stimulation de l'apprêtement vacuolaire favorisant la présentation antigénique	162
10. Conclusion	166
11. Perspectives futures	167
12. Bibliographie.....	169

ANNEXE I.....	clxxxvi
The Phagosomal Proteome in Interferon-γ-Activated Macrophages	clxxxvii
ANNEXE II	ccxxxiii
Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection	ccxxxiv
ANNEXE III.....	ccxlv
Contribution de l'autophagie dans l'apprêtement d'antigènes viraux endogènes menant à la présentation antigénique par les CMH de classe I	ccxlv

Liste des figures

Chapitre I, Introduction

Figure 1. Représentation schématique du complexe du protéasome.	26
Figure 2: Formation de l'immunoprotéasome.	28
Figure 3. Rôle des PI3K de classe I et de classe III dans l'initiation de l'autophagie....	33
Figure 4 : Différentes protéines de la famille Atg sont recrutées sur la membrane pré-autophagosomale et participent à la formation de l'autophagosome.....	35
Figure 5. Mécanisme d'évasion immunitaire employé par HSV-1 pour contrer l'autophagie.	39
Figure 6: Organisation du complexe de chargement peptidique du CMH de classe I ...	48
Figure 7. Voies "classiques" d'apprêtement des antigènes menant à la présentation antigénique par les molécules du CMH.....	52
Figure 8. Étapes de maturation menant à la production de virus HSV-1 infectieux.	67

Chapitre II, Résultats

Article I

Figure 1 : A vacuolar pathway participates in the processing of endogenous viral proteins for presentation on MHC class I molecules.....	110
Figure 2 : Autophagy induced during HSV-1 infection contributes to the processing and presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules.	111
Figure 3 : Both gB and LC3 accumulate in perinuclear regions during HSV-1 infection.	112
Figure 4 : HSV-1 induces the formation of autophagosome-like structures from the nuclear envelopes of infected macrophages.	113
Figure 5 : The four-layered membrane structures that emerge from the nuclear envelope have autophagosome-like features.....	114
Figure 6 : Involvement of lytic vacuolar compartments in the processing and presentation of endogenous antigens on MHC class I molecules after treatment with proinflammatory cytokines.	115
Supplementary Figure 1. Increase in autophagosomes formation during the late phase of infection.....	116
Supplementary Figure 2. Atg5-dependent contribution of autophagy in MHC class I presentation.	117
Supplementary Figure 3. Participation of autophagy in the vacuolar processing of endogenous viral proteins.....	118

Article II

Figure 1. HSV-1 egress in BMA3.1 macrophages.	143
Figure 2. Trafficking events during HSV-1 infection allow the transfer of viral antigen, including the glycoprotein B, to phagosomes.....	144
Figure 3. Inducible participation of the vacuolar pathway in the processing and presentation of endogenous and exogenous viral peptides on MHC class I molecules.	145
Figure 4. Autophagy contributes in viral antigen transfer to phagosome organelles and improves MHC class I presentation of gB antigen by the phagosomal compartment..	146
Figure 5. Phagosomal compartment process viral antigen for MHC class I presentation and its formation is inhibited by HSV-1 infection.....	147

Liste des abréviations

3-MA	3-méthyladénine
ADN	Acide deoxyribonucleic
AMBRA	Activating molecules in Beclin-1 regulated autophagy
APC	Antigen-presenting cell
ARN	Acide ribonucléique
Atg	Autophagy-related gene
BCL2	B-cell lymphoma 2
CD8	Cluster of differentiation 8
CLIP	Class II invariant chain-associated peptide
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
Ctl	Contrôle
DC	Dendritic cell
D.O.	Densité optique
EBNA-1	Epstein-Barr virus nuclear antigen 1
EIF2a	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
ERAAP	Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing
ERp57	Endoplasmic reticulum protein 57
gB	Glycoprotéine B
GFP	Green fluorescent protein
HLA	Human leukocyte antigen
Hsc	Heat shock cognate
Hsp	Heat shock protein
HSV-1	Herpes simplex virus type 1
ICP34.5	Infected cell product 34.5
IL-1	Interleukine-1
INF	Infection

INF- γ	Interféron-gamma
KDa	Kilodalton
LAMP-2	Lysosome-associated membrane protein type-2A
LAT:	Latency Associated Transcript
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LMP-2	Latent membrane protein 2
LPS	Lipopolysaccharides
min	Minutes
MP1	Matrix protein 1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NKT	Natural Killer T cells
nm	Nanometer
PA28	Proteasome activator 28
PBS	Phosphate buffer saline
PDI	Protein disulfide isomerase
PERK	Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKR	Double-stranded RNA-activated protein kinase
PMN	Piecemeal microautophagy of the nucleus
PRR	Pattern recognition receptor
RE	Réticulum endoplasmique
S	Svedberg
SKD1	Suppressor of K ⁺ transport growth defect1
SQSTM1	Sequestosome 1
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	T cell receptor
Th1	Type 1 helper T cell
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factors

TOR	Target of rapamycin
TPPII	Tripeptidyl-peptidase II
t-SNARE	Target- "SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptors"
US11	Unique sequences short 11
UVRAG:	Ultra-violet radiation resistance associated gene
VPS-34	Vacuolar protein sorting 34
v-SNARE	Vesicle- "SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptors"

Remerciements

Je remercie profondément le Dr Michel Desjardins de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance tout au long de ces années. Je tiens également à remercier toute l'équipe de recherche du Dr Desjardins pour la merveilleuse ambiance de travail qu'ils m'ont fournie durant mes études. Un merci tout particulier à Christiane Rondeau, Annie Laplante, Magali Chemali, Diane Gingras, Johanne Duron et Roger Lippé pour leur aide et leur soutien dans mon projet. Un merci également à tous les autres membres du laboratoire: Jonathan Boulais, Guillaume Goyette, François-Xavier Campbell-Valois, Mathieu Houde, Isabelle Jutras, Sylvain Brunet, Pascale Gueirard et Matthias Trost. Un merci particulier à Sophie Duclos pour son aide avec la rédaction de cette thèse.

Je ne dirai jamais assez à quel point je dois remercier ma copine Marie-Claude Lacourse pour son soutien indéfectible tout au long de mes études graduées. Ceci est également vrai pour les membres de ma famille. Merci à tous.

CHAPITRE I :

Introduction

1. L'immunologie

1.1 Historique

Les premières observations de nature immunologique remontent à plus de 400 ans avant Jésus-Christ. Pendant l'épidémie qui sévit durant la guerre du Péloponnèse, l'historien grec Thucydides observa que les personnes ayant survécu à l'infection étaient aptes à s'occuper des malades. En Chine, plus de 100 ans avant Jésus-Christ on pratiquait déjà la "variolisation". Cette technique consistait à prélever du pus sur une personne atteinte d'une forme plus ou moins virulente de la maladie et à l'inoculer chez un individu sain. Bien qu'efficace, la variolisation conduisait parfois à la mort des sujets et les personnes infectées représentaient un risque de contagion. L'origine de l'immunologie moderne est attribuée à Edward Jenner qui, en 1796, réalisa la première "vaccination" en utilisant le virus de la variole bovine, qui est inoffensif chez l'humain, afin de conférer une protection immunitaire contre la forme humaine du virus de la variole. Contrairement à la variolisation, il n'y avait pas de risque de mortalité, les personnes vaccinées ne présentaient pas ou peu de signes cliniques et celles-ci ne représentaient aucun risque de contagion. Malheureusement, les mécanismes sous-jacents menant à cette résistance immunitaire étaient encore inconnus à cette époque. Il faudra attendre près d'un siècle pour que Robert Koch établisse pour la première fois un lien direct entre les maladies infectieuses et les microorganismes pathogènes, chaque maladie étant causée par un microorganisme distinct. Par la suite, l'immunologie connaîtra plusieurs avancées importantes dont la réalisation d'un vaccin contre le choléra et la rage par Louis Pasteur en 1885. Une autre percée importante fut la découverte d'une antitoxine diphtérique dans le sérum de patients ayant été atteints de diphtérie par Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato en 1890. C'est le travail de Jules Bordet, en compagnie de Behring, qui donnera naissance aux bases de l'immunologie humorale. Durant la même période, les travaux de Ilya Ilyich

Metchnikov en 1884 sur la phagocytose vont donner naissance aux bases de l'immunologie cellulaire¹.

L'importance relative de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire dans la protection contre les pathogènes et les autres substances étrangères fut ardemment discutée entre Paul Ehrlich et Metchnikov. Malheureusement pour Metchnikov, la compréhension des bases biochimiques de la spécificité de la liaison antigène-anticorps gagna en ampleur dans les années subséquentes. Ce n'est que depuis quelques décennies que l'immunologie cellulaire prit de l'importance avec la compréhension (partielle...) du rôle joué par les lymphocytes T et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes. Comme nous le verrons plus loin dans cette thèse, les difficultés de compréhension de l'immunité cellulaire relèvent principalement de la très grande complexité des mécanismes qui lui sont reliés.

2. Le système immunitaire

Le système immunitaire est classiquement décrit comme étant un ensemble d'éléments permettant à l'organisme de discriminer le "soi" du "non-soi"². Ces éléments de défense procurent donc à l'organisme une protection contre les agents pathogènes étrangers tels que les virus, les bactéries, les helminthes, les levures et les champignons. Cependant, le système immunitaire est également en mesure de reconnaître un "soi" altéré comme dans le cas des cellules cancéreuses. Le système immunitaire est globalement divisé en deux grands systèmes composés de l'immunité innée (ou non spécifique) et l'immunité acquise (ou spécifique). Bien que ces deux sous-systèmes aient été souvent considérés comme totalement distincts, il semble désormais acquis que l'immunité innée et l'immunité acquise soient des systèmes parfaitement imbriqués.

2.1 L'immunité innée

Composé entre autres de barrières physiques, de leucocytes, de substances antimicrobiennes, de mécanismes inflammatoires, du complément et de la fièvre, ce système est très efficace contre une grande diversité d'agents pathogènes. L'immunité innée constitue une excellente première ligne de défense. Par contre, l'absence de spécificité envers les agents pathogènes rend ce système rapidement défaillant en cas d'agression par un pathogène ayant la capacité d'échapper aux mécanismes de défense de ce système. Heureusement, la présence d'une interaction constante entre l'immunité innée et acquise permet l'établissement rapide de mécanismes de défense spécifiquement dirigés contre le pathogène en question. Par exemple, l'autophagie et la phagocytose, deux mécanismes de défense non spécifiques permettant la dégradation d'agents pathogènes intra- ou extracellulaires, sont maintenant reconnus pour permettre le développement d'une réponse immunitaire spécifique.^{1,2}

2.2 L'immunité acquise

Beaucoup plus récente sur le plan évolutif, l'immunité acquise permet une reconnaissance très précise et détaillée des composants moléculaires de notre organisme. Ainsi, tout élément étranger au profil moléculaire de notre organisme sera reconnu et détruit par le système immunitaire adaptatif. Pour parvenir à ses fins, le système immunitaire adaptatif utilise deux types de réponses, soit la réponse à médiation humorale et la réponse à médiation cellulaire. Pour chacune de ces réponses, il existe un type spécialisé de cellules qui ont évolué afin de reconnaître spécifiquement les antigènes associés aux différents pathogènes. Ce sont les lymphocytes B qui ont pour fonction de produire les immunoglobulines, plus communément appelées anticorps, afin d'assurer l'immunité à médiation humorale. Dans le cas de l'immunité à médiation cellulaire, ce sont principalement les lymphocytes T préalablement activés par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (APC) qui en assurent la fonction. Dans les deux cas, les lymphocytes possèdent un récepteur antigénique unique qui, ayant lié un antigène qui lui est propre, engendre une expansion clonale de ce dernier. En plus de permettre le développement de cellules effectrices, la réponse adaptative permet également le développement de cellules mémoires assurant ainsi une plus grande rapidité de la réponse immunitaire en cas de réinfection par le même pathogène.¹

2.2.1 Les cellules de la réponse à médiation cellulaire

Les cellules composant le système immunitaire adaptatif à l'origine de l'immunité à médiation cellulaire proviennent des cellules souches pluripotentes hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces cellules pluripotentes génèrent des cellules souches multipotentes qui donneront naissance aux précurseurs lymphoïdes et myéloïdes. Ces précurseurs génèreront l'ensemble des cellules composant le système immunitaire; les lymphocytes T (dérivant des précurseurs lymphoïdes) et les

monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (formés à partir des précurseurs myéloïdes)³.

2.2.2 Les lymphocytes T

Avant de pouvoir accomplir leur rôle, les lymphocytes T fraîchement sortis de la moelle osseuse devront subir un “formatage” dans le thymus. Il existe deux étapes majeures assurant la sélection thymique, soit la sélection positive et la sélection négative¹. Dans le premier cas, les lymphocytes T doivent être en mesure de reconnaître les molécules du CMH exprimées par les cellules épithéliales du cortex thymique. Seuls les lymphocytes en mesure de lier les CMH avec suffisamment d’affinité survivent, les autres seront éliminés par apoptose. Par la suite, les cellules ayant franchi la sélection positive migrent au coeur du thymus pour y subir la deuxième étape de leur formation. Cette fois, les lymphocytes sont mis en présence de complexes peptide-CMH dont les peptides sont issus du "soi". Les lymphocytes interagissant trop fortement avec ceux-ci seront, encore une fois, éliminés par apoptose. Comme c’est l’absence d’interaction avec les complexes peptide-CMH qui assure la survie des lymphocytes, on parle alors de sélection négative⁴. Cette dernière étape est cruciale afin d’éviter l’envoi dans l’organisme de lymphocytes autoréactifs à l’origine de maladies auto-immunes. Une fois franchies les étapes de la sélection thymique, les lymphocytes T dits "naïfs" gagnent la circulation sanguine et lymphatique où ils pourront s’activer en lymphocytes T "effecteurs" et/ou "mémoires" suite à la rencontre d’un antigène qui leur est propre. Cependant, cette différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs s’effectue par les cellules présentatrices d’antigènes professionnelles, dont les cellules dendritiques et les macrophages font partie, sous le contrôle de molécules de co-stimulation et de cytokines. Ce n’est qu’une fois cette différenciation effectuée que les lymphocytes T (devenus effecteurs) pourront jouer leur rôle en périphérie et éliminer, par exemple, une cellule infectée.¹

2.2.3 Les lymphocytes T CD4⁺

Le lymphocyte T CD4⁺ joue un rôle central dans le développement de la réponse immunitaire, et ce tant dans la réponse humorale que dans la réponse à médiation cellulaire. En effet, lorsqu'une liaison soutenue survient entre un complexe peptide-CMH de classe II et son TCR (T cell receptor), ce lymphocyte peut se différencier en CD4⁺ T_H1 ou T_H2, qui vont différer quant à leur production subséquente de cytokines. De façon générale, les lymphocytes T_H1 vont moduler l'immunité à médiation cellulaire en sécrétant des cytokines telles que l'interféron- γ et l'interleukine 2 (IL-2), alors que les lymphocytes T_H2 vont moduler l'immunité humorale en sécrétant de l'IL-4, IL-10 et IL-13. L'interaction intercellulaire des lymphocytes T CD4⁺ s'effectue presque uniquement avec les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles telles que les macrophages et les cellules dendritiques puisque l'expression des CMH de classe II est pratiquement limitée à ces cellules. Comme pour tous les lymphocytes préalablement activés, une fraction du répertoire de ceux-ci possède la capacité de se différencier en cellules mémoires.⁵

2.2.4 Les lymphocytes T CD8⁺

Une fois activés par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, les lymphocytes T CD8⁺ naïfs se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (ou CTL; cytotoxic T lymphocytes). C'est suite à l'interaction de leur TCR avec un complexe peptide-CMH de classe I présent à la surface d'un APC que cette différenciation s'effectue. Les lymphocytes T CD8⁺ sont particulièrement efficaces dans l'élimination des cellules infectées par des virus. En raison de leur capacité destructrice, la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs en lymphocytes T cytotoxiques requiert une activité co-stimulatrice soutenue. Cette activité co-stimulatrice est favorisée par l'action des lymphocytes T CD4⁺ qui, par la sécrétion de cytokines, vont augmenter

l'expression des molécules co-stimulatrices des APC présentant le complexe peptide-CMH de classe I. Encore une fois, une partie des lymphocytes T CD8⁺ activés vont se différencier en cellules mémoires.⁶

2.2.5 Les macrophages

Les macrophages proviennent de la différenciation des monocytes sanguins suite à leur migration dans les tissus corporels⁷. Les macrophages, grâce à leur extraordinaire capacité phagocytaire, occupent un rôle prépondérant dans l'immunité innée⁸. Cependant, ces derniers peuvent également jouer un rôle dans le développement de la réponse immunitaire adaptative grâce à leur capacité à exprimer des molécules de co-stimulation. Leur aptitude à intervenir à la fois dans l'immunité innée et adaptative font des macrophages un type cellulaire très versatile. De plus, les macrophages ont la capacité d'augmenter le niveau d'expression de leurs molécules de CMH de classe I et de classe II ainsi que de leurs molécules de co-stimulation en réponse à la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron- γ , ou encore, en réponse à la présence de produit bactérien tel que le LPS (lipopolysaccharide). Finalement, les macrophages peuvent également participer au processus inflammatoire en sécrétant différentes cytokines telles que l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6.¹

2.2.6 Les cellules dendritiques

Bien que les cellules dendritiques aient des capacités phagocytaires proches de celles des macrophages, elles sont particulièrement spécialisées dans la présentation antigénique et ce, tant par les molécules de CMH de classe I que de classe II. La maturation des cellules dendritiques, provoquée par la rencontre d'un élément pathogène, entraîne leur migration vers les ganglions lymphatiques où elles interagissent avec les lymphocytes T. Le très grand nombre de molécules de CMH de

classe II exprimées par ces cellules ainsi que le niveau exceptionnel de molécules de co-stimulation telles que CD86 en font la cellule présentatrice d'antigènes par excellence. Finalement, l'habileté des cellules dendritiques à présenter des antigènes extracellulaires sur des molécules de CMH de classe I par le phénomène de présentation croisée leur permet d'activer les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et de provoquer leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques. Ce mécanisme de présentation croisée est également présent au niveau des macrophages mais à un niveau bien inférieur à celui des cellules dendritiques.⁹

3. La dégradation des protéines

Il existe deux systèmes principaux menant à la dégradation de protéines chez les cellules eucaryotes: le protéasome et le lysosome. Le premier, situé dans le cytoplasme et constitué par un complexe protéolytique nommé protéasome, permet la dégradation des antigènes pathogéniques ainsi que la dégradation des protéines cellulaires endogènes. Ce système, très bien conservé au cours de l'évolution, permet l'apprêtement des antigènes en peptides pouvant être reconnus par le complexe de chargement peptidique des CMH de classe I¹⁰. Les lysosomes, quant à eux, constituent la deuxième voie de dégradation cellulaire. Présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, ces organites contiennent une quarantaine d'enzymes hydrolytiques leur permettant d'assurer leur fonction digestive. Les lysosomes remplissent deux rôles fondamentaux, soit l'hétérophagie et l'autophagie. Dans le premier cas, il s'agit de la digestion de matière extracellulaire provenant, par exemple, de la phagocytose d'organismes pathogènes. La maturation des phagosomes et leur interaction avec les lysosomes donneront naissance aux phagolysosomes. Dans le cas de l'autophagie, les lysosomes assurent la digestion d'une portion de la cellule par elle-même. Ce sont les autophagosomes qui, en premier lieu, capturent les éléments ciblés pour la dégradation, et évolueront en autophagolysosomes suite à leur interaction avec le compartiment lysosomal.

3.1 Le protéasome

Le protéasome est localisé dans le cytoplasme, le noyau, ou associé au réticulum endoplasmique dans les cellules eucaryotes. Les protéines qui le constituent comptent parmi les plus abondantes de la cellule¹¹. Les différentes composantes du protéasome sont le plus souvent identifiées en fonction de leur coefficient de sédimentation de Svedberg (S). Ainsi, l'unité principale du protéasome formant le coeur catalytique du complexe est appelée la sous-unité 20S. À chaque extrémité de l'unité 20S, se trouve un complexe régulateur appelé cap 19S (ou PA700); l'ensemble des deux sous-unités 19S et de l'unité 20S forme le protéasome 26S (Figure 1).

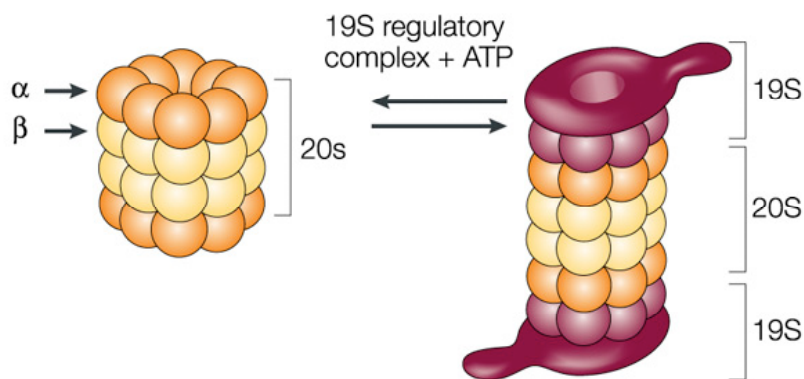


Figure 1. Représentation schématique du complexe du protéasome.

Celui-ci est composé du complexe 20S, lequel comprend les sous-unités α et β ainsi que deux complexes régulateurs appelés 19S. L'ensemble de ces sous-unités forme le protéasome 26S (image provenant de Adams J.¹²).

Le protéasome 26S est responsable de la dégradation sélective des protéines polyubiquitinylées. Ce complexe lie et dégrade les protéines intracellulaires qui sont « marquées » par une chaîne de polyubiquitine. L'unité 20S est composée de 28 sous-unités disposées en 4 anneaux heptamériques¹³. Les deux anneaux intérieurs, composés

de 7 sous-unités de type β (β 1- β 7), sont responsables de l'activité catalytique du protéasome. Ce sont les sous-unités β 1, β 2, et β 5 qui confèrent l'activité protéolytique du complexe protéasomal. Les sous-unités β sont synthétisées sous forme de précurseurs (étendus en N-terminal) qui sont par la suite clivés lors de leur incorporation au niveau du protéasome. Ce clivage libère un résidu thréonine en N-terminal qui est essentiel au fonctionnement du site actif^{14 15}. Il est à noter que les sites actifs du protéasome sont situés à l'intérieur du cylindre, empêchant ainsi la dégradation non spécifique de protéines cytoplasmiques^{16, 17}. Il y aurait sommairement trois types d'activité catalytique: une activité similaire à la chymotrypsine clivant les résidus hydrophobes, une activité similaire à la trypsine clivant les résidus basiques, et une activité similaire aux caspases clivant les résidus acides¹⁸⁻²⁰. De leur côté, les deux anneaux extérieurs de l'unité 20S sont composés des sous-unités de type α (α 1- α 7) et joueraient un rôle dans l'interaction avec le cap 19S, ainsi que dans l'ouverture du canal intérieur pour l'accession à la chambre protéolytique¹⁶.

Les deux caps régulateurs 19S situés de chaque côté de l'unité 20S du protéasome sont constitués de deux portions. Une de celles-ci, comprenant six unités avec une fonction ATPasique, a pour rôle de reconnaître les substrats ubiquitylés en plus d'interagir avec les anneaux α de l'unité 20S afin d'ouvrir le pore et de déplier les substrats destinés à être dégradés²¹. La liaison des substrats ubiquitylés au protéasome est facilitée par des protéines telles que p62/SQSTM1 et CDC48/p97 qui, par leurs différents domaines de liaison, sont en mesure de lier à la fois le protéasome et les protéines ubiquitylées, favorisant ainsi une proximité essentielle entre le substrat à dégrader et le protéasome²²⁻²⁴. L'autre portion comprend neuf sous-unités différentes dont la fonction principale est d'assurer la déubiquitylation des substrats. Ce processus est en partie assuré par la sous-unité RPN11 qui, par son activité métallo-isopeptidase, assure le recyclage de l'ubiquitine²⁵.

Cependant, la composition du protéasome peut être modifiée en fonction des conditions physiologiques ou de la localisation anatomique dans laquelle le protéasome est exprimé. En effet, lors d'une réponse immunitaire impliquant la sécrétion d'interféron- γ par les cellules immunitaires, les cellules stimulées par cet interféron- γ modifient certaines composantes du protéasome. Les unités constitutives β_1 , β_2 et β_5 du corps catalytique du protéasome 20S sont remplacées par les unités inductibles LMP-2, MECL et LMP-7 respectivement^{26, 27}. L'interféron- γ induit également la production de l'unité régulatrice PA28 (également appelée 11S) en remplacement de l'unité régulatrice 19S²⁸. Ce complexe induit par l'interféron- γ est appelé immunoprotéasome et possède une action protéolytique favorable à la génération d'épitopes servant à la présentation par les CMH de classe I^{28, 29} (Figure 2).

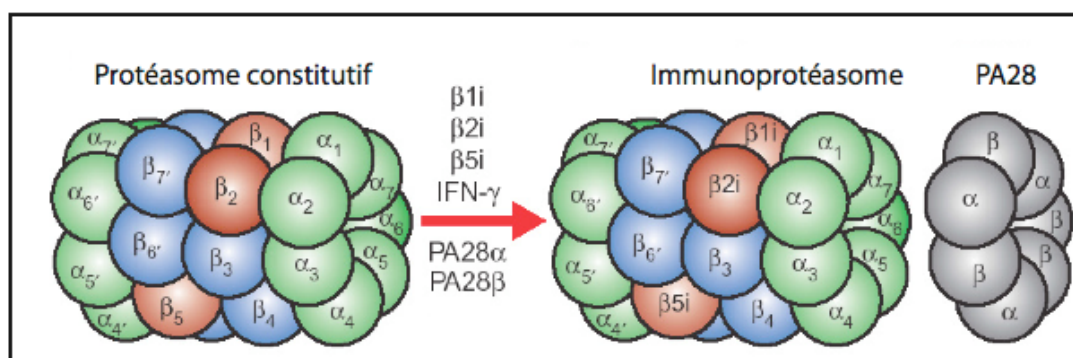


Figure 2: Formation de l'immunoprotéasome.

Le protéasome constitutif (20S) est formé de 28 sous-unités disposées en 4 anneaux heptamériques. Trois de ces sous-unités (β_1 , β_2 , et β_5) sont remplacées suite à une stimulation par l'interféron- γ par les sous-unités β_{1i} , β_{2i} , et β_{5i} (également appelées LMP-2, MECL et LMP-7 respectivement). L'interféron- γ induit également la production de l'unité régulatrice PA28 (également appelée 11S) en remplacement de l'unité régulatrice 19S (Image adaptée de Kloetzel³⁰, 2004).

3.2 Ubiquitinylation des protéines

Les protéines ciblées pour la dégradation par le protéasome sont typiquement marquées par l'ubiquitine. L'ubiquitine, une protéine très bien conservée au cours de l'évolution, est composée de 76 acides aminés qui s'attachent de façon covalente aux résidus lysines suite à une réaction appelée ubiquitinylation³¹. Ce système de conjugaison emploie trois types d'enzymes : E1 (enzyme activatrice), E2 (enzyme de conjugaison) et E3 (enzyme de liaison) qui, par leur action séquentielle, assurent le marquage de protéines ciblées pour la dégradation³¹. Le mécanisme est initié par l'enzyme activatrice E1 qui active la glycine en C-terminal de l'ubiquitine formant ainsi un lien thioester avec un de ses résidus cystéines. Cette forme activée d'ubiquitine est par la suite transférée, également par un lien thioester, à l'enzyme de conjugaison E2. Finalement, l'enzyme ligase E3 catalyse la liaison covalente entre l'ubiquitine activée et la protéine à dégrader sur un résidu lysine de ce substrat protéique. Cette réaction peut se poursuivre en boucle afin de permettre la polyubiquitinylation des protéines. Dans ce cas, les molécules d'ubiquitine subséquentes sont liées aux molécules d'ubiquitine préalablement fixées au substrat à dégrader sur un résidu lysine de l'ubiquitine (généralement la lysine⁴⁸) déjà associée au substrat. Le tout forme une chaîne multiple d'ubiquitine liée de façon covalente aux protéines ciblées pour la dégradation. Il est à noter qu'il n'existe qu'une seule forme de l'enzyme activatrice E1, et par conséquent la spécificité de la réaction d'ubiquitinylation est assurée par les enzymes E2 et E3 qui elles sont présentes sous de nombreuses formes³¹.

3.3 L'autophagie

L'autophagie inclut l'ensemble des mécanismes cataboliques menant à la dégradation des composants cellulaires par le lysosome. Bien que l'autophagie soit présente de façon constitutive chez les eucaryotes, il s'agit d'une voie de dégradation qui prend toute son ampleur lors de situations de stress. Il existe trois formes majeures d'autophagie, soit la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperones, et la macro-autophagie. Cette dernière, souvent appelée simplement autophagie, peut également être sous-divisée en différentes catégories, comme par exemple : la pexophagie, la « RE-phagie », la mitophagie, la crinophagie ou encore la xénophagie. Cependant, quelle que soit la forme d'autophagie, la résultante demeure toujours la même, soit la séquestration de matériel intracellulaire et sa dégradation subséquente par le lysosome.

Dans le cas de la micro-autophagie, une portion du cytoplasme est engloutie par de petites invaginations à la surface du lysosome³². La membrane des vésicules ainsi internalisées est dégradée tout comme les protéines cytoplasmiques solubles qu'elles contenaient. Ce type d'autophagie semble être impliqué dans la dégradation de base de protéines à longue durée de vie³³ et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en favorisant la digestion des membranes en excès du compartiment endovacuolaire³⁴. Une sous-catégorie de la micro-autophagie appelée « piecemeal microautophagy of the nucleus » (PMN) favorise la dégradation d'une partie de l'enveloppe nucléaire en permettant l'invagination de la membrane nucléaire directement dans le compartiment endovacuolaire³⁵. Bien que ce type d'autophagie ait été uniquement observé dans la levure jusqu'à présent, ces observations démontrent l'efficacité avec laquelle les mécanismes autophagiques peuvent éliminer les constituants cellulaires quels qu'ils soient.

Contrairement à la micro- et à la macro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperones ne requiert pas de trafic membranaire afin de permettre le transfert de matériel dans les compartiments lysosomaux. Ce type d'autophagie s'active principalement lors de longues périodes de stress et viendrait compléter l'action de la macro-autophagie. Les protéines cibles pour l'autophagie médiée par les chaperones contiennent dans leur séquence primaire le motif KFERQ³⁶. Les mécanismes menant à la translocation des protéines à travers la membrane lysosomale ont été largement élucidés. En effet, cette translocation est réalisée grâce à un complexe multi-protéique formé de chaperones moléculaires. Brièvement, le motif KFERQ présent sur les protéines cibles est reconnu par la forme constitutive de HSP70 (HSC70)³⁷. Les complexes HSP70-protéine cible ainsi formés interagissent avec un récepteur présent sur la membrane du lysosome, la protéine LAMP-2a³⁸. Pour que la translocation puisse avoir lieu, une seconde protéine chaperone lysosomale, HSC73, doit être active afin de permettre le transfert des protéines en question dans la lumière du lysosome³⁹. Ce mécanisme de transfert protéique semble être régulé par la cathepsine A qui, en dégradant la protéine LAMP-2a, pourrait diminuer le niveau d'autophagie médiée par les chaperones⁴⁰.

La macro-autophagie, qui constitue la forme majeure d'autophagie, implique la séquestration de matériel cytoplasmique à l'intérieur d'une vacuole appelée autophagosome, constituée d'une double membrane lipidique. L'autophagosome fusionne alors avec des compartiments de la voie endocytaire (endosome précoce, endosome tardif, lysosome) devenant ainsi progressivement un autophagolysosome qui constitue la forme mature de l'autophagosome. Le matériel hydrolytique acquis au cours de ces mécanismes de fusion permet la dégradation de la membrane interne de l'autophagolysosome et l'exposition subséquente de son contenu aux hydrolases acides lysosomales

3.3.1 Biogenèse des autophagosomes

La formation des autophagosomes est sous le contrôle de molécules clés qui de par leur action vont inhiber ou, au contraire, initier l'autophagie. Parmi ces molécules clés, la protéine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) exerce un pouvoir inhibiteur majeur sur l'initiation de l'autophagie. L'action de mTOR est fortement influencée par la présence de nutriments ou de facteurs de croissance⁴¹. En effet, en présence d'insuline et/ou d'autres facteurs de croissance, les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) de classe I, qui lient les récepteurs de type tyrosine kinase, modulent l'activation de la kinase mTOR supprimant ainsi l'autophagie⁴². En effet, lorsque l'autophagie n'est pas requise par la cellule, mTOR, en complexe avec les protéines ULK1 et Atg13, maintient un haut niveau de phosphorylation de ses partenaires ce qui inhibe le déclenchement de l'autophagie. Par contre, en absence de nutriment, l'association mTOR-ULK1-Atg13 est rompue, ainsi que l'activité kinase de mTOR, ce qui libère ses partenaires ULK1 et Atg13 sous une forme hypophosphorylée et le tout déclenche la formation d'autophagosomes. En plus des PI3K de classe I modulant l'autophagie au niveau de la membrane plasmique, les PI3K de classe III, agissent sur l'initiation de l'autophagie en générant du phosphatidylinositol 3-phosphate au niveau des endomembranes. La plus étudiée de ces PI3K de classe III est VPS34 qui contribue à moduler l'activité de mTOR et ainsi contrôle le niveau de l'autophagie dans la cellule^{43, 44}. VPS34 forme un complexe avec Beclin 1 (appelée Atg6 chez la levure)⁴⁵ dont l'activité est régulée positivement par des partenaires d'interaction de Beclin 1 tels que UVRAG⁴⁶ (UV radiation Resistance Associated Gene) et AMBRA1⁴⁷ (Activating Molecules in Beclin 1 Regulated Autophagy) ou encore inhibée par un autre partenaire d'interaction de Beclin 1, BCL-2⁴⁸ (B-Cell Lymphoma-2). L'action de la kinase VPS34 présente dans le complexe Beclin-VPS34 favoriserait la formation de PI3P au niveau des endomembranes et favoriserait ainsi le recrutement de protéines essentielles à la formation des autophagosomes⁴⁹.

L'identification de ces molécules clés dans les mécanismes d'initiation de l'autophagie a permis l'utilisation d'agents pharmacologiques afin d'étudier l'impact de l'autophagie dans différentes conditions physiologiques ou pathologiques. Parmi ces drogues, la rapamycine est sans aucun doute la plus utilisée pour activer l'autophagie grâce à sa capacité à inhiber l'action de mTOR. La 3-méthyladénine, une drogue inhibant les PI3K de classe III, est quant à elle utilisée afin de bloquer la formation d'autophagosomes^{50, 51} (Figure 3). Il existe également d'autres voies métaboliques pouvant conduire à l'amorce des processus autophagiques. Par exemple, la protéine kinase R (PKR) et la phosphorylation du facteur d'élongation eucaryotique 2 α (eIF2 α) qui en découle permettent d'activer l'autophagie lors d'infection par le virus HSV-1^{52, 53}.

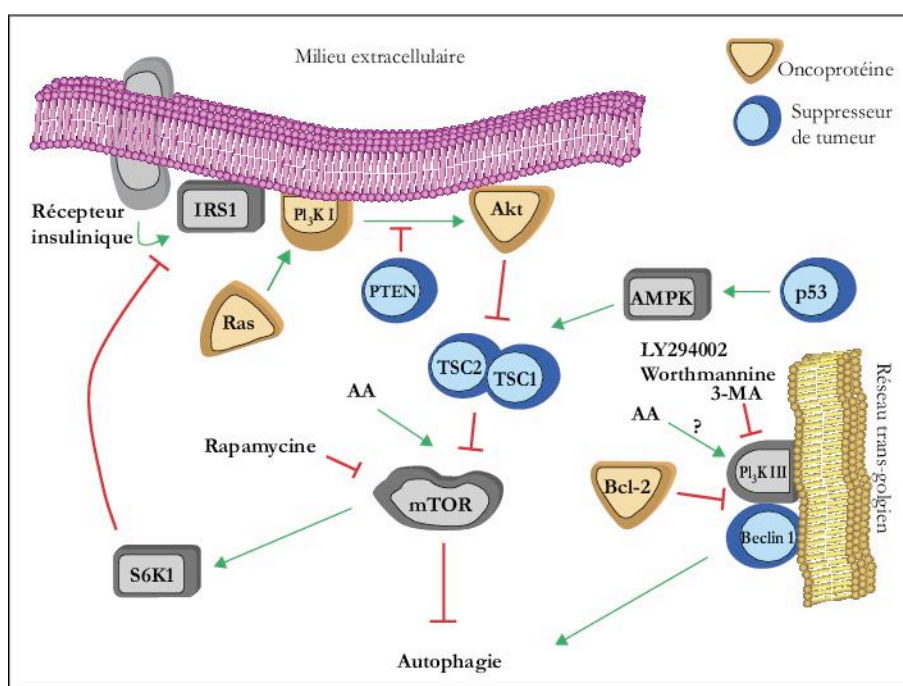


Figure 3. Rôle des PI3K de classe I et de classe III dans l'initiation de l'autophagie.

La formation de l'autophagosome requière la production de phosphatidylinositol 3-phosphate par la phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K) type III localisée vraisemblablement sur la membrane du réseau trans-golgien où son action est contrôlée par la protéine beclin-1. De plus, la macroautophagie est favorisée par divers signaux stimuli dont la voie de signalisation par la PI3K de type I/PKB/mTOR pour aboutir à la membrane d'autophagosomes. La contribution exacte entre la signalisation des PI3K de type I

et de type III et le déclenchement de la formation de l'autophagosome reste à élucider. (image provenant de Codogno *et al.*⁵⁴).

Dans les cellules de mammifères, l'étape qui suit l'initiation de l'autophagie est la formation et l'élongation d'une membrane isolée, appelée phagophore⁵⁵. Dans la levure, la structure pré-autophagosomale, l'équivalent du phagophore, est définie comme étant le site initial de recrutement des protéines reliées à l'autophagie. Bien que l'origine de la membrane servant à la formation du phagophore soit toujours débattue, plusieurs études suggèrent fortement que le réticulum endoplasmique soit à l'origine de celle-ci^{56, 57}. Malgré que les détails moléculaires concernant la formation des autophagosomes restent à élucider, les études chez la levure ont permis d'identifier plus d'une trentaine de protéines impliquées dans l'autophagie. En fait, sur les 31 protéines reliées à l'autophagie identifiées chez la levure, au moins 18 d'entre elles ont été directement impliquées dans la formation des autophagosomes^{58, 59}. Certaines de ces protéines recrutées au niveau de la structure pré-autophagosomale demeurent associées plus ou moins longtemps aux autophagosomes durant le processus de maturation et peuvent donc être utilisées comme marqueurs de ce compartiment. Ceci est particulièrement vrai pour la protéine Atg8, appelée LC3 (microtubule-associated protein Light Chain 3) chez les mammifères⁶⁰.

Deux systèmes de conjugaison, presque similaires à l'ubiquitinylation et à la sumoylation, servent à la formation d'autophagosomes chez les mammifères. Le premier système est constitué des protéines Atg5 et Atg12. Ce complexe Atg5-Atg12 permet le recrutement du deuxième système, soit la protéine LC3 qui est elle-même conjuguée à la phosphatidyléthanolamine pour former le complexe LC3-PE⁶¹. L'association de LC3-PE au phagophore n'est que temporaire pour ce qui est des complexes liés à la face externe de l'autophagosome. La liaison qui unit LC3-PE à la membrane de l'autophagosome est hydrolysée par la protéine Atg4, libérant ainsi la protéine LC3. Par contre, une partie des complexes LC3-PE associés à la membrane interne des autophagosomes est protégée contre l'hydrolyse de Atg4 et, par conséquent,

une partie de ces complexes LC3-PE demeure liée aux autophagosomes jusqu'à leur dégradation par les enzymes lysosomales. Il est également intéressant de noter que la protéine LC3 interagit avec la protéine p62/SQSTM1, une protéine capable de reconnaître des agrégats des protéines polyubiquitinylées au niveau cytoplasmique⁶². Cette interaction permet donc de cibler des agrégats protéiques au niveau des autophagosomes afin de permettre leur dégradation. L'autre complexe formé d'Atg5-Atg12 est, quant à lui, recyclé du côté cytoplasmique avant la formation complète de l'autophagosome (Figure 4).

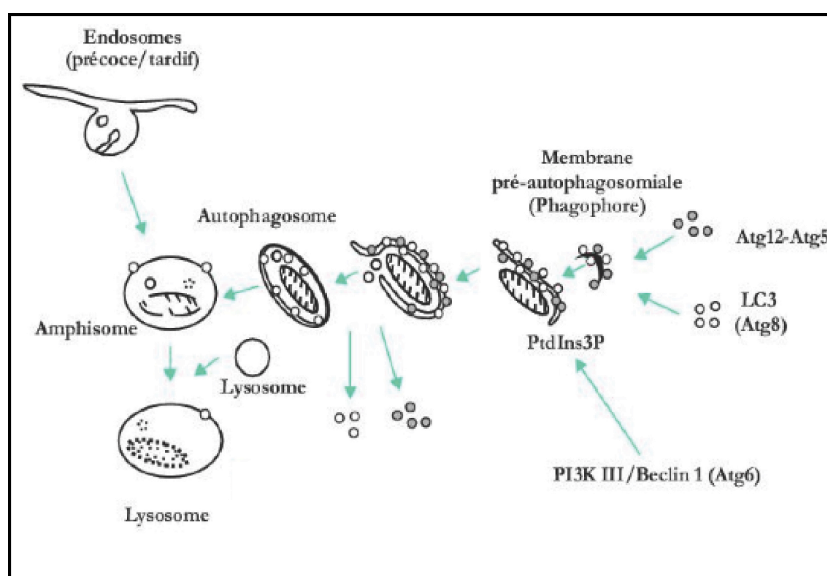


Figure 4 : Différentes protéines de la famille Atg sont recrutées sur la membrane pré-autophagosomiale et participent à la formation de l'autophagosome.

La majorité des protéines Atg associées à la membrane de l'autophagosome en formation sont recyclées vers le cytosol avant que celui-ci ne soit complètement formé. Par contre, une fraction des protéines Atg8 (LC3) associée à la face interne de l'autophagosome demeure liée à ce dernier et peut donc être utilisée comme marqueurs de ce compartiment (image provenant de Codogno *et al.*⁵⁴).

Par la suite, les autophagosomes subissent différentes étapes de maturation qui les amèneront à interagir avec divers compartiments intracellulaires. Les autophagosomes vont tout d'abord fusionner avec les endosomes précoces⁶³, puis avec les endosomes tardifs⁶⁴ pour former un amphisome⁶⁵. Finalement, il y aura fusion avec les lysosomes et transformation en autophagolysosome^{66, 67}. Cependant, pour que cette fusion entre les lysosomes et les autophagosomes puisse avoir lieu, une acidification des autophagosomes et/ou lysosomes doit préalablement survenir⁶⁸. En effet, il semble que l'acidification vacuolaire soit requise pour un appariement efficace des molécules SNAREs entre les vésicules, permettant ainsi la fusion des membranes⁶⁹. Ces résultats indiquent que la maturation des autophagosomes dans les cellules de mammifère comporte des étapes multiples qui incluent plusieurs événements de fusion membranaire avec les compartiments endosomaux et lysosomaux. Certaines protéines clés dans ces étapes de maturation des autophagosomes ont été identifiées. Par exemple, l'expression du dominant négatif de la protéine SKD1 AAA ATPase provoque l'accumulation des autophagosomes précoces, indiquant une diminution des événements de fusion avec les compartiments endo/lysosomaux⁷⁰. RAB7, une GTPase normalement impliquée dans la fonctionnalité des endosomes tardifs et du compartiment lysosomal, semble également nécessaire à la maturation des autophagosomes précoces en autophagosomes tardifs⁷¹.

3.3.2 Autophagie et immunité innée

Le rôle de l'autophagie dans l'immunité couvre plusieurs aspects, notamment dans l'immunité innée. Bien que l'autophagie soit généralement destinée à la séquestration de matériel intrinsèque à la cellule, elle peut également participer à l'élimination de matériel étranger à la cellule tel que des pathogènes intracellulaires. Ce type d'autophagie, appelé xénophagie, peut servir tant à l'élimination de bactéries, de parasites que de virus. De plus, l'autophagie joue également un rôle prépondérant dans

l'inflammation et la signalisation cellulaire ce qui en fait un joueur clé de l'immunité innée.

3.3.3 Autophagie et pathogènes intracellulaires

La première observation d'un rôle potentiel de l'autophagie dans la défense cellulaire face à un pathogène intracellulaire provient d'une étude morphologique de cellules de cochon d'Inde infectées par *Rickettsia conorii*⁷². Cependant, l'implication formelle de l'autophagie dans la défense cellulaire face aux pathogènes intracellulaires était presque impossible à démontrer à cette époque puisque la machinerie moléculaire engagée dans la formation des autophagosomes était, à ce moment, inconnue. Cependant, les nombreuses études réalisées depuis ont permis d'identifier des marqueurs spécifiques de l'autophagie en plus d'identifier des moyens d'activer ou d'inhiber celle-ci. L'utilisation de ces marqueurs et des modulateurs de l'autophagie a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant de l'autophagie dans l'élimination de pathogènes intracellulaires⁷³. Évidemment, plusieurs pathogènes ont évolué de façon à se protéger contre les mécanismes d'autophagie et même, dans certains cas, à utiliser l'autophagie pour leur propre bénéfice⁷⁴.

Une liste exhaustive de microorganismes intracellulaires pouvant être la cible de l'autophagie a désormais été établie. Parmi ces pathogènes, citons, le *Mycobacterium tuberculosis* qui est reconnu pour ses capacités à bloquer la maturation des phagosomes et ainsi survivre et se multiplier à l'intérieur de la cellule hôte. L'activation de l'autophagie dans ces cellules hôtes permet de contrecarrer les mécanismes d'évasion immunitaire du *Mycobacterium tuberculosis* en favorisant la pleine maturation des phagosomes, provoquant ainsi la dégradation des bactéries⁷⁵. L'autophagie permet également la capture et le contrôle de pathogènes envahisseurs tels que les bactéries *Streptococcus* du groupe A⁷⁶, *Salmonella enterica*⁷⁷, *Listeria monocytogenes*^{78, 79} ainsi que de certains parasites tels que *Toxoplasma gondii*^{80, 81}.

L'importance de l'autophagie dans le contrôle des pathogènes intracellulaires est démontrée par la multitude de mécanismes développés par les microorganismes pour contrer celle-ci. Les virus de la famille de l'herpès comptent parmi les pathogènes ayant développé une vaste gamme de stratégies afin de bloquer l'autophagie sous toutes ses formes. Par exemple, la glycoprotéine B (gB) du virus HSV-1 s'associe à "PKR-like ER-localized eIF2 α kinase" (PERK) dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) afin de bloquer son action et ainsi maintenir un semblant d'homéostasie dans le RE⁸². La protéine ICP34.5, quant à elle, permet à la fois d'inhiber l'action de Beclin 1⁸³ et de contrecarrer l'action de PKR en déphosphorylant la sous-unité α du facteur d'initiation de translation 2 (eIF2 α)^{52, 53}. De plus, une autre protéine de HSV-1, US11, s'associe également à PKR, bloquant son action et inhibant ainsi la phosphorylation de eIF2 α ^{84, 85} (Figure 5). Plusieurs autres virus ont également évolué afin de réduire au maximum l'action de l'autophagie, par exemple, le cytomégalovirus⁸⁶, le γ -herpès 68⁸⁷ et le virus de l'hépatite C, qui lui est en mesure de réduire la fusion des autophagosomes avec les lysosomes⁸⁸.

l'autophagie permet le transfert de virus présents dans le cytoplasme de la cellule infectée au niveau des compartiments vacuolaires, endroit où les TLR7 sont localisés. Ce transport effectué par l'autophagie permet ainsi le rapprochement essentiel entre les TLR et les motifs associés aux pathogènes afin de permettre aux TLR d'effectuer leur fonction. La signalisation par les TLR qui en résulte provoque, dans ce cas, la production d'interféron de type 1 par les cellules dendritiques (DC), rendant ainsi les cellules plus résistantes à l'infection. Il a également été démontré que le recrutement des TLR9 au niveau des autophagosomes chez les lymphocytes B permet d'amplifier à la fois le niveau de signalisation des TLR9 et du récepteur B des lymphocytes⁹¹. Il est également intéressant de noter que le virus HSV-1 est reconnu par les TLR9⁹², cependant un lien direct entre l'autophagie et la signalisation par TLR9 lors d'infection par HSV-1 demeure encore à démontrer.

3.3.4 Autophagie et signalisation cellulaire

Il est à noter que le lien entre les TLR et l'autophagie va dans les deux sens, puisque si l'autophagie favorise la signalisation des TLR, il est également vrai que la signalisation par les TLR favorise l'autophagie^{93, 94}. Par contre, tous les TLR ne stimulent pas la formation d'autophagosomes avec la même intensité. TLR3, 4 et 7 semblent être les plus aptes à stimuler l'autophagie. La stimulation de l'autophagie par des PRR (Pattern-Recognition Receptors) autres que les TLR a également été observée et décrite comme étant essentielle au contrôle de la bactérie *Listeria* chez la drosophile⁹⁵. La protéine kinase PKR, un PRR qui reconnaît l'ARN double brin, est une autre molécule intracellulaire essentielle à l'activation de l'autophagie lors d'une infection virale par HSV-1 ainsi que lors de conditions de stress cellulaire, en particulier si ce stress est localisé au niveau du réticulum endoplasmique^{53, 96}. PERK, qui est l'équivalent de PKR mais localisée au niveau du RE, semble également essentielle au déclenchement de l'autophagie suite à un stress du RE⁹⁷. Le rôle de PERK, d'abord identifié dans la réponse au stress du RE (unfolded protein response) a également été

souligné dans les mécanismes cellulaires menant au déclenchement de l'autophagie⁸⁹. Bien que davantage d'études seront nécessaires afin d'élucider en détail le lien moléculaire entre le "unfolded protein response" du RE et l'autophagie, il a été démontré que le "unfolded protein response" précède le déclenchement de l'autophagie⁹⁸ lors de stress du RE. De tels stress du RE qui sont observés, par exemple, lors d'infections par HSV-1 entraînent la phosphorylation de PERK. Une telle phosphorylation indique une réponse du RE face au stress provoqué par l'infection virale⁹⁹. L'ajout de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction protéique, réduit fortement le niveau de phosphorylation de PERK indiquant que l'accumulation de protéines virales dans le RE est très certainement la cause du stress provoquant cette phosphorylation.

3.4 La phagocytose

La phagocytose est un processus très ancien sur le plan évolutif, permettant aux cellules d'internaliser du matériel extracellulaire tel que des pathogènes, dans le but de pouvoir les dégrader et les tuer. Dans le cas d'organismes unicellulaires comme les *Amoebae*, la phagocytose permet également l'entrée de matériel servant de nutriment essentiel à leur survie. Par contre, chez les organismes plus évolués pourvus d'un système digestif, le rôle de la phagocytose est généralement étroitement associé à des fonctions immunitaires ou au maintien de l'homéostasie en permettant par exemple l'élimination des corps apoptotiques. Chez les mammifères, la phagocytose est fortement restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Cependant, d'autres types cellulaires peuvent également effectuer de la phagocytose, notamment les neutrophiles qui sont un type cellulaire impliqué dans l'élimination des bactéries. De plus, les cellules d'origine fibroblastique et épithéliale peuvent également, sous certaines conditions, effectuer de la phagocytose¹⁰⁰.

3.4.1 Biogenèse et maturation des phagosomes

La formation de phagosomes s'amorce par la reconnaissance et la fixation au niveau de la membrane plasmique de l'élément à phagocyter. Ceci s'effectue grâce à la présence de récepteurs membranaires liant les ligands de la particule à ingérer. Les récepteurs les plus étudiés pour leur capacité à déclencher le processus de phagocytose sont sans aucun doute les récepteurs Fc, les récepteurs du complément, les récepteurs de type 'scavenger', les récepteurs mannose et les récepteurs reconnaissant la phosphatidylsérine permettant l'internalisation des corps apoptotiques¹⁰¹. La liaison des ligands à leur récepteur induit une cascade de signalisation générant un réarrangement membranaire menant à la formation de pseudopodes. Ce réarrangement membranaire est provoqué par une réorganisation du réseau d'actine induite par des GTPases de la famille RHO (RAC1 et CDC42) lorsque le récepteur Fc est impliqué¹⁰². Par contre, la réorganisation de l'actine passe par la GTPase RHO lorsque l'internalisation se fait par le récepteur du complément¹⁰³. On voit donc que les mécanismes moléculaires engagés dans la formation des phagosomes diffèrent en fonction des récepteurs membranaires ayant été stimulés.

Une fois la formation du phagosome terminée, celui-ci s'engage dans un processus complexe de maturation dont le but est la formation d'un compartiment apte à dégrader et à tuer les pathogènes. Les étapes menant à la génération de phagolysosomes consistent en une série d'événements de fusion membranaire où les phagosomes vont interagir séquentiellement avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes. Les phagosomes acquièrent ainsi progressivement les marqueurs spécifiques de ces différents compartiments¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Parmi ces marqueurs acquis progressivement, on retrouve des GTPases de la famille RAS telles que RAB5 et RAB7, toutes deux impliquées dans la fusion des membranes¹⁰⁷.

3.4.2 L'origine de la membrane phagosomale

Puisque les particules ingérées passent obligatoirement par la membrane plasmique, on devrait logiquement s'attendre à ce que la majeure partie de la membrane du phagosome soit composée de la membrane plasmique. Par contre, une analyse protéomique du phagosome a révélé la présence d'une quantité non négligeable de protéines provenant du réticulum endoplasmique¹⁰⁸. Cette présence de protéines originaires du RE semble s'expliquer par la fusion directe du RE avec la membrane plasmique fournissant ainsi un apport de membrane au phagosome naissant¹⁰⁹. La présence de contacts transitoires entre le RE et le phagosome naissant de *Dictyostelium* a également été rapportée, ce qui suggère que l'utilisation du RE pourrait être un mécanisme commun entre les espèces¹¹⁰. Finalement, une étude portant sur les fusions membranaires modulées par les protéines SNARES entre les divers compartiments cellulaires a indiqué que la t-SNARE Sso1/Sec9c de la membrane plasmique pouvait interagir avec la v-SNARE Sec22 présente sur le RE. Ce résultat semble, encore une fois, démontrer le potentiel d'interaction entre le RE et la membrane plasmique lors de la biogenèse des phagosomes¹¹¹. Si tel est le cas, le phagosome ainsi formé pourrait contenir l'ensemble de la machinerie nécessaire à la présentation antigénique normalement localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Par conséquent, les phagosomes pourraient non seulement dégrader et tuer les pathogènes internalisés, mais pourraient également servir d'élément déclencheur de la réponse immunitaire adaptative¹¹².

4. La présentation antigénique

Bien que la présentation antigénique par les molécules du CMH soit une fonction immunitaire hautement spécialisée, l'apprêtement des antigènes menant à la présentation par les molécules du CMH s'effectue par deux systèmes protéolytiques généraux et ubiquitaires. Essentiellement, toutes les cellules nucléées de l'organisme

apprêtent les peptides antigéniques en utilisant un ensemble de protéases qui sont normalement impliquées dans le renouvellement et la dégradation des protéines cellulaires. Le système ubiquitine-protéasome est sans aucun doute le système clé dans la génération de la majorité des peptides antigéniques servant à la présentation par les CMH de classe I^{113, 114}. Le deuxième système protéolytique, formé par le compartiment endovacuolaire lysosomal est, quant à lui, l'élément clé dans l'apprêtement antigénique menant à la génération de peptides utilisés pour le chargement des CMH de classe II¹¹⁵.

La reconnaissance d'antigènes, qu'ils soient endogènes ou exogènes à l'organisme, constitue l'étape clé dans le développement de la réponse à médiation cellulaire. Pour que cette reconnaissance puisse avoir lieu, l'antigène en question doit être "présenté" aux lymphocytes T par les molécules de CMH à la surface des cellules. Les molécules de CMH servant à présenter les peptides antigéniques sont des glycoprotéines hautement spécialisées liant de façon non covalente les antigènes, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène. Il existe deux classes de molécules de CMH, chacune étant ségréguée dans des compartiments cellulaires différents et servant à présenter des antigènes distincts. Les molécules de CMH de classe I, localisées dans le RE, assurent la présentation des antigènes endogènes, alors que les molécules de CMH de classe II, localisées dans le compartiment endovacuolaire, permettent la présentation des antigènes exogènes.

4.1 La présentation antigénique par les CMH de classe I

Les molécules de CMH de classe I ont pour fonction de présenter les antigènes intracellulaires, tels que ceux produits lors d'une infection virale, afin de stimuler les lymphocytes T CD8⁺. Contrairement aux CMH de classe II qui sont exprimés par seulement une sous-population de cellules du système immunitaire, les CMH de classe I sont exprimés par l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme. Par contre, tout comme pour les CMH de classe II, l'expression des CMH de classe I peut être

augmentée par la présence de cytokines, notamment l'interféron- γ ¹¹⁶. De plus, la présentation par les CMH de classe I joue un rôle primordial dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺ menant au contrôle des infections virales. Ceci est particulièrement vrai dans le cas d'infection par le virus HSV-1¹¹⁷.

4.1.1 Structure des CMH de classe I

Le CMH de classe I consiste en une chaîne lourde α composée d'un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire, et un domaine luminal comprenant trois régions : $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Suite à la synthèse de la chaîne lourde α dans le réticulum endoplasmique, celle-ci s'associe avec la chaîne légère β_2 -microglobuline. Le tout s'effectue avec l'aide de la chaperone calnexine qui aide initialement la chaîne α à se replier. Par la suite, la protéine calréticuline favorise l'association de la β_2 -microglobuline avec la chaîne lourde.

4.1.2 L'apprêtement de peptides antigéniques

La génération de peptides antigéniques favorables à leur chargement sur les molécules de CMH de classe I débute dans le cytoplasme de la cellule. Ceci est aussi vrai même pour les protéines du réticulum endoplasmique qui sont rétrotransloquées dans le cytoplasme pour leur dégradation par le protéasome¹¹⁸. Le protéasome génère dans la plupart des cas des peptides antigéniques précurseurs qui sont adéquats en C-terminal mais qui comportent souvent une extension en N-terminal de quelques acides aminés¹¹⁹. Par conséquent, ces peptides de 2-25 acides aminés requièrent un apprêtement supplémentaire en N-terminal par des aminopeptidases résidant dans le cytoplasme ou encore dans le réticulum endoplasmique^{30, 120}. Parmi ces aminopeptidases, notons la TPPII (cytoplasmic TriPeptidyl Peptidase II) qui est impliquée dans la dégradation post-protéasomale des peptides ayant plus de 15 acides

aminés¹²¹. Cette dernière pourrait même servir à générer des peptides antigéniques en absence d'une activité protéasomale¹²². Cependant, les protéases présentes dans le cytoplasme peuvent également détruire les peptides antigéniques en les dégradant de façon excessive. Plus de 99% des peptides générés par le protéasome seraient détruits ainsi dans le cytoplasme avant de pouvoir atteindre le réticulum endoplasmique¹²³. Certaines protéines chaperones cytoplasmiques telles que HSP70 (Heat Shock Protein 70) et HSP90 (Heat Shock Protein 90) offriraient une protection contre la dégradation excessive des peptides antigéniques¹²⁴. On voit donc que la dégradation des antigènes en peptides est essentielle à la présentation par les CMH de classe I, mais qu'une délicate balance doit être maintenue afin d'éviter la destruction de ces peptides par les protéases cellulaires.

À ce stade, la majorité des peptides sont encore à l'étape de peptides précurseurs puisque que ceux-ci sont d'environ 10 à 12 acides aminés ou moins. Ils sont néanmoins prêts pour être transférés dans le réticulum endoplasmique. Ce transfert s'effectue grâce à l'activité du transporteur peptidique TAP (Transporter associated with Antigen Processing) localisé sur la membrane du RE¹²⁵. Le transporteur peptidique TAP est un hétérodimère formé par l'union des molécules TAP1 et TAP2¹²⁶. Il faut noter que bien que la plus grande part de la présentation antigénique effectuée par les molécules de CMH de classe I soit dépendante de l'action de TAP^{127, 128}, la présentation de certains peptides peut également survenir de façon TAP-indépendante, particulièrement dans le cas de protéines membranaires^{129, 130}. Une fois transportés dans le réticulum endoplasmique, les peptides peuvent emprunter différentes routes. Ils peuvent s'associer au CMH de classe I, être liés à des protéines chaperones du RE, être apprêtés par des aminopeptidases du RE, être dégradés et détruits ou encore être rétrotransloqués dans le cytoplasme¹³¹. Le but de l'ensemble de ces différentes possibilités est de maintenir une concentration relativement faible de peptides dans le RE de façon à ce que les peptides les plus récents puissent avoir accès aux molécules de CMH de classe I sans devoir entrer en compétition avec une multitude de peptides s'accumulant dans le RE¹²³.

Dans certains cas, la génération de peptides adéquats pour leur chargement sur les molécules de CMH de classe I nécessite un apprêtement supplémentaire dans le RE. L'enzyme clé assurant cet apprêtement supplémentaire permettant au peptide de pouvoir se loger parfaitement dans la niche peptidique des CMH de classe I est la ERAAP (Endoplasmic Reticulum Associated Antigen Processing)¹³². Cette enzyme reconnaît le peptide du côté carboxy-terminal et coupe en N-terminal les peptides afin de générer des peptides de 8-10 acides aminés de longueur¹³³. L'expression de cette enzyme est stimulée par l'interféron- γ , une cytokine pro-inflammatoire qui favorise la présentation antigénique. L'action de ERAAP peut donc influencer fortement le répertoire peptidique présenté par les CMH de classe I¹³⁴. L'enzyme ERAAP sert également à dégrader et détruire les peptides n'ayant aucune affinité pour la niche peptidique des CMH de classe I¹³⁵. À l'opposé, certaines protéines de RE telles que PDI (Protein Disulfide Isomerase), peuvent lier les peptides antigéniques et les protéger contre une dégradation excessive¹³¹.

L'étape finale menant à la génération de complexes peptide-CMH se produit au niveau du complexe de chargement peptidique. Ce dernier orchestre l'assemblage final des CMH de classe I avec le peptide pour la génération de complexes peptide-CMH stables pouvant être exportés vers la membrane plasmique. Le rôle principal des complexes de chargement peptidique est d'assurer un contrôle de la qualité afin d'éviter que des peptides sous-optimaux soient exportés à la surface¹³⁶. Le complexe de chargement peptidique est formé de multiples protéines dont la molécule chaperone calréticuline, la protéine transmembranaire tapasine, la protéine oxidoréductase ERp57, la protéine PDI et les transporteurs hétérodimériques TAP^{120, 137}. C'est le transporteur TAP qui sert de plateforme pour la formation de ce complexe de chargement peptidique (Figure 6). Comme mentionné auparavant, les molécules de CMH de classe I sont repliées adéquatement et s'associent à la chaîne légère β 2-microglobuline grâce à l'aide des protéines calnexine et calréticuline. La protéine tapasine sert de lien entre les

molécules TAP et le complexe CMH de classe I assurant ainsi une proximité favorable à la reconnaissance des peptides par les CMH de classe I arrivant dans le RE. La formation de ce complexe multi-protéique est également soutenue par les protéines ERp57 et PDI. Une fois qu'un peptide de haute affinité pour le CMH de classe I réussit à se loger dans la niche peptidique, il y a stabilisation des CMH de classe I et ceux-ci sont exportés par la voie constitutive de sécrétion cellulaire. C'est le chargement du peptide sur la molécule de CMH de classe I qui permet à la molécule du CMH d'atteindre sa conformation finale. Ce changement de conformation cause la dissociation du CMH de classe I du complexe de chargement du peptide, et le complexe peptide:CMH est libre d'emprunter la voie de sécrétion passant par l'appareil de Golgi afin d'atteindre la membrane plasmique, où il pourra stimuler les lymphocytes T CD8⁺ (Figure 7).

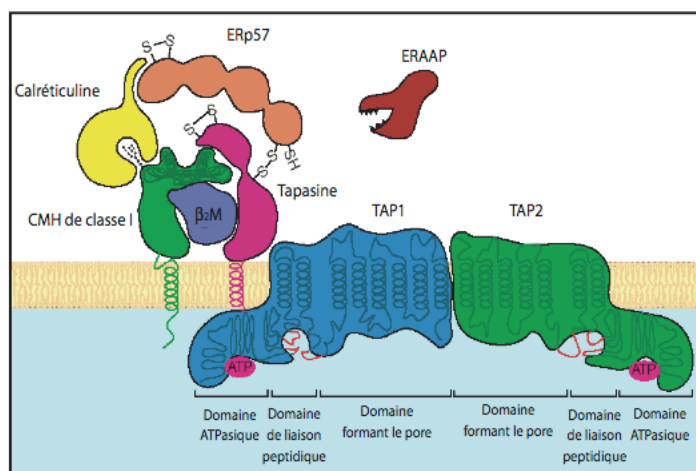


Figure 6: Organisation du complexe de chargement peptidique du CMH de classe I

Le transporteur peptidique TAP est au cœur de la formation. La protéine tapasine assure le lien entre TAP et le CMH de classe I. Le maintien et la fonctionnalité du complexe sont également assurés, entre autres, par les protéines calréticuline et ERp57. (Image adaptée de Ackerman *et al*¹³⁸, 2004)

4.1.3 Le répertoire peptidique

En conditions physiologiques, c'est-à-dire en absence d'infection, le répertoire peptidique présenté à la surface des cellules par les CMH de classe I est composé uniquement de peptides du "soi". Ce répertoire peptidique, composé de plus de 100 000 peptides, est appelé immunopeptidome¹³⁹. Ce dernier permet non seulement de moduler le répertoire des lymphocytes T lors du développement thymique en régulant les sélections positive et négative, mais permet également la survie et l'expansion des lymphocytes T périphériques¹⁴⁰. De plus, en conditions pathologiques telles qu'une infection virale, l'immunopeptidome du "soi" permet d'amplifier la réponse envers les pathogènes intracellulaires en favorisant l'interaction des complexes peptides-CMH présentant des peptides d'origine virale et le TCR des lymphocytes T cytotoxiques¹⁴¹. Le répertoire peptidique présenté par les CMH, qu'il provienne du "soi" ou du "non-soi", permet de lier le milieu intracellulaire à l'environnement extracellulaire afin de rendre disponible le protéome cellulaire pour la surveillance par les lymphocytes T cytotoxiques. Ce répertoire peptidique présenté par l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme est généré, comme nous venons de le voir, par la voie d'apprêtement et de présentation des CMH de classe I.

4.3 La présentation d'antigènes par les CMH de classe II

Les molécules de CMH de classe II sont traditionnellement reconnues pour leur capacité à présenter des antigènes exogènes servant à la stimulation des lymphocytes T CD4⁺. Contrairement aux CMH de classe I qui sont exprimés par l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme, l'expression des CMH de classe II est majoritairement restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B. Cependant, dans certaines conditions, comme par exemple en présence d'interféron- γ , d'autres types cellulaires peuvent également en exprimer. La présentation par les CMH de classe II joue un rôle primordial tant dans l'élaboration de la réponse humorale en aidant la différenciation

des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps que dans le contrôle et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques^{142, 143}.

4.3.1 Structure des CMH de classe II

Les molécules de CMH de classe II sont des hétérodimères constitués de deux protéines transmembranaires, une chaîne α et une chaîne β . Chaque chaîne comporte quatre domaines: un domaine intracellulaire, un domaine hydrophobe pour la région transmembranaire et deux domaines extracellulaires α_1 et α_2 ou β_1 et β_2 pour la chaîne α et β respectivement. Les domaines α_2 et β_2 situés près de la membrane du côté extracellulaire ont une structure similaire à des domaines d'immunoglobulines. Ce sont les domaines α_1 et β_1 , situés à l'extrémité N-terminale, qui forment le site de fixation du peptide antigénique¹⁴⁴. Les flancs du site peptidique sont délimités par deux hélices α et le plancher est composé de feuillettes β . L'association entre les deux chaînes est maintenue par des liaisons non covalentes et des ponts disulfures assurent l'intégrité de la structure des chaînes α et β ¹⁴⁴.

4.3.2 Apprêtement et présentation des antigènes par les CMH de classe II

Synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique, les deux chaînes α et β vont s'associer à la chaîne invariante (Ii) pour former un complexe nonamérique $(\alpha\beta)_3Ii_3$ ¹⁴⁵. La fonction de la chaîne double est d'inhiber temporairement toute fixation peptidique sur la molécule de CMH¹⁴⁶ et de diriger en plus le complexe CMH-Ii vers le compartiment endocyttaire où résident les CMH de classe II^{147, 148}. La chaîne invariante est ensuite dégradée par les diverses protéases telles que les cathepsines S et L présentes dans le compartiment endocyttaire laissant seulement un fragment de la chaîne invariante dans la niche peptidique¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Ce fragment, appelé CLIP (CLass II associated Invariant chain Peptide), est par la suite remplacé par un peptide antigénique.

Cet échange peptidique est facilité par un pH acide, la dégradation protéolytique du fragment CLIP et par une molécule chaperone très similaire au CMH de classe II, HLA-DM (H-2M chez la souris)^{152, 153}. Une autre molécule très similaire au CMH de classe II, la molécule HLA-DO (H-2O chez la souris) est également en mesure de moduler l'échange peptidique au niveau des CMH de classe II. Cependant, cette molécule n'est exprimée que dans les cellules épithéliales thymiques ainsi que dans les lymphocytes B¹⁵⁴. L'activité de HLA-DO est optimale à pH 6, et cette molécule inhibe la fixation des peptides dans les endosomes naissants. À des pH plus acides comme ceux retrouvés dans les endosomes matures, ce sont les molécules HLA-DM qui sont les plus actives. Cette modulation de HLA-DM par HLA-DO permet de modifier le répertoire des peptides antigéniques présentés à la surface des cellules présentatrices^{155, 156}. Cependant, la stimulation par l'interféron- γ lors d'une réponse inflammatoire atténue l'effet de HLA-DO favorisant ainsi la présentation d'antigènes exogènes. Une fois le peptide exogène logé dans la niche peptidique des CMH de classe II, ceux-ci sont exportés à la membrane plasmique afin de pouvoir stimuler les lymphocytes T CD4⁺ (Figure 7). Malheureusement, les mécanismes sous-jacents au transport des CMH de classe II à la membrane plasmique sont encore mal compris. La dégradation de la chaîne invariante et par conséquent du motif de ciblage au compartiment endosomal où résident les CMH de classe II favoriserait leur sortie vers la membrane plasmique. Leur présence à la membrane est contrôlée par des mécanismes d'ubiquitinylation qui favoriseraient l'internalisation des CMH de classe II et leur recyclage au niveau du compartiment endosomal¹⁴⁸. Il est à noter que les antigènes internalisés par phagocytose sont dégradés par les protéases acquises lors de la maturation des phagosomes (par fusion avec le compartiment endosomal) et que les peptides générés dans le phagosome n'ont pas besoin d'atteindre le compartiment endocyttaire où résident les CMH de classe II pour être chargés sur ceux-ci. En effet, le phagosome lors de sa maturation acquiert l'ensemble de la machinerie nécessaire aux chargements antigéniques sur les CMH de classe II¹⁵⁷.

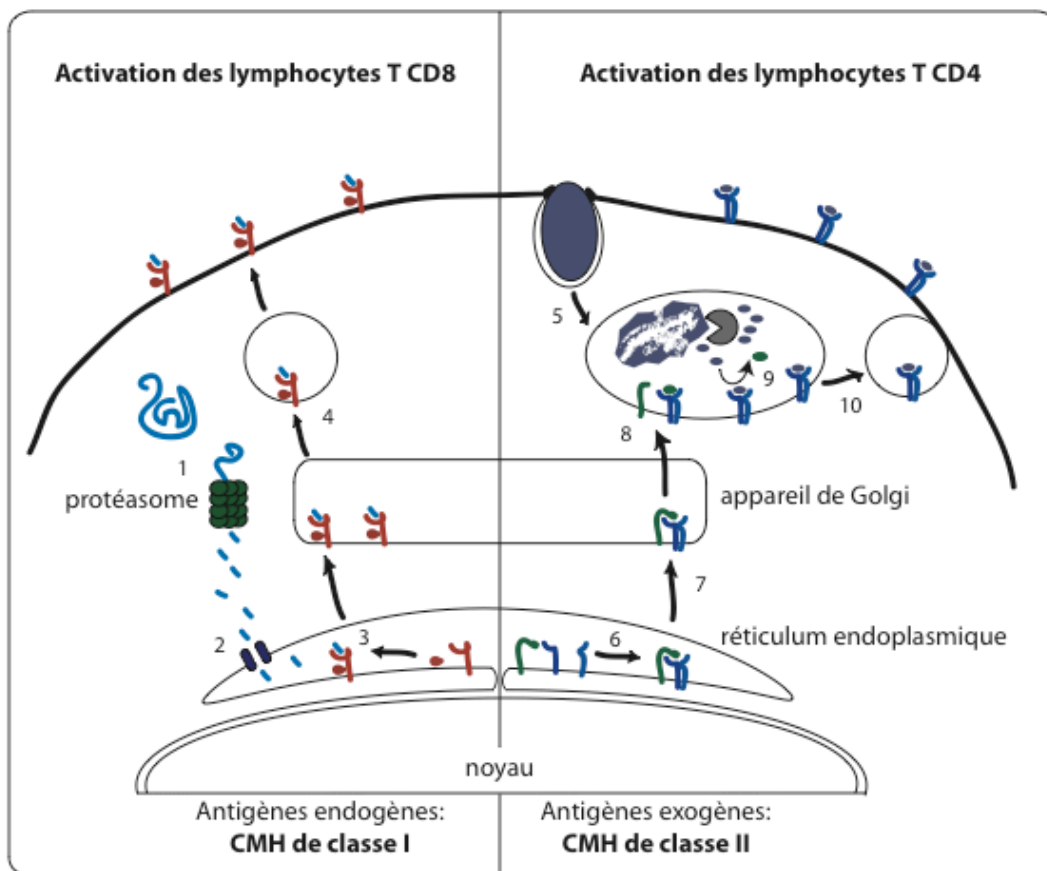


Figure 7. Voies “classiques” d’apprêtement des antigènes menant à la présentation antigénique par les molécules du CMH.

Les antigènes endogènes sont exclusivement présentés sur des molécules du CMH de classe I. Les antigènes intracellulaires sont digérés par le complexe du protéasome dans le cytoplasme (1). Les peptides qui résultent de cette dégradation sont transportés à l’intérieur du réticulum endoplasmique par les transporteurs peptidiques TAP (2) afin d’être chargés sur les molécules du CMH de classe I (3). Les complexes peptide-CMH de classe I sont par la suite exportés à la surface cellulaire par la voie de sécrétion constitutive de la cellule (4). Les antigènes exogènes sont quant à eux exclusivement présentés sur des CMH de classe II. Ceux-ci sont acquis principalement par endocytose ou phagocytose (5). Les deux chaînes constituant les CMH de classe II, synthétisées dans le réticulum endoplasmique, s’associent à la chaîne invariante (6) et sont transportées jusqu’au compartiment endocyttaire (7). La digestion partielle de la chaîne invariante dans le compartiment endocyttaire génère un fragment peptidique (appelé CLIP) dans la niche peptidique des molécules de CMH de classe II (8). Les peptides générés par la dégradation des antigènes exogènes remplacent le peptide CLIP dans la niche peptidique des CMH (9) et

les complexes peptide-CMH de classe II sont alors exportés à la surface cellulaire par les endosomes de recyclage (10). *TAP* : *Transporter associated with Antigen Processing*; *CLIP* : *CLass II-associated Invariant chain Peptide*.

4.4 Voies alternatives menant à la présentation antigénique

Jusqu'à très récemment, les antigènes utilisés pour le chargement peptidique des CMH de classe I et des CMH de classe II étaient considérés comme provenant de sources totalement distinctes. Selon ce paradigme, les peptides liant les molécules du CMH de classe I proviennent d'antigènes endogènes à la cellule alors que les peptides liant les molécules du CMH de classe II proviennent du milieu extracellulaire. Bien que ce paradigme demeure en grande partie valable, il est désormais établi que des peptides originaires du milieu extracellulaire peuvent être présentés par les CMH de classe I par un mécanisme appelé "présentation croisée". Dans le même ordre d'idée, il est également établi que les molécules de CMH de classe II peuvent présenter des peptides issus du milieu intracellulaire. De plus, non seulement la présentation des antigènes peut s'effectuer sur les deux types de CMH, et ce peu importe leur origine, mais il semble également que la machinerie moléculaire d'apprêtement antigénique de la voie dite "classique" de présentation antigénique puisse servir à la fois pour la présentation par les CMH de classe I et de classe II.

4.4.1 La présentation croisée d'antigènes exogènes

Bien que pratiquement toutes les cellules de l'organisme possèdent la voie de présentation via le CMH de classe I, seules les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles telles que les cellules dendritiques et les macrophages possèdent la voie de présentation via le CMH de classe II. Chez ces cellules, l'apprêtement des antigènes intracellulaires peut s'effectuer dans le cytoplasme et le RE afin d'alimenter la voie de présentation des CMH de classe I, alors que l'internalisation d'antigènes

extracellulaires par endocytose ou phagocytose assurent la génération des peptides antigéniques pour la présentation par les CMH de classe II. Selon ce raisonnement, les antigènes viraux exprimés lors d'infections ne pourraient être présentés que par les CMH de classe I et être reconnus par les lymphocytes T CD8⁺, alors que les pathogènes extracellulaires qui sont phagocytés ne seraient uniquement présentés qu'aux lymphocytes T CD4⁺. On voit donc que cette ségrégation des voies d'apprêtement antigénique restreint énormément le répertoire peptidique pouvant être présenté par chaque classe de CMH. L'autre problème majeur associé à la dichotomie des voies de présentation est de taille. En effet, pour que les lymphocytes T CD8⁺ puissent éliminer les cellules infectées par un virus, ils doivent obligatoirement être activés de façon à se différencier de cellules naïves en cellules effectrices cytotoxiques. Seules les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles possèdent les molécules de co-stimulation nécessaires à la stimulation permettant la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs en lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Par conséquent, cela voudrait dire que peu importe le virus infectant l'organisme, les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles devraient "s'infecter" afin de pouvoir activer les lymphocytes T CD8⁺ naïfs. Bien que ce type de sacrifice ait déjà été proposé pour expliquer la capacité des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles à stimuler les lymphocytes T CD8⁺ naïfs lors d'infection virale¹⁵⁸, une autre hypothèse, faisant maintenant consensus, a été préconisée. Cette hypothèse alloue la capacité aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles d'apprêter les antigènes exogènes et de les présenter sur des CMH de classe I par un mécanisme appelé présentation croisée¹⁵⁹. Il est intéressant de constater que les phénomènes de présentation croisée avaient été indirectement observés plusieurs années auparavant dans une étude démontrant la capacité des cellules immunitaires à stimuler les lymphocytes T CD8⁺ à partir d'antigènes exogènes par un mécanisme appelé stimulation croisée¹⁶⁰.

Parmi les premières études ayant soulevé un doute quant à la ségrégation des voies de présentation antigénique, notons celle du groupe de Kaufmann qui observa une

population de lymphocytes T en mesure de lyser les macrophages infectés par le *Mycobacterium leprae*¹⁶¹. Le même groupe a observé que des cellules de Schwann, également infectées par *M. leprae*, et ayant été stimulées par de l'interféron- γ afin de stimuler l'expression des CMH de classe I, pouvaient être détruites par des lymphocytes T cytotoxiques¹⁶². Plus tard, ils ont constaté que ces mêmes cellules de Schwann, lorsque mises en présence d'ovalbumine, étaient lysées par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à l'ovalbumine¹⁶³. Seul un mécanisme permettant la présentation d'antigènes exogènes sur des CMH de classe I pouvait expliquer la capacité des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques à reconnaître et lyser les cellules de Schwann infectées par *M. leprae*. Les bases de ce mécanisme se sont précisées en 1993 lorsque le groupe de Rock démontra que le niveau de présentation de l'ovalbumine extracellulaire par les CMH de classe I était environ 1000 fois supérieur lorsque l'ovalbumine était internalisée par phagocytose¹⁶⁴. Dans la même année, un autre groupe arriva aussi à la conclusion que la phagocytose, de bactérie cette fois, permettait la présentation d'antigènes extracellulaires sur des CMH de classe I¹⁶⁵.

4.4.2 Les voies de la présentation croisée

Suite à la découverte du phénomène de présentation croisée, plusieurs groupes se sont concentrés sur les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans ce mécanisme. Toujours en utilisant l'ovalbumine comme modèle, le groupe de Harding est arrivé à la même conclusion que celui de Rock en démontrant que la phagocytose était beaucoup plus efficace que l'endocytose dans la génération de molécules de CMH de classe I présentant un antigène exogène. Cette équipe a démontré que cette présentation sur les CMH de classe I suite à la phagocytose de l'ovalbumine était insensible à la bréfeldine A, une drogue qui bloque la voie normale de biosynthèse, bloquant ainsi la voie classique de présentation des CMH de classe I. Ils ont proposé une possible régurgitation des peptides générés dans le phagosome à la surface permettant ainsi aux peptides de se fixer aux molécules de CMH de classe I exprimées à

la surface des macrophages¹⁶⁶. Une autre étude du même groupe a permis de soutenir le modèle de la régurgitation en démontrant que la présentation croisée d'antigènes se réalisait en absence d'un rôle actif du protéasome et des molécules de transport peptidique TAP¹⁶⁷. Une extension de ce modèle a même proposé que les peptides se logeant dans les CMH de classe I pouvaient être directement générés à l'extérieur de la cellule suite à l'exocytose des protéases lysosomales¹⁶⁸. Cependant, l'efficacité des protéases lysosomales dans la génération de peptides servant au chargement de CMH de classe I semble moindre que celle du protéasome¹⁶⁹. Ceci n'empêche pas que certaines de ces protéases puissent activement participer à l'apprêtement d'antigènes afin de permettre la présentation croisée¹⁷⁰.

Un deuxième modèle expliquant les mécanismes de présentation croisée a été élaboré suite à la découverte d'une voie permettant le transport des antigènes présents dans le phagosome vers le cytoplasme¹⁷¹. Ces travaux ont permis d'augmenter d'un cran la compréhension des mécanismes moléculaires entourant la présentation croisée. Dans ce modèle, les antigènes sont rétrotransloqués de la lumière du phagosome vers le cytoplasme où la voie classique de présentation antigénique de CMH de classe I pourrait prendre en charge les antigènes et les apprêter correctement pour la présentation par les CMH de classe I. Par conséquent, l'action du protéasome, des transporteurs peptidiques TAP ainsi que le transport de complexes peptide-CMH à travers l'appareil de Golgi est nécessaire pour assurer la présentation des antigènes exogènes. Ce modèle permettait pour la première fois d'établir un lien direct entre la voie vacuolaire normalement réservée aux CMH de classe II et la voie classique de présentation des CMH de classe I. Malheureusement, de nombreuses études comportant des résultats contradictoires sont venues brouiller les cartes. Dans certains cas, il semblait que les molécules de transport peptidique TAP n'étaient pas requises pour la présentation croisée¹⁷²⁻¹⁷⁵, ce qui renforçait le modèle de l'apprêtement vacuolaire/régurgitation. Par contre, d'autres groupes insistaient sur l'utilité des molécules TAP et du protéasome dans la présentation croisée¹⁷⁶⁻¹⁷⁹, ce qui pointait dans

la direction du modèle “phagosome-au-cytosol”. Le même genre de résultats contradictoires sont également survenus dans la voie empruntée par le complexe peptide-CMH pour atteindre la surface cellulaire. Certains prétendent que les complexes n’ont pas besoin de transiter par le Golgi, et dans ce cas la présentation est insensible à la bréfeldine A, ce qui favorise le modèle de la régurgitation^{167, 177}. D’autres, par contre, semblent favoriser un passage de complexes peptide-CMH à travers le Golgi, ce qui renforce le modèle du “phagosome-au-cytosol”^{178, 180}. Ces résultats opposés quant à la sensibilité à la bréfeldine A pourraient s’expliquer en partie par l’état d’activation des cellules utilisées lors des expériences¹⁸¹. En effet, selon ce groupe, la stimulation des récepteurs Toll-like des cellules dendritiques provoquerait une modification des protéines ARF localisées sur le compartiment vacuolaire, le rendant ainsi insensible à la bréfeldine A. Un des résultats les plus intéressants qui supportent le modèle du “phagosome-au-cytosol” provient d’une étude démontrant un rôle essentiel de la rétrotranslocation des peptides antigéniques dans le cytoplasme afin de permettre la présentation croisée¹⁸².

Quoi qu’il en soit, notre compréhension des mécanismes moléculaires permettant aux phagosomes de contribuer à la présentation d’antigènes extracellulaires a fait un bond majeur suite à une étude protéomique du phagosome démontrant la présence de protéines normalement associées au réticulum endoplasmique au niveau des phagosomes¹⁰⁸. Une autre étude, fonctionnelle cette fois-ci, a clairement impliqué le réticulum endoplasmique dans la genèse des phagosomes naissants¹⁰⁹. La contribution du réticulum endoplasmique dans la formation des phagosomes permet donc d’établir un lien direct entre la voie classique de présentation des CMH de classe I et la voie vacuolaire, théoriquement réservée au CMH de classe II. La fonctionnalité des phagosomes dans l’apprêtement des antigènes exogènes menant à la présentation par les CMH de classe I a d’ailleurs été magnifiquement démontrée par trois groupes indépendants¹⁸³⁻¹⁸⁵. L’implication du réticulum endoplasmique dans la genèse du phagosome est devenue la principale explication de la capacité du compartiment

vacuolaire à effectuer de la présentation croisée¹¹². De plus, la capacité du compartiment endosomal à effectuer de la présentation croisée semble également liée à une contribution directe du réticulum endoplasmique¹⁸⁶. Ce transfert de la machinerie moléculaire associée à la voie classique de présentation des CMH de classe I au niveau du compartiment vacuolaire suggère qu'il serait également possible de moduler l'efficacité de la présentation croisée par les mêmes conditions modulant la présentation de la voie classique des CMH de classe I au niveau du RE. Une étude protéomique semble en effet suggérer qu'une stimulation des cellules phagocytaires par l'interféron- γ , une cytokine stimulant fortement la présentation par les CMH de classe I, puisse permettre d'augmenter la présentation croisée chez ces cellules¹⁸⁷. Comme vous le verrez plus loin dans cette thèse, cette hypothèse fut confirmée lors d'une étude protéomique et fonctionnelle portant sur la modulation du phagosome par l'interféron- γ ¹⁸⁸ (voir annexe 1).

4.5 Autophagie et immunité acquise

Bien que traditionnellement la présentation antigénique par les CMH de classe II ait été décrite comme étant réservée aux antigènes exogènes, des études récentes tendent à démontrer le contraire. En effet, l'analyse de peptides élués de molécules de CMH de classe II a révélé qu'une proportion significative (+/- 20%) de ces peptides associés au CMH de classe II provenaient d'antigènes endogènes tant d'origine cytoplasmique que nucléaire¹⁸⁹⁻¹⁹⁴. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent reconnaître ces antigènes cytoplasmiques et nucléaires après leur apprêtement intracellulaire. Cette capacité des lymphocytes T CD4⁺ à reconnaître les peptides endogènes présentés par les molécules du CMH de classe II a, entre autres, été démontrée pour des antigènes viraux de virus tels que celui de l'influenza, d'Epstein Barr, de la rougeole et de l'hépatite C¹⁹⁵⁻¹⁹⁹. La présentation de peptides endogènes sur des molécules de CMH de classe II a également été observée dans des cellules tumorales^{200, 201}. Par conséquent, il semble que des antigènes intracellulaires, normalement localisés hors du compartiment endovacuolaire,

puissent accéder à la voie d'apprêtement des molécules du CMH de classe II et ainsi augmenter la diversité du répertoire peptidique présenté par ces molécules.

Bien que différentes voies aient été proposées pour contribuer à la présentation d'antigènes endogènes par les CMH de classe II, la très grande majorité des études récentes ont identifié l'autophagie comme étant l'élément essentiel à cette présentation^{190, 195, 200, 202-204}. L'antigène EBNA1 du virus Epstein-Barr fut le premier antigène dérivé d'un pathogène dont la présentation par les CMH de classe II a été liée à la macro-autophagie¹⁹⁵. En plus de la macro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperones est également en mesure d'effectuer le transfert d'antigènes intracellulaires vers les vacuoles de chargement de molécules de CMH de classe II²⁰⁴. On voit donc que plus d'une voie peut contribuer à la présentation d'antigènes endogènes par les molécules de CMH de classe II. De plus, il semble que certains antigènes puissent être présentés par les CMH de classe II par une voie dépendante de l'action du protéasome et des molécules TAP²⁰⁵. Ainsi, non seulement diverses formes d'autophagie peuvent contribuer à la présentation d'antigènes endogènes par les CMH de classe II, mais il semble que la machinerie cellulaire jusqu'ici exclusivement réservée à la présentation par les CMH de classe I puisse également y participer. Cependant, le rôle joué par les molécules de transport antigénique TAP dans la présentation d'antigènes intracellulaires par les CMH de classe II demeure quelque peu controversé^{203, 204, 206-209}. Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces résultats soulignent parfaitement toute la diversité des voies métaboliques pouvant être utilisées lors de l'apprêtement d'antigènes endogènes pour la présentation par les molécules de CMH de classe II.

En plus de permettre la présentation d'antigènes endogènes par les CMH de classe II pour stimuler les lymphocytes T CD4⁺, l'autophagie semble également impliquée dans la formation du répertoire lymphocytaire durant la sélection thymique. En effet, l'expression de la protéine Atg5 dans les thymocytes est requise pour une sélection thymique efficace. De plus, l'absence d'expression de Atg5 dans les cellules

thymiques favorise le développement de lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs, indiquant un rôle très probable de l'autophagie dans l'acquisition des mécanisme de tolérance immunitaire face aux auto-antigènes²¹⁰.

4.5.1 Autophagie et présentation par les CMH de classe I

L'apprêtement des antigènes pour leur présentation par les CMH de classe I s'effectue classiquement par le protéasome dans le cytoplasme de la cellule. En effet, le compartiment endovacuolaire est généralement réservé à la présentation par les CMH de classe II. Cependant, cette règle peut être transgressée puisque des antigènes exogènes peuvent être apprêtés dans le compartiment phagosomal et être présentés par les CHM de classe I par un mécanisme appelé présentation croisée^{160, 165}. Par conséquent, l'idée que les autophagosomes puissent, eux aussi, apprêter des antigènes pour la présentation par les CMH de classe I a été soulevée dans de nombreuses revues de la littérature sur le sujet²¹¹⁻²¹³. Cependant, l'implication de l'autophagie dans la présentation d'antigènes intracellulaires par les CMH de classe I restait à démontrer. Certains travaux semblaient même indiquer que l'autophagie n'aurait qu'un rôle très mineur voire inexistant dans l'apprêtement d'antigènes endogènes menant à la présentation antigénique par les CMH de classe I^{195, 200, 203, 214}. Par exemple, l'ajout de 3-méthyladénine, un inhibiteur de l'autophagie, ou encore la suppression d'Atg12, une protéine essentielle à la formation des autophagosomes, ne semblent pas affecter la présentation de certains antigènes intracellulaires issus de lymphocytes B transformés par le virus Epstein-Barr^{195, 203}. De plus, l'incorporation forcée de la protéine MP1 du virus de l'influenza dans les autophagosomes par sa fusion avec le marqueur de l'autophagie LC3 ne semble guère augmenter la présentation de cette protéine virale par les CMH de classe I²¹⁴. Cette même étude a également observé que contrairement au CMH de classe II, les molécules de classe I ne colocalisaient que très marginalement avec le compartiment autophagosomal.

Par contre, plusieurs autres observations suggèrent l'idée inverse indiquant que l'autophagie pourrait jouer un rôle dans la présentation d'antigènes intracellulaires par les molécules du CMH de classe I. Par exemple, il est déjà connu que l'autophagie est impliquée dans l'élimination d'agrégats protéiques ubiquitinylés²¹⁵ et son inhibition provoque l'accumulation de ces agrégats dans le cytoplasme des cellules²¹⁶. La formation de tels agrégats dans les cellules dendritiques, appelés DALIS, est reconnue pour influencer fortement le répertoire peptidique présenté par les molécules de CMH de classe I²¹⁷. Par conséquent, il est tentant d'émettre l'hypothèse que la dégradation de ces agrégats de protéines par l'autophagie générerait les épitopes nécessaires à la présentation par les CMH de classe I.

De nombreux pathogènes, notamment *T. gondii*, *L. monocytogenes* ou encore *M. tuberculosis* sont retrouvés à l'intérieur de compartiments autophagiques. La présentation de peptides provenant de ces pathogènes par les molécules du CMH de classe I et de classe Ib aux lymphocytes T CD8⁺ laisserait entrevoir, encore une fois, un rôle possible de l'autophagie dans la génération des peptides servant à cette présentation²¹¹. Dans le même ordre d'idée, certains types de peptides présents uniquement au niveau des mitochondries sont également présentés par des molécules de CMH de classe Ib. Le rôle de l'autophagie dans l'élimination des mitochondries (appelée mitophagie) étant clairement démontré, on pourrait suggérer que ce type de présentation soit dépendant de l'autophagie²¹¹.

Bien que l'origine de la membrane servant à la formation des autophagosomes soit toujours débattue, plusieurs études suggèrent fortement que le réticulum endoplasmique soit impliqué dans la biogenèse de ces organites^{56, 57} (voir figure 1, annexe 2). Si tel est le cas, les autophagosomes sont donc pourvus de toute la machinerie nécessaire à la présentation par les CMH de classe I. Par ailleurs, non seulement le RE semble être impliqué dans la formation des autophagosomes, mais il semble qu'en situation de stress focalisé au niveau du RE, une partie de celui-ci peut

directement être dégradé par une voie autophagique^{218, 219}. De plus, de nombreux pathogènes tels que *L. pneumonia* et *B. abortus* ont été retrouvés à l'intérieur d'autophagosomes contenant des marqueurs du RE comme SEC61, une protéine pouvant participer à la translocation de peptides antigéniques²²⁰. Ce type de translocation peptidique pourrait ainsi permettre aux peptides de sortir des autophagosomes et d'accéder à la voie "classique" de présentation par les CMH de classe I. Notons que la très grande majorité des travaux ayant impliqué le RE dans la biogenèse des autophagosomes ont été réalisés dans des conditions d'infection bactérienne, virale ou dans des conditions de stress du RE. Étant donné que les infections virales provoquent un stress important au niveau du RE, il n'est pas surprenant d'observer que dans une telle situation une partie du RE puisse servir à la formation des autophagosomes ou être directement la cible des mécanismes d'autophagie. Notons que l'implication du RE dans la formation des phagosomes a également permis d'expliquer, en grande partie, la capacité de ces organites à générer des peptides exogènes pouvant être présentés par les CMH de classe I¹¹².

Jusqu'à maintenant, le lien le plus direct entre l'autophagie et la présentation par les CMH de classe I provient d'études sur la présentation croisée. Une première étude utilisant l'ovalbumine comme antigène modèle a permis de démontrer que la stimulation de l'autophagie dans les cellules donneuses d'antigènes favorise la présentation croisée de l'ovalbumine par les cellules dendritiques (cellules receveuses) aux lymphocytes T CD8⁺. À l'inverse, l'inhibition de l'autophagie dans les cellules donneuses diminue le niveau de présentation croisée de ce même antigène par les cellules receveuses. De plus, le même groupe a également été en mesure d'obtenir des résultats similaires avec l'antigène tumoral gp100²²¹. Étonnamment, l'ajout de chlorure d'ammonium, qui bloque la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, provoque une augmentation du niveau de présentation croisée. Ce résultat semble indiquer que le compartiment autophagolysosomal pourrait complètement dégrader les antigènes et ainsi réduire le niveau de présentation croisée. Une autre étude a également

démontré un lien probable entre l'activation de l'autophagie et la présentation croisée d'antigènes viraux lors de la phagocytose de cellules infectées contenant des autophagosomes²²². Ce groupe a observé lors d'immunisation *in vivo* que les cellules engagées dans un processus autophagique ont une capacité supérieure à induire de la présentation croisée par rapport aux cellules apoptotiques. Cependant, ce même groupe est arrivé à la conclusion que l'augmentation de la présentation croisée était dépendante de deux mécanismes distincts. Le premier est une persistance accrue de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH, et le second mécanisme responsable des effets observés serait la production d'interféron de type I par les cellules dendritiques ayant phagocyté les cellules autophagiques. Par conséquent, il est difficile d'évaluer la contribution directe de l'autophagie par la formation d'autophagosomes et l'apprêtement des antigènes, versus une contribution indirecte relevant davantage de l'action de protéines reliées à l'autophagie mais indépendante de la formation d'autophagosomes.

4.6 Autres voies alternatives de présentation antigénique

De multiples voies de présentation antigénique ont été décrites dans la littérature. Par exemple, la présentation de quelques peptides endogènes par les CMH de classe II, qui en soi constitue une voie alternative, semble dans certains cas nécessiter un apprêtement par la machinerie moléculaire normalement réservée aux CMH de classe I. En effet, il semble que pour quelques peptides présentés par les molécules de classe II, l'action du protéasome ou d'autres protéases cytoplasmiques soit requise^{206, 223}, et même que dans certains cas, cette présentation dépendrait de l'action du transporteur peptidique TAP^{205, 208}. La présentation par le CMH de classe I n'est pas en reste puisque de très nombreuses voies alternatives ont également été décrites. Une de ces études illustre à merveille toute la complexité entourant l'apprêtement antigénique, spécialement lors d'un contexte d'infection virale. En fonction de la méthode utilisée pour exprimer leur protéine d'intérêt, le groupe de Del Val a observé que la présentation

du même peptide pouvait ou non être sensible à la bréfeldine A (une drogue inhibant le transport à travers la voie constitutive de sécrétion)²²⁴. Toujours dans un contexte viral, la présentation de la protéine LMP-2 du virus Epstein Barr semble se faire indépendamment du transporteur peptidique TAP^{129, 225}. Dans le cas de cellules infectées par le virus de Sendai, la présentation de certains peptides serait indépendante des molécules TAP et insensible à l'action de la bréfeldine A^{226, 227}. Ceci ne représente qu'un très bref aperçu des voies alternatives d'apprêtement antigénique observées lors d'infection virale. Il semble donc que contrairement à une condition physiologique, en situation de stress cellulaire tel que lors d'une infection virale, la cellule infectée possède en réserve des voies métaboliques lui permettant de maximiser l'apprêtement antigénique. Ceci permettrait d'assurer un niveau de présentation par les CMH de classe I à son plein potentiel pour ainsi permettre l'élimination des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques. En terminant sur les voies alternatives menant à la présentation par les molécules de CMH de classe I, une étude récente a révélé, encore une fois, toute la complexité des mécanismes mis en place pour contrer les infections virales. Cette étude du groupe de Neefjes a permis de démontrer de façon élégante le transfert de peptides viraux à travers les jonctions communicantes, provoquant ainsi l'élimination des cellules avoisinant une cellule infectée. Selon leur hypothèse, ce mécanisme assurerait l'élimination d'un cordon cellulaire entourant la cellule infectée et ralentirait ainsi la dissémination du virus dans l'organisme²²⁸.

5. Caractéristiques du virus Herpès simplex de type I

Le virus de l'herpès simplex de type I (HSV-1) fait partie de la grande famille virale *Herpesviridae*, qui regroupe plus de huit espèces pouvant infecter l'homme. Cette famille de virus se divise en trois sous-familles, soit alpha, bêta et gamma. La famille du groupe alpha inclut les virus HSV-1, HSV-2 et le virus causant la varicelle, Varicella Zoster. Le plus connu des virus du groupe bêta est le Cytomégalo virus alors que dans le cas de la sous-famille gamma, il s'agit du virus Epstein-Barr causant la mononucléose.

Cependant, peu importe la sous-famille de ces virus, tous comportent un génome d'ADN double brin, une capsidie icosaédrique et une enveloppe lipidique. De plus, ils sont en mesure de causer la lyse de leurs cellules hôtes et de persister sous forme latente dans l'organisme.

5.1 Morphologie du virus HSV-1

La taille de la capsidie virale est d'environ 125 nm, cependant la taille du virion mature fait presque le double, soit de 200 à 250 nm. Il est possible de distinguer quatre éléments différents en microscopie électronique sur les virions matures: une structure centrale essentiellement composée de l'ADN viral, une capsidie virale recouvrant l'ADN, une structure amorphe et plutôt mal définie appelée le tégument qui recouvre la capsidie et finalement une enveloppe lipidique où sont localisées les glycoprotéines virales.²²⁹

5.2 Les glycoprotéines virales

Le génome du virus contient les gènes nécessaires à la production d'au moins dix glycoprotéines dont gB, gC, gD, gE, gH, gI, gL et gM. Neuf de ces glycoprotéines ont été détectées à la surface de l'enveloppe du virus. Parmi ces glycoprotéines, gB joue un rôle primordial dans les mécanismes d'entrée du virus en participant activement à la fusion membranaire²³⁰. À l'instar des glycoprotéines de la cellule hôte, les glycoprotéines virales sont produites par la voie normale de biosynthèse. Suite à leur traduction, celles-ci sont glycosylées dans la lumière du réticulum endoplasmique et transitent alors vers le Golgi. Leur passage dans le Golgi transforme les sucres immatures ajoutés dans le RE en sucres matures et les glycoprotéines sont par la suite triées dans le compartiment trans-golgien²³¹. De plus, certaines des glycoprotéines virales, dont gB, s'accumulent au niveau de l'enveloppe nucléaire et joueraient un rôle dans la sortie des virions lors de leur maturation²³²⁻²³⁴. Cependant, à la différence des

glycoprotéines présentes dans le compartiment trans-golgien, celles présentes au niveau de l'enveloppe nucléaire contiennent des formes immatures de motifs glycosylés. De plus, il est intéressant de noter que la maturation de certaines glycoprotéines virales est influencée par l'activité de la protéine virale ICP34.5, une protéine connue pour son rôle dans le contrôle de l'autophagie^{83, 235}.

5.3 Cycle de l'infection par HSV-1

Malgré les nombreuses études portant sur le cycle de réplication du virus HSV-1, plusieurs interrogations demeurent quant aux étapes requises pour l'obtention de virus matures et infectieux. Sommairement, l'infection débute par la liaison des glycoprotéines virales aux récepteurs membranaires de la cellule hôte. S'ensuit une fusion entre la membrane virale et la membrane plasmique de la cellule hôte. Par la suite, la capsid est internalisée et transportée jusqu'au noyau de la cellule où l'ADN viral est répliqué. C'est également dans le noyau que les nouvelles capsides servant à encapsider l'ADN viral sont assemblées. Ces nouvelles capsides, appelées nucléocapsides, se dirigent ensuite vers le cytoplasme en fusionnant tout d'abord avec la membrane nucléaire interne. Ce faisant, les futurs virions acquièrent une enveloppe lipidique et se retrouvent dans l'espace périnucléaire, lui-même en continuité avec le réticulum endoplasmique. La majorité des études s'entendent sur le fait qu'un deuxième événement de fusion membranaire se produit avec la membrane externe du noyau, libérant ainsi un virus nu dans le cytoplasme²³⁶. Cependant, il a également été proposé que le virion enveloppé présent dans l'espace périnucléaire pouvait poursuivre sa maturation en sortant de cet espace périnucléaire par le réticulum endoplasmique²³⁷. Quoiqu'il en soit, il semble que la majorité des groupes de recherche pointent vers un ré-enveloppement de virus nu présent dans le cytoplasme des cellules infectées au niveau de vacuoles cytoplasmiques dérivées, par exemple, du réseau trans-golgien²³⁸. Finalement, ces virions vont rejoindre l'espace extracellulaire par exocytose via une

fusion avec la membrane plasmique, et les virus ainsi libérés pourront recommencer le cycle infectieux auprès de nouvelles cellules (Figure 8).

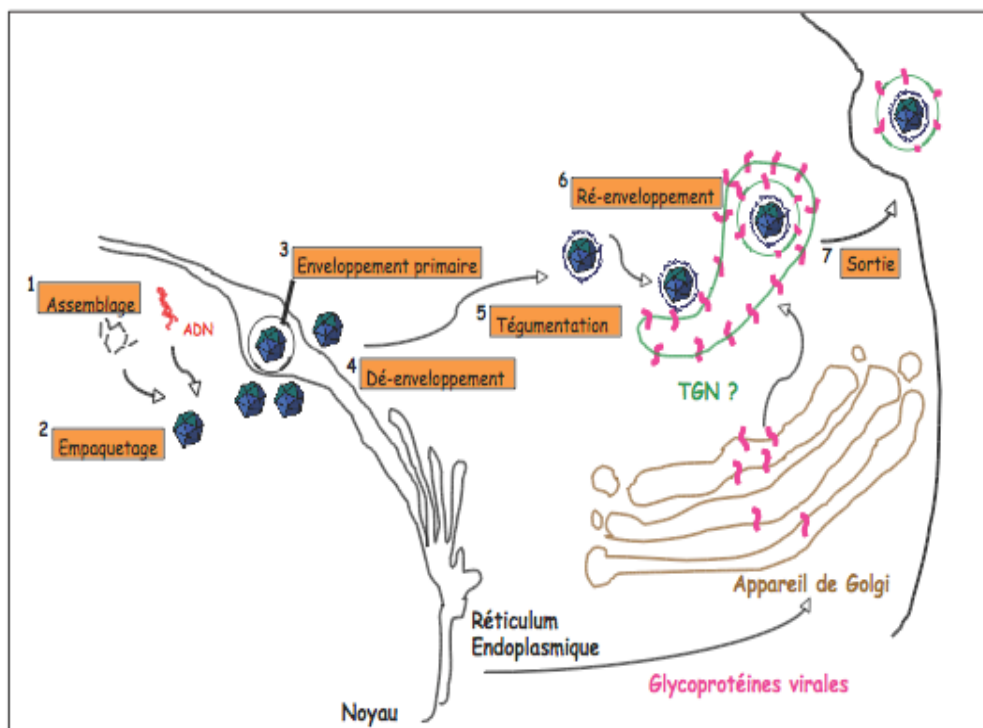


Figure 8. Étapes de maturation menant à la production de virus HSV-1 infectieux.

Suite à l'assemblage de capsid virale dans le noyau (1) et de l'encapsidation de l'ADN viral à l'intérieur de celle-ci (2), une première fusion avec la membrane nucléaire interne permet la relâche de virion enveloppé dans la bicouche de la membrane nucléaire (3). Une seconde fusion permet la relâche de virus nu dans le cytoplasme (4), suivie de l'ajout de protéines formant le téguent (5) ainsi que le ré-enveloppement du virus au niveau trans-golgien (6). Le tout se termine par la relâche dans le milieu extracellulaire de virion infectieux (7) (image: gracieusement de Sophie Turcotte et Roger Lippé).

5.4. Latence et persistance du virus HSV-1

Lors de la primo-infection, le virus HSV-1 infecte généralement les muqueuses, bien qu'en cas de microlésion de la peau d'autres sites d'infection peuvent également être observés. Les premières cellules servant à répliquer le virus sont habituellement les cellules épithéliales composant la partie superficielle de la muqueuse. Cependant, l'infection se répand généralement assez rapidement vers les cellules du tissu

conjonctif, notamment au niveau des fibroblastes. Par la suite, les virions produits lors de l'infection de ces premières cellules infectent les cellules nerveuses environnantes où un transport axonal rétrograde de la capsidie amène celle-ci jusqu'à la racine dorsale du ganglion trijumeau. C'est à cet endroit que la latence virale s'installe, et par conséquent le ganglion trijumeau devient donc un réservoir naturel du virus HSV-1²³⁹. Bien que chez l'homme la transcription des gènes viraux lors de la latence se limite essentiellement aux gènes LAT (Latency-Associated Transcript)²⁴⁰, chez la souris il semble que davantage de gènes soient transcrits^{241, 242}. Lors de la réactivation du virus, généralement provoquée par une condition de stress telle qu'une irradiation aux rayons ultraviolets, une microlésion, de la fatigue ou une co-infection, le virus migre par transport antérograde le long des axones pour atteindre les tissus périphériques des muqueuses ayant servi de site d'entrée du virus lors de la primo-infection^{243, 244}.

5.5 Contrôle de l'infection virale

Bien que les mécanismes entourant la transition entre la phase de latence menant à la réactivation virale soient encore mal connus, les lymphocytes T CD8⁺ joueraient un rôle prépondérant dans le maintien de cette latence virale²⁴⁴⁻²⁴⁷. Les lymphocytes T CD4⁺ permettent également de contrôler l'infection en favorisant le plein développement de la réponse immunitaire à médiation cellulaire effectuée par les lymphocytes T CD8⁺²⁴⁸. Malheureusement, le virus HSV-1 a développé de multiples mécanismes d'évasion immunitaire lui permettant de déjouer le système immunitaire de l'hôte. L'inhibition des molécules de transport peptidique TAP par la protéine virale ICP47 représente un des mécanismes les plus connus provoquant une chute de l'expression des CMH de classe I à la surface des cellules infectées^{249, 250}. La présentation par les CMH de classe II est quant à elle bloquée par la gB qui agit en remplacement de la chaîne invariante, empêchant ainsi la liaison des peptides antigéniques^{251, 252}. Le virus HSV-1 est aussi en mesure de contrer l'action des cellules

NKT (Natural Killer T) en perturbant la présentation par les molécules CD1d²⁵³. En plus d'inhiber la réponse immunitaire adaptative, le virus HSV-1 possède des mécanismes lui permettant de se protéger contre la réponse humorale en fixant les immunoglobulines par leur portion Fc, bloquant ainsi l'action de l'anticorps²⁵⁴. Il possède également plusieurs mécanismes lui permettant de contrecarrer l'immunité innée. Par exemple, il bloque la réponse autophagique afin d'éviter la dégradation des virions⁸³; il inhibe la réponse au stress en bloquant l'action de PKR⁵² et il interfère avec la réponse antivirale médiée par les interférons²⁵⁵⁻²⁵⁷. On comprend donc un peu mieux comment le virus HSV-1 arrive à persister dans l'organisme de l'hôte.

6. Introduction au projet et objectifs du travail

La découverte de voies alternatives permettant de transgresser le dogme établi en immunologie, c'est-à-dire la présentation des antigènes endogènes par les CMH de classe I et celle des antigènes exogènes par les CMH de classe II, a favorisé l'exploration de nouvelles avenues pouvant contribuer à la présentation antigénique par les molécules de CMH. La première de ces voies alternatives, appelée présentation croisée¹⁵⁹, a permis d'établir un rôle de la voie endovacuolaire dans l'apprêtement d'antigènes exogènes menant à la présentation par les CMH de classe I¹⁸³⁻¹⁸⁶. La deuxième voie alternative majeure ayant été décrite est celle induite par la formation d'autophagosomes permettant le transfert d'antigènes endogènes et leur présentation par les CMH de classe II^{190, 195, 200, 203, 204, 214, 258}. Par conséquent, la capacité des compartiments endocyttaire et phagocytaire à apprêter des antigènes exogènes afin de permettre leur présentation sur des CMH de classe I, associée à la capacité des autophagosomes à transférer des antigènes endogènes vers un compartiment endovacuolaire, ont soulevé l'hypothèse que l'autophagie pourrait contribuer à l'établissement d'une voie alternative de présentation par les CMH de classe I. Cette hypothèse était également soutenue par la contribution potentielle du réticulum endoplasmique dans la formation des autophagosomes naissants^{56, 57}. Rappelons que la

contribution du réticulum endoplasmique dans la biogenèse des phagosomes a permis d'expliquer la capacité de ceux-ci à apprêter les antigènes exogènes et à permettre leur présentation par les CMH de classe I¹¹². De plus, il est intéressant de noter que la fonctionnalité des phagosomes quant à la présentation croisée a été en partie attribuée à la présence de la machinerie de rétrotranslocation normalement associée au réticulum endoplasmique¹⁸². La présence d'éléments de translocation membranaire tel que Sec61 sur la membrane des autophagosomes²⁵⁹ laissait encore une fois suggérer que ces organites pourraient être aptes à apprêter des antigènes et permettre leur présentation sur des CMH de classe I.

Par conséquent, l'objectif principal de ce projet était de confirmer ou d'infirmer un lien entre l'autophagie et la présentation par les molécules du CMH de classe I. Un des objectifs secondaires était d'établir un lien entre les événements de trafic membranaire et le transfert d'antigènes intracellulaires vers le compartiment endovacuolaire. Une attention spéciale a été portée sur la membrane du réticulum endoplasmique et la possibilité que des événements de fusion entre ce dernier et le compartiment endovacuolaire puissent non seulement permettre au compartiment endovacuolaire d'acquérir la machinerie de présentation des CMH de classe I, mais pourraient également favoriser le transfert d'antigènes endogènes vers ce compartiment. Finalement, le dernier objectif d'importance dans ce projet était d'étudier l'impact sur la présentation croisée d'antigènes viraux de certaines conditions pathologiques rencontrées lors d'infection virale. Dans ce cas, nous avons concentré nos efforts sur l'effet de l'interféron- γ (une cytokine pro-inflammatoire dont l'action est primordiale lors d'infection virale^{260, 261}) et sur les conditions d'hyperthermie imitant la réponse fébrile fréquemment observée lors d'infection par les virus.

6.1 But et méthodologie

Le but du projet de recherche présenté ici consistait à caractériser l'efficacité des voies d'apprêtement antigénique menant à la présentation d'antigènes viraux par les molécules de CMH de classe I, soit lors d'une infection par le virus HSV-1 soit lors de la phagocytose de celui-ci. Nous avons choisi le virus HSV-1 comme modèle d'étude pour plusieurs motifs. Tout d'abord, ce virus entre dans la cellule principalement par fusion avec la membrane plasmique et devient, par conséquent, un excellent modèle d'antigènes intracellulaires. De plus, le virus HSV-1 possède plusieurs mécanismes lui permettant d'échapper au système immunitaire, notamment la possibilité d'inhiber la formation d'autophagosomes^{52, 53, 83}. La disponibilité d'un virus mutant (Leib, D.A. manuscrit en préparation) incapable d'inhiber l'autophagie nous a donc permis de mieux caractériser l'influence de celle-ci sur la présentation antigénique par les CMH de classe I. Finalement, le virus HSV-1 est un virus enveloppé comportant de nombreuses glycoprotéines produites au niveau du réticulum endoplasmique. En suivant ces glycoprotéines, il nous a été possible d'étudier les phénomènes de trafic membranaire impliquant le réticulum endoplasmique. De plus, la disponibilité d'un virus HSV-1 exprimant la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) en fusion avec la protéine de la capsidie a simplifié le suivi des infections en plus de faciliter l'étude des événements de trafic membranaire.

L'ensemble des expériences d'infection virale (ou de phagocytose de virus) réalisées dans ce projet a été effectuée avec une lignée cellulaire de macrophages (BMA) provenant de souris exprimant l'allèle de CMH de classe I H-2K^b. Le choix de macrophages comme modèle expérimental s'explique par deux principaux facteurs. Premièrement, les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles avec une grande capacité phagocytaire, ce qui nous a permis de les utiliser pour effectuer l'étude de la présentation croisée du virus HSV-1. Deuxièmement, les macrophages jouent un rôle important dans la réponse immunitaire

lors d'infection par le virus HSV-1^{262, 263}. Par conséquent, leur utilisation *in vitro* comme modèle de cellules présentatrices dans notre étude pouvait nous aider à mieux comprendre leur fonction *in vivo*. De plus, la disponibilité d'une lignée de cellules T CD8⁺ (hybridome HSV-2.3.2E2) reconnaissant spécifiquement la séquence peptidique gB₄₉₈₋₅₀₅ (de la glycoprotéine B de HSV-1) lorsque ce peptide est présenté par les molécules de CMH de classe I de l'allèle H-2K^b nous a permis de suivre la présentation antigénique au cours de l'infection par HSV-1 ou lors des expériences de présentation croisée²⁶⁴. Finalement, la production de β -galactosidase de façon proportionnelle à la stimulation du TCR de ces cellules T a grandement facilité la quantification du niveau de stimulation de ces cellules.

Chapitre II:

Résultats

7. Article I

Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection

Luc English¹, Magali Chemali¹, Johanne Duron¹, Christiane Rondeau¹, Annie Laplante¹, Diane Gingras¹, Diane Alexander², David Leib², Christopher Norbury³, Roger Lippé¹ & Michel Desjardins^{1,4,5}

Nature Immunology, 2009 May;10(5):480-7.

Résumé

Les protéines virales exprimées par les cellules hôtes lors d'une infection sont habituellement apprêtées dans le cytoplasme par le protéasome pour être exprimées à la surface cellulaire par la voie "classique" de présentation antigénique des CMH de classe I. Notre étude montre qu'en effet, les macrophages infectés par le virus de l'Herpès Simplex type 1 stimulent initialement les lymphocytes T CD8⁺ par l'intermédiaire de la voie "classique" de présentation antigénique. Cependant, nos résultats indiquent qu'une deuxième voie "vacuolaire" d'apprêtement des antigènes viraux est déclenchée au cours de la phase tardive de l'infection. Des analyses morphologiques et fonctionnelles montrent que cette voie "vacuolaire" comporte deux formes distinctes d'autophagie, dont une nouvelle forme impliquant la formation d'autophagosomes par un processus d'enroulement de l'enveloppe nucléaire. De plus, notre étude montre qu'il est possible de stimuler la voie "vacuolaire" et ainsi augmenter le niveau de présentation antigénique lors d'une infection virale en utilisant des conditions d'hyperthermie ou des cytokines pyrogènes telles que l'IL-1 β . Enfin, nous montrons que les peptides viraux apprêtés dans les autophagosomes accèdent à la voie "classique" de présentation des CMH de classe I, mettant en évidence la complexité des interactions moléculaires intervenant entre les machineries cellulaires associées à l'immunité innée et acquise.

Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection

Luc English¹, Magali Chemali¹, Johanne Duron¹, Christiane Rondeau¹, Annie Laplante¹, Diane Gingras¹, Diane Alexander², David Leib², Christopher Norbury³, Roger Lippé¹ & Michel Desjardins^{1,4,5}

1. Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada.

2. Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA.

3. Department of Microbiology and Immunology, Pennsylvania State University, Milton S. Hershey College of Medicine, Hershey, Pennsylvania, USA.

4. Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada.

5. Caprion Pharmaceuticals, Montréal, Québec, Canada.

Received 23 December 2008; Accepted 12 February 2009; Published online 22 March 2009.

Nature Immunology, 2009 May;10(5):480-7.

7.1 Abstract

Viral proteins are usually processed by the 'classical' major histocompatibility complex (MHC) class I presentation pathway. Here we showed that although macrophages infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) initially stimulated CD8⁺ T cells by this pathway, a second pathway involving a vacuolar compartment was triggered later during infection. Morphological and functional analyses indicated that distinct forms of autophagy facilitated the presentation of HSV-1 antigens on MHC class I molecules. One form of autophagy involved a previously unknown type of autophagosome that originated from the nuclear envelope. Whereas interferon- γ stimulated classical MHC class I presentation, fever-like hyperthermia and the pyrogenic cytokine interleukin 1 β activated autophagy and the vacuolar processing of viral peptides. Viral peptides in autophagosomes were further processed by the proteasome, which suggests a complex interaction between the vacuolar and MHC class I presentation pathways.

7.2 Introduction

The elaboration of an efficient immune response against pathogens involves complex intracellular antigen-processing events. Endogenous antigens such as viral proteins synthesized by infected host cells are degraded in the cytoplasm by the proteasome, and the resulting peptides are translocated into the endoplasmic reticulum, where they are loaded onto major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. In contrast, exogenous antigens are processed by hydrolases in lytic endovacuolar compartments and are loaded on MHC class II molecules that reach the cell surface using recycling machineries associated with these organelles. Although initially thought to be strictly segregated, these pathways are actually functionally interconnected, as shown by the ability of cells to present exogenous antigens on MHC class I molecules; this process is referred to as 'cross-presentation'¹.

Autophagy, a process that allows the transfer of endogenous cellular components into lytic vacuolar compartments, has been shown to be essential to both innate and adaptive immunity^{2,3,4}. This process can be used to eliminate intracellular bacteria and viruses^{5, 6, 7, 8, 9, 10, 11}. Furthermore, autophagy can facilitate the presentation of endogenous antigens on MHC class II molecules, thereby leading to activation of CD4⁺ T cells^{12, 13}. The nature of the endovacuolar membranes involved in the formation of autophagosomes is still a matter of active investigation, but the endoplasmic reticulum is one potential source of autophagosome membrane¹⁴. As substantial amounts of viral membrane glycoproteins are synthesized in the endoplasmic reticulum of infected cells, it is likely that some of these antigens will reach lytic vacuolar organelles during autophagy. Despite the fact that several reports have demonstrated that antigens generated in the lumen of phagosomes can be loaded (or 'cross-presented') on MHC class I molecules and trigger a CD8⁺ T cell response^{15, 16, 17}, it is not known whether a similar process could occur after autophagy. Here we provide evidence that infection of macrophages with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) triggered a vacuolar response

that increased the presentation of a peptide of HSV-1 glycoprotein B (gB) to CD8⁺ T cells on MHC class I molecules. This vacuolar response, linked to autophagy, could be modulated by various cytokines and stress conditions.

7.3 Results

7.3.1 Two phases of MHC class I presentation

Incubation of BMA3.1A7 (called 'BMA' here) macrophages with HSV-1 expressing a green fluorescent protein (GFP)-tagged capsid protein (K26-GFP) resulted in the infection of about 35% of the cells, as determined by flow cytometry (data not shown). Fluorescence microscopy showed that K26-GFP capsids assembled in the nucleus of infected cells at about 6–8 h after infection, reaching a maximum at about 12 h after infection (data not shown). Starting at 6 h after infection, infected macrophages stimulated a CD8⁺ T cell hybridoma specific for a peptide of amino acids 498–505 of HSV-1 gB^{18, 19}, as measured by the release of beta-galactosidase after T cell activation (Fig. 1a). The capacity of macrophages to stimulate CD8⁺ T cells continued to increase up to 12 h after infection, the time at which cellular mortality induced by the viral infection began to occur (data not shown). This macrophage cell death probably explains the decrease in CD8⁺ T cell stimulation between 12 h and 14 h after infection (Fig. 1a).

Stimulation of the CD8⁺ T cell hybridoma was much lower after treatment of macrophages with the proteasome inhibitor MG-132 or with brefeldin A, a drug that inhibits the transport of molecules through the biosynthetic pathway (Fig. 1b). These results indicate that processing and presentation of the viral antigen gB in infected macrophages involves the 'classical' endogenous pathway of MHC class I presentation. However, bafilomycin A, a drug that inhibits the vacuolar proton pump and the acidification of endosomes and lysosomes, had only a minimal effect during the early period of infection (up to 8 h after infection) but strongly inhibited the capacity of infected macrophages to stimulate CD8⁺ T cells at 10 h and 12 h after infection (Fig. 1c). These results suggest that the initial processing of endogenous gB by the classical

pathway is followed by the engagement of a vacuolar pathway that considerably improves the processing of gB and the activation of CD8⁺ T cells. The possibility of a contribution by a vacuolar pathway was supported by immunofluorescence analyses that indicated that endogenous gB localized together with the endo-lysosomal marker LAMP-1 during infection (Fig. 1d). The possibility of the presence of gB in degradative compartments was further supported by the finding of higher gB expression in infected macrophages treated with bafilomycin (data not shown). These results raised the issue of how gB reaches the lysosomal degradative pathway. The possibility of transfer of gB to lysosomes through phagocytosis of infected cells (cross-presentation) was ruled out by results showing that incubation of H-2b BMA macrophages together with HSV-1-infected H-2d J774 macrophages did not result in activation of the H-2b-specific CD8⁺ T cell hybridoma (Fig. 1e). Hence, vacuolar processing of gB in the later period of infection was more likely to involve membrane-trafficking events that occurred exclusively in the infected cell.

Data have shown that endogenous viral proteins can be presented on MHC class II molecules by a process involving autophagy⁹, which indicates that trafficking events that enable the transport of endogenous proteins to vacuolar degradative organelles can occur in virus-infected cells. To determine if autophagy was involved in the late processing of endogenous gB and its presentation on MHC class I molecules, we first monitored the presence of LC3, a marker of autophagy, in macrophages at various times after infection (Fig. 2a). Although we did not detect it in uninfected cells, we found LC3 beginning at 4–6 h after infection, which indicated that an autophagic response occurred during the late phase of HSV-1 infection in macrophages. Whereas the inhibitory effect of bafilomycin indicated that a vacuolar response of some kind was triggered during the late phase of infection in macrophages (Fig. 1c), the possibility of a contribution of autophagy to this process was suggested by the substantial inhibition of the CD8⁺ T cell-stimulatory capacity of macrophages treated with 3-methyladenine, a commonly used inhibitor of autophagy (Fig. 2b). Confirmation of the involvement of autophagy in

the processing and presentation of gB peptides on MHC class I molecules was provided by experiments involving small interfering RNA (siRNA)-mediated silencing of Atg5, a protein involved in the formation of autophagosomes²⁰. Macrophages treated with a control siRNA had a greater capacity to stimulate CD8⁺ T cells between 8 h and 12 h after infection, but macrophages treated with Atg5-specific siRNA did not (Fig. 2c), which linked this late gain in stimulation to the induction of autophagy.

Further support for the idea that autophagy contributes to the vacuolar processing and presentation of gB on MHC class I molecules was provided by results indicating that treatment of infected macrophages with rapamycin, an inhibitor of the kinase mTOR that stimulates autophagy²¹, considerably improved CD8⁺ T cell stimulation (Fig. 2d). We obtained similar results with macrophages exposed to a mild heat shock before infection (39 °C for 12 h), a condition also known to induce autophagy²² (Fig. 2d). The enhanced CD8⁺ T cell stimulation induced by mTOR or heat shock was abolished by the addition of bafilomycin (Fig. 2e). These data further link the vacuolar processing of gB to autophagy. We obtained similar results with mouse embryonic fibroblasts isolated from Atg5^{-/-} mice²⁰ (Supplementary Fig. 1a). Silencing of Atg5 in infected macrophages with siRNA abolished the effect of rapamycin (Fig. 2f), which confirmed the specificity of this drug for the autophagic pathway. Similarly, neither bafilomycin (Supplementary Fig. 1c,d) nor 3-methyladenine (data not shown) affected the capacity of infected macrophages to stimulate CD8⁺ T cells when autophagy was inhibited by silencing of Atg5. Our results so far indicated that a vacuolar pathway linked to autophagy, triggered within 8–10 h of infection, enhanced the ability of infected macrophages to stimulate gB-specific CD8⁺ T cells.

7.3.2 Late-stage autophagy involving the nuclear envelope

To study the autophagic response associated with HSV-1 infection in macrophages, we used immunofluorescence and electron microscopy. We first analyzed

the induction of autophagy by assessing the autophagic marker LC3. We noted a weak signal for LC3 in uninfected macrophages (Fig. 3a), but uninfected cells submitted to a mild heat shock (Fig. 3b) or treated with rapamycin (Fig. 3c) had strong punctate LC3 signals in the cytoplasm. In contrast, there was a strong LC3 signal in close association with the nuclear envelope in cells 6–8 h after HSV-1 infection (Fig. 3d,e). In many cases, vesicles strongly labeled for LC3 seemed to be connected to the nuclear envelope. The colocalization of LC3 and gB suggested that autophagic structures containing viral proteins might originate in the vicinity of the nucleus at a late phase of infection. The difference between the typical labeling noted when autophagy was triggered by rapamycin and that in infected cells might be linked to the fact that HSV-1 infection has been shown to inhibit macroautophagy²³.

The accumulation of LC3 around the nucleus was possibly associated with a cellular process distinct from classical macroautophagy and induced as a late response to infection. To test that hypothesis, we compared the distribution of gB and LC3 in macrophages infected with wild type HSV-1 and a mutant HSV-1 lacking the ICP34.5 protein (Δ 34.5); unlike the wild-type virus, this mutant virus is unable to inhibit macroautophagy. As expected, the Δ 34.5 virus failed to express any detectable ICP34.5 protein (data not shown). In addition, consistent with the ability of ICP34.5 to mediate dephosphorylation of the translation-initiation factor eIF2 α ²⁴, the Δ 34.5 virus induced more phosphorylated eIF2 α than did wild-type HSV-1 (data not shown). Macrophages infected with the Δ 34.5 virus showed considerable accumulation of LC3 on vesicular structures, which also contained large amounts of gB and were present throughout the cytoplasm (Fig. 3e). We found no apparent labeling for LC3 in the vicinity of the nuclear envelope. In contrast, infection with the corresponding wild-type virus (strain 17+) led to the accumulation of LC3 near the nuclear envelope between 6 h and 8 h after infection (Fig. 3e); these results are in agreement with results obtained with the KOS wild-type strain (Fig. 3d). These findings collectively suggested that distinct types of autophagic structures were induced in response to the Δ 34.5 and wild

type viruses. Macrophages infected with $\Delta 34.5$ or wild-type HSV-1 (at an identical multiplicity of infection) were able to stimulate gB-specific CD8⁺ T cells to a similar extent (Fig. 3f). However, the expression of HSV-1 proteins (Fig. 3g) and gB (Fig. 3h) was much lower in macrophages infected with the $\Delta 34.5$ virus, in agreement with published studies^{25,26}. Thus, macrophages infected with the $\Delta 34.5$ virus stimulated gB-specific CD8⁺ T cells much more efficiently. Bafilomycin strongly inhibited the stimulatory ability of macrophages infected with either $\Delta 34.5$ or wild-type HSV-1 (Fig. 3i), which emphasizes the involvement of a vacuolar pathway in both cases.

To characterize the autophagosomal structures induced during the late phase of infection, we used electron microscopy for detailed morphological analysis (Fig. 4 and Supplementary Fig. 2). We noted two types of prominent structures in infected cells. The first was characterized by the presence of double-membraned structures reminiscent of the morphology of autophagosomes found in cells treated with rapamycin (Supplementary Fig. 1a). These structures often surrounded viral particles in the cytoplasm (Supplementary Fig. 1b). The degradation of microbial invaders by autophagy has been described before and is referred to as 'xenophagy'²⁷. These structures showed substantial labeling for LC3 and, to a lesser extent, for gB (Supplementary Fig. 1c,d), which confirmed the presence of viral proteins in autophagosomes. The second type of organelle had multiple membranes either connected to the nuclear envelope or present in the cytoplasm (Fig. 4a,e). These structures seemed to emerge through a coiling process of the inner and outer nuclear membrane, forming four-layered structures that engulfed part of the nearby cytoplasm (Fig. 4b,c). In several examples, similar structures containing cytoplasm and unenveloped viral capsids seemed to be disconnected from the nucleus (Fig. 4d). These structures were not present in uninfected or rapamycin-treated cells (Supplementary Fig. 1e). However, there were more two- and four-membraned structures in infected macrophages at the late phase of infection (Supplementary Fig. 1e,f). To determine whether the four-layered membrane structures present in the cytoplasm were similar to

those that emerged from the nuclear envelope, we used electron microscopy to locate the product of the enzyme glucose-6-phosphatase, a specific marker of the endoplasmic reticulum and nuclear envelope. The results indicated that the product of glucose-6-phosphatase was restricted to the endoplasmic reticulum and nuclear envelope (Fig. 4e). The four-layered membrane structures connected to the nuclear envelope, as well as those present in the cytoplasm, were also positive for glucose-6-phosphatase (Fig. 4f), which confirmed their origin in the endoplasmic reticulum and/or nuclear envelope.

To determine whether the four-layered membrane structures had features of autophagosomes, we used immunoelectron microscopy to detect the autophagosome marker LC3. We found accumulation of LC3 on membrane structures emerging from the nuclear envelope, as well as on four-layered membrane structures apparently disconnected from the nucleus and present in the cytoplasm (Fig. 5a,b). The association between LC3 and the membrane of autophagosomes indicated that our antibody recognized the LC3-II cleaved form of the protein²⁸. Quantitative analysis of the immunolabeling for LC3 showed there was an average (\pm s.e.m.) of 3.03 \pm 0.47 gold particles per μm membrane on autophagosomes, compared with 0.15 \pm 0.02 and 0.70 \pm 0.15 gold particles per μm membrane for the plasma membrane and nuclear membrane, respectively. We also found gB on the membrane of the nuclear envelope (data not shown), as well as on the four-layered membrane structures (Fig. 5c). The ability of these structures to fuse with lytic organelles was confirmed by the presence of bovine serum albumin–gold particles, transferred from lysosomes, in these structures (Fig. 5d). These data collectively confirm the autophagosomal nature of the four-layered membrane structures originating from the nuclear envelope.

7.3.3 Cytokines engage classical and vacuolar responses

Treatment of macrophages with the proinflammatory cytokine interferon- γ (IFN- γ) stimulates the clearance of mycobacteria by a process involving autophagy⁶.

Therefore, we tested whether this cytokine might promote the vacuolar processing of gB and improve the ability of HSV-1-infected macrophages to stimulate CD8⁺T cells. As heat treatment of macrophages stimulated autophagy, we also tested the potential effect of the pyrogenic cytokine interleukin 1 β (IL-1 β). IFN- γ considerably enhanced the ability of HSV-1-infected macrophages to stimulate CD8⁺ T cells (Fig. 6a). IL-1 β and mild heat-shock treatment also augmented the stimulatory capacity of macrophages (Fig. 6a). Notably, staining with dansylcadaverin, a marker of autophagy, was greater after exposure to mild heat shock or IL-1 β but not after treatment with IFN- γ (Fig. 6b). Electron microscopy also showed that cells stimulated with heat shock or IL-1 β had more autophagosomes (data not shown). These results suggest that the enhanced ability of macrophages to stimulate CD8⁺ T cells after treatment with mild heat shock or IL-1 β was linked to the contribution of a vacuolar pathway related to autophagy. We confirmed that hypothesis by showing that treatment of IL-1 β or heat shock-treated macrophages with either 3-methyladenine, the inhibitor of autophagy, or bafilomycin, the inhibitor of the vacuolar proton pump, resulted in a much lower capacity of macrophages to stimulate CD8⁺ T cells than that of control cells (Fig. 6c–e). In contrast, the very strong stimulation of CD8⁺ T cells induced by infected macrophages kept at 37 °C or treated with IFN- γ was not strongly affected by 3-methyladenine or bafilomycin and therefore was not due to vacuolar processing (Fig. 6c,f). Confirmation that autophagy did not contribute to the stimulatory effect of IFN- γ was provided by experiments showing that this cytokine enhanced the capacity of infected embryonic fibroblasts isolated from wild-type and Atg5^{-/-} mice to stimulate CD8⁺ T cells (Supplementary Fig. 2a). However, the stimulatory effect induced by IL-1 β and mild heat shock was completely abolished by brefeldin A and MG-132 (Fig. 6d,e). The effect of these two inhibitors of the 'classical' pathway of MHC class I presentation indicated a close interaction occurring between this pathway and the vacuolar pathway in the processing of gB (Supplementary Fig. 3).

7.4 Discussion

One of the main components of the complex cell-entry 'machinery' of herpes viruses is gB²⁹. This transmembrane protein of the viral envelope is synthesized in the endoplasmic reticulum of infected cells. In agreement with published work¹⁸, we found that gB was expressed within 2 h after infection in BMA macrophages and was present in the perinuclear region of infected cells. gB can also accumulate in the inner membrane as well as the outer membrane of the nuclear envelope^{30, 31}. Our results indicated that the processing of gB by infected macrophages has two distinct phases. During the first phase, which occurs 6–8 h after infection, gB is processed mainly by the classical pathway of MHC class I presentation, which involves proteasome-mediated degradation and transport steps through the biosynthetic apparatus. During the second phase of infection, which occurs 8–12 h after infection, a vacuolar pathway is triggered and contributes substantially to the capacity of infected macrophages to stimulate CD8⁺ T cells. The cellular trafficking events that enable the transport of gB in the lysosomal degradative pathway are poorly understood. We were able to rule out the possibility of a contribution by a cross-presentation pathway involving the phagocytosis of infected cells by neighboring macrophages, which emphasized the fact that gB reaches the vacuolar processing pathway by an endogenous route. Instead, our results indicated the involvement of autophagy in facilitating the processing and presentation of endogenous viral peptides on MHC class I molecules.

Our findings may seem to contradict earlier reports indicating that HSV-1 inhibits macroautophagy²³; this inhibition is key to the neurovirulence of the virus¹¹. However, a closer look at infected macrophages suggests that a form of autophagy distinct from macroautophagy is triggered. Macroautophagy can be induced in a variety of cells by mild heat shock or treatment with the mTOR inhibitor rapamycin^{21, 22}. In uninfected macrophages, these conditions induced throughout the cytoplasm the formation of

autophagosomes with a double-membraned structure. In contrast, HSV-1-infected macrophages had two types of structures. In addition to the double-membraned structures, four-layered membrane structures that emerged from the nuclear envelope and accumulated in the cytoplasm at around 8 hours after infection were present in most infected macrophages. We did not find such structures in uninfected cells treated with rapamycin, which suggested that they arose from a specific host response to HSV-1 infection distinct from macroautophagy. Although four-layered membrane structures have been reported before in the cytoplasm of HSV-1-infected mouse embryonic fibroblasts²⁵, the autophagosomal nature of those structures was not documented. Here we have shown that these four-layered membrane structures were 'decorated' with LC3, a protein that is key to the formation of autophagosomes²⁸, and that these structures fused with lysosomes filled with bovine serum albumin–gold, thereby generating an environment suitable for the hydrolytic degradation of gB.

We conclude that the ability of HSV-1 to inhibit macroautophagy early after infection, and thus to potentially limit the presentation of viral peptides, is counterbalanced by a host response involving the induction of a previously unknown autophagy pathway at a later time after infection. Our conclusion is supported by the results obtained with the $\Delta 34.5$ mutant virus. Macrophages infected with this mutant were able to trigger a strong immune response, like macrophages infected with wild-type viruses. Although the apparent magnitude of activation of CD8⁺ T cells induced by wild-type and $\Delta 34.5$ viruses was similar, the quantity of gB and viral proteins expressed in $\Delta 34.5$ -infected cells was much lower than that in macrophages infected with wild-type HSV-1. Macrophages infected with either $\Delta 34.5$ or wild-type HSV-1 engaged strong vacuolar responses. The distinct localization of LC3 to autophagosomes in the cytoplasm in macrophages infected with $\Delta 34.5$ virus, in contrast to its localization to the nuclear membrane in macrophages infected with wild-type virus, indicates that both types of autophagic responses can participate in the processing of viral proteins for presentation on MHC class I molecules.

It has been reported that IFN- γ stimulates autophagy and the clearance of mycobacteria in macrophages³. In our studies, IFN- γ had no substantial effect on the induction of autophagy, a discrepancy that might be explained by the cell type and/or concentration of the cytokine used for stimulation³². Nevertheless, IFN- γ -treated macrophages were much more efficient at stimulating CD8⁺ T cells after HSV-1 infection. As cotreatment with bafilomycin or 3-methyladenine had no effect on this IFN- γ -induced stimulatory capacity, we conclude that vacuolar processing and autophagy were not essential to the response induced by IFN- γ . The stimulatory effect of IFN- γ on antigen presentation is well established. This cytokine upregulates assembly of the immunoproteasome³³ and stimulates expression of TAP1, the transporter associated with antigen presentation³⁴, two key components of the classical MHC class I presentation pathway. Therefore, it was not unexpected to find strong inhibition of the stimulation of CD8⁺ T cells when we treated IFN- γ -stimulated macrophages with MG-132 and BFA. In contrast, the IL-1 β -induced improvement in the ability of infected macrophages to stimulate CD8⁺ T cells was inhibited considerably by 3-methyladenine and bafilomycin, which confirmed the contribution of autophagy to this process.

The similarity in the results obtained with IL-1 β and mild heat-shock treatment suggests that IL-1 β induces a cellular response similar to the one that occurs during fever-like conditions. Indeed, IL-1 β is well known for its ability to induce fever³⁵. Tumor necrosis factor, a second pyrogenic cytokine, also stimulated autophagy and the vacuolar processing of gB in our system (data not shown). These results suggest that the stress induced during fever conditions or after stimulation with pyrogenic cytokines triggers defense mechanisms, promoting more-efficient processing of viral antigens in vacuolar organelles. Notably, cytomegalovirus, a member of the herpesviridae family, can block signaling by IL-1 β and tumor necrosis factor during the early phase of infection³⁶, a process that might protect the virus by inhibiting the induction of antigen processing through a vacuolar response.

Our results showing that lytic organelles associated with the processing of antigens for presentation on MHC class II molecules¹² participated in the presentation of endogenous viral peptides on MHC class I molecules emphasize the dynamic cooperation between the 'classical' and 'vacuolar' pathways of antigen presentation. This close interaction is further emphasized by results showing that even in conditions in which vacuolar processing contributes to most of the viral antigen processing, such as after IL-1 β or heat-shock stimulation, MG-132 and BFA still had a strong inhibitory effect. These results support a model in which the vacuolar processing of viral proteins in autophagosomes is followed by processing by the proteasome and peptide loading onto MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. The molecular mechanisms that enable the transfer of viral peptides from autophagosomes to proteasomes in the cytoplasm are unknown. A similar transport step has been shown to take place on phagosomes³⁷. Although the molecular 'machines' that enable these translocation events have not been identified, it has been proposed that endoplasmic reticulum translocons such as Sec61 and/or derlin-1 could be involved^{16, 17, 38}. Although the nature of the endomembranes involved in the formation of autophagosomes during macroautophagy is still a matter of debate, our results have shown that the nuclear envelope, made of endoplasmic reticulum, is the membrane used to form the gB-enriched autophagosomes with four-layered membranes in HSV-1-infected macrophages. The endoplasmic reticulum has been shown to participate in a form of autophagy in yeasts referred to as 'ER-phagy'¹⁴. Whether this process is homologous with the nuclear envelope-derived autophagic process documented here remains to be investigated. Published studies have shown that viruses take advantage of macroautophagy to find refuge in organelles, where they freely assemble³⁹. Our results indicate that autophagy can also benefit the host by providing an additional pathway for the degradation of endogenous viral proteins for antigen presentation.

7.5 Methods

7.5.1 Cells, viruses, antibodies and reagents.

The BMA3.1A7 macrophage cell line was derived from C57BL/6 mice as described³⁷ and was cultured in complete DMEM (10% (vol/vol) FCS, penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml)). The mouse macrophage cell line J774 was from American Type Culture Collection. The beta-galactosidase-inducible HSV gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma HSV-2.3.2E2 (provided by W. Heath, University of Melbourne) was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 5% (vol/vol) FCS, glutamine (2 mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml), the aminoglycoside G418 (0.5 mg/ml) and hygromycin B (100 µg/ml). The HSV-1 K26-GFP mutant (strain KOS), carrying a GFP-tagged capsid protein VP26, was provided by P. Desai⁴⁰. The ICP34.5-null virus D34.5 was constructed by a strategy similar to that used to make the null mutant 17termA41. A 3,333-base pair DpnII fragment containing the gene encoding ICP34.5 with a nonsense mutation inserted at the sequence encoding the amino acid at position 30 was transfected into Vero cells together with infectious DNA from HSV-1 strain 17²⁵. Individual plaques resulting from this transfection were screened by PCR amplification, followed by screening by SpeI digestion. After three rounds of plaque purification, viral stock was generated from which infectious DNA was prepared and 'marker rescue' was done. The ICP34.5-null Δ34.5 virus was characterized by immunoblot analysis for ICP34.5 and phosphorylated eIF2alpha as described²⁵. Primary antibodies used were as follows: rabbit polyclonal antibody to LC3a (anti-LC3a; AP1801a; Abgent), rabbit polyclonal anti-LC3b (AP1802a; Abgent), rabbit polyclonal antibody to cleaved LC3b (AP1806a; Abgent), mouse monoclonal anti-gB (M612449; Fitzgerald), rat anti-LAMP-1 (1D4B; Developmental Studies Hybridoma Bank), rabbit polyclonal anti-Atg5 (NB-110-53818; Novus Biologicals), mouse monoclonal anti-tubulin (B-5-1-2; Sigma) and rabbit polyclonal anti-HSV (RB-1425-A; Neomarkers). The secondary antibodies Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit, Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-mouse and Alexa Fluor 488-conjugated

goat anti-mouse were from Invitrogen. Brefeldin A, bafilomycin A, MG-132, 3-methyladenine and rapamicyn were from Sigma.

7.5.2 Heat shock, cytokine treatment and infection.

For heat-shock treatment, macrophages (1×10^5 cells per well in 24-well plates) were incubated for 12 h at 39 °C, followed by a recovery period of 2 h at 37 °C before infection. The cytokines IL-1 β (5 ng/ml; R&D Systems) and IFN- γ (200 U/ml; PBL) were added 18–24 h before infection and were kept in the medium during viral infection. Macrophages were infected by incubation for 30 min with virus at a multiplicity of infection of 10. Cells were then washed and were incubated in fresh medium for a total of 8 h unless indicated otherwise. Drugs were added to the medium from 2 h after infection until the end of infection at the following concentrations: brefeldin A, 5 μ g/ml; bafilomycin A, 0.5 μ M; MG-132, 5 μ M; 3-methyladenine, 10 mM; and rapamicyn, 10 μ g/ml.

7.5.3 CD8⁺ T cell hybridoma assay.

Mock- or HSV-1-infected macrophages (2×10^5) were washed in Dulbecco's PBS and were fixed for 10 min at 23 °C with 1% (wt/vol) paraformaldehyde, followed by three washes in complete DMEM. Antigen-presenting cells were then cultured for 12 h at 37 °C together with 4 times 10^5 HSV-2.3.2E2 cells (the beta-galactosidase-inducible, gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma) for analysis of the activation of T cells. Cells were then washed in Dulbecco's PBS and lysed (0.125 M Tris base, 0.01 M cyclohexane diaminotetraacetic acid, 50% (vol/vol) glycerol, 0.025% (vol/vol) Triton X-100 and 0.003 M dithiothreitol, pH 7.8). A beta-galactosidase substrate buffer (0.001 M MgSO₄ x 7 H₂O, 0.01 M KCl, 0.39 M NaH₂PO₄ x H₂O, 0.6 M Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 100 mM 2-mercaptoethanol and 0.15 mM chlorophenol red beta-D-galactopyranoside, pH 7.8)

was added for 2–4 h at 37 °C. Cleavage of the chromogenic substrate chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside was quantified in a spectrophotometer as absorbance at 595 nm.

7.5.4 Immunofluorescence and dansylcadaverin labeling.

For immunofluorescence analysis, control, treated and/or infected macrophages were fixed and made permeable with a Cytotfix/Cytoperm kit according to the manufacturer's recommendations (BD Biosciences). Cells were then incubated for 60 min at 25 °C with anti-LC3, anti-gB or anti-LAMP-1. For analysis of infection with HSV-1 K26-GFP, infected cells were visualized by detection of GFP fluorescence at 488 nm. Cells were analyzed with a confocal laser-scanning microscope (LSM 510Meta Axiovert; Carl Zeiss) or standard Axiophot fluorescent microscope (Zeiss) or by flow cytometry with a FACSCalibur (BD). For labeling with dansylcadaverin (Sigma), macrophages left untreated or exposed to IL-1 β , IFN- γ or mild heat shock were infected for 8 h and then stained for 15 min at 37 °C with 50 μ M dansylcadaverin. Cells were then washed in Dulbecco's PBS and were lysed in 200 μ l lysis buffer (described above). Total fluorescence was quantified with a SpectraMax Gemini electron microscopy spectrophotometer (excitation, 380 nm; emission, 525 nm).

7.5.5 Electron microscopy

For morphological analysis, cells were fixed in 2.5% (vol/vol) glutaraldehyde and were embedded in Epon (Mecalab). Glucose-6-phosphatase was detected by electron microscopy cytochemistry as described⁴². For immunocytochemistry after embedding, cells were fixed in 1% (vol/vol) glutaraldehyde and were embedded at -20 °C in Lowicryl (Canemco). Lowicryl ultrathin sections were incubated overnight with antibodies and were visualized by 60 min of incubation with protein A–gold complex (10 nm). Rabbit anti-LC3 and mouse anti-gB were used at dilution of 1:10.

7.5.6 Analysis with siRNA.

Control siRNA (nontargeting; siCONTROL) and siRNA specific for mouse Atg5 (L-064838-00-0005; ON-TARGETplus SMARTpool) were from Dharmacon. Cells were transfected with 100 nM siRNA using the DermaFECT 4 siRNA transfection reagent according to the manufacturer's recommendations (Dharmacon). After 24 h, transfection medium was replaced by complete medium.

7.6 Acknowledgments

We thank J. Thibodeau and C. Perreault for critical reading of the manuscript; K. Rock (University of Massachusetts Medical School) for BMA cells; W. Heath (University of Melbourne) for the HSV-2.3.2E2 hybridoma; G. Arthur (University of Manitoba) for the wild-type and *Atg5*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts produced by N. Mizushima (Medical and Dental University, Tokyo); P. Desai (Johns Hopkins University) for the HSV-1 K26-GFP mutant; and M. Bendayan for assistance with electron microscopy. Supported by the Canadian Institutes for Health Research (R.L. and M.D.), the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (L.E.), Fonds de la Recherche en Santé du Québec (L.E.), the US National Institutes of Health (EY09083) and Research to Prevent Blindness (D.L.)

7.7 Author Contributions

L.E. planned and did most of the experiments and actively participated in writing the manuscript; M.C. did the experiments with mouse embryonic fibroblasts; J.D. maintained viral stocks; C.R. did the technical work for Epon electron microscopy; A.L. provided technical assistance for immunoblot analysis and immunofluorescence; D.G. did the immunogold labeling and morphological quantification; D.A. and D.L. produced the ICP34.5 HSV-1 mutant; C.N. participated in the planning and development of the antigen-presentation assay and provided help in writing the manuscript; R.L. provided HSV-1 virus stocks and expertise with the infection system and helped write the manuscript; and M.D. planned and directed the work and wrote the manuscript.

Competing interests statement

The authors declare competing financial interests.

7.8 References

1. Bevan, M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143, 1283–1288 (1976).
2. Deretic, V. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 26, 523–528 (2005).
3. Levine, B. & Deretic, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 767–777 (2007).
4. Schmid, D. & Munz, C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* 27, 11–21 (2007).
5. Andrade, R.M., Wessendarp, M., Gubbels, M.J., Striepen, B. & Subauste, C.S. CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J. Clin. Invest.* 116, 2366–2377 (2006).
6. Gutierrez, M.G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753–766 (2004).
7. Ling, Y.M. et al. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of Toxoplasma gondii in primed effector macrophages. *J. Exp. Med.* 203, 2063–2071 (2006).
8. Nakagawa, I. et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* 306, 1037–1040 (2004).
9. Ogawa, M. et al. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* 307, 727–731 (2005).
10. Liu, Y. et al. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121, 567–577 (2005).
11. Orvedahl, A. et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1, 23–35 (2007).

12. Paludan, C. et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307, 593–596 (2005).
13. Dengjel, J. et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7922–7927 (2005).
14. Bernales, S., Schuck, S. & Walter, P. ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 3, 285–287 (2007).
15. Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12889–12894 (2003).
16. Houde, M. et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402–406 (2003).
17. Guermonprez, P. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397–402 (2003).
18. Mueller, S.N. et al. The early expression of glycoprotein B from herpes simplex virus can be detected by antigen-specific CD8⁺ T cells. *J. Virol.* 77, 2445–2451 (2003).
19. Mueller, S.N., Jones, C.M., Smith, C.M., Heath, W.R. & Carbone, F.R. Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J. Exp. Med.* 195, 651–656 (2002).
20. Kuma, A. et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032–1036 (2004).
21. Noda, T. & Ohsumi, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963–3966 (1998).
22. Komata, T. et al. Mild heat shock induces autophagic growth arrest, but not apoptosis in U251-MG and U87-MG human malignant glioma cells. *J. Neurooncol.* 68, 101–111 (2004).
23. Talloczy, Z. et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 190–195 (2002).

24. He, B., Gross, M. & Roizman, B. The gamma134.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 843–848 (1997).
25. Alexander, D.E., Ward, S.L., Mizushima, N., Levine, B. & Leib, D.A. Analysis of the role of autophagy in replication of herpes simplex virus in cell culture. *J. Virol.* 81, 12128–12134 (2007).
26. Talloczy, Z., Virgin, H.W. IV. & Levine, B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* 2, 24–29 (2006).
27. Levine, B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120, 159–162 (2005).
28. Kabeya, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728 (2000).
29. Heldwein, E.E. et al. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313, 217–220 (2006).
30. Stannard, L.M., Himmelhoch, S. & Wynchank, S. Intra-nuclear localization of two envelope proteins, gB and gD, of herpes simplex virus. *Arch. Virol.* 141, 505–524 (1996).
31. Farnsworth, A. et al. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10187–10192 (2007).
32. Khalkhali-Ellis, Z. et al. IFN-gamma regulation of vacuolar pH, cathepsin D processing and autophagy in mammary epithelial cells. *J. Cell. Biochem.* 105, 208–218 (2008).
33. Griffin, T.A. et al. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J. Exp. Med.* 187, 97–104 (1998).

34. Epperson, D.E. et al. Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J. Immunol.* 149, 3297–3301 (1992).
35. Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C. & Bartfai, T. Cytokines and fever. *Front. Biosci.* 9, 1433–1449 (2004).
36. Jarvis, M.A. et al. Human cytomegalovirus attenuates interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha proinflammatory signaling by inhibition of NF-kappaB activation. *J. Virol.* 80, 5588–5598 (2006).
37. Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243–246 (1995).
38. Ackerman, A.L., Giodini, A. & Cresswell, P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25, 607–617 (2006).
39. Jackson, W.T. et al. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3, e156 (2005).
40. Desai, P. & Person, S. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J. Virol.* 72, 7563–7568 (1998).
41. Bolovan, C.A., Sawtell, N.M. & Thompson, R.L. ICP34.5 mutants of herpes simplex virus type 1 strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. *J. Virol.* 68, 48–55 (1994).
42. Griffiths, G., Quinn, P. & Warren, G. Dissection of the Golgi complex. I. Monensin inhibits the transport of viral membrane proteins from medial to trans Golgi cisternae in baby hamster kidney cells infected with Semliki Forest virus. *J. Cell Biol.* 96, 835–850 (1983).

7.9 Figure legend

Figure 1: A vacuolar pathway participates in the processing of endogenous viral proteins for presentation on MHC class I molecules. (a) Activation of the gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma (which expresses beta-galactosidase as an indicator of T cell activation) by macrophages infected for various times (horizontal axis) with HSV-1, then incubated for 12 h at 37 °C with the hybridoma. A595, absorbance at 595 nm. (b) Activation of the hybridoma as described in a, with the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO; negative control), bafilomycin A (Baf), brefeldin A (BFA) or MG-132 at 2 h after macrophage infection. (c) Activation of the hybridoma as described in a, with the addition of bafilomycin A at 2 h after macrophage infection. (d) Immunofluorescence microscopy of gB (blue) and LAMP-1 (red) in HSV-1-infected macrophages; pink indicates colocalization. Original magnification, 40X. (e) CD8⁺ T cell-stimulatory capacity (as described in a) of uninfected macrophages (Mock), of BMA (BMA-HSV) or J774 (J774-HSV) macrophages infected for 8 h with HSV-1, and of cocultures of J774 macrophages (H-2d) infected for 1 h with HSV-1, then mixed with uninfected BMA (H-2b) macrophages at a ratio of 1:1 and cultured together for 8 h (J774-HSV + BMA). Results in **b,c,e** are normalized to results obtained for CD8⁺ T cells stimulated with macrophages treated with DMSO (**b,c**) or infected BMA macrophages (**e**) and are presented in arbitrary units. Data are from one representative of three independent experiments (mean and s.d. of triplicate samples; **a**), are from three independent experiments (mean and s.e.m. of triplicate samples error bars; **b,c,e**) or are representative of three independent experiments (**d**).

Figure 2: Autophagy induced during HSV-1 infection contributes to the processing and presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules. (a) Immunofluorescence microscopy of LC3 expression in macrophages infected for 2–8 h (left margin) with HSV-1. Original magnification, times 20. **(b)** Activation of the gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma (described in Fig. 1a) by macrophages infected for various times (horizontal axis) with HSV-1, with (DMEM + 3-MA) or without (DMEM) the addition of 3-methyladenine 2 h after infection, then incubated for 12 h at 37 °C with the hybridoma. **(c)** Activation of the hybridoma (as described in b) by macrophages transfected for 60 h with control (Ctrl) siRNA or Atg5-specific siRNA, then infected for 8 h or 12 h with HSV-1. **(d)** Immunoblot analysis of Atg-5 in siRNA-treated macrophages. **(e)** Activation of the hybridoma (as described in b) by macrophages infected with HSV-1 and incubated at 37 °C (Basal), incubated for 12 h at 39 °C before being infected with HSV-1 (heat shock (HS)), or treated with rapamycin during HSV-1 infection (Rapa), with (+ Baf) or without the addition of bafilmycin A at 2 h after infection. **(f)** Activation of the hybridoma (as described in b) by macrophages transfected for 60 h with control siRNA or Atg5-specific siRNA, then infected for 8 h with HSV-1, with (+) or without (-) the addition of rapamycin at 2 h after infection. Results in **b,c,e,f** are normalized to results obtained for CD8⁺ T cells stimulated with macrophages infected for 8 h at 37 °C without further treatment (**b,e**) or infected macrophages treated with control siRNA (**c,f**) and are presented in arbitrary units. Data are representative of three independent experiments (**a,d**) or are from three independent experiments (mean and s.e.m. of triplicate samples; **b,c,e,f**).

Figure 3: Both gB and LC3 accumulate in perinuclear regions during HSV-1 infection. (a–c) Immunofluorescence microscopy of uninfected macrophages incubated at 37 °C (control; a), subjected to mild heat shock (b) or treated with rapamycin (c), then stained with anti-LC3. (d) Immunofluorescence microscopy of the expression of LC3, gB and GFP (VP26) by macrophages infected for various times (left margin) with HSV-1. White indicates colocalization. (e) Immunofluorescence microscopy of macrophages infected for 6 h or 8 h (left margin) with wild-type HSV-1 (WT) or HSV-1 lacking ICP34.5 (Δ 34.5). Blue, staining of nuclei with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). Original magnification, 100X (a–c) or 63X (d, e). Results in a–e are representative of three independent experiments. (f) Activation of the gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma (as described in Fig. 1a) by macrophages infected for various times (horizontal axis) with wild-type HSV-1 strain 17+ (WT 17+) or Δ 34.5 HSV-1. Data are from three independent experiments (mean and s.e.m. of triplicate samples). (g,h) Immunoblot analysis (IB; g) and flow cytometry (h) of the expression of HSV-1 proteins (g) and gB (h) in macrophages infected for various times (above lanes (g) or plots (h)) with wild-type or Δ 34.5 HSV-1. Ctrl, control (uninfected BMA macrophages; h). Data are representative of two (g) or three (h) independent experiments. (i) Activation of the gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma (as described in Fig. 1a) by macrophages infected for various times (below graph) with wild-type or Δ 34.5 HSV-1, with (+) or without (–) the addition of bafilomycin A at 2 h after infection. Results in f,i are normalized to results obtained for CD8⁺ T cells stimulated with macrophages infected for 6 h with wild-type virus (f) or with infected macrophages incubated without bafilomycin (i) and are presented in arbitrary units. Data are from three independent experiments (mean and s.e.m. of triplicate samples).

Figure 4: HSV-1 induces the formation of autophagosome-like structures from the nuclear envelopes of infected macrophages. Electron microscopy of macrophages 10 h after infection with HSV-1. **(a)** Arrows indicate membrane-coiled structures emerging from the nucleus of an infected cell. **(b–d)** Four-layered membrane structures formed by coiling of the nuclear membrane. **(e,f)** Glucose-6-phosphatase (black deposits) on autophagosome-like structures emerging from the nuclear envelope or free in the cytoplasm, and viral capsids in the cytoplasm engulfed in the lumen of an autophagosome-like compartment. N, nucleus; VP, viral particles. Scale bars, 1 μm **(a)**, 0.25 μm **(b–d,f)** or 0.4 μm **(e)**. Images are representative of three independent experiments with at least 100 cell profiles in each.

Figure 5: The four-layered membrane structures that emerge from the nuclear envelope have autophagosome-like features. Immunoelectron microscopy of macrophages 10 h after infection with HSV-1. **(a–c)** Accumulation of LC3 **(a,b)** and gB **(c)**. **(d)** Fusion of four-layered membrane structures and lysosomes preloaded with bovine serum albumin–gold (BSA-gold; black dots). Original magnification, 54,800X **(a,b)**, 69,000X **(c)** or 38,000X **(d)**. Images are representative of three **(a–c)** or two **(d)** independent experiments.

Figure 6: Involvement of lytic vacuolar compartments in the processing and presentation of endogenous antigens on MHC class I molecules after treatment with proinflammatory cytokines. (a) Activation of the gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma (as described in Fig. 1a) by macrophages exposed to DMSO (negative control), mild heat shock, IL-1 β or IFN- γ . **(b)** Dansylcadaverin staining of untreated macrophages (Basal) or macrophages exposed to mild heat shock, IFN- γ or IL-1 β and infected for 8 h with wild-type HSV-1, normalized to the signal obtained in basal conditions and presented in arbitrary units. **(c–f)** Activation of the gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma (as described in Fig. 1a) by macrophages incubated at 37 °C **(c)** or exposed to mild heat shock **(d)**, IL-1 β **(e)** or IFN- γ **(f)** and infected for 8 h with wild-type HSV-1 with the addition of DMSO (negative control), 3-methyladenine, bafilomycin, brefeldin A or MG-132 at 2 h after infection. Results in **a,c–f** are normalized to results obtained for CD8⁺ T cells stimulated with macrophages incubated with DMSO in each condition and are presented in arbitrary units. Data are from three independent experiments (mean and s.e.m. of triplicate samples).

Supplementary Figure 1. Increase in autophagosomes formation during the late phase of infection. **(a)** Macrophages were treated with rapamycin and analyzed by electron microscopy. Black arrows, double-membrane structures constituting ‘classical’ autophagosomes. **(b-d)** Macrophages were infected with wild-type HSV-1 for 10 h and were analyzed by electron microscopy micrographs. Left, pre-autophagosomal structures surrounding HSV-1 capsids. Right, autophagosomal structures interacting with electron-dense lysosomal compartments. **(c,d)** Viral gB **(c)** and cellular LC3 **(d)** were detected by immuno-electron microscopy. **(e,f)** Quantification of the number of nuclear derived autophagosomes **(e)** or ‘classical’ autophagosomes **(f)** in uninfected macrophages, uninfected rapamycin-treated macrophages, and macrophages infected for the indicated time periods with wild-type HSV-1. **(a,b,c,d)** Images are representative of observations made in three independent experiments. **(e,f)** Error bars, s.e.m. Data are mean of samples from three independent experiments.

Supplementary Figure 2. Atg5-dependent contribution of autophagy in MHC class I presentation. **(a)** Wild-type or *Atg5*^{-/-} murine embryonic fibroblasts (MEFs) were incubated at 37°C or 39°C, with or without IFN- γ , prior to infection with wild-type HSV-1. Where indicated bafilomycin (Baf) or rapamycin (Rapa) was added 2 h (Baf) or 1 h (Rapa) after infection. MEFs were then incubated with the gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma, which expresses LacZ as an indicator for T cell receptor activation, for 12 h at 37°C. LacZ expression was measured. Dashed line depicts the detection limit ($A_{595} = 0.1$). **(b)** MEFs were treated with IFN- γ (200 U/ml, 18 h) and expression of TAP-1 was measured by immunoblot. Representative of two independent experiments. **(c,d)** BMA3.1 macrophages were transfected with control siRNA or *Atg5*-specific siRNA for 60 h, after which they were infected with wild-type HSV-1 for the indicated time periods. Bafilomycin (Baf) was added, where indicated, 2 h after infection. CD8⁺ T cell activation was measured as in (a). CD8⁺ T cell activation was shown in arbitrary units and was normalized to the signal obtained with macrophages transfected with control siRNA, infected with HSV-1 (8 h) and treated with DMSO. **(a,c,d)** Error bars, s.e.m. Data are mean of triplicate samples from three independent experiments.

Supplementary Figure 3. Participation of autophagy in the vacuolar processing of endogenous viral proteins. Our working model proposes that HSV-1 gB is processed through the classical MHC class I presentation pathway during the first few hours after infection in macrophages. This process involves degradation by the proteasome (1), translocation of peptides into the ER (2), and transport of loaded MHC class I molecules to the cell surface (3). During the later phase of infection, gB is processed via a vacuolar pathway that involves the formation of LC3-expressing autophagosome-like structures from the coiling of the nuclear envelope where viral gB is enriched (4), together with the formation of LC3⁺ conventional autophagosomes (5). These structures can fuse with lysosomes to form autophagolysosomes where gB is partly degraded by hydrolases (6). The ER nature of the autophagosomal organelles is likely to provide molecules enabling the translocation of gB peptides from the lumen of autophagolysosomes to the cytoplasm (7). These peptides are then handled by the classical pathway, as described in steps 2 and 3. PAS, pre-autophagosomal structure.

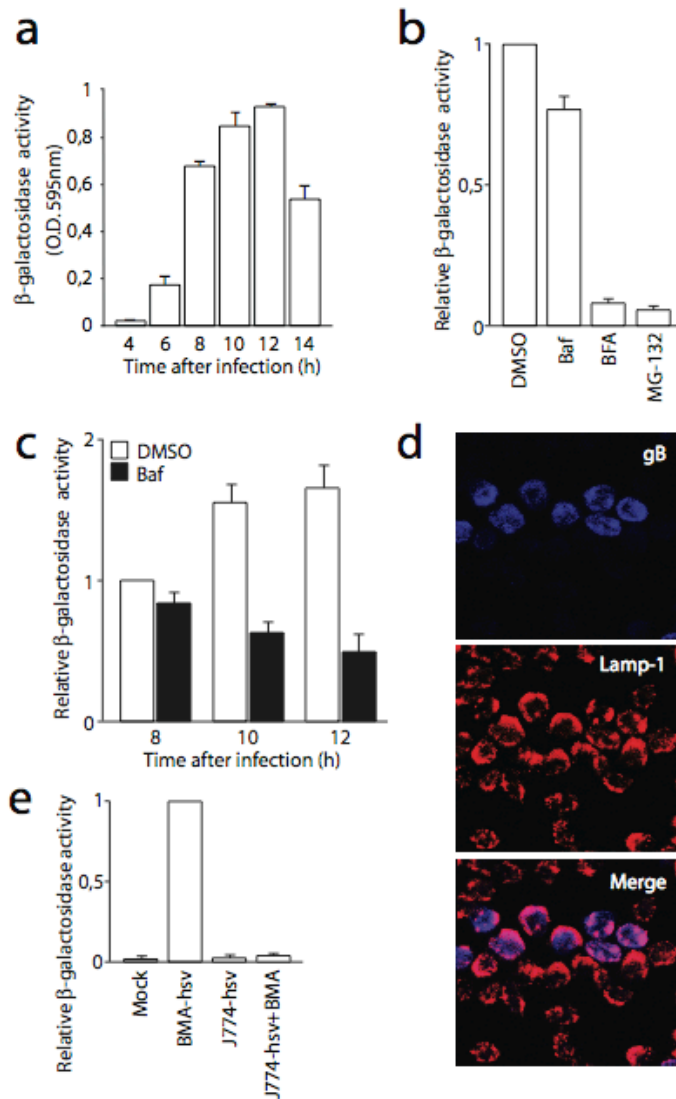


Figure 1 : A vacuolar pathway participates in the processing of endogenous viral proteins for presentation on MHC class I molecules.

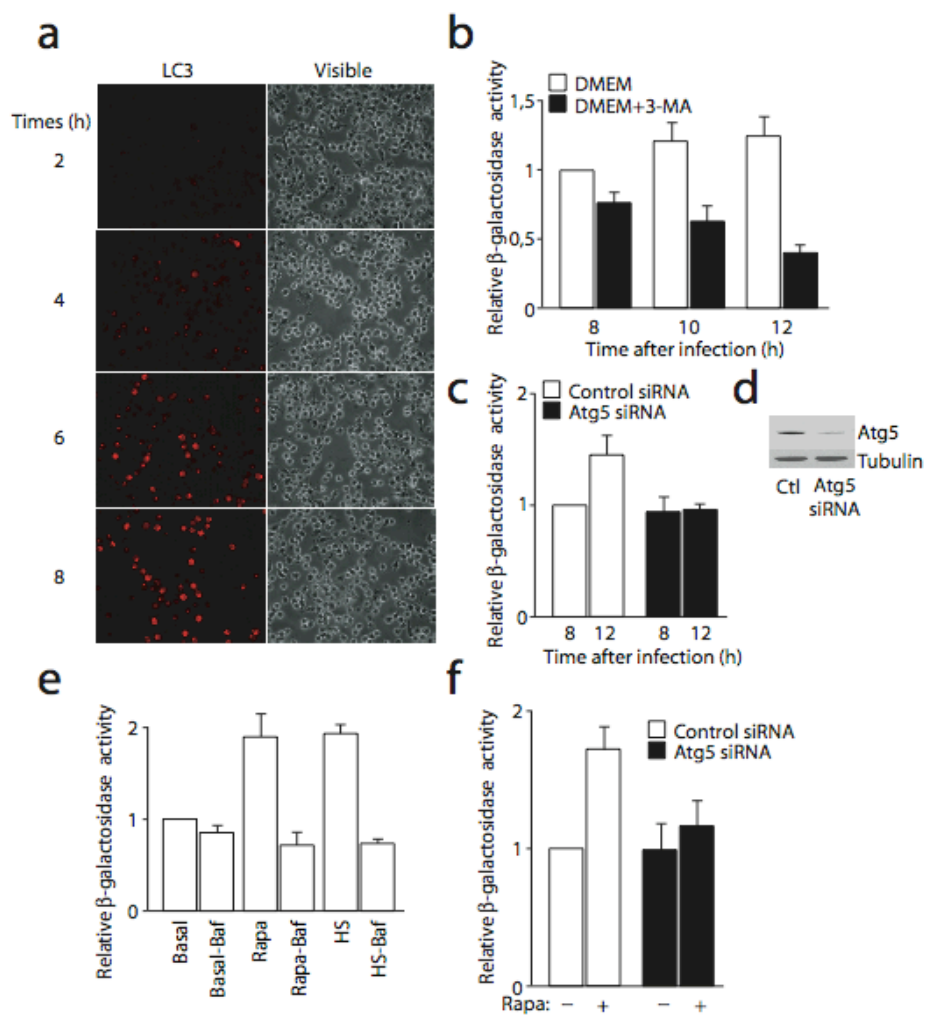


Figure 2 : Autophagy induced during HSV-1 infection contributes to the processing and presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules.

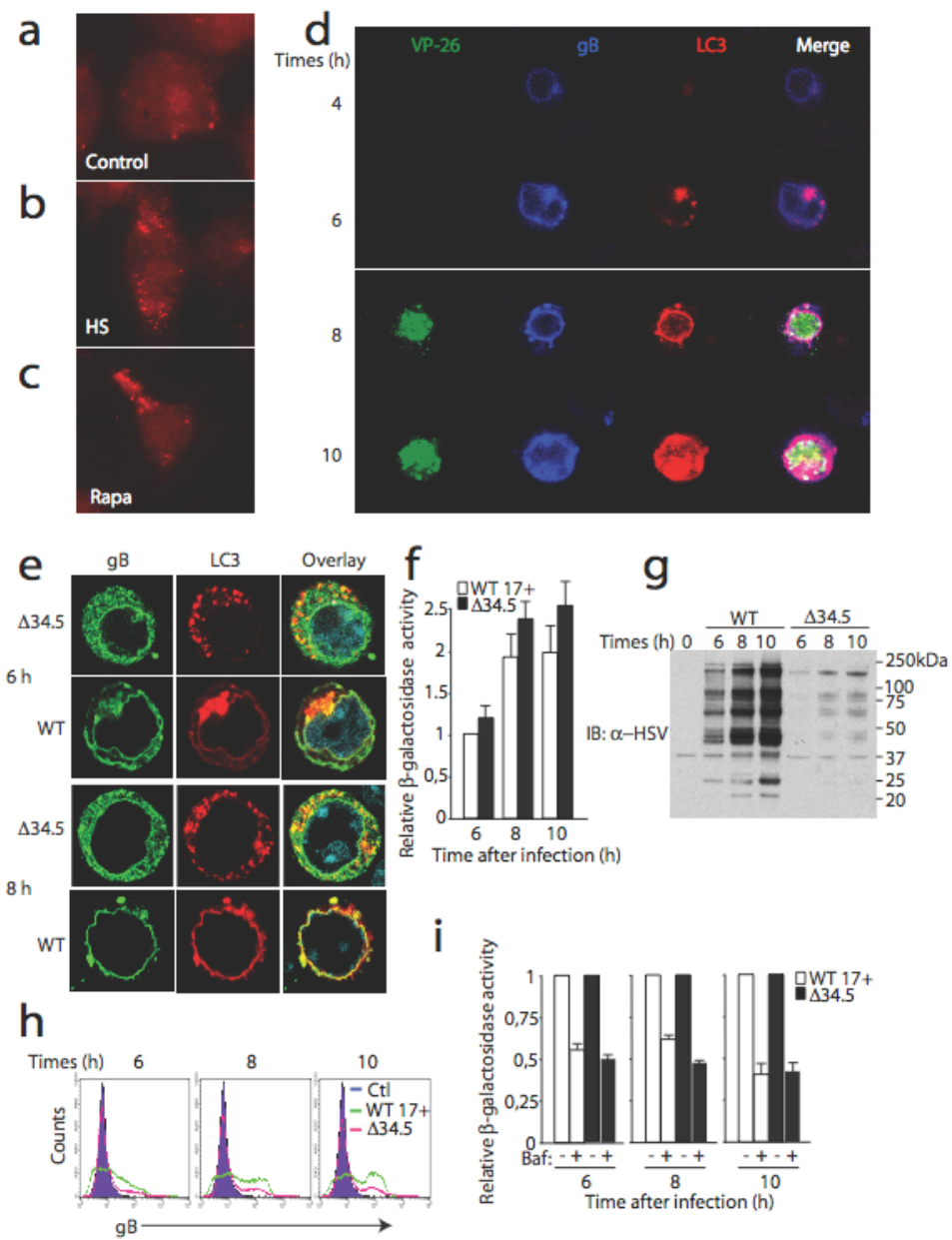


Figure 3 : Both gB and LC3 accumulate in perinuclear regions during HSV-1 infection.

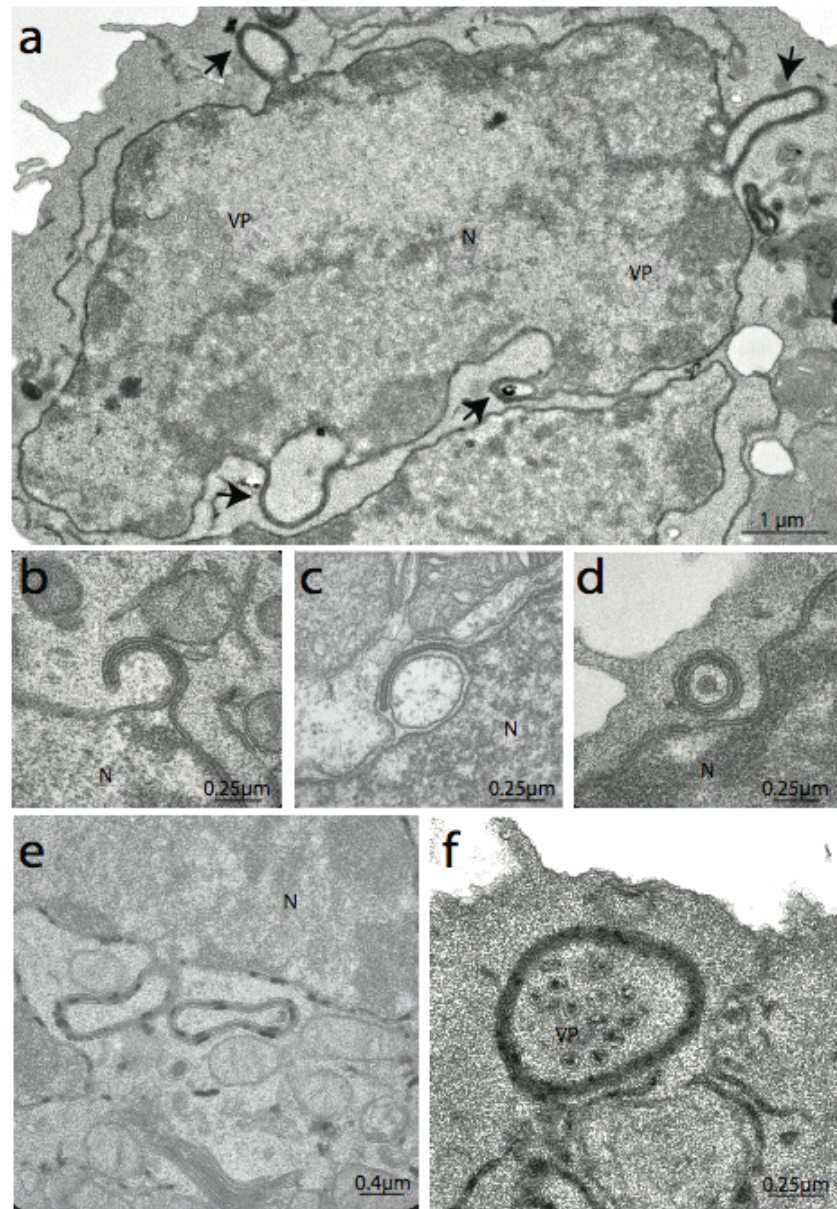


Figure 4 : HSV-1 induces the formation of autophagosome-like structures from the nuclear envelopes of infected macrophages.

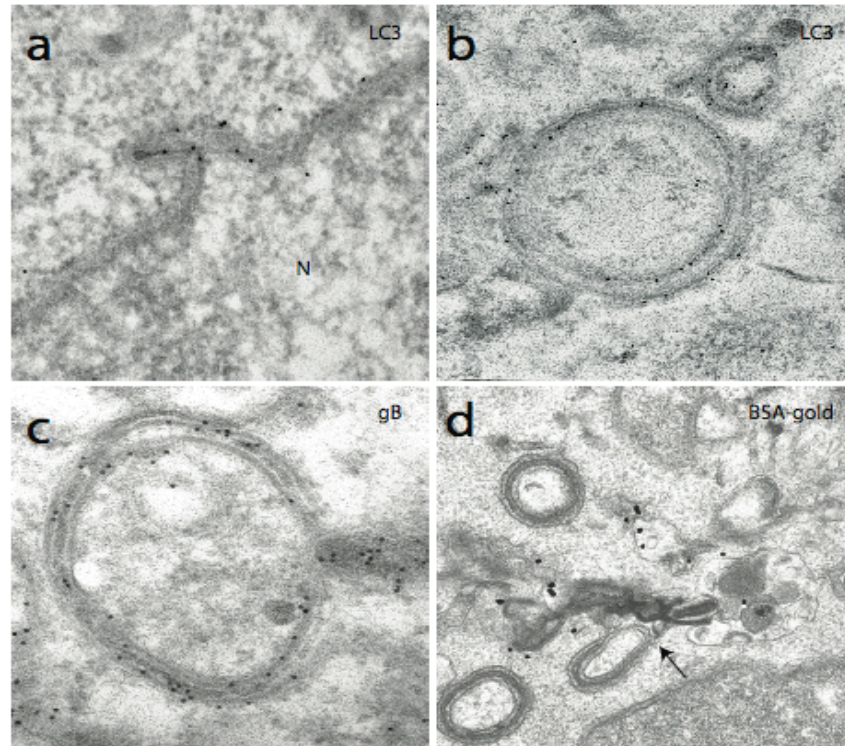


Figure 5 : The four-layered membrane structures that emerge from the nuclear envelope have autophagosome-like features.

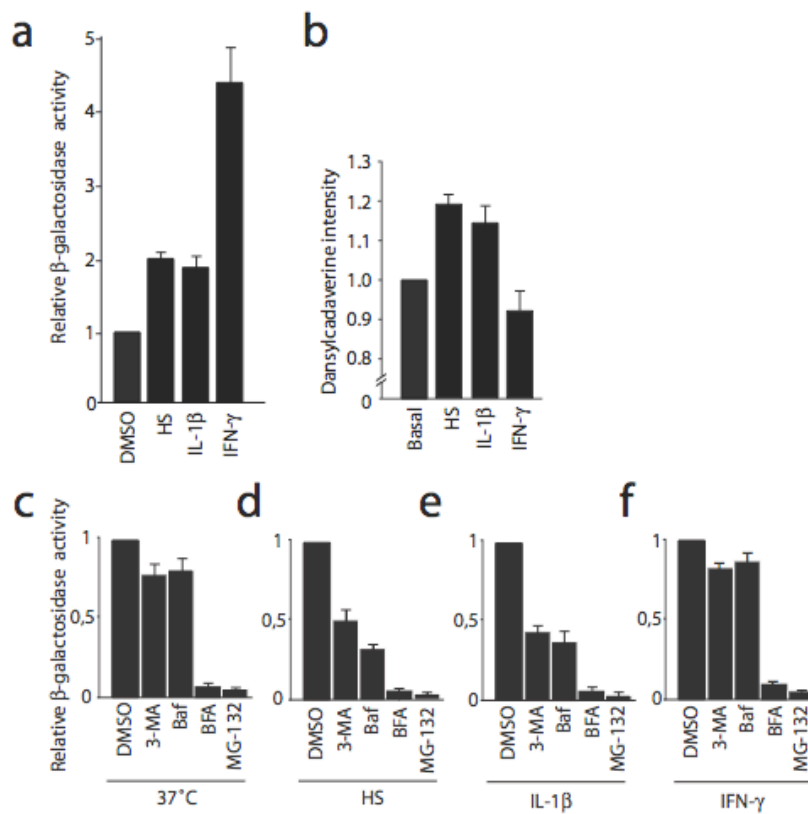
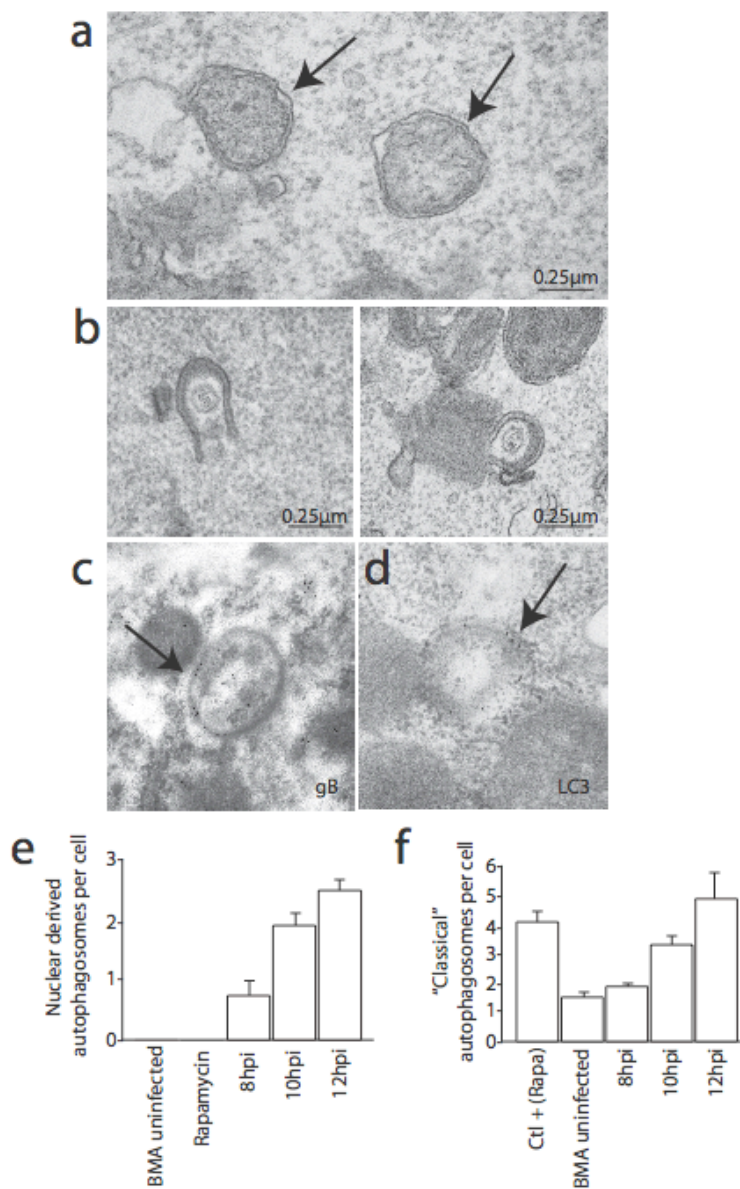
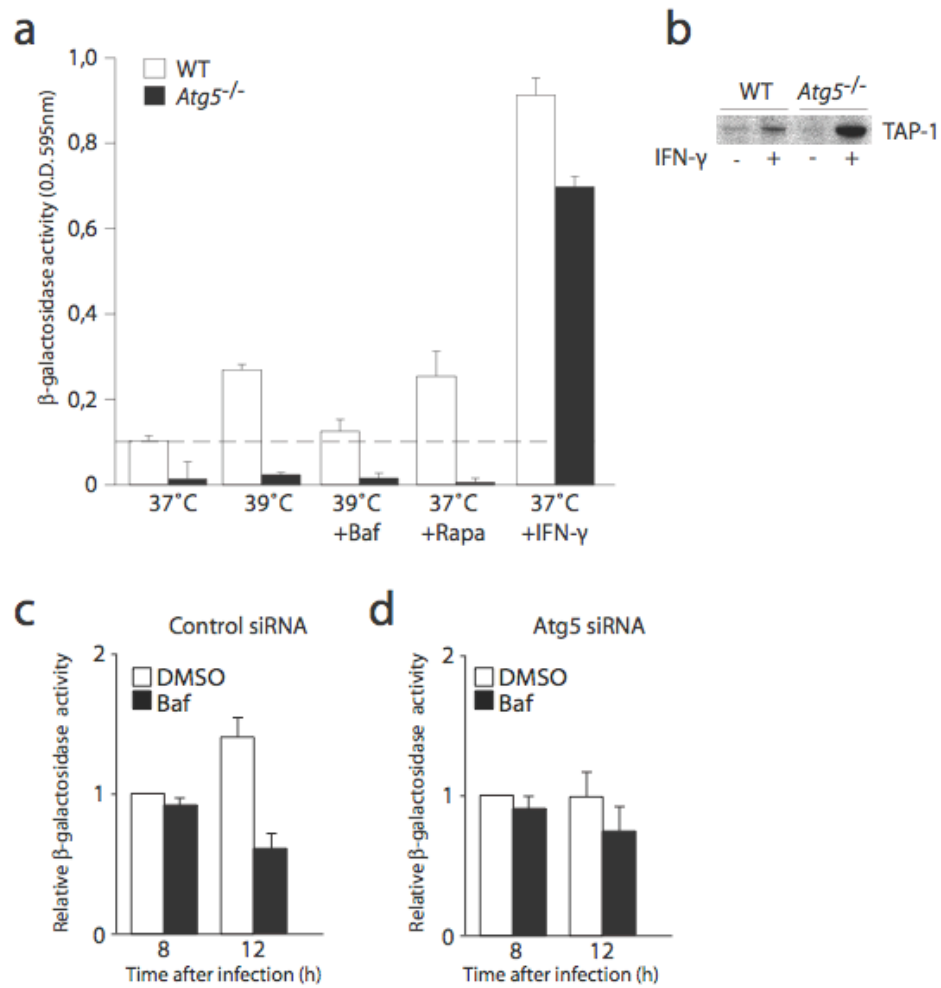


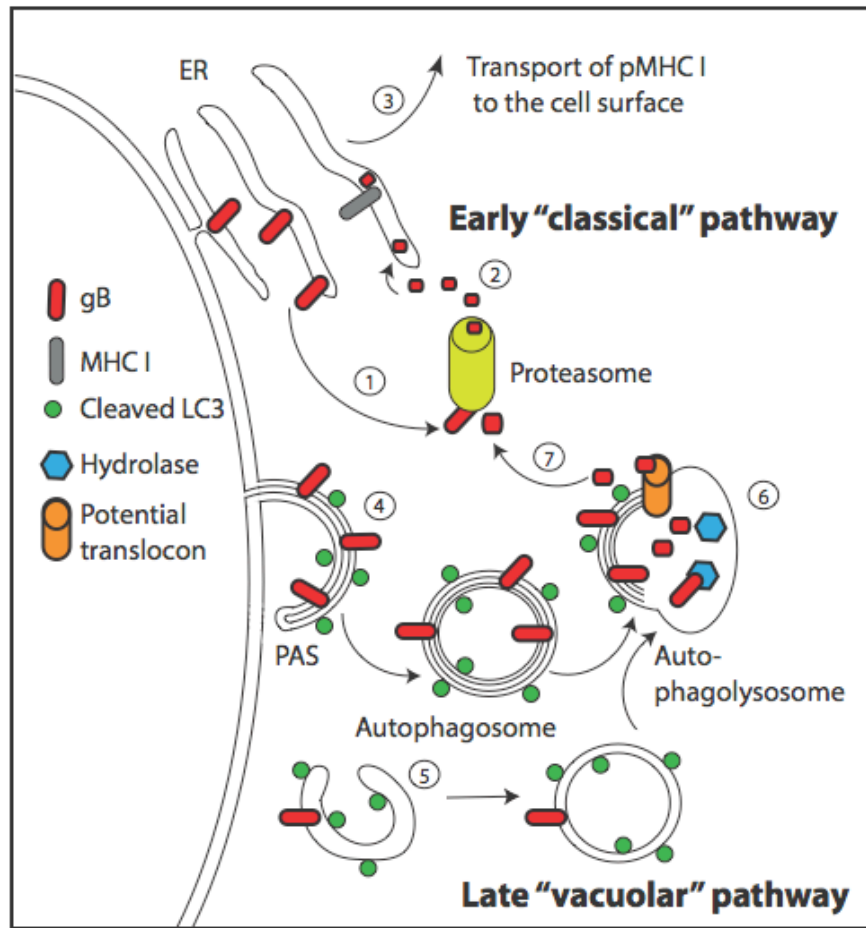
Figure 6 : Involvement of lytic vacuolar compartments in the processing and presentation of endogenous antigens on MHC class I molecules after treatment with proinflammatory cytokines.



Supplementary Figure 1. Increase in autophagosomes formation during the late phase of infection



Supplementary Figure 2. *Atg5*-dependent contribution of autophagy in MHC class I presentation.



Supplementary Figure 3. Participation of autophagy in the vacuolar processing of endogenous viral proteins

8. Article II

Trafficking of endogenous viral antigens from endoplasmic reticulum-derived compartments to phagosomes contributes to MHC class I presentation

Luc English¹, Roger Lippé¹, and Michel Desjardins^{1,2*}

Article en préparation

Résumé

Les événements de transport membranaire participent à plusieurs éléments clés du fonctionnement cellulaire, y compris les mécanismes de défense immunitaire. En effet, la formation d'organites de dégradation tels que les phagosomes et les autophagosomes requiert des réarrangements membranaires complexes qui nécessitent un transport de membrane. Il a été proposé que le réticulum endoplasmique (RE) puisse être à l'origine de cette membrane servant à la biogenèse des phagosomes et des autophagosomes. Dans cette étude, nous avons étudié les interactions entre le RE et les phagosomes en suivant la glycoprotéine B (gB) du virus *Herpès simplex* de type 1 (HSV-1) produite au niveau du RE des cellules infectées. La formation de phagosomes par l'internalisation de billes de latex dans les macrophages infectés nous a permis d'observer des interactions RE-phagosomes au cours de l'infection par HSV-1 et le transfert concomitant de gB aux phagosomes. Ce transfert de gB aux phagosomes favorise son apprêtement et conséquemment, provoque une augmentation de la présentation de celle-ci sur les molécules du CMH de classe I. De plus, nos résultats indiquent que le compartiment phagosomal est en mesure d'interagir avec le compartiment autophagosomal, qui est hautement enrichi en gB, provoquant également une augmentation de la présentation antigénique de la gB sur les molécules de CMH de classe I. Par conséquent, les événements de transport membranaire impliquant directement le RE ou des compartiments dérivés de ce dernier, tels que les autophagosomes, renforcent la capacité des macrophages à promouvoir l'activation des lymphocytes T CD8⁺.

Trafficking of endogenous viral antigens from endoplasmic reticulum-derived compartments to phagosomes contributes to MHC class I presentation

Luc English¹, Roger Lippé¹, and Michel Desjardins^{1,2}

1. Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succ Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

2. Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal

Article en préparation

8.1 Abstract

Membrane trafficking events participate in several key aspects of cellular function, including immune defense mechanisms. Indeed, the formation of degradative organelles such as phagosomes and autophagosomes requires membrane rearrangements that imply complex membrane trafficking events. The endoplasmic reticulum (ER) compartment has been proposed to be a source of membrane for the biogenesis of both phagosomes and autophagosomes. In this study, we monitored the potential interaction between ER and phagosomes by following the trafficking of the glycoprotein B (gB) of *Herpes simplex 1* (HSV-1) present in the ER of infected cells. Formation of latex bead-containing phagosomes in infected macrophages allowed us to observe ER-phagosome interactions during HSV-1 infection and the concomitant transfer of gB to phagosomes. The transfer of gB to phagosomes improves the processing and presentation of this antigen on MHC class I molecules. Furthermore, our results indicate that phagosomes interact with autophagosomes highly enriched with gB, a process that also stimulates the MHC class I presentation of this antigen. Thus, membrane trafficking events involving ER-derived compartments and phagosomes enhance the ability of macrophages to promote CD8⁺ T cells activation.

8.2 Introduction

Membrane trafficking plays key roles in both endogenous and exogenous antigen processing and presentation. The original view proposed two segregated pathways of antigen presentation^{1, 2}. Endogenous antigens, including viral proteins synthesized by infected cells, are degraded in the cytoplasm by the proteasome, and the resulting peptides translocated in the endoplasmic reticulum (ER) where they are loaded on MHC class I molecules that reach the surface through the biosynthetic exocytic apparatus. In contrast, exogenous antigens, internalized by endocytosis or phagocytosis, are processed by hydrolases in lytic endovacuolar compartments and loaded on MHC class II molecules that reach the cell surface using the membrane recycling machinery associated with these organelles. The strict segregation of these pathways has been revisited to account for the ability of cells to present exogenous antigens on MHC class I molecules, a process referred to as cross-presentation³.

It was shown that antigens from bacteria engulfed by phagocytosis, with no known mechanism to reach the cytoplasm, can be presented on MHC class I molecules in a brefeldin A-insensitive manner, highlighting the existence of an endovacuolar pathway for cross-presentation⁴. In addition, the demonstration of the ability of phagosomes to translocate foreign peptides into the cytoplasm raised the interesting possibility that the classical proteasome-ER pathway might be used for the presentation of phagocytosed peptides⁵. In the last few years, we and others presented evidence that the ER interacts with phagosomes early during the biogenesis of this organelle in macrophages⁶ and dendritic cells⁷. This process, potentially bringing together the lytic environment of phagosomes and the ER machinery of MHC class I presentation, was linked with the ability of phagosomes to process exogenous antigens and participate in their presentation on MHC class I molecules in a TAP-dependant⁷⁻⁹ or independent manner¹⁰. Although quantitative assessments have recently suggested that, in some cases, the presence of ER on phagosomes could be minimal¹¹, functional analyses have clearly indicated that the ER retrotranslocation machinery is present on phagosomes,

where it plays a key role in cross-presentation in dendritic cells¹². Furthermore, recent studies highlighted the presence of ER elements on phagosomes containing the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* and mycobacteria, and their involvement in antigen presentation on MHC class I molecules^{13, 14}.

An additional aspect of membrane trafficking, autophagy, has been shown to enable the transfer of endogenous antigens into lytic endovacuolar compartments¹⁵ and their presentation on MHC class II molecules¹⁶⁻¹⁸ as well as MHC class I molecule¹⁹. The recent finding that phagosomes interact with autophagosomes^{20, 21} raises the possibility that this type of interaction might also favor the contribution of phagosomes in the presentation of endogenous antigens on MHC class I molecules. In order to determine whether phagosomes interact with ER and ER-derived autophagosomes, we followed the trafficking and presentation of a viral protein, the glycoprotein B of *Herpes simplex* 1, expressed in the ER membrane of infected macrophages. Our results indicate that gB and viral particles are rapidly transferred from the ER and autophagosomes to phagosomes in infected macrophages, and that this process enhance significantly the processing and presentation of this endogenous protein on MHC class I molecules.

8.3 Results and discussion

Observation at the fluorescent microscope showed that BMA3.1 murine macrophages infected with GFP-tagged HSV-1 (K26GFP-HSV-1) started to display assembled GFP-tagged-capsids around 6 hours after infection, reaching a maximum level at 12 hours after infection (Fig. 1A). Morphological analyses at the electron microscope (EM) at 10 hours after infection showed the presence of newly assembled HSV-1 viral particles in the nucleus, as well as within the nuclear envelope where viruses are surrounded by a membrane (Fig. 1B and 1C). Naked capsids were also observed in the cytoplasm (Fig. 1C) indicating that the deenvelopment/reenvelopment model of HSV-1 maturation^{22, 23} may be valid in the BMA3.1 macrophages cell line. The continuity between the ER and the nuclear envelope implicated that viral particles might reach the ER compartment. As a matter of fact, enveloped viral particles were observed in the lumen of the ER (Fig. 1D), as shown previously²⁴. The ER nature of this compartment was confirmed by the presence of glucose-6-phosphatase (G-6-P) activity (black deposits), a specific enzyme marker of the ER⁶. In agreement with published work, we found that gB, a viral glycoprotein synthesized in the ER of infected cells, was expressed within 2-4 hours after infection in BMA macrophages^{25, 26}. This protein was also present in the inner membrane as well as the outer membrane of the nuclear envelope (Fig. 1E), as shown previously^{27, 28}. Thus, our results indicate that ER and ER-derived organelles display viral peptides within their membrane, as well as enveloped viral particles within their lumen, indicating that these viral markers could be used to follow the trafficking of ER in infected cells. Viral markers have been extensively used in the past to study membrane trafficking in a variety of cell models. For example, hemagglutinin and the glycoprotein G, from influenza and vesicular stomatitis viruses respectively, have been used to study the sorting and trafficking of molecules to the apical and basolateral sides of polarized cells^{29, 30}. We reported previously that ER interacts with phagosomes in various types of macrophages including BMA3.1⁹. Although other groups have reported such interactions^{7, 8, 12-14}, a

study concluded that phagosomes/ER interactions were unlikely to occur¹¹. To further address that point, we took advantage of the presence of well-defined viral markers in the ER of HSV-1-infected macrophages to determine whether ER and its derived organelles interact with phagosomes, and the effect of these potential interactions in antigen presentation. Observation at the electron microscope of macrophages in which phagosomes were formed early after HSV-1 infection (PPI: phagocytosis post-infection) showed numerous cell profiles where ER is apparently in direct continuity with phagosomes (Figs. 1F and G).

Immunofluorescence microscopy indicated that the labeling for newly synthesized gB was present in a perinuclear region typical of the ER, as well as in, or closely associated with, phagosomes around 2 hours after the formation of these organelles in infected cells (Fig. 2A). Western blotting confirmed the presence of gB peptides in phagosomes isolated from infected cells (Fig 2B). Interestingly, the main forms of gB present in phagosomes were of lower molecular weight compared to the total cell lysate and purified viruses, suggesting that intraphagosomal degradation of gB occurred. Immunofluorescence microscopy also indicated that GFP-tagged viral particles were present in the nucleus of infected macrophages between 6-8 hours after infection, as well as in close association with phagosomes (Fig 2C). The presence of enveloped viral particles within the phagosome lumen was confirmed by electron microscopy (Fig. 2D), while Western blotting showed the presence of a broad range of viral proteins in phagosomes isolated from infected cells (Fig. 2E). Treatment of phagosomes isolated from infected macrophages with the endoglycosidase H, an enzyme that only cleaves immature oligosaccharide structures present in the ER, indicated that the gB molecules transferred to phagosomes during HSV-1 infection are endo H-sensitive and thus come from the ER compartment. Indeed, full length gB as well as partially digested gB was observed following endoglycosidase H treatment (Fig. 2F). In contrast, gB associated with purified HSV-1 virus remained unchanged after endoglycosidase H treatment indicating a post-ER processing of this glycoprotein.

Altogether, these results suggest that viral particles targeted to the nuclear

envelop/ER during the egress process, as well as viral proteins synthesized in the host ER, find their way to the lumen of phagosomes and are exposed to the lytic environment of this organelle. Phagosomes were shown to be able to participate in the processing of exogenous peptides presented on MHC class I molecules⁷⁻⁹. In that context, we expected that the transfer of endogenous viral proteins to phagosomes and their partial degradation would enhance the overall ability of macrophages to process and present gB peptides to CD8⁺ T cells. Surprisingly, we measured that the presence of gB in phagosomes did not improve the ability of macrophages to stimulate gB-specific CD8⁺ T cells (not shown). We have shown previously that gB loaded in phagosomes by the internalization of HSV-1 viral particles immobilized on latex beads was processed and presented efficiently on MHC class I molecules only when macrophages were pre-treated with interferon- γ ³¹. Such treatment, however, inhibited partially the replication of HSV-1 (results not shown). In a previous study we observed that both interferon- γ and a mild heat treatment mimicking fever-like conditions improved the ability of macrophages to process endogenous gB and present this antigen on MHC class I molecules¹⁹. Other studies also established that exposure of antigen presenting cells to a mild heat shock (fever like temperature) had immunostimulatory effects^{32, 33}, and enhanced the presentation of viral proteins³⁴. Thus we seek out to find whether heat stimulation would also improve the ability of macrophages to process gB present in phagosomes for presentation on MHC class I molecules. As expected, the formation of phagosomes in infected macrophages (PPI) kept at 37°C did not improve the ability of these cells to stimulate gB-specific CD8⁺ T cells. In contrast, the formation of phagosomes in heat-stimulated macrophages improved their ability to stimulate CD8⁺ T by up to 40 to 50% (Fig. 3A). This increase was inhibited by the proton pump inhibitor bafilomycin A, confirming that the gain was related to the processing of gB that occurred in phagosomes by hydrolytic degradation (Fig. 3A). The improved ability to present gB peptides by infected macrophages containing phagosomes was clearly dependent on the number of phagosomes formed in the HSV-1 infected cells (Fig 3B). To make sure that the increase in gB presentation did not occur by the cross

presentation of newly synthesized HSV-1 particles, we performed series of experiments in which the HSV-1 replication inhibitors phosphonoacetic acid (PAA) was added. Treatment with this drug did not influence the gain obtained by the PPI indicating that the improved stimulation of gB-specific CD8⁺ T cells was not related to the capture of newly released viral particles (12 hpi) (Fig. 3C).

It was shown recently that phagosomes can interact with autophagosomes^{20, 35}. Accordingly, we performed series of experiments to determine whether autophagy might also promote the transfer of endogenous antigens to the phagosomal compartment. Western blotting using a polyclonal antibody raised against HSV-1 indicated that treatment with rapamycin, a drug widely used to stimulate autophagy, increased the relative amount of viral proteins transferred to phagosomes (8hpi) (Fig. 4A). Similar results were obtained when we looked at the transfer of gB (Fig. 4B). We have shown recently that naked HSV-1 viral particles can be sequestered within the lumen of autophagosomes displaying either 2 or 4 membranes¹⁹. These membranes are positive for the enzyme glucose-6-phosphatase (G-6-P), indicating that they are, at least in part, originating from the ER (10 hpi) (Fig. 4C). In our PPI experiments, we observed, in parallel to ER-phagosome interaction (Fig. 2D), phagosomes displaying naked viral particles, as well as parts of their membrane made of 4 layers labelled for G-6-P (10hpi) (Fig. 4D). The improved transfer of viral antigen, including gB, to the phagosomal compartment induced by rapamycin resulted in a significant increase in the ability of macrophages to stimulate CD8⁺ T cells, while inhibition of autophagy, using 3-methyladenine, had the opposite effect (Fig 4E).

So far, our results indicate that an intraphagosomal processing of gB occurs following the interaction of phagosomes with ER and ER-derived organelles during HSV-1 infection. To test this hypothesis, we treated macrophages with various lysosomal protease inhibitors and determined whether these drugs influence the stimulation of gB-specific CD8⁺ T cells. While PMSF had only a minimal effect on

macrophages infected with HSV-1, this drug completely abolished the gain in gB presentation normally observed when phagosomes are formed in macrophages (Fig 5A). Interestingly, treatment with chymostatin (not shown) or aprotinin strongly increased the stimulation of CD8⁺ T cells (Fig. 5A). Western blotting indicated that phagosomes isolated from aprotinin-treated macrophages contained an increased amount of gB fragments (Fig. 5B), supporting the idea that the lytic environment of this organelle plays a direct role in the production of viral peptides used for MHC class I presentation. It has been clearly established that protease inhibitors can modulate antigen presentation by MHC class II molecules³⁶⁻³⁸. Our results extend these findings by showing that lysosomal hydrolases also participate in the vacuolar processing of endogenous peptides for presentation on MHC class I molecules. Very interestingly, despite the strong stimulation observed in presence of aprotinin, co-incubation with brefeldin A or with the proteasomal inhibitor MG-132 abolished CD8⁺ T cell activation by close to 90%. These results indicate that the degradation of endogenous gB in phagosomes is followed by further steps of processing involving the proteasome and the trafficking of gB-loaded MHC class I molecules to the cell surface via a brefeldin A-sensitive pathway. The recent finding that the ER retrotranslocation machinery is present and functional on phagosomes¹² might explain how viral peptides generated in phagosomes can be further processed by the proteasome and targeted to the “classical” MHC class I pathway, in agreement with the previously described model of “phagosome to cytosol pathway”⁵.

It has been shown that HSV can inhibit autophagy, an observation that led to the proposal that this cellular process might be an important defense mechanism against HSV-1 viral infection³⁹⁻⁴¹. Considering that autophagy improves MHC class I presentation during HSV-1 infection, the ability of HSV-1 to inhibit this process clearly benefits the pathogen. In that line of thought, we investigated whether HSV-1 infection in macrophages might also inhibit phagocytosis. Our results show that most infected cells can no longer internalize latex beads 6h after infection (Fig. 5C and 5D). Addition of latex beads to macrophages at that time point had no significant effect on the ability

of macrophages to activate gB-specific CD8⁺ T cells, indicating that the stimulation of phagocytic receptors or other related mechanism could not account for the enhanced presentation of the gB antigen (Fig. 5E). Further experiments should address the molecular mechanisms linked to phagocytosis inhibition and whether this inhibition contributes to HSV-1 virulence.

Our results show that complex membrane trafficking events contribute to the enhancement of viral antigen processing and presentation on MHC class I molecules during viral infection. This finding, together with recent reports indicating that autophagosomes might be formed by ER membrane^{42, 43} emphasizes the dynamic interaction occurring between the ER and lytic vacuolar organelles. Our results also highlight a dynamic cooperation of the “classical” and “vacuolar” pathways of antigen presentation. Moreover, the ability to stimulate this cooperation under stress and by inducing the formation of vacuolar organelles raises potential applications for the establishment of more efficient vaccination protocols. It will also be of interest to determine whether the contribution of lytic organelles might extend the repertoire of endogenous peptides presented on both MHC class I and class II molecules.

8.4 Materials and methods

8.4.1 Cells, virus and reagents

The BMA3.1A macrophage cell line derived from C57BL/6 mice were used as described previously⁵. The lacZ-inducible gB HSV-specific CD8⁺ T cell hybridoma HSV-2.3.2E2 was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 5% of fetal calf serum (FCS), 2 mmol glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. The HSV-1 K26GFP mutant (strain KOS) carries a GFP-tagged capsid protein VP26 and was kindly provided by Phrasant Desai⁴⁴. Rabbit polyclonal anti-HSV-1 was from Neomarker. Mouse monoclonal anti-gB antibody was from Fitzgerald. Goat anti-mouse-568-labelled secondary antibody was from Invitrogen. Endoglycosidase H was used according to the manufacturer's indications and was from Roche. All drugs were from Sigma and were added to the medium after latex beads phagocytosis or 1.5 hour post-infection at the following concentration: phosphonoacetic acid (100µg/ml), brefeldin A (5µg/ml), bafilomycin A (1 µM), MG-132 (5µM), aprotinin (10nM), 3-methyladenine (10mM), rapamycin (10µg/ml), PMSF (1µM) was from Bioshop.

8.4.2 Heat shock treatment, infection and phagosome formation

Macrophages (1×10^5 cells/well) were incubated at 39°C for 12 hours and then incubated at 37°C for a recovery period of 2 hours before infection. Infection was performed at a multiplicity of infection of 10 for 30 minutes, followed by a chase of 30 minutes. Cells were then fed or not with latex beads (LB) (NH₂ 1,93µm diameter, Merck) for 30 minutes. Macrophages were then washed and incubated for a total of 8 hours after infection, unless indicated. Phagosomes formed in infected macrophages were isolated as described⁶.

8.4.3 CD8⁺ T cell hybridoma assay

Mock- or HSV-1-infected macrophages (2×10^5) were washed in Dulbecco's PBS and were fixed for 10 min at 23 °C with 1% (wt/vol) paraformaldehyde, followed by three washes in complete DMEM. Antigen-presenting cells were then cultured for 12 h at 37°C together with 4×10^5 HSV-2.3.2E2 cells (the beta-galactosidase-inducible, gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma) for analysis of the activation of T cells. Cells were then washed in Dulbecco's PBS and lysed (0.125 M Tris base, 0.01 M cyclohexane diaminotetraacetic acid, 50% (vol/vol) glycerol, 0.025% (vol/vol) Triton X-100 and 0.003 M dithiothreitol, pH 7.8). A beta-galactosidase substrate buffer (0.001 M MgSO₄ x 7 H₂O, 0.01 M KCl, 0.39 M NaH₂PO₄ x H₂O, 0.6 M Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 100 mM 2-mercaptoethanol and 0.15 mM chlorophenol red beta-D-galactopyranoside, pH 7.8) was added for 2–4 h at 37 °C. Cleavage of the chromogenic substrate chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside was quantified in a spectrophotometer in absorbance at 595 nm.

8.4.4 Immunofluorescence and flow cytometry

Cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's indications (Cytotfix/Cytoperm Kit, BD). Latex beads were detected by using Blue-W-labeled beads (1,9µm from Merck), and infected cells detected using HSV-1 K26GFP mutant virus. Samples were analyzed using a confocal laser scanning microscope or by using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

8.4.5 Electron microscopy

For morphological analyses, cells were fixed in 2.5% (vol/vol) glutaraldehyde and were embedded in Epon (Mecalab). Glucose-6-phosphatase was detected by electron microscopy cytochemistry as described⁴⁵. For immunocytochemistry after embedding,

cells were fixed in 1% (vol/vol) glutaraldehyde and were embedded at -20 °C in Lowicryl (Canemco). Lowicryl ultrathin sections were incubated overnight with antibodies and were visualized by 60 min of incubation with protein A–gold complex (10 nm) and mouse anti-gB were used at dilution of 1:10.

8.5 Acknowledgments

We thank Ken Rock (University of Massachusetts Medical School) for BMA cells; Frank Carbone and William Heath (University of Melbourne) for the HSV-2.3.2E2 hybridoma; P. Desai (Johns Hopkins University) for the HSV-1 K26-GFP mutant. Supported by the Canadian Institutes for Health Research (R.L. and M.D.), The Human Frontier Science Program (M.D.) and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada and Fond de la Recherche en Santé du Québec (L.E.).

8.6 Author Contributions

L.E. planned and realized the experiments and wrote the manuscript; R.L. provided HSV-1 virus stocks and expertise with the infection system and M.D. directed the work and wrote the manuscript.

8.7 Reference list

1. Cresswell, P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* **12**, 259-293 (1994).
2. Germain, R.N. & Margulies, D.H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* **11**, 403-450 (1993).
3. Bevan, M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* **143**, 1283-1288 (1976).
4. Pfeifer, J.D. *et al.* Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**, 359-362 (1993).
5. Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**, 243-246 (1995).
6. Gagnon, E. *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119-131 (2002).
7. Guermonprez, P. *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397-402 (2003).
8. Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12889-12894 (2003).
9. Houde, M. *et al.* Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-406 (2003).
10. Bertholet, S. *et al.* Leishmania antigens are presented to CD8⁺ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol* **177**, 3525-3533 (2006).
11. Touret, N. *et al.* Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* **123**, 157-170 (2005).
12. Ackerman, A.L., Giodini, A. & Cresswell, P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic

cells. *Immunity* **25**, 607-617 (2006).

13. Grotzke, J.E. *et al.* The Mycobacterium tuberculosis phagosome is a HLA-I processing competent organelle. *PLoS Pathog* **5**, e1000374 (2009).

14. Goldszmid, R.S. *et al.* Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in Toxoplasma gondii-infected dendritic cells. *J Exp Med* **206**, 399-410 (2009).

15. Schmid, D., Pypaert, M. & Munz, C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **26**, 79-92 (2007).

16. Paludan, C. *et al.* Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* **307**, 593-596 (2005).

17. Jaraquemada, D., Marti, M. & Long, E.O. An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* **172**, 947-954 (1990).

18. Malnati, M.S. *et al.* Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* **357**, 702-704 (1992).

19. English, L. *et al.* Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* (2009).

20. Sanjuan, M.A. *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**, 1253-1257 (2007).

21. Shui, W. *et al.* Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16952-16957 (2008).

22. Granzow, H. *et al.* Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**, 3675-3684 (2001).

23. Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G. & Granzow, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* **9**, 423-429 (2006).

24. Leuzinger, H. *et al.* Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* **79**, 13047-13059 (2005).

25. Mueller, S.N., Jones, C.M., Smith, C.M., Heath, W.R. & Carbone, F.R. Rapid

cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J Exp Med* **195**, 651-656 (2002).

26. Mueller, S.N. *et al.* The early expression of glycoprotein B from herpes simplex virus can be detected by antigen-specific CD8⁺ T cells. *J Virol* **77**, 2445-2451 (2003).

27. Stannard, L.M., Himmelhoch, S. & Wynchank, S. Intra-nuclear localization of two envelope proteins, gB and gD, of herpes simplex virus. *Arch Virol* **141**, 505-524 (1996).

28. Farnsworth, A. *et al.* Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 10187-10192 (2007).

29. Matlin, K.S. & Simons, K. Sorting of an apical plasma membrane glycoprotein occurs before it reaches the cell surface in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* **99**, 2131-2139 (1984).

30. Rindler, M.J., Ivanov, I.E., Plesken, H. & Sabatini, D.D. Polarized delivery of viral glycoproteins to the apical and basolateral plasma membranes of Madin-Darby canine kidney cells infected with temperature-sensitive viruses. *J Cell Biol* **100**, 136-151 (1985).

31. Trost, M. *et al.* The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* **30**, 143-154 (2009).

32. Basu, S. & Srivastava, P.K. Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *Int Immunol* **15**, 1053-1061 (2003).

33. Pritchard, M.T., Li, Z. & Repasky, E.A. Nitric oxide production is regulated by fever-range thermal stimulation of murine macrophages. *J Leukoc Biol* **78**, 630-638 (2005).

34. Callahan, M.K., Wohlfert, E.A., Menoret, A. & Srivastava, P.K. Heat shock up-regulates Imp2 and Imp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes. *J Immunol* **177**, 8393-8399 (2006).

35. Gutierrez, M.G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and

- Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753-766 (2004).
36. Delamarre, L., Couture, R., Mellman, I. & Trombetta, E.S. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J Exp Med* **203**, 2049-2055 (2006).
 37. Hegde, N.R. *et al.* Endogenous human cytomegalovirus gB is presented efficiently by MHC class II molecules to CD4⁺ CTL. *J Exp Med* **202**, 1109-1119 (2005).
 38. Savina, A. *et al.* NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* **126**, 205-218 (2006).
 39. Talloczy, Z., Virgin, H.W.t. & Levine, B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* **2**, 24-29 (2006).
 40. Talloczy, Z. *et al.* Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 190-195 (2002).
 41. Orvedahl, A. *et al.* HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* **1**, 23-35 (2007).
 42. Axe, E.L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685-701 (2008).
 43. Simonsen, A. & Stenmark, H. Self-eating from an ER-associated cup. *J Cell Biol* **182**, 621-622 (2008).
 44. Desai, P. & Person, S. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* **72**, 7563-7568 (1998).
 45. Griffiths, G., Quinn, P. & Warren, G. Dissection of the Golgi complex. I. Monensin inhibits the transport of viral membrane proteins from medial to trans Golgi cisternae in baby hamster kidney cells infected with Semliki Forest virus. *J Cell Biol* **96**, 835-850 (1983).

8.8 Figure legends

Fig 1. HSV-1 egress in BMA3.1 macrophages. **A)** Immunofluorescence microscopy indicates that the incubation of BMA3.1 macrophages with HSV-1-GFP at a multiplicity of infection of 10 for 30 min led to the assembly of viral capsids in around 30% of the cells after 6-12h post-infection. **B)** Electron micrographs of HSV-1-infected macrophages (10 hpi) show the presence of naked viral particles (VP) in the nucleus (N), with an enveloped virus in the nuclear envelope (black arrow) (10 hpi). Insert shows a magnification. **C)** Naked viral particles (white arrow) are observed in the cytoplasm (Cy) (10 hpi) N: nucleus. **D)** Enveloped HSV-1 viruses are also observed in the endoplasmic reticulum (ER) lumen. The ER nature of these membranes is confirmed by the presence of the enzyme marker glucose-6-phosphatase (black deposits) (10 hpi). **E)** Immuno-electron micrographs of HSV-1 infected macrophages show the presence of the glycoprotein B located at the nuclear envelope (10 hpi) N: nucleus. **F)** A close contact is observed between G-6-P-labeled ER and a phagosome containing a latex bead (LB) (10 hpi). **G)** Magnification of the direct contact between the ER and the phagosome observed in F. **B-G)** Scale bar 250 μ m

Fig 2. Trafficking events during HSV-1 infection allow the transfer of viral antigen, including the glycoprotein B, to phagosomes. **A)** Confocal microscopy of macrophages at 3 h after infection shows the presence of the viral protein gB (red) in a peri-nuclear organelle and in close contact with phagosomes (blue) formed shortly after infection. **B)** Western blotting with an anti-gB shows that this protein migrates at around 105 kDa when purified viruses are loaded on SDS-PAGE. The total cell lysate of infected macrophages shows the presence of the native form (higher arrow) as well as truncated forms of the proteins (lower arrows). In contrast, phagosomes isolated from infected cells display mainly truncated forms. No labelling is observed in phagosomes isolated from uninfected cells (Ctl) used as negative control (8 hpi). **C)** Confocal microscopy indicates that a GFP signal associated with the capsid of newly assembled viral particles can be observed in the nucleus of infected cells around 8 hpi. At that time point, GFP is also detected around latex bead-containing phagosomes. **D)** Electron microscopy analysis shows the presence of viral particles (white arrow) in the lumen of a phagosomes displaying multi-layered membrane structures (black arrow) labelled for the ER specific marker G-6-P (black deposits) (10 hpi) Scale bar 250µm. **E)** Western blotting using a polyclonal anti-HSV-1 shows the presence of viral antigens in phagosomes isolated from HSV-1 infected macrophages (Phago). No signal is observed on phagosomes isolated from uninfected cells (Ctl), showing the specificity of the anti- HSV-1 antibody. A different pattern of peptides is obtained on the total cell lysate (TCL) of infected macrophage (8 hpi). **F)** Western blotting using a monoclonal anti-gB antibody shows the sensitivity of gB to the action of endoglycosidase H enzyme. Phagosomes isolated from uninfected macrophages (Phago) were used as control for the specificity of the anti-gB antibody. Purified HSV-1 virus (HSV-1) was used to shows the mature form of the glycoprotein B associated with mature viruses (8 hpi).

Figure 3. Inducible participation of the vacuolar pathway in the processing and presentation of endogenous and exogenous viral peptides on MHC class I molecules. **A)** Phagosome formation in HSV-1 infected macrophages (PPI, phagocytosis post-infection) kept in basal condition (37°C) has not impact on the ability of these cells to activated CD8⁺ T cells. In contrast, formation of phagosomes in macrophages pre-exposed to heat (39°C) for 12 hours (HS) prior to infection induces a significant improvement in the ability of macrophages to stimulate CD8⁺ T cells. Treatment with bafilomycin A (Baf) in these conditions inhibited the gain of activation, compared with macrophages kept in basal conditions. Errors bars indicate standard deviations (8 hpi). **B)** The improved ability to present gB peptide by MHC class I molecules following the formation of phagosome in infected macrophages (PPI) increase proportionally with the number of phagosomes formed in these cells (10 hpi). **C)** Incubation of infected macrophages with phosphonoacetic acid, a inhibitor of viral replication, had no impact on the ability of the phagosomal compartment to improve MHC class I presentation of gB (12 hpi). Errors bars indicate standard deviations.

Figure 4. Autophagy contributes in viral antigen transfer to phagosome organelles and improves MHC class I presentation of gB antigen by the phagosomal compartment. **A)** Western blot analysis using a polyclonal anti-HSV-1 shows that rapamycin treatment increases the level of viral antigens in phagosomes (PPI-Rapa), compared to phagosomes isolated from untreated cells (PPI). No signal is detected in phagosomes isolated from uninfected cells (Ctl), showing the specificity of the anti-HSV-1 antibody. A different pattern of peptides is observed in the total cell lysate (TCL) of infected macrophages compared to isolated phagosomes (8 hpi). **B)** Western blot analysis using anti-gB antibody shows that rapamycin treatment increases the level of gB antigens in phagosomes (PPI-Rapa), compared to phagosomes isolated from untreated cells (PPI). No signal is detected in phagosomes isolated from uninfected cells (Ctl), showing the specificity of the antibody (8 hpi). **C)** Electron micrographs showing a nuclear derived autophagosome in the cytoplasm of HSV-1 infected macrophages. The ER nature of these membranes is confirmed by the presence of the enzyme marker glucose-6-phosphatase (black deposits) (10 hpi). **D)** Close association of nuclear derived autophagosome with latex bead-containing phagosomes (LB) in HSV-1 infected macrophages. The ER nature of these membranes is confirmed by the presence of the enzyme marker glucose-6-phosphatase (black deposits) (10 hpi). **E)** Induction of autophagy by the addition of rapamycin (Rapa) increased the ability of macrophages containing phagosomes to activate gB-specific CD8⁺ T cells, while inhibition of autophagy using 3-methyladenine (3-MA) decreased this process (8 hpi). Errors bars indicate standard deviations. **C-D)** Scale bar 250µm

Figure 5. Phagosomal compartment process viral antigen for MHC class I presentation and its formation is inhibited by HSV-1 infection. **A)** All macrophages were pre-treated at 39°C for 12h prior to infection. Formation of phagosomes shortly after infection (PPI) led to a significant improvement in the ability of macrophages to stimulate CD8⁺ T cells, compared to cells without phagosomes (inf) at 8 hpi. While treatment with protease inhibitor PMSF abolish the gain in MHC class I presentation observed following phagosome formation in infected macrophages, aprotinin treatment led to a significant increase in the ability of macrophages to activate CD8⁺ T cells. However, this stimulation was almost completely inhibited by a co-treatment with MG-132 or brefeldin A (BFA). All drugs were added 1 hour post-infection for a total of 7 hours. **B)** Western blotting indicates that treatment of macrophages with aprotinin (PPI + Apro) increases the level of gB truncated forms present in isolated phagosomes (black arrows). Ctl, The antibody against gB does not cross-react with phagosomes isolated from uninfected macrophages (negative control) (8 hpi). **C)** Macrophages infected or not with HSV-1 for 30 min were fed latex beads at different time points after infection. Although practically all the cells not exposed to viruses were able to internalize latex beads, 40% of the cells exposed to viruses (which correspond closely to the percentage of infected cells) were unable to phagocytose beads 4-5h post-infection. **D)** Flow cytometry indicate that phagocytosis of latex beads is strongly inhibited after the infection of macrophages by HSV-1 (K26-GFP) (black squares), compared to mock infected cells (circles). **E)** Co-incubation of infected macrophages (white bar) with a gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma led to its activation. The formation of phagosomes in macrophages 60 min after their infection with HSV-1 (P1hpi) improved significantly their ability to activate CD8⁺ T cells. Incubation of infected macrophages with latex beads 6h post-infection (P6hpi), a condition that does not promote the formation of phagosomes, does not improve significantly the ability of macrophages to activate CD8⁺ T cells (12 hpi). Errors bars indicate standard deviations.

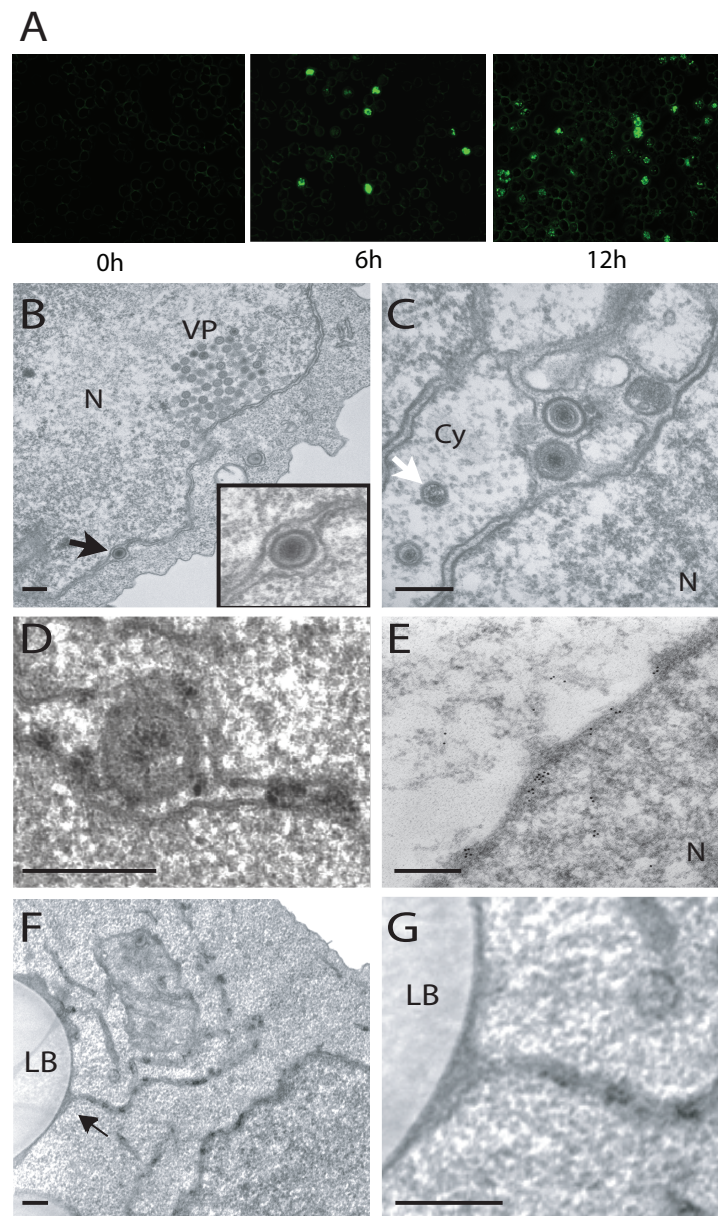


Figure 1. HSV-1 egress in BMA3.1 macrophages.

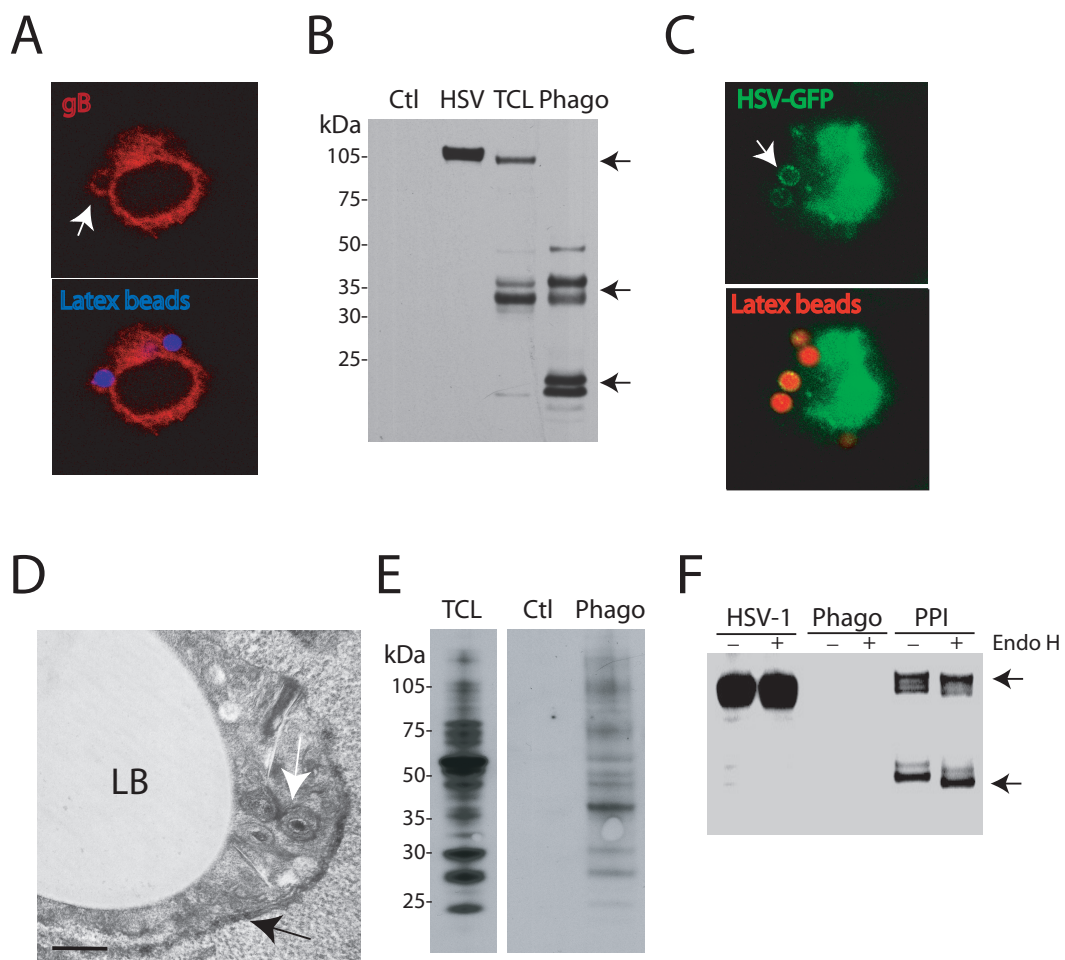


Figure 2. Trafficking events during HSV-1 infection allow the transfer of viral antigen, including the glycoprotein B, to phagosomes.

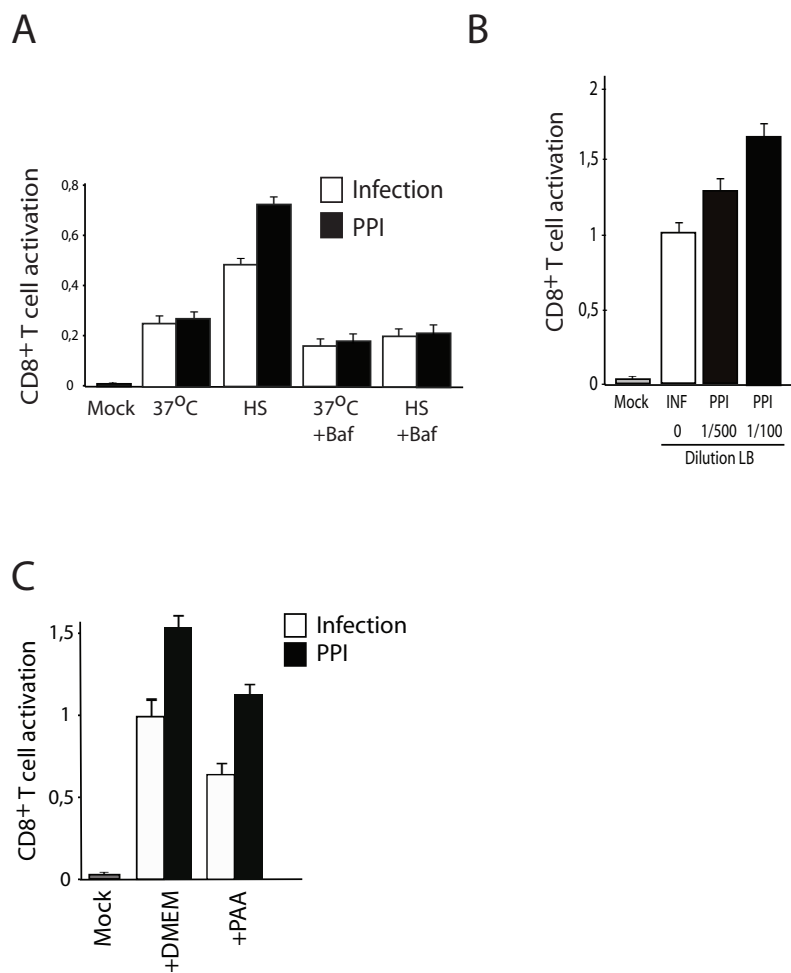


Figure 3. Inducible participation of the vacuolar pathway in the processing and presentation of endogenous and exogenous viral peptides on MHC class I molecules.

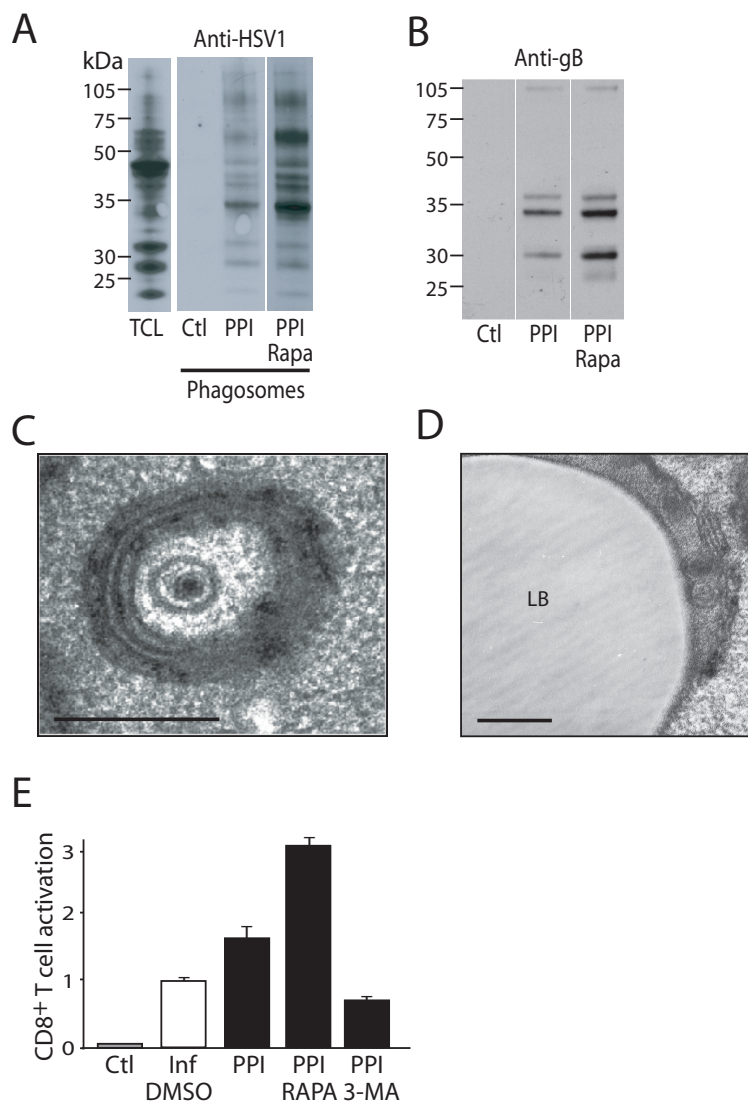


Figure 4. Autophagy contributes in viral antigen transfer to phagosome organelles and improves MHC class I presentation of gB antigen by the phagosomal compartment.

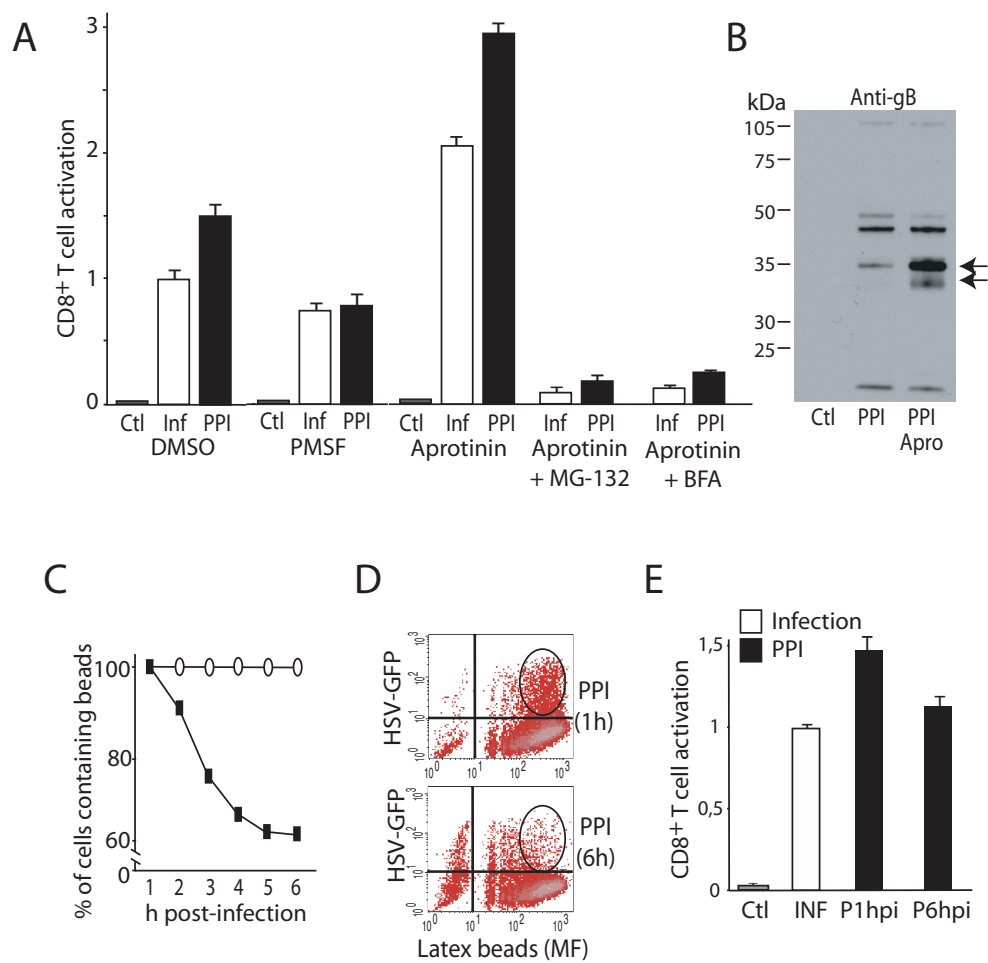


Figure 5. Phagosomal compartment process viral antigen for MHC class I presentation and its formation is inhibited by HSV-1 infection.

CHAPITRE III :

Discussion

9. Discussion

La phagocytose et l'autophagie sont deux mécanismes très anciens sur le plan évolutif permettant la capture et la destruction de pathogènes. La capacité des phagosomes à détruire les pathogènes extracellulaires et celle des autophagosomes à éliminer les pathogènes intracellulaires font de ces deux organites des éléments centraux de l'immunité innée. Cependant, comme pour bien des mécanismes de l'immunité innée, ceux-ci ne sont que le prélude au développement de l'immunité acquise. En effet, l'habileté avec laquelle le compartiment phagocytaire assure la destruction et la présentation d'éléments étrangers à la cellule, tant sur des molécules de CMH de classe I que de classe II, est un bon exemple de l'action indissociable de l'immunité innée et acquise. Les résultats présentés dans le chapitre II de cette thèse nous permettent maintenant d'établir le même constat quant à la prédisposition du compartiment autophagocytaire à établir un lien direct entre l'immunité innée et l'immunité acquise par sa capacité à contribuer à la présentation antigénique par les molécules du CMH de classe I. Parmi les résultats qui seront discutés ici, nous aborderons également les éléments entourant les événements de réarrangement membranaire nécessaires à la formation des phagosomes et des autophagosomes et de l'impact de ce réarrangement sur la présentation antigénique.

9.1 L'autophagie, un processus ubiquitaire

Contrairement à la phagocytose qui est plus ou moins restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, l'autophagie est un processus ubiquitaire observé chez l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme. Cette caractéristique fait de l'autophagie un mécanisme de défense inné par excellence pouvant assurer une protection à l'ensemble des cellules de l'organisme lors d'une infection. Par exemple, dans le cas d'une infection causée par le virus HSV-1, la présence d'autophagosomes a été observée dans différents types cellulaires dont des cellules nerveuses⁸³, des

fibroblastes^{52, 53, 265} et des macrophages²⁶⁶. De plus, l'ensemble de ces études ont démontré que l'autophagie joue un rôle central dans la pathogénicité du virus HSV-1. En effet, la capacité du virus HSV-1 à inhiber l'autophagie apparaît au coeur des mécanismes développés par ce virus pour contrer les actions du système immunitaire. Cette inhibition de l'autophagie est provoquée par l'expression de la protéine virale ICP34.5. Cette dernière bloque la formation d'autophagosomes de deux façons bien distinctes. Premièrement, elle inhibe la protéine Beclin-1 impliquée dans l'initiation de l'autophagie en se liant à celle-ci et, parallèlement à cette action, elle affecte le niveau de phosphorylation de eIF2 α en perturbant l'action de la protéine phosphatase 1 α ²⁶⁷. Il est intéressant de noter que l'action de ICP34.5 est également effective dans la levure, ce qui souligne la conservation des mécanismes moléculaires liés à l'autophagie dans des espèces relativement éloignées^{53, 267}.

À première vue, les résultats présentés dans l'article I du chapitre II peuvent sembler contradictoires avec ceux observés dans la littérature, qui montrent un pouvoir inhibiteur du virus HSV-1 sur l'autophagie. Cependant, bien que nos travaux démontrent un rôle indéniable de l'autophagie dans la production de peptides viraux servant à la présentation par les molécules de CMH de classe I, ceux-ci démontrent également une forte inhibition de l'autophagie "classique" lors de l'infection de macrophages. Par contre, cette inhibition de l'autophagie "classique" par le virus HSV-1 semble conduire au développement d'une nouvelle forme d'autophagie. En effet, l'inhibition de l'autophagie par le virus HSV-1 provoque une nette redistribution du signal LC3, un marqueur des autophagosomes, vers l'enveloppe nucléaire des cellules infectées. Cette redistribution du marqueur LC3 menant à la formation d'autophagosomes issus de la membrane nucléaire n'est que faiblement observée lorsque les cellules sont infectées par un virus mutant (Δ 34.5) incapable d'inhiber l'autophagie. Cela laisse supposer que la formation d'autophagosomes issus de l'enveloppe nucléaire serait probablement initiée par une voie n'impliquant pas l'utilisation de Beclin-1. Quoi qu'il en soit, la présence de LC3 associée à cette nouvelle

forme d'autophagosomes semble indiquer qu'une partie de la machinerie moléculaire de l'autophagie "classique" est vraisemblablement utilisée pour la formation de ces autophagosomes dérivés du noyau. De plus, la présence de ces autophagosomes à quatre membranes issus de la membrane nucléaire avait déjà été observée chez des fibroblastes infectés par HSV-1²⁶⁵. Néanmoins, cette étude ne faisait aucun lien entre l'inhibition de l'autophagie classique et l'apparition de ces autophagosomes d'origine nucléaire. Par contre, ceux-ci ont également été observés dans la phase tardive de l'infection et leur observation au niveau des fibroblastes semble indiquer que ce type d'autophagie pourrait également survenir dans des cellules autres que celles du système immunitaire. Bien qu'hypothétique, cette observation d'autophagosomes formés à même la membrane nucléaire chez des fibroblastes suggère que ce type d'autophagie pourrait être une voie autophagique tout aussi ubiquitaire que l'autophagie "classique". D'ailleurs, des phénomènes d'autophagie permettant la digestion de fragments du noyau (appelée "piecemeal microautophagy of the nucleus") ont déjà été décrits chez la levure³⁵. Bien que les mécanismes entourant ce type d'autophagie soient très différents de ceux décrits dans l'article I de cette thèse, ils mettent en évidence la possibilité de dégrader une portion du noyau et soulignent, encore une fois, l'aspect possiblement universel de l'autophagie menant à une dégradation d'une partie du compartiment nucléaire.

9.2 L'autophagie et la phagocytose, deux mécanismes ayant beaucoup en commun

L'autophagie et la phagocytose sont deux mécanismes très anciens et fort probablement apparus parallèlement à l'apparition des cellules eucaryotes^{268, 269}. Dans les deux cas, ces organites permettent la séquestration et la dégradation de pathogènes. Pour y parvenir, ces deux mécanismes capturent les pathogènes, intracellulaires dans le cas de l'autophagie et extracellulaires dans le cas de la phagocytose, à l'intérieur d'une vacuole dont la membrane lipidique est d'origine intracellulaire. Bien que la membrane des autophagosomes soit double alors que celle des phagosomes soit simple, leur

composition pourrait partager un certain nombre de points communs. En effet, dans les deux cas, il semble que le réticulum endoplasmique fournisse une partie de la membrane essentielle à la formation de ces deux organites. La présence d'un grand nombre de protéines originaires du réticulum endoplasmique associées aux phagosomes a été mise en évidence par les travaux Garin *et al.*¹⁰⁸. Puis, les travaux fonctionnels de Gagnon *et al.* ont directement démontré l'implication de la membrane du réticulum endoplasmique dans la biogenèse du phagosome¹⁰⁹. Dans le cas des autophagosomes, bien que les travaux les plus convaincants aient été réalisés très récemment⁵⁶, des résultats remontant à plusieurs années avaient déjà identifié une contribution du réticulum endoplasmique dans la formation des autophagosomes²⁷⁰. Il est intéressant de noter que si l'implication du réticulum endoplasmique dans la formation des phagosomes et des autophagosomes a initialement été contestée dans les deux cas^{271, 272}, de nombreux travaux sont venus par la suite soutenir cette hypothèse de la participation du RE dans la biogenèse de ces deux organites.

Une fois formées, ces deux organites subissent plusieurs étapes de maturation qui les mèneront dans les deux cas à des fusions successives avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs puis avec les lysosomes^{105, 273}. Ces événements de fusions membranaires permettent l'acquisition séquentielle des constituants moléculaires, dont des hydrolases acides, nécessaires à la destruction des pathogènes contenus dans ces deux types d'organites lytiques. Grâce à cette cascade d'événements transformant les autophagosomes en autophagolysosomes et les phagosomes en phagolysosomes, ces deux compartiments sont en mesure de jouer leur rôle clé dans l'immunité innée. Par ailleurs, leurs fonctions immunitaires semblent être stimulées par des récepteurs associés à l'immunité innée tels que les récepteurs Toll-like (TLRs). Dans le cas des phagosomes, la stimulation et la signalisation par ces récepteurs modifient non seulement la cinétique de maturation des phagosomes en phagolysosomes mais affectent également le niveau de phagocytose. En effet, la stimulation des TLRs permet d'augmenter la capacité phagocytaire des macrophages, et les phagosomes ainsi formés

acquièrent plus rapidement leurs fonctions destructrices²⁷⁴. Dans le cas des autophagosomes, la stimulation de TLRs et la signalisation qui en découle favorisent nettement leur formation ainsi que la capture de pathogènes intracellulaires⁹³. De plus, il est très intéressant de constater que la stimulation des TLRs promeut l'interaction du compartiment autophagosomal avec le compartiment phagosomal. Ce type d'interaction directe entre ces deux compartiments permettrait une maturation accélérée du phagosome, le rendant très rapidement lytique face au pathogène²⁷⁵. L'interaction directe entre les autophagosomes et les phagosomes avait d'ailleurs déjà été soulignée dans une étude protéomique récente²⁷⁶. Les résultats présentés dans l'article II du chapitre II de cette thèse permettent de confirmer les résultats obtenus dans les études précédentes. De plus, nos travaux permettent également de démontrer que ce type d'interaction entre les autophagosomes et les phagosomes favorise le transfert d'antigènes endogènes vers un compartiment, en théorie, capable d'effectuer de la présentation antigénique sur les molécules de CMH de classe I (comme démontré dans nos travaux) et de classe II. Nos résultats ont aussi permis de démontrer que les autophagosomes dérivés de l'enveloppe nucléaire semblent se comporter comme les autophagosomes classiques, puisque ceux-ci sont également en mesure d'interagir avec le compartiment phagosomal. Par contre, des études ultérieures seront nécessaires afin de déterminer si la formation de ces autophagosomes issus de la membrane nucléaire est également stimulée par la signalisation provenant des TLRs. Comme il est déjà connu que le virus HSV stimule certains types de TLRs²⁷⁷, il serait intéressant de déterminer si cette stimulation lors de l'infection par HSV-1 favorise le développement des autophagosomes classiques et/ou dérivés de la membrane nucléaire.

Le dernier point majeur entourant la similarité entre les compartiments autophagosomal et phagosomal concerne la présentation antigénique. La capacité des phagosomes à contribuer à la génération de peptides servant à la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe I et de classe II est connue depuis plusieurs années^{157, 171}. Cependant, la contribution du compartiment autophagosomal

dans l'apprêtement d'antigènes intracellulaires menant à la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II est beaucoup plus récente^{190, 195}. Les travaux présentés dans l'article I du chapitre II permettent pour la première fois d'établir un lien direct entre la séquestration d'antigènes viraux dans des autophagosomes, tant classiques que dérivés de l'enveloppe nucléaire, et leur présentation sur des CMH de classe I. Par conséquent, les autophagosomes, tout comme les phagosomes, sont des organites en mesure de contribuer à la présentation antigénique et ce tant pour les molécules du CMH de classe I que de classe II. Ceci démontre encore une fois la très grande similarité entre ces deux compartiments. Cette similarité s'étend donc non seulement à l'origine de leur membrane, leur mécanisme de maturation, leur interaction avec la signalisation de récepteurs de l'immunité innée, mais également au niveau fonctionnel en assurant un lien direct entre l'immunité innée et l'immunité acquise grâce à leur capacité à participer à la présentation antigénique par les molécules du CMH.

9.3 L'autophagie, une aide essentielle à la voie classique de présentation des CMH de classe I

La démonstration d'un lien entre la formation d'autophagosomes et la présentation antigénique a été établie par divers groupes et ce pour de nombreux antigènes^{190, 195, 204, 214, 258}. Cependant, dans tous les cas cette présentation était effectuée sur des molécules du CMH de classe II, ce qui restreint ce mécanisme aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Dans le cas d'une infection virale, ce type de voie d'apprêtement antigénique pourrait directement permettre l'activation des lymphocytes T CD4⁺ par la cellule présentatrice d'antigènes professionnelle infectée. Ceci favoriserait l'établissement d'une réponse immunitaire rapide puisque la présentation des antigènes viraux pourrait survenir au moment même de leur synthèse dans la cellule. Sans ce type de voie d'apprêtement, l'infection virale devrait

préalablement causer la mort cellulaire afin de permettre la phagocytose de celle-ci par une autre cellule présentatrice d'antigènes et ainsi permettre la présentation des peptides viraux sur des molécules de CMH de classe II.

Cependant, contrairement aux molécules du CMH de classe II, les molécules du CMH de classe I sont exprimées par pratiquement toutes les cellules de l'organisme. La découverte que l'autophagie puisse participer à l'apprêtement d'antigènes intracellulaires, spécialement ceux d'origine virale et permettre leur présentation sur des CMH de classe I est donc des plus intéressantes. L'impact réel de l'autophagie dans la contribution à une réponse immunitaire acquise menant à une activation lymphocytaire maximale a d'ailleurs été souligné dans une étude *in vivo*²⁷⁸. En effet, l'infection de souris par un virus mutant (Δ 34.5) incapable d'inhiber l'autophagie provoque une augmentation significative du nombre de lymphocytes T CD8⁺ en comparaison avec le virus de souche sauvage dans les jours suivant l'infection. Ce résultat suggère donc que l'inhibition de l'autophagie par le virus HSV-1 permet de réduire le développement d'une réponse lymphocytaire cytotoxique en réponse à l'infection. Les résultats obtenus dans l'article I pourraient permettre d'expliquer ces augmentations des lymphocytes T cytotoxiques observées lorsque la formation des autophagosomes n'est pas inhibée. En effet, le plafonnement (voire la diminution) du niveau de présentation de la glycoprotéine B par les macrophages lorsque l'autophagie est inhibée durant l'infection pourrait compromettre le développement et l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Bien que l'inhibition de l'autophagie n'ait pas d'impact sur l'expression des complexes gB-CMH de classe I dans la phase précoce de l'infection, il en est tout autrement durant la phase tardive de l'infection. Cette absence de contribution de l'autophagie en début d'infection peut fort probablement être attribuée à l'inhibition de l'autophagie par la protéine virale ICP34.5. Par contre, durant la phase tardive de l'infection où le stress causé par l'infection est fortement augmenté, deux formes distinctes d'autophagosomes sont formées dans les macrophages. La présence de ces autophagosomes contribue nettement à augmenter le niveau de présentation de la glycoprotéine B sur les CMH de

classe I puisque l'inhibition de l'autophagie par une technique d'interférence par ARN contre la protéine Atg5 ou l'ajout de drogue bloquant la formation d'autophagosomes réduisent significativement la présentation de cette protéine par les CMH de classe I. Cependant, la contribution exacte de chacune de ces deux formes d'autophagosomes dans la présentation antigénique de la glycoprotéine B demeure encore à élucider. Compte tenu des résultats de notre étude, cette inhibition de l'autophagie semble être un mécanisme développé par le virus afin d'échapper à l'immunité acquise. Jusque là, le développement par HSV-1 d'un système de blocage rapide de l'autophagie dans la cellule infectée avait été seulement considéré comme un moyen pour le virus d'échapper à son élimination physique dans l'autophagosome et donc à l'immunité innée.

Bien que nos résultats ne nous permettent pas de savoir si cette nouvelle voie d'apprêtement est effective dans un contexte d'infection virale autre que celui de HSV-1, il serait tentant de l'envisager pour certains cas déjà décrits dans la littérature. Citons par exemple le cas de la protéine EBNA-1 du virus Epstein-Barr (virus de la grande famille des *herpesviridae*), déjà reconnue pour être la cible de l'autophagie¹⁹⁵. La protéine EBNA-1 a la capacité de bloquer sa dégradation par le protéasome grâce à un domaine répétitif formé de motifs glycine-alanine²⁷⁹. Il est donc, en théorie, impossible pour les lymphocytes B infectés d'exprimer à leur surface des molécules de CMH de classe I présentant des épitopes dérivés de cette protéine afin d'être reconnus par les lymphocytes T CD8⁺. Cependant, de nombreux lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à la protéine EBNA-1 peuvent être détectés chez des individus infectés par le virus Epstein-Barr. Bien que la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs en lymphocytes T cytotoxiques effecteurs se produise vraisemblablement par un mécanisme de présentation croisée²⁸⁰, il a également été démontré que les cellules infectées pouvaient apprêter cette protéine endogène par une voie impliquant le protéasome²⁸¹. Bien que spéculatif, un apprêtement préalable de cette protéine à l'intérieur des autophagosomes pourrait permettre l'élimination du motif glycine-alanine, qui inhibe la dégradation par

le protéasome, et ainsi favoriser l'apprêtement de cet antigène par la voie classique de présentation des CMH de classe I. Une telle action séquentielle dans l'apprêtement des antigènes entre le compartiment autophagosomal et la voie classique de présentation des CMH de classe I est d'ailleurs tout à fait en accord avec le modèle proposé dans l'article I de cette thèse (voir les annexes 2 et 3). On voit donc *a posteriori* que la nouvelle voie d'apprêtement intracellulaire découverte dans les travaux présentés dans cette thèse pourrait permettre d'expliquer certains phénomènes reliés à la présentation antigénique observés lors d'une infection par un virus différent de HSV-1.

9.4 Rôle prépondérant du réticulum endoplasmique dans la contribution vacuolaire menant à la présentation antigénique

L'utilisation du réticulum endoplasmique dans la biogenèse des phagosomes a permis, entre autres, d'expliquer la capacité de ce compartiment à apprêter des antigènes exogènes et à permettre leur présentation sur des CMH de classe I. Nous avons donc cherché à savoir si le réticulum endoplasmique contribuait à la formation des autophagosomes au cours de l'infection par HSV-1, ce qui pourrait expliquer la fonctionnalité de la présentation de la glycoprotéine B par les molécules du CMH de classe I via les autophagosomes. Les analyses en microscopie électronique nous ont permis d'identifier deux formes distinctes d'autophagosomes produites dans la phase tardive de l'infection. La forme dominante, et sans aucun doute la plus impressionnante, d'autophagosomes est formée à même l'enveloppe nucléaire et implique les deux membranes nucléaires, soit la membrane nucléaire interne et la membrane nucléaire externe. Comme la membrane externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique, cela confère à ce type d'autophagosomes toute la machinerie nécessaire au chargement peptidique sur les molécules du CMH de classe I. Parallèlement au développement de ces autophagosomes issus du noyau, des autophagosomes classiques sont aussi observés. La découverte récente de la contribution potentielle du réticulum endoplasmique à la formation des autophagosomes "classiques"⁵⁶ a été confirmée dans

nos travaux par la détection de l'enzyme glucose-6-phosphatase (un marqueur spécifique du réticulum endoplasmique) localisée sur la membrane des autophagosomes classiques formés dans la phase tardive de l'infection (Figure 1, annexe 2). Par conséquent, les deux types d'autophagosomes observés durant l'infection par le virus HSV-1 posséderaient toute la machinerie associée à la voie classique de présentation antigénique par les CMH de classe I normalement retrouvée uniquement dans le réticulum endoplasmique. De plus, ceux-ci posséderaient également toute la machinerie nécessaire au transport des protéines à travers les membranes. La présence de cette machinerie semble essentielle puisque selon le modèle proposé dans notre étude, les antigènes séquestrés dans les autophagosomes doivent pouvoir être transférés du côté cytoplasmique afin de poursuivre leur parcours dans la voie classique de présentation des CMH de classe I. Par conséquent, il semble que la présentation antigénique qui découle de l'action des autophagosomes soit très similaire au modèle du "phagosome-au-cytosol" proposé pour la présentation croisée lors de la phagocytose d'antigènes exogènes¹⁷¹. Une étude récente a d'ailleurs démontré que la machinerie de rétrotranslocation associée au réticulum endoplasmique est essentielle à la sortie des antigènes du phagosome vers le cytoplasme et sa présence est essentielle à la présentation d'antigènes exogènes sur des molécules du CMH de classe I¹⁸². Comme les autophagosomes issus de la membrane nucléaire sont, par extension, également issus du réticulum endoplasmique, cette machinerie de rétrotranslocation est fort probablement présente sur ces autophagosomes. Dans le cas des autophagosomes classiques, non seulement la présence de membrane dérivée du réticulum endoplasmique a été observée, mais une étude récente a même permis d'identifier la présence du translocon Sec61²⁵⁹ soupçonné d'être responsable du transport des antigènes de la lumière des autophagosomes (ou des phagosomes) vers le cytoplasme. Par conséquent, tous les éléments nécessaires à l'exécution du modèle proposé dans l'article I de cette thèse semblent être présents pour assurer un apprêtement partiel des antigènes viraux dans les autophagosomes, suivi d'un transport de ces mêmes antigènes vers le cytoplasme où ils seront pris en charge par la voie classique de présentation des CMH de classe I.

En plus de permettre l'acquisition de la machinerie moléculaire associée à la présentation par les CMH de classe I, l'utilisation du réticulum endoplasmique dans la formation des autophagosomes pourrait, en théorie, permettre le transfert direct des glycoprotéines virales vers ce compartiment. Jusqu'à présent, il est admis que les protéines cellulaires sont transférées à l'autophagosome suite à leur ubiquitination et à leur agrégation dans le cytoplasme. Ces agrégats sont en effet reconnus par la machinerie d'autophagie et séquestrés au sein de l'autophagosome. Cependant, les analyses en microscopie électronique que nous avons effectuées démontrent clairement la présence de la glycoprotéine B associée aux membranes internes des autophagosomes issus de la membrane nucléaire. Ces résultats confirment donc que l'utilisation de la membrane nucléaire/réticulum endoplasmique dans la formation de ce type d'autophagosomes favorise également le transfert direct des antigènes localisés dans ce compartiment vers les autophagosomes, sans passer par l'ubiquitination et l'agrégation des protéines dans le cytoplasme.

Nos travaux en microscopie électronique mettent en évidence un autre moyen pour l'autophagosome d'acquérir des antigènes viraux. En effet, il apparaît très clairement dans nos analyses que les deux types d'autophagosomes sont en mesure de séquestrer des antigènes viraux localisés dans le cytoplasme de la cellule. En effet, il nous a été possible de visualiser la présence de capsides virales tant dans la lumière des autophagosomes classiques que dans la lumière des autophagosomes issus de la membrane nucléaire. Par conséquent, il serait donc possible de retrouver pratiquement toutes les protéines virales normalement présentes sur un virus mature dans les autophagosomes. Bien que notre étude fût concentrée sur la présentation de la glycoprotéine B par les CMH de classe I, en théorie, l'autophagie pourrait contribuer à la présentation de multiples antigènes viraux.

Comme il a été mentionné auparavant, le recrutement du réticulum endoplasmique lors de la formation des phagosomes a permis de proposer une explication quant à la capacité de ce compartiment à participer à la présentation par les molécules du CMH de classe I. Par ailleurs, les études réalisées dans l'article II de cette thèse ont permis de

démontrer que l'interaction entre le réticulum endoplasmique et le phagosome permettait de transférer des antigènes intracellulaires vers le compartiment phagosomal. Premièrement, l'observation de fusion directe entre le réticulum endoplasmique et les phagosomes présents dans le cytoplasme des macrophages infectés par le virus HSV-1 permettait d'emblée d'émettre l'hypothèse que ce type d'interaction pouvait permettre le transfert de la glycoprotéine B vers le compartiment phagosomal. Les études biochimiques ont, quant à elles, clairement démontré que la glycoprotéine B était présente dans le phagosome sous une forme immature puisque les sucres qui y étaient associés présentaient une sensibilité à l'endoglycosidase H. Par conséquent, nous avons été en mesure d'exclure la possibilité que la glycoprotéine B mature exprimée à la surface des cellules infectées ait été ré-endocytée à partir de la membrane plasmique, puisqu'elle serait alors devenue insensible à l'endoglycosidase H suite à son passage dans le Golgi. De plus, il a été possible d'observer la présence de virus enveloppés dans la lumière des phagosomes. Or, de tels virus enveloppés ont été visualisés dans la lumière du réticulum endoplasmique des cellules infectées alors qu'uniquement des capsides nues ont pu être observées dans la lumière des autophagosomes. Par conséquent, ces observations suggèrent fortement que les virus enveloppés observés dans la lumière des phagosomes aient été transférés suite à l'interaction entre le réticulum endoplasmique et le compartiment phagosomal. Cependant, nous avons également observé la présence de capsides virales nues dans les phagosomes ce qui suggérait que des interactions entre les autophagosomes et le compartiment phagosomal pouvaient survenir durant l'infection. Nous avons été en mesure de confirmer que non seulement les autophagosomes classiques pouvaient interagir et fusionner avec le compartiment phagosomal, mais également les autophagosomes composés de quatre membranes issus de la membrane nucléaire. Comme ces deux types d'autophagosomes sont dérivés en partie du réticulum endoplasmique, ces résultats soulignent avec emphase la capacité du réticulum endoplasmique ou des compartiments qui en dérivent à interagir avec le compartiment phagosomal. Par conséquent, il semble que le réticulum endoplasmique ait une propension à interagir avec les compartiments

dégradatifs de la cellule et, ce faisant, permettrait le transfert d'antigènes endogènes vers des compartiments vacuolaires lytiques. Cette facilité avec laquelle le réticulum endoplasmique interagit, directement ou indirectement, avec les compartiments vacuolaires dégradatifs a d'ailleurs été soulignée dans de nombreuses études. L'exemple le plus éloquent est sans doute celui du "ER-phagy" dans lequel une partie du réticulum endoplasmique sert directement à la formation d'autophagosomes²¹⁸. Cette formation d'autophagosomes à partir du réticulum endoplasmique semble être en étroite relation avec le niveau de stress retrouvé à l'intérieur de ce compartiment. En effet, l'interaction directe entre le réticulum endoplasmique et l'autophagie croît proportionnellement avec le stress associé au réticulum endoplasmique^{98, 282}. Il est également intéressant de constater que divers stress cellulaires, dont un manque de nutriments, favorisent aussi la dégradation d'une partie du réticulum endoplasmique par des mécanismes autophagiques²⁸³.

Quoi qu'il en soit, un des impacts majeurs de ce transfert d'antigènes endogènes vers les compartiments vacuolaires dégradatifs est l'augmentation de l'apprêtement de ces antigènes contenus dans le réticulum endoplasmique. Durant une infection par le virus HSV-1, l'apprêtement vacuolaire de la glycoprotéine B contribue nettement à augmenter le niveau de présentation de cette protéine sur les molécules de CMH de classe I. Par conséquent, il n'est pas surprenant de voir que le virus HSV-1 a développé des mécanismes afin de réduire au maximum la contribution potentielle du compartiment endovacuolaire dans l'apprêtement des antigènes viraux pouvant mener à une présentation antigénique. En effet, en plus d'inhiber la formation des autophagosomes, nos travaux montrent également que le virus HSV-1 est en mesure d'inhiber la formation de phagosomes dans les macrophages infectés. Compte tenu des résultats obtenus, il semble que cette inhibition soit favorable au virus puisqu'elle évite le développement et la formation d'un compartiment pouvant augmenter le niveau de présentation antigénique des protéines virales par les molécules du CMH de classe I. De plus, un autre point majeur pouvant contribuer à l'évasion immunitaire du virus HSV-1

est sa capacité à réduire fortement le niveau de stress du réticulum endoplasmique lors de sa réplication⁸². Si l'on tient compte du lien entre le stress associé au réticulum endoplasmique et l'autophagie, il semble, encore une fois, que ce type de mécanisme puisse être bénéfique au virus en diminuant le transfert d'antigènes viraux contenus dans le réticulum endoplasmique vers un compartiment vacuolaire dégradatif. Ceci permettrait de réduire la génération de peptides viraux pouvant servir à la présentation antigénique par les molécules du CMH.

9.5 Stimulation de l'apprêtement vacuolaire favorisant la présentation antigénique

La protéomique a permis de révolutionner notre compréhension des mécanismes moléculaires entourant l'apprêtement des antigènes exogènes dans le phagosome, qui mènent à la présentation sur les molécules du CMH de classe I. En effet, l'identification de multiples protéines provenant du réticulum endoplasmique sur le phagosome a permis de proposer une explication quant à la capacité du phagosome à contribuer à la présentation d'antigènes sur les CMH de classe I¹⁸³. Les études protéomiques ont également permis d'établir qu'un traitement des cellules avec de l'interféron- γ , une cytokine pro-inflammatoire, provoquait la formation de phagosomes plus aptes à tuer les pathogènes, et suggéraient fortement une amélioration de la capacité de ce compartiment à apprêter les antigènes pour la présentation antigénique¹⁸⁷. Ce changement probable de la capacité à générer des peptides pouvant servir à la présentation antigénique par les molécules de CMH de classe I suite au traitement des cellules par l'interféron- γ était en quelque sorte prévisible. En effet, il était déjà connu qu'une stimulation par l'interféron- γ provoque une augmentation de la machinerie moléculaire associée à la voie classique de présentation des CMH de classe I. Comme cette machinerie moléculaire est majoritairement localisée dans le réticulum endoplasmique et que ce dernier sert à la formation des phagosomes, il n'était donc pas surprenant d'observer une augmentation de la machinerie reliée à la présentation des CMH de classe I sur les phagosomes. Par contre, ces travaux ont encore une fois

souligné le lien direct qui existe entre le compartiment vacuolaire et le réticulum endoplasmique. L'importance et l'impact de l'interféron- γ sur l'efficacité des phagosomes à apprêter des antigènes extracellulaires et à permettre leur présentation sur des molécules du CMH de classe I ont d'ailleurs été clairement démontrés dans les travaux de cette thèse (voir annexe 1 et article II). En effet, la présentation croisée d'antigènes exogènes phagocytés par des macrophages n'ayant subi aucun traitement particulier est quasi inexistante. Par contre, chez les macrophages ayant subi un prétraitement avec de l'interféron- γ , il nous a été possible d'observer une forte activité de présentation croisée en comparaison aux macrophages n'ayant subi aucune stimulation. Ceci confirme donc les résultats de protéomique qui prévoyaient une telle augmentation de la présentation croisée. La nécessité de stimuler les macrophages pour déclencher une activité de présentation croisée suggère que certains stimuli sont requis afin de provoquer la formation de phagosomes aptes à servir de compartiments compétents pour la présentation croisée. Par exemple, il a déjà été démontré que la stimulation de TLRs par des motifs associés aux pathogènes pouvait jouer ce rôle et favoriser la présentation croisée²⁸⁴. Les travaux présentés dans l'article II de cette thèse ont également permis d'identifier un autre facteur favorisant l'établissement de conditions favorables au développement de phagosomes compétents pour la présentation croisée. En effet, nous avons démontré que des conditions d'hyperthermie, telles que celles observées lors d'un épisode de fièvre relié à une infection virale, engendraient la formation de phagosomes compétents pour la présentation croisée. Par conséquent, il semble de plus en plus probable que la capacité du compartiment vacuolaire à permettre la présentation d'antigènes sur les molécules du CMH de classe I soit associée à l'exposition de la cellule à certains stimuli tels que ceux rencontrés lors d'une infection.

Les résultats obtenus dans l'article I de cette thèse qui démontrent la capacité du compartiment autophagosomal à contribuer à la présentation d'antigènes endogènes sur les molécules du CMH de classe I vont également dans ce sens. Tout comme pour le phagosome, l'hyperthermie imitant la fièvre semble aussi favoriser un

apprêtement vacuolaire menant à la présentation des antigènes viraux sur les CMH de classe I. De plus, nous avons également observé que la cytokine pyrogénique IL-1 β était en mesure de produire sensiblement les mêmes effets que l'hyperthermie. Il semble donc que la présence de facteurs de stress, déjà connue pour induire l'autophagie^{285, 286}, puisse également être associée à la capacité du compartiment autophagosomal à acquérir et/ou apprêter les antigènes intracellulaires pour la présentation antigénique par les molécules du CMH de classe I. L'absence de contribution du compartiment autophagosomal en début d'infection et sa forte contribution dans la phase tardive, moment où le stress cellulaire est à son comble, semblent également supporter cette hypothèse. Bien qu'il n'ait pas encore été démontré que la stimulation de TLRs puisse favoriser la présentation antigénique par les autophagosomes, comme c'est le cas avec les phagosomes, il a toutefois été démontré que la signalisation par les TLRs favorisait leur développement. Ceci démontre encore une fois l'existence d'un lien étroit entre le compartiment vacuolaire, qu'il soit phagosomal ou autophagosomal, et la présence de facteurs de stress.

Les résultats obtenus après traitement des cellules par l'interféron- γ semblent, *a priori*, ébranler le parallèle que nous essayons d'établir entre la réactivité des compartiments phagosomaux et autophagosomaux quant à la présentation sur des CMH de classe I. En effet, nous avons montré que la stimulation des macrophages par l'interféron- γ favorisait un apprêtement vacuolaire des antigènes dans les expériences de présentation croisée. Or, dans le cas d'une infection par HSV-1, ce traitement provoque une forte augmentation de l'implication de la voie classique de présentation antigénique par les molécules du CMH de classe I, et non de la voie vacuolaire. Nous proposons deux explications à ce phénomène. Tout d'abord, la stimulation de la voie classique par l'interféron- γ est telle qu'elle pourrait masquer la contribution éventuelle d'une voie vacuolaire normalement observée dans les phases tardives de l'infection. Ensuite, la stimulation des cellules par l'interféron- γ mène à une diminution considérable de la quantité d'antigènes viraux produits lors de l'infection, attestant de l'induction d'une

forte résistance des cellules face à cette infection. Or, c'est la quantité d'antigènes viraux présents dans la cellule infectée qui détermine le stress subit par cette cellule. Ainsi, le traitement d'une cellule infectée par l'interféron- γ a pour conséquence de diminuer le stress qu'elle subit de la part du virus. La nécessité pour la cellule de faire appel à l'autophagie pour lutter contre l'infection serait donc diminuée après traitement par l'interféron- γ , ce qui pourrait expliquer pourquoi nous n'observons pas d'apprêtement vacuolaire des antigènes viraux dans ce cas précis, même dans les phases tardives de l'infection.

D'autre part, il faut aussi mettre en perspective les fonctions primaires des macrophages dans l'organisme. Bien que ces cellules soient des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, leur rôle principal demeure la séquestration de pathogènes et leur destruction. Il a donc été proposé que les macrophages auraient une tendance à dégrader de façon excessive les antigènes dans la phagosome, ce qui provoquerait la destruction des peptides pouvant servir à la présentation antigénique par les molécules du CMH²⁰². Les résultats obtenus dans cette thèse vont également en ce sens puisque l'ajout d'aprotinine, un inhibiteur de protéases à sérine, permet d'augmenter l'efficacité du compartiment phagosomal dans l'apprêtement antigénique menant à la présentation sur des molécules du CMH de classe I (article II et article en annexe I). Il est intéressant de noter que la stimulation des cellules par l'interféron- γ modifie la cinétique de maturation des phagosomes en diminuant momentanément la dégradation des antigènes afin de favoriser leur présentation sur les CMH de classe I. Dans cette condition où les macrophages étaient stimulés par l'interféron- γ , l'ajout d'aprotinine n'avait que très peu d'impact sur la présentation croisée (annexe 1), ce qui tend à confirmer l'hypothèse que les macrophages dégraderaient de façon excessive les antigènes présents dans le phagosome.

10. Conclusion

L'autophagie et la phagocytose sont deux processus clés permettant la séquestration et l'élimination des pathogènes. Cette capacité à dégrader les pathogènes en font des organites de toute première importance dans l'immunité innée. Cependant, leur fonction immunitaire s'étend bien au-delà de leur capacité digestive permettant le contrôle des microorganismes. Leur habileté à générer des peptides antigéniques et l'efficacité avec laquelle ces deux organites en assurent le chargement sur les molécules du CMH de classe II afin de stimuler les lymphocytes T CD4⁺ en font des compartiments vacuolaires jouant un rôle majeur dans l'immunité acquise. La découverte que les autophagosomes, tout comme les phagosomes, puissent participer à l'apprêtement d'antigènes pour la présentation antigénique par les CMH de classe I a permis de compléter la boucle en démontrant que ces deux compartiments peuvent participer à la présentation d'antigènes tant sur les molécules du CMH de classe I que de classe II. Cette capacité à participer à la présentation de peptides antigéniques sur les molécules du CMH de classe I et de classe II permet à ces organites de pouvoir contribuer à stimuler à la fois les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺. Ceci maximise donc la mise en place de la réponse immunitaire adaptative et assure un contrôle immunitaire optimal en cas d'infection. De plus, la fonctionnalité de ces deux organites dans la présentation antigénique par les molécules du CMH de classe I semble être étroitement reliée à leur interaction avec le réticulum endoplasmique lors de leur biogenèse. Cette interaction assure à la fois le transfert de la machinerie moléculaire associée à la présentation par les CMH I du réticulum endoplasmique vers le compartiment autophagosomal et, lors d'une infection virale, le transfert d'antigènes intracellulaires vers un compartiment apte à les apprêter et assurer leur présentation sur les molécules du CMH.

11. Perspectives futures

Bien que la découverte des autophagosomes remonte à plusieurs décennies, plus de la moitié des publications scientifiques sur le sujet ont paru dans les deux dernières années. Cet engouement récent pour l'autophagie a d'ailleurs permis d'établir un rôle prépondérant de celle-ci dans une multitude de conditions tant physiologiques que pathologiques. Cette acquisition toute récente de nouvelles connaissances sur l'autophagie, spécialement dans le domaine de l'immunité, a déjà permis l'élaboration de stratégies favorisant le développement de réponses immunitaires optimales face à certains agents pathogènes. Par exemple, la stimulation de l'autophagie lors de l'administration d'un vaccin anti-tuberculose à des souris permet d'augmenter considérablement l'efficacité du vaccin¹. Bien que cette étude se concentrait principalement sur la présentation antigénique par les CMH de classe II, et donc sur l'activation des lymphocytes T CD4⁺, ce groupe a également observé une augmentation significative du nombre de lymphocytes T CD8⁺ lorsque l'autophagie était stimulée lors de la vaccination. Ce résultat tend à valider les observations effectuées dans cette thèse en démontrant, *in vivo*, que la stimulation de l'autophagie permet d'amplifier l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Bien qu'indirectement, ces résultats suggèrent que l'autophagie favorise la présentation antigénique par les molécules du CMH de classe I. Il est intéressant de noter que la stimulation de l'autophagie a été effectuée par un traitement à la rapamycine, une drogue déjà utilisée en clinique et que nous avons également utilisée dans nos travaux afin de stimuler la présentation des antigènes viraux de HSV-1. Bien que davantage d'études seront nécessaires afin de valider l'importance *in vivo* de l'autophagie dans la présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe I, ces travaux laissent fortement suggérer qu'une telle approche pourrait être utilisée dans les futurs protocoles de vaccination antivirale, incluant évidemment ceux contre l'herpès.

D'un point de vue plus général, il sera également très intéressant de déterminer la contribution exacte de la fièvre sur le niveau d'autophagie des cellules infectées et son influence sur la présentation antigénique menant à une réponse immunitaire antivirale efficace. Dans le même ordre d'idée, la détermination du rôle précis de l'IL-1 β dans le déclenchement de l'autophagie au niveau des cellules infectées devra être étudié plus en profondeur. Par exemple, l'IL-1 β est reconnue pour induire la fièvre et causer une perte d'appétit *in vivo*, or ces deux conditions sont reconnues pour stimuler l'autophagie et par conséquent, la présentation antigénique. La détermination de la contribution exacte de la fièvre (ou des cytokines pyrogéniques telles que l'IL-1 β) dans le développement d'une réponse immunitaire optimale nous amènera peut-être à modifier nos habitudes de vie et à réduire ainsi l'utilisation de médicaments permettant de diminuer la fièvre, afin de maximiser notre réponse immunitaire.

Finalement, l'utilisation du virus HSV-1 dans le traitement anti-tumoral semble être une avenue de plus en plus prometteuse. En effet, l'infection des cellules tumorales par le virus HSV-1 permet d'augmenter l'antigénicité des cellules cancéreuses et par conséquent, leur élimination par le système immunitaire². Pour y parvenir, les différents groupes ayant eu recours à cette stratégie ont utilisé des virus HSV-1 atténués. Bien que plusieurs variantes du virus aient été utilisées, tous les virus avaient au minimum une délétion pour la protéine ICP34.5 afin d'éviter une inhibition de l'autophagie dans les cellules tumorales infectées³. Dans de telles conditions, il a été démontré que l'infection de souris avec le vecteur HSV-1 déficient pour la protéine ICP34.5 provoque une augmentation significative du nombre de lymphocytes T CD8⁺ comparativement à la forme sauvage du virus HSV-1⁴. Encore une fois, ces résultats semblent confirmer l'importance de l'autophagie dans la présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe I lors d'infection virale. Dans ces conditions, il sera intéressant d'étudier la contribution de la forme classique des autophagosomes versus ceux issus de l'enveloppe nucléaire dans la réponse immunitaire anti-tumorale. À suivre...

12. Bibliographie

1. William, P.E. *Fundamental Immunology*, fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. (2003).
2. Roitt, I. *Immunologie, éditions pradel, Paris*. (1990).
3. Laiosa, C.V., Stadtfeld, M. & Graf, T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* **24**, 705-738 (2006).
4. Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 139-176 (2003).
5. Jenkins, M.K. *et al.* In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* **19**, 23-45 (2001).
6. Wong, P. & Pamer, E.G. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* **21**, 29-70 (2003).
7. Auffray, C., Sieweke, M.H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 669-692 (2009).
8. Aderem, A. & Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**, 593-623 (1999).
9. Trombetta, E.S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* **23**, 975-1028 (2005).
10. Rock, K.L. *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761-771 (1994).
11. Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 801-847 (1996).
12. Adams, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* **4**, 349-360 (2004).
13. Hartmann-Petersen, R., Seeger, M. & Gordon, C. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* **28**, 26-31 (2003).
14. Schmidtke, G. *et al.* Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J* **15**, 6887-6898 (1996).
15. Chen, P. & Hochstrasser, M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* **86**, 961-972 (1996).
16. Groll, M. *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**, 1062-1067 (2000).
17. Groll, M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471 (1997).
18. Orłowski, M., Cardozo, C. & Michaud, C. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of

- two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* **32**, 1563-1572 (1993).
19. Eleuteri, A.M., Kohanski, R.A., Cardozo, C. & Orłowski, M. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J Biol Chem* **272**, 11824-11831 (1997).
 20. Kisselev, A.F. *et al.* The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* **278**, 35869-35877 (2003).
 21. Tanaka, K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 12-36 (2009).
 22. Elsasser, S. & Finley, D. Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol* **7**, 742-749 (2005).
 23. Seibenhener, M.L. *et al.* Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol* **24**, 8055-8068 (2004).
 24. Richly, H. *et al.* A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* **120**, 73-84 (2005).
 25. Verma, R. *et al.* Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-615 (2002).
 26. Aki, M. *et al.* Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* **115**, 257-269 (1994).
 27. Cruz, M., Elenich, L.A., Smolarek, T.A., Menon, A.G. & Monaco, J.J. DNA sequence, chromosomal localization, and tissue expression of the mouse proteasome subunit Imp10 (Psm10) gene. *Genomics* **45**, 618-622 (1997).
 28. Knowlton, J.R. *et al.* Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature* **390**, 639-643 (1997).
 29. Tanaka, K. & Kasahara, M. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* **163**, 161-176 (1998).
 30. Kloetzel, P.M. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* **5**, 661-669 (2004).
 31. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479 (1998).
 32. Ahlberg, J., Marzella, L. & Glaumann, H. Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis. *Lab Invest* **47**, 523-532 (1982).
 33. Mortimore, G.E., Lardeux, B.R. & Adams, C.E. Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. *J Biol Chem* **263**, 2506-2512 (1988).
 34. Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Camerini, E. & De Virgilio, C. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol Cell* **19**, 15-26 (2005).
 35. Roberts, P. *et al.* Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 129-141 (2003).

36. Dice, J.F. & Chiang, H.L. Peptide signals for protein degradation within lysosomes. *Biochem Soc Symp* **55**, 45-55 (1989).
37. Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P. & Dice, J.F. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* **246**, 382-385 (1989).
38. Cuervo, A.M. & Dice, J.F. Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J Cell Sci* **113 Pt 24**, 4441-4450 (2000).
39. Cuervo, A.M., Dice, J.F. & Knecht, E. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J Biol Chem* **272**, 5606-5615 (1997).
40. Cuervo, A.M., Mann, L., Bonten, E.J., d'Azzo, A. & Dice, J.F. Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO J* **22**, 47-59 (2003).
41. Lum, J.J., DeBerardinis, R.J. & Thompson, C.B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 439-448 (2005).
42. Lum, J.J. *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237-248 (2005).
43. Byfield, M.P., Murray, J.T. & Backer, J.M. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem* **280**, 33076-33082 (2005).
44. Nobukuni, T. *et al.* Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14238-14243 (2005).
45. Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* **2**, 330-335 (2001).
46. Liang, C. *et al.* Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* **8**, 688-699 (2006).
47. Fimia, G.M. *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**, 1121-1125 (2007).
48. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939 (2005).
49. Obara, K., Sekito, T., Niimi, K. & Ohsumi, Y. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J Biol Chem* **283**, 23972-23980 (2008).
50. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471-484 (2006).
51. Seglen, P.O. & Gordon, P.B. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1889-1892 (1982).
52. Talloczy, Z., Virgin, H.W.t. & Levine, B. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* **2**, 24-29 (2006).
53. Talloczy, Z. *et al.* Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 190-195 (2002).
54. Meley, D., Pattingre, S. & Codogno, P. [PI3 kinases and the control of autophagia]. *Bull Cancer* **93**, 439-444 (2006).

55. Xie, Z., Nair, U. & Klionsky, D.J. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**, 3290-3298 (2008).
56. Axe, E.L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685-701 (2008).
57. Simonsen, A. & Stenmark, H. Self-eating from an ER-associated cup. *J Cell Biol* **182**, 621-622 (2008).
58. Klionsky, D.J. *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**, 539-545 (2003).
59. Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T. & Ohsumi, Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* **12**, 209-218 (2007).
60. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-5728 (2000).
61. Ohsumi, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 211-216 (2001).
62. Bjorkoy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**, 603-614 (2005).
63. Liou, W., Geuze, H.J., Geelen, M.J. & Slot, J.W. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* **136**, 61-70 (1997).
64. Punnonen, E.L., Autio, S., Kaija, H. & Reunanen, H. Autophagic vacuoles fuse with the prelysosomal compartment in cultured rat fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **61**, 54-66 (1993).
65. Berg, T.O., Fengsrud, M., Stromhaug, P.E., Berg, T. & Seglen, P.O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* **273**, 21883-21892 (1998).
66. Dunn, W.A., Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* **110**, 1935-1945 (1990).
67. Eskelinen, E.L. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**, 1-10 (2005).
68. Yamamoto, A. *et al.* Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* **23**, 33-42 (1998).
69. Ungermann, C., Wickner, W. & Xu, Z. Vacuole acidification is required for trans-SNARE pairing, LMA1 release, and homotypic fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11194-11199 (1999).
70. Nara, A. *et al.* SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell Struct Funct* **27**, 29-37 (2002).
71. Jager, S. *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **117**, 4837-4848 (2004).
72. Rikihisa, Y. Glycogen autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by rickettsiae. *Anat Rec* **208**, 319-327 (1984).
73. Levine, B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* **120**, 159-162 (2005).
74. Taylor, M.P. & Kirkegaard, K. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol* **81**, 12543-12553 (2007).

75. Gutierrez, M.G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753-766 (2004).
76. Nakagawa, I. *et al.* Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* **306**, 1037-1040 (2004).
77. Birmingham, C.L., Smith, A.C., Bakowski, M.A., Yoshimori, T. & Brumell, J.H. Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J Biol Chem* **281**, 11374-11383 (2006).
78. Rich, K.A., Burkett, C. & Webster, P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol* **5**, 455-468 (2003).
79. Py, B.F., Lipinski, M.M. & Yuan, J. Autophagy limits Listeria monocytogenes intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* **3**, 117-125 (2007).
80. Andrade, R.M., Wessendarp, M., Gubbels, M.J., Striepen, B. & Subauste, C.S. CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest* **116**, 2366-2377 (2006).
81. Ling, Y.M. *et al.* Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of Toxoplasma gondii in primed effector macrophages. *J Exp Med* **203**, 2063-2071 (2006).
82. Mulvey, M., Arias, C. & Mohr, I. Maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in herpes simplex virus type 1-infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor. *J Virol* **81**, 3377-3390 (2007).
83. Orvedahl, A. *et al.* HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* **1**, 23-35 (2007).
84. Cassady, K.A., Gross, M. & Roizman, B. The herpes simplex virus US11 protein effectively compensates for the gamma1(34.5) gene if present before activation of protein kinase R by precluding its phosphorylation and that of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *J Virol* **72**, 8620-8626 (1998).
85. Mulvey, M., Poppers, J., Sternberg, D. & Mohr, I. Regulation of eIF2alpha phosphorylation by different functions that act during discrete phases in the herpes simplex virus type 1 life cycle. *J Virol* **77**, 10917-10928 (2003).
86. Chaumorcet, M., Souquere, S., Pierron, G., Codogno, P. & Esclatine, A. Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy* **4**, 46-53 (2008).
87. Ku, B. *et al.* Structural and biochemical bases for the inhibition of autophagy and apoptosis by viral BCL-2 of murine gamma-herpesvirus 68. *PLoS Pathog* **4**, e25 (2008).
88. Sir, D., Liang, C., Chen, W.L., Jung, J.U. & Ou, J.H. Perturbation of autophagic pathway by hepatitis C virus. *Autophagy* **4**, 830-831 (2008).
89. Lee, D.Y., Lee, J. & Sugden, B. The unfolded protein response and autophagy: herpesviruses rule! *J Virol* **83**, 1168-1172 (2009).
90. Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N. & Iwasaki, A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315**, 1398-1401 (2007).

91. Chaturvedi, A., Dorward, D. & Pierce, S.K. The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity* **28**, 799-809 (2008).
92. Welner, R.S. *et al.* Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* **112**, 3753-3761 (2008).
93. Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G. & Deretic, V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* **27**, 1110-1121 (2008).
94. Xu, Y. *et al.* Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* **27**, 135-144 (2007).
95. Yano, T. *et al.* Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol* **9**, 908-916 (2008).
96. Hoyer-Hansen, M. & Jaattela, M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* **14**, 1576-1582 (2007).
97. Kouroku, Y. *et al.* ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* **14**, 230-239 (2007).
98. Bernales, S., McDonald, K.L. & Walter, P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* **4**, e423 (2006).
99. Cheng, G., Feng, Z. & He, B. Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2alpha dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein. *J Virol* **79**, 1379-1388 (2005).
100. Rabinovitch, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* **5**, 85-87 (1995).
101. Greenberg, S. & Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* **14**, 136-145 (2002).
102. Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J.C. & Chavrier, P. Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J* **17**, 6219-6229 (1998).
103. Caron, E. & Hall, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**, 1717-1721 (1998).
104. Desjardins, M. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* **5**, 183-186 (1995).
105. Desjardins, M., Nzala, N.N., Corsini, R. & Rondeau, C. Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* **110** (Pt 18), 2303-2314 (1997).
106. Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. & Griffiths, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* **124**, 677-688 (1994).
107. Desjardins, M. *et al.* Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem* **269**, 32194-32200 (1994).
108. Garin, J. *et al.* The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**, 165-180 (2001).
109. Gagnon, E. *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119-131 (2002).

110. Muller-Taubenberger, A. *et al.* Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J* **20**, 6772-6782 (2001).
111. McNew, J.A. *et al.* Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *J Cell Biol* **150**, 105-117 (2000).
112. Desjardins, M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* **3**, 280-291 (2003).
113. Kloetzel, P.M. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 179-187 (2001).
114. York, I.A., Goldberg, A.L., Mo, X.Y. & Rock, K.L. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* **172**, 49-66 (1999).
115. Hsing, L.C. & Rudensky, A.Y. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* **207**, 229-241 (2005).
116. Strehl, B. *et al.* Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* **207**, 19-30 (2005).
117. van Lint, A. *et al.* Herpes simplex virus-specific CD8+ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation. *J Immunol* **172**, 392-397 (2004).
118. Raasi, S. & Wolf, D.H. Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 780-791 (2007).
119. Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L. & Goldberg, A.L. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J* **20**, 2357-2366 (2001).
120. Jensen, P.E. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* **8**, 1041-1048 (2007).
121. York, I.A., Bhutani, N., Zendzian, S., Goldberg, A.L. & Rock, K.L. Tripeptidyl peptidase II is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most MHC class I antigen presentation. *J Immunol* **177**, 1434-1443 (2006).
122. Guil, S. *et al.* Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental. *J Biol Chem* **281**, 39925-39934 (2006).
123. Yewdell, J.W., Reits, E. & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **3**, 952-961 (2003).
124. Kunisawa, J. & Shastri, N. The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway. *Mol Cell* **12**, 565-576 (2003).
125. Neefjes, J.J., Momburg, F. & Hammerling, G.J. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* **261**, 769-771 (1993).
126. Scholz, C. & Tampe, R. The intracellular antigen transport machinery TAP in adaptive immunity and virus escape mechanisms. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 509-515 (2005).
127. Marusina, K. & Monaco, J.J. Peptide transport in antigen presentation. *Curr Opin Hematol* **3**, 19-26 (1996).

128. Jugovic, P., Hill, A.M., Tomazin, R., Ploegh, H. & Johnson, D.C. Inhibition of major histocompatibility complex class I antigen presentation in pig and primate cells by herpes simplex virus type 1 and 2 ICP47. *J Virol* **72**, 5076-5084 (1998).
129. Lautscham, G. *et al.* Identification of a TAP-independent, immunoproteasome-dependent CD8+ T-cell epitope in Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *J Virol* **77**, 2757-2761 (2003).
130. Tiwari, N. *et al.* A transporter associated with antigen-processing independent vacuolar pathway for the MHC class I-mediated presentation of endogenous transmembrane proteins. *J Immunol* **178**, 7932-7942 (2007).
131. Elliott, T. & Neefjes, J. The complex route to MHC class I-peptide complexes. *Cell* **127**, 249-251 (2006).
132. Kanaseki, T. & Shastri, N. Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing regulates quality of processed peptides presented by MHC class I molecules. *J Immunol* **181**, 6275-6282 (2008).
133. Chang, S.C., Momburg, F., Bhutani, N. & Goldberg, A.L. The ER aminopeptidase, ERAAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17107-17112 (2005).
134. Hammer, G.E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D. & Shastri, N. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* **7**, 103-112 (2006).
135. Kanaseki, T., Blanchard, N., Hammer, G.E., Gonzalez, F. & Shastri, N. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* **25**, 795-806 (2006).
136. Hammer, G.E., Kanaseki, T. & Shastri, N. The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity* **26**, 397-406 (2007).
137. Zhang, Y. & Williams, D.B. Assembly of MHC class I molecules within the endoplasmic reticulum. *Immunol Res* **35**, 151-162 (2006).
138. Ackerman, A.L. & Cresswell, P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* **5**, 678-684 (2004).
139. Shastri, N., Cardinaud, S., Schwab, S.R., Serwold, T. & Kunisawa, J. All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol Rev* **207**, 31-41 (2005).
140. Goldrath, A.W. & Bevan, M.J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* **402**, 255-262 (1999).
141. Anikeeva, N. *et al.* Quantum dot/peptide-MHC biosensors reveal strong CD8-dependent cooperation between self and viral antigens that augment the T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16846-16851 (2006).
142. Viville, S. *et al.* Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* **72**, 635-648 (1993).
143. Bevan, M.J. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* **4**, 595-602 (2004).
144. Madden, D.R. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* **13**, 587-622 (1995).
145. Jasanoff, A., Wagner, G. & Wiley, D.C. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J* **17**, 6812-6818 (1998).

146. Roche, P.A. & Cresswell, P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**, 615-618 (1990).
147. Pieters, J., Bakke, O. & Dobberstein, B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* **106** (Pt 3), 831-846 (1993).
148. Neefjes, J.J., Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.J. & Ploegh, H.L. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* **61**, 171-183 (1990).
149. Riese, R.J. & Chapman, H.A. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **12**, 107-113 (2000).
150. Nakagawa, T. *et al.* Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-453 (1998).
151. Shi, G.P. *et al.* Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**, 197-206 (1999).
152. Mosyak, L., Zaller, D.M. & Wiley, D.C. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* **9**, 377-383 (1998).
153. Jensen, P.E., Weber, D.A., Thayer, W.P., Chen, X. & Dao, C.T. HLA-DM and the MHC class II antigen presentation pathway. *Immunol Res* **20**, 195-205 (1999).
154. Karlsson, L., Surh, C.D., Sprent, J. & Peterson, P.A. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* **351**, 485-488 (1991).
155. 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* **17**, 2971-2981 (1998).
156. van Ham, S.M. *et al.* HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* **7**, 950-957 (1997).
157. Ramachandra, L., Song, R. & Harding, C.V. Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide:class II MHC complexes. *J Immunol* **162**, 3263-3272 (1999).
158. Freigang, S., Probst, H.C. & van den Broek, M. DC infection promotes antiviral CTL priming: the 'Winkelried' strategy. *Trends Immunol* **26**, 13-18 (2005).
159. Kurts, C. *et al.* Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* **184**, 923-930 (1996).
160. Bevan, M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* **143**, 1283-1288 (1976).
161. Chiplunkar, S., De Libero, G. & Kaufmann, S.H. Mycobacterium leprae-specific Lyt-2+ T lymphocytes with cytolytic activity. *Infect Immun* **54**, 793-797 (1986).
162. Steinhoff, U. & Kaufmann, S.H. Specific lysis by CD8+ T cells of Schwann cells expressing Mycobacterium leprae antigens. *Eur J Immunol* **18**, 969-972 (1988).
163. Steinhoff, U., Schoel, B. & Kaufmann, S.H. Lysis of interferon-gamma activated Schwann cell by cross-reactive CD8+ alpha/beta T cells with specificity for the mycobacterial 65 kd heat shock protein. *Int Immunol* **2**, 279-284 (1990).

164. Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B. & Rock, K.L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4942-4946 (1993).
165. Pfeifer, J.D. *et al.* Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**, 359-362 (1993).
166. Harding, C.V. & Song, R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* **153**, 4925-4933 (1994).
167. Song, R. & Harding, C.V. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* **156**, 4182-4190 (1996).
168. Chen, L. & Jondal, M. Alternative processing for MHC class I presentation by immature and CpG-activated dendritic cells. *Eur J Immunol* **34**, 952-960 (2004).
169. Kessler, B. *et al.* Pathways accessory to proteasomal proteolysis are less efficient in major histocompatibility complex class I antigen production. *J Biol Chem* **278**, 10013-10021 (2003).
170. Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M. & Rock, K.L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**, 155-165 (2004).
171. Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**, 243-246 (1995).
172. Bachmann, M.F. *et al.* TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins. *Eur J Immunol* **25**, 1739-1743 (1995).
173. Gromme, M. *et al.* Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10326-10331 (1999).
174. Ruedl, C., Storni, T., Lechner, F., Bachi, T. & Bachmann, M.F. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur J Immunol* **32**, 818-825 (2002).
175. Schoenberger, S.P. *et al.* Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells. *J Immunol* **161**, 3808-3812 (1998).
176. Chefalo, P.J., Granda, A.G., 3rd, Van Kaer, L. & Harding, C.V. Tapasin^{-/-} and TAP1^{-/-} macrophages are deficient in vacuolar alternate class I MHC (MHC-I) processing due to decreased MHC-I stability at phagolysosomal pH. *J Immunol* **170**, 5825-5833 (2003).
177. Day, P.M., Yewdell, J.W., Porgador, A., Germain, R.N. & Bennink, J.R. Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8064-8069 (1997).
178. Brossart, P. & Bevan, M.J. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* **90**, 1594-1599 (1997).
179. Bertholet, S. *et al.* Leishmania antigens are presented to CD8⁺ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol* **177**, 3525-3533 (2006).

180. Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G. & Rock, K.L. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* **158**, 2723-2730 (1997).
181. Chen, L. & Jondal, M. Brefeldin A inhibits vesicular MHC class I processing in resting but not in CpG- and disruption-activated DC. *Mol Immunol* **46**, 158-165 (2008).
182. Ackerman, A.L., Giodini, A. & Cresswell, P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* **25**, 607-617 (2006).
183. Houde, M. *et al.* Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-406 (2003).
184. Guermonprez, P. *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397-402 (2003).
185. Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12889-12894 (2003).
186. Burgdorf, S., Scholz, C., Kautz, A., Tampe, R. & Kurts, C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* **9**, 558-566 (2008).
187. Jutras, I. *et al.* Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics* **7**, 697-715 (2008).
188. Trost, M. *et al.* The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* **30**, 143-154 (2009).
189. Chicz, R.M. *et al.* Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* **178**, 27-47 (1993).
190. Dengjel, J. *et al.* Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7922-7927 (2005).
191. Dongre, A.R. *et al.* In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur J Immunol* **31**, 1485-1494 (2001).
192. Friede, T. *et al.* Natural ligand motifs of closely related HLA-DR4 molecules predict features of rheumatoid arthritis associated peptides. *Biochim Biophys Acta* **1316**, 85-101 (1996).
193. Muntasell, A. *et al.* Dissection of the HLA-DR4 peptide repertoire in endocrine epithelial cells: strong influence of invariant chain and HLA-DM expression on the nature of ligands. *J Immunol* **173**, 1085-1093 (2004).
194. Muntasell, A. *et al.* HLA-DR4 molecules in neuroendocrine epithelial cells associate to a heterogeneous repertoire of cytoplasmic and surface self peptides. *J Immunol* **169**, 5052-5060 (2002).
195. Paludan, C. *et al.* Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* **307**, 593-596 (2005).
196. Gueguen, M. & Long, E.O. Presentation of a cytosolic antigen by major histocompatibility complex class II molecules requires a long-lived form of the antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14692-14697 (1996).

197. Chen, M. *et al.* Efficient class II major histocompatibility complex presentation of endogenously synthesized hepatitis C virus core protein by Epstein-Barr virus-transformed B-lymphoblastoid cell lines to CD4(+) T cells. *J Virol* **72**, 8301-8308 (1998).
198. Jacobson, S., Sekaly, R.P., Jacobson, C.L., McFarland, H.F. & Long, E.O. HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells. *J Virol* **63**, 1756-1762 (1989).
199. Jaraquemada, D., Marti, M. & Long, E.O. An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* **172**, 947-954 (1990).
200. Dorfel, D. *et al.* Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* **105**, 3199-3205 (2005).
201. Zeng, G., Wang, X., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A. & Wang, R.F. CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3964-3969 (2001).
202. Brazil, M.I., Weiss, S. & Stockinger, B. Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol* **27**, 1506-1514 (1997).
203. Nimmerjahn, F. *et al.* Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* **33**, 1250-1259 (2003).
204. Zhou, D. *et al.* Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* **22**, 571-581 (2005).
205. Tewari, M.K., Sinnathamby, G., Rajagopal, D. & Eisenlohr, L.C. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol* **6**, 287-294 (2005).
206. Lich, J.D., Elliott, J.F. & Blum, J.S. Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins. *J Exp Med* **191**, 1513-1524 (2000).
207. Malnati, M.S. *et al.* Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* **357**, 702-704 (1992).
208. Dissanayake, S.K., Tuera, N. & Ostrand-Rosenberg, S. Presentation of endogenously synthesized MHC class II-restricted epitopes by MHC class II cancer vaccines is independent of transporter associated with Ag processing and the proteasome. *J Immunol* **174**, 1811-1819 (2005).
209. Dani, A. *et al.* The pathway for MHCII-mediated presentation of endogenous proteins involves peptide transport to the endo-lysosomal compartment. *J Cell Sci* **117**, 4219-4230 (2004).
210. Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N. & Klein, L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* **455**, 396-400 (2008).
211. Vyas, J.M., Van der Veen, A.G. & Ploegh, H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* **8**, 607-618 (2008).

212. Crotzer, V.L. & Blum, J.S. Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol* **182**, 3335-3341 (2009).
213. Swanson, M.S. Autophagy: eating for good health. *J Immunol* **177**, 4945-4951 (2006).
214. Schmid, D., Pypaert, M. & Munz, C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **26**, 79-92 (2007).
215. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**, 24131-24145 (2007).
216. Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884 (2006).
217. Lelouard, H. *et al.* Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* **417**, 177-182 (2002).
218. Bernales, S., Schuck, S. & Walter, P. ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* **3**, 285-287 (2007).
219. Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J. Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol* **17**, 279-285 (2007).
220. Dorn, B.R., Dunn, W.A., Jr. & Progulske-Fox, A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* **4**, 1-10 (2002).
221. Li, Y. *et al.* Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res* **68**, 6889-6895 (2008).
222. Uhl, M. *et al.* Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8(+) T cells. *Cell Death Differ* (2009).
223. Mukherjee, P. *et al.* Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on MHC class II is dependent on cytoplasmic proteolysis. *J Immunol* **167**, 2632-2641 (2001).
224. Johnstone, C. *et al.* Relevance of viral context and diversity of antigen-processing routes for respiratory syncytial virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J Gen Virol* **89**, 2194-2203 (2008).
225. Lautscham, G. *et al.* Processing of a multiple membrane spanning Epstein-Barr virus protein for CD8(+) T cell recognition reveals a proteasome-dependent, transporter associated with antigen processing-independent pathway. *J Exp Med* **194**, 1053-1068 (2001).
226. Zhou, X. *et al.* Characterization of TAP-independent and brefeldin A-resistant presentation of Sendai virus antigen to CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol* **42**, 66-75 (1995).
227. Zhou, X. *et al.* TAP2-defective RMA-S cells present Sendai virus antigen to cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* **23**, 1796-1801 (1993).
228. Neijssen, J. *et al.* Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* **434**, 83-88 (2005).
229. Bowman, B.R., Baker, M.L., Rixon, F.J., Chiu, W. & Quijcho, F.A. Structure of the herpesvirus major capsid protein. *EMBO J* **22**, 757-765 (2003).
230. Navarro, D., Paz, P. & Pereira, L. Domains of herpes simplex virus I glycoprotein B that function in virus penetration, cell-to-cell spread, and cell fusion. *Virology* **186**, 99-112 (1992).

231. Torrisi, M.R., Di Lazzaro, C., Pavan, A., Pereira, L. & Campadelli-Fiume, G. Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *J Virol* **66**, 554-561 (1992).
232. Wisner, T.W. *et al.* Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* **83**, 3115-3126 (2009).
233. Padula, M.E., Sydnor, M.L. & Wilson, D.W. Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space. *J Virol* **83**, 4757-4765 (2009).
234. Stannard, L.M., Himmelhoch, S. & Wynchank, S. Intra-nuclear localization of two envelope proteins, gB and gD, of herpes simplex virus. *Arch Virol* **141**, 505-524 (1996).
235. Chatterjee, S., Wang, J.W., Cismowski, M.J., Bower, J.R. & Rosenthal, K.S. HSV-2 ICP34.5 protein modulates herpes simplex virus glycoprotein processing. *Arch Virol* **154**, 661-663 (2009).
236. Skepper, J.N., Whiteley, A., Browne, H. & Minson, A. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* **75**, 5697-5702 (2001).
237. Leuzinger, H. *et al.* Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* **79**, 13047-13059 (2005).
238. Granzow, H. *et al.* Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**, 3675-3684 (2001).
239. Cook, M.L. & Stevens, J.G. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect Immun* **7**, 272-288 (1973).
240. Stevens, J.G., Haarr, L., Porter, D.D., Cook, M.L. & Wagner, E.K. Prominence of the herpes simplex virus latency-associated transcript in trigeminal ganglia from seropositive humans. *J Infect Dis* **158**, 117-123 (1988).
241. Kramer, M.F. & Coen, D.M. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **69**, 1389-1399 (1995).
242. Chen, S.H. *et al.* Neither LAT nor open reading frame P mutations increase expression of spliced or intron-containing ICP0 transcripts in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **76**, 4764-4772 (2002).
243. Segal, A.L., Katcher, A.H., Brightman, V.J. & Miller, M.F. Recurrent herpes labialis, recurrent aphthous ulcers, and the menstrual cycle. *J Dent Res* **53**, 797-803 (1974).
244. Ship, II, Ashe, W.K. & Scherp, H.W. Recurrent "fever blister" and "canker sore". Tests for herpes simplex and other viruses with mammalian cell cultures. *Arch Oral Biol* **3**, 117-124 (1961).
245. Knickelbein, J.E. *et al.* Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* **322**, 268-271 (2008).
246. Liu, T., Khanna, K.M., Chen, X., Fink, D.J. & Hendricks, R.L. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med* **191**, 1459-1466 (2000).

247. Liu, T., Khanna, K.M., Carriere, B.N. & Hendricks, R.L. Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons. *J Virol* **75**, 11178-11184 (2001).
248. Rajasagi, N.K. *et al.* CD4+ T cells are required for the priming of CD8+ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. *J Virol* **83**, 5256-5268 (2009).
249. Orr, M.T. *et al.* Inhibition of MHC class I is a virulence factor in herpes simplex virus infection of mice. *PLoS Pathog* **1**, e7 (2005).
250. Goldsmith, K., Chen, W., Johnson, D.C. & Hendricks, R.L. Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. *J Exp Med* **187**, 341-348 (1998).
251. Sievers, E. *et al.* Glycoprotein B from strain 17 of herpes simplex virus type I contains an invariant chain homologous sequence that binds to MHC class II molecules. *Immunology* **107**, 129-135 (2002).
252. Neumann, J., Eis-Hubinger, A.M. & Koch, N. Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. *J Immunol* **171**, 3075-3083 (2003).
253. Yuan, W., Dasgupta, A. & Cresswell, P. Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling. *Nat Immunol* **7**, 835-842 (2006).
254. Van Vliet, K.E., De Graaf-Miltenburg, L.A., Verhoef, J. & Van Strijp, J.A. Direct evidence for antibody bipolar bridging on herpes simplex virus-infected cells. *Immunology* **77**, 109-115 (1992).
255. Johnson, K.E., Song, B. & Knipe, D.M. Role for herpes simplex virus 1 ICP27 in the inhibition of type I interferon signaling. *Virology* **374**, 487-494 (2008).
256. Eisemann, J., Muhl-Zurbes, P., Steinkasserer, A. & Kummer, M. Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 interferes with the interferon signaling pathway. *Immunobiology* **212**, 877-886 (2007).
257. Melroe, G.T., DeLuca, N.A. & Knipe, D.M. Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J Virol* **78**, 8411-8420 (2004).
258. Riedel, A. *et al.* Endogenous presentation of a nuclear antigen on MHC class II by autophagy in the absence of CRM1-mediated nuclear export. *Eur J Immunol* **38**, 2090-2095 (2008).
259. Matsunaga, K. *et al.* Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* **11**, 385-396 (2009).
260. Samuel, C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents (2001).
261. Shtrichman, R. & Samuel, C.E. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol* **4**, 251-259 (2001).
262. Mott, K., Brick, D.J., van Rooijen, N. & Ghiasi, H. Macrophages are important determinants of acute ocular HSV-1 infection in immunized mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 5605-5615 (2007).
263. Bauer, D., Mrzyk, S., van Rooijen, N., Steuhl, K.P. & Heiligenhaus, A. Macrophage-depletion influences the course of murine HSV-1 keratitis. *Curr Eye Res* **20**, 45-53 (2000).

264. Mueller, S.N., Heath, W., McLain, J.D., Carbone, F.R. & Jones, C.M. Characterization of two TCR transgenic mouse lines specific for herpes simplex virus. *Immunol Cell Biol* **80**, 156-163 (2002).
265. Alexander, D.E., Ward, S.L., Mizushima, N., Levine, B. & Leib, D.A. Analysis of the role of autophagy in replication of herpes simplex virus in cell culture. *J Virol* **81**, 12128-12134 (2007).
266. English, L. *et al.* Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* (2009).
267. Orvedahl, A. & Levine, B. Autophagy and viral neurovirulence. *Cell Microbiol* **10**, 1747-1756 (2008).
268. Yutin, N., Wolf, M.Y., Wolf, Y.I. & Koonin, E.V. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct* **4**, 9 (2009).
269. Levine, B. & Klionsky, D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-477 (2004).
270. Ueno, T., Munro, D. & Kominami, E. Membrane markers of endoplasmic reticulum preserved in autophagic vacuolar membranes isolated from leupeptin-administered rat liver. *J Biol Chem* **266**, 18995-18999 (1991).
271. Touret, N. *et al.* Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* **123**, 157-170 (2005).
272. Yamamoto, A., Masaki, R. & Tashiro, Y. Characterization of the isolation membranes and the limiting membranes of autophagosomes in rat hepatocytes by lectin cytochemistry. *J Histochem Cytochem* **38**, 573-580 (1990).
273. Meijer, A.J. & Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2445-2462 (2004).
274. Blander, J.M. & Medzhitov, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**, 1014-1018 (2004).
275. Sanjuan, M.A. *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**, 1253-1257 (2007).
276. Shui, W. *et al.* Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16952-16957 (2008).
277. Sato, A., Linehan, M.M. & Iwasaki, A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17343-17348 (2006).
278. Broberg, E.K. *et al.* Spread and replication of and immune response to gamma134.5-negative herpes simplex virus type 1 vectors in BALB/c mice. *J Virol* **78**, 13139-13152 (2004).
279. Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. & Masucci, M.G. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12616-12621 (1997).
280. Bickham, K. *et al.* Dendritic cells initiate immune control of epstein-barr virus transformation of B lymphocytes in vitro. *J Exp Med* **198**, 1653-1663 (2003).
281. Lee, S.P. *et al.* CD8 T cell recognition of endogenously expressed epstein-barr virus nuclear antigen 1. *J Exp Med* **199**, 1409-1420 (2004).

282. Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z. & Klionsky, D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* **281**, 30299-30304 (2006).
283. Hamasaki, M., Noda, T., Baba, M. & Ohsumi, Y. Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast. *Traffic* **6**, 56-65 (2005).
284. Mouries, J. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* **112**, 3713-3722 (2008).
285. Kawakami, T. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* (2009).
286. Zhang, H. *et al.* Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells. *Toxicol Sci* (2009).

ANNEXE I

Resource

The Phagosomal Proteome in Interferon- γ -Activated Macrophages

Matthias Trost^{1,2}, Luc English¹, Sébastien Lemieux², Mathieu Courcelles², Michel Desjardins^{1,3,5}, and Pierre Thibault^{2,4},

Immunity. 2009 Jan;30(1):143-54.

Resource**The Phagosomal Proteome in Interferon- γ -Activated Macrophages**

Matthias Trost^{1, 2}, Luc English¹, Sébastien Lemieux², Mathieu Courcelles², Michel Desjardins^{1, 3, 5}, and Pierre Thibault^{2, 4}.

1. Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada
2. Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada
3. Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada
4. Departments of Chemistry and Biochemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada
5. Caprion Proteomics, 7159 Alexander Fleming, Montréal, Québec H4S 2C8, Canada

Received 6 August 2008;

revised 31 October 2008;

accepted 11 November 2008.

Published online: January 15, 2009.

Available online 15 January 2009.

Immunity. 2009 Jan;30(1):143-54.

Summary

The ability of macrophages to clear pathogens and elicit a sustained immune response is regulated by various cytokines, including interferon- γ (IFN- γ). To investigate the molecular mechanisms by which IFN- γ modulates phagosome functions, we profiled the changes in composition, abundance, and phosphorylation of phagosome proteins in resting and activated macrophages by using quantitative proteomics and bioinformatics approaches. We identified 2415 phagosome proteins together with 2975 unique phosphorylation sites with a high level of sensitivity. Using network analyses, we determined that IFN- γ delays phagosomal acquisition of lysosomal hydrolases and peptidases for the gain of antigen presentation. Furthermore, this gain in antigen presentation is dependent on phagosomal networks of the actin cytoskeleton and vesicle-trafficking proteins, as well as Src kinases and calpain proteases. Major histocompatibility complex class I antigen-presentation assays validated the molecular participation of these networks in the enhanced capacity of IFN- γ -activated macrophages to crosspresent exogenous antigens to CD8⁺ T cells.

Introduction

In mammals, the internalization of microorganisms by macrophages, neutrophils, or dendritic cells (DCs) results in sequential events involving the microorganisms' sequestration in phagosomes, their neutralization and degradation by hydrolytic enzymes, the processing of antigens, and their presentation at the cell surface. Although the first two steps define the function of phagocytosis in innate immunity, the subsequent steps enable the link between innate and adaptive immunity to elicit a sustained immune response. The ability of professional phagocytes to kill microorganisms and present their antigens through major histocompatibility complex (MHC) class II or MHC class I crosspresentation is modulated in part by the proinflammatory cytokine interferon- γ (IFN- γ) (Platanias, 2005).

IFN- γ represents one of the most efficient cytokines for triggering antimicrobial activity in macrophages and plays a central role in the containment of infections by several pathogens ([Huang et al., 1993] and [Rosenberger and Finlay, 2002]), including those capable of altering phagosome biogenesis and intracellular signaling ([Orth et al., 1999] and [Park et al., 2002]). The ability of IFN- γ to endow macrophages with the capacity to kill ingested pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis* is attributed to a complex transcriptional regulatory network altering the expression of more than a thousand genes (Ehrt et al., 2001). Most notably, IFN- γ induces nitric oxide synthase (Xie et al., 1992) and phagocyte oxidase (Nathan et al., 1983) associated with the production of reactive oxygen species (ROS). IFN- γ also alters phagosome maturation, triggers macrophage immune response, and promotes antigen loading on MHC class I and II molecules ([Guermónprez et al., 2003], [Houde et al., 2003], [Jutras et al., 2008], [Watts and Amigorena, 2001] and [Yates et al., 2007]). However, the molecular mechanisms and signaling events by which IFN- γ modulates MHC class I antigen presentation still remain unclear.

To study the changes in protein composition and phosphorylation taking place in macrophage phagosomes after IFN- γ activation, we have made use of a sensitive mass spectrometry (MS)-based systems-biology approach. A versatile label-free quantitation approach was used for profiling protein abundance and phosphorylation stoichiometry of subcellular phagosome extracts from IFN- γ -activated and resting RAW 267.4 mouse macrophages. This approach provided evidence indicating that phagosome functional properties in cytokine-primed macrophages are modulated by the regulation of Src and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways. Our analyses also revealed that early phagosomes from IFN- γ -activated macrophages are temporarily shielded by a denser actin network, delaying lysosomal proteolytic activities to maximize epitope generation and antigen presentation. We showed that phagosomal Src kinases and calpains were modulated by IFN- γ and participated in the crosspresentation of exogenous proteins to CD8⁺ T cells. The observed results markedly expand our views of the dynamic changes in phagosome-protein composition and phosphorylation that occur as activated macrophages respond to pathogen infection.

Results

Quantitative Proteomics Analysis of Phagosomes from IFN- γ -Stimulated Macrophages

To identify phagosome proteins modulated by IFN- γ , we undertook a comparative MS analysis of purified phagosome extracts from stimulated and nonstimulated RAW 267.4 mouse macrophage cells. Phagosomes formed by the internalization of 0.8 μm latex beads for 30 min were subsequently purified on a sucrose density gradient for yielding enriched protein extracts containing less than 5% contamination from other cellular organelles as estimated from immunoblotting experiments (Figures S1, S2, and S3 available online). We used a two-pronged approach based on label-free quantitative proteomics to profile changes in protein abundance and phosphorylation stoichiometry in the corresponding extracts (Figure S4). Accordingly, protein extracts were first separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) prior to band excision, tryptic digestion, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses for identifying phagosomal proteins and comparing their respective abundance across biological replicates ($n = 3$) of stimulated and resting macrophage cells.

Comparative MS analysis of phagosome extracts on an Orbitrap mass spectrometer led to the identification of 29,941 unique peptides from 2,415 proteins with an average sequence coverage of 24% and a false-discovery rate (FDR) $< 1\%$ with a forward and reverse International Protein Index (IPI) mouse database. This level of identification for a single organelle is attributed to the high sensitivity and mass accuracy of the Orbitrap mass spectrometer, which enables a 4-fold enhancement in protein assignment compared to previous data obtained on a Q-TOF instrument (Jutras et al., 2008). Although expression levels remained unaffected for most identified proteins, a subset of 431 phagosome proteins showed more than 2-fold change in

abundance ($p < 0.1$) upon IFN- γ stimulation (Table S1 and Figure S2). We compiled a list of some of the differentially abundant proteins identified in phagosomes for different functional categories (Table 1). The list includes cytoskeletal proteins, trafficking proteins, and membrane receptors, as well as proteins involved in lipid signaling. Among proteins showing statistically significant changes in abundance were known IFN- γ -inducible proteins such as nitric oxide synthase, GTPase p47, and LRG-47 ([Singh et al., 2006] and [Xie et al., 1992]).

These analyses also revealed that 48 phagosome proteins with unaffected expression, including v-ATPase, showed marked changes in their phosphorylation status upon IFN- γ stimulation. To obtain a more comprehensive analysis of the changes in phosphorylation and cell-signaling events in phagocytosis and phagosome maturation, we isolated phagosomes from 5×10^{10} cells (2500 dishes) and combined TiO₂ phosphopeptide enrichment (Larsen et al., 2005), multi-dimensional chromatography, and high-accuracy multistage MS (Figure S1 and Table S2). We identified 1166 different phosphoproteins (2949 phosphorylation sites, FDR < 1%), of which 459 phosphoproteins (861 phosphorylation sites) were regulated by IFN- γ (2-fold change, $p < 0.1$). Comparison of the identified phosphorylation sites with those of SwissProt (v51.0), Phospho.ELM (<http://phospho.elm.eu.org/>), and data from the largest publicly available mouse phosphoproteome study (Villen et al., 2007) indicated that 2131 sites (72%) have not been previously reported. We also evaluated the confidence level in the site localization by using a probability score function (Olsen et al., 2006) and determined that 75% of the identified sites (2201 sites) corresponded to high-confidence assignments (Figure S2). Among proteins bearing unreported phosphorylation sites were Rab proteins, Src-family kinases, protein kinase C, and several members of MAP kinase pathways. The availability of protein-abundance measurements together with changes in phosphorylation stoichiometry provides valuable insight into site regulation in response to IFN- γ . For example, we identified for the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor (SNARE) protein

VAMP4 three different phosphorylation sites with fold changes of 0.2 (Ser30), 0.07 (Ser88), and 0.06 (Ser90), whereas the protein abundance showed a fold change of 0.2. Taken together, these proteomics results provide the most detailed view of the dynamic changes of phagosome composition and reveal the importance of posttranslational modifications in the functional regulation of this organelle by cytokines.

IFN- γ Modulates Kinase Activity on the Phagosome

Comprehensive analysis of the specific phosphorylation motifs found in our data set with the Motif-X algorithm (Schwartz and Gygi, 2005) yielded sequence motifs for 2005 peptides, of which 27% were assigned to sites modulated by IFN- γ (Figure 1 and Figure S6). A high proportion (32%) of these sequence motifs corresponded to proline-directed phosphorylation, suggesting the activation of MAP kinases and/or cyclin-dependent kinases (CDKs). Also, a subset of identified phosphopeptides upregulated by IFN- γ corresponded to arginine-directed phosphorylation, possibly arising from families of calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK-II), protein kinase A (PKA), or protein kinase C (PKC), whereas downregulated phosphopeptides represented acidic-residue-directed motifs sharing CK-II consensus sequences (Angiolillo et al., 1993). We grouped kinases identified on the phagosome into functional families, many of them being differentially regulated either by changes in protein abundance or phosphorylation stoichiometry (Figure 2).

Altogether, we identified 117 unique protein kinases and phosphatases, including several members with unreported phosphorylation sites. For instance, we identified 3 additional sites for PKC delta and 11 additional sites on Src kinases (4 for Fgr, 5 for Hck, 1 for Src, and 1 for Lyn) previously shown to regulate phagocytosis (Majeed et al., 2001) (Table S2). The activation of tyrosine kinases was also reflected in the higher distribution of Tyr phosphorylation sites (Ser: 85.8%; Thr: 11.1%; Tyr: 3.1%) as compared to that in recent large-scale phosphoproteome studies ([Olsen et al., 2006]

and [Villen et al., 2007]). Phosphorylation at Tyr residues is thought to play a key role in cell signaling (Machida et al., 2003), indicating the importance of phosphotyrosine signaling on the phagosome.

Protein Interaction Network Analysis Uncovers Specific Molecular Machineries Involved in Phagocytosis

We conducted a systems-biology analysis of our proteomics data to identify the dynamic and functional changes in the composition of the phagosome upon IFN- γ activation. First, we used the protein expression and phosphorylation data to develop a protein interaction network with the program STRING (<http://string.embl.de>) (von Mering et al., 2007), which integrates known and predicted interactions from different sources. We combined interactions found in mouse and their human orthologs, resulting in a network of 1,641 proteins (nodes) and 12,991 connections (edges) (Figure 3). From this complex network, we extracted subnetworks by using Gene Ontology (GO). Groups of phagosomal proteins with specific GO terms changing in abundance or phosphorylation were compared to the background of all identified proteins. GO terms were considered significant when they had p values < 0.05 , resulting in 319 significant terms. Protein groups were then sorted according to GO's Cellular Component, Biological Processes, and Molecular Function categories (Table S3 and Figure S7). We identified several major groups of phagosomal proteins modulated by IFN- γ , including subnetworks comprising Src kinases and proteins involved in vesicle trafficking, cytoskeleton rearrangement, lysosomal functions, and immune response. The functional significance of these subnetworks is detailed below.

IFN- γ Affects Phagosome Maturation through Dynamic Changes in Actin and Actin-Binding Proteins

Onset of phagosome formation is characterized by the activation of receptors and the recruitment of actin filaments to the plasma membrane for efficient engulfment of internalized particles, followed by the recruitment of motor proteins to sever the particle away from the plasma membrane (Swanson and Hoppe, 2004). The signaling pathways that give rise to actin cytoskeletal rearrangements are dependent on polyphosphatidylinositides and phosphatidylinositol (PI) kinases mediated by effector molecules such as small GTPases Rac1, Arf6, and Cdc42 (Greenberg, 1999). Increase in PI phosphatase activity subsequently promotes the production of specific PI, the assembly of actin filaments, and the recruitment of actin-myosin motors to sever the particle away from the plasma membrane (Swanson and Hoppe, 2004). Upon IFN- γ stimulation, our proteomics data indicate that myosins, kinesins, and several members of the actin machinery were upregulated, whereas tubulin and intermediate filaments keratin and vimentin did not show substantial changes in abundance (Figure 3 and Table 1). These results are consistent with previous reports in neutrophil-like cells indicating that the F-actin meshwork surrounding the phagosome is removed during phagosome maturation and that Cdc42 is inactivated for actin removal (Lerm et al., 2007). Cdc42 abundance did not change on the phagosome, as further confirmed by immunoblot (Figure S4), although its activation could be affected by the phosphorylation of its regulators Cdc42 effector proteins 2 and 4 (Table 1). A persistent network of actin was observed on phagosomes from IFN- γ -activated macrophages, accounting for a delayed disassembly of actin filaments (Figure S4). The prolonged actin meshwork was also correlated with the increased abundance and phosphorylation of Ena-VASP-like (Evl), one of four mammalian members of the Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein family, a regulator of actin polymerization at the leading edge (Sechi and Wehland, 2004) (Table 1 and Figure S4). On the phagosomes of activated macrophages, we also identified Zyxin, a protein that interacts with members

of the Ena/VASP family and is important for their targeting to focal adhesions and actin-rich structures (Krause et al., 2003). The increased abundance and phosphorylation of Zyxin and Evl suggest that these proteins form a complex regulating the actin cytoskeleton on the early phagosome, thereby extending the actin meshwork, a condition delaying lysosomal fusion events as previously observed for phagosomes of *Leishmania* and *Salmonella* pathogens ([Holm et al., 2001] and [Meresse et al., 2001]).

Macrophage Activation by IFN- γ Delays Fusion with Lysosomes

Maturation of the phagosome required for proteolytic degradation involves fusion and fission events to recycle plasma-membrane proteins and to recruit endosome- and lysosome-specific components directed by SNAREs and small GTPases (e.g., LRG47 or proteins of the Rab family) (Desjardins, 1995). Our proteomics analysis identified 41 different Rab proteins and at least five of their known interactors, consistent with their importance in the regulation of membrane fusion and trafficking during phagosome maturation. Out of all the Rab GTPases identified, only Rab7b, Rab12, Rab20, and Rab43 displayed substantial changes in abundance or phosphorylation upon IFN- γ activation (Table 1). Our results also indicated that the regulation of SNAREs and interactions with SNARE-binding proteins were primarily modulated by changes in phosphorylation. Our proteomics analyses on purified phagosome extracts identified nine syntaxins, five syntaxin-binding proteins, six vesicle-associated membrane proteins (VAMPs), nine vacuolar protein sorting-associated proteins (Vps), and their associated proteins. A total of 30 phosphorylation sites were identified on SNAREs, of which only 5 sites were previously known. Quantitative phosphoproteomics analyses revealed that 10 phosphorylation sites primarily located in the coiled-coil domain of SNAREs showed significant changes in stoichiometry upon IFN- γ activation, probably regulating binding of vesicular and target-membrane SNAREs.

Our GO and network analyses (Figure 3 and Figure S7) revealed that phagosomal fusion with transport vesicles, endosomes, and lysosomes is affected by IFN- γ activation. We performed immunoblot kinetic analyses to further validate the strong downregulation of a large network of lysosomal proteins (Figure 4) and confirmed a delayed acquisition of the lysosomal markers LAMP-1, lysozyme C, and β -hexosaminidase A in IFN- γ -activated macrophages.

Furthermore, we observed a strong upregulation of specific serine-protease inhibitors and a downregulation of lysosomal serine peptidases, accounting for a reduction in serine-protease activity. In contrast, cysteine proteases calpain 1, 2, and 5 were upregulated, whereas the inhibitor cystatin C and lysosomal thiol-proteases legumain and cathepsin L were markedly reduced (Figure 4C), suggesting the activation of specific proteolytic activity. These results are consistent with those of Yates et al., who observed reduced hydrolytic and proteolytic activities in phagosomes from IFN- γ -activated macrophages with an internalization assay with fluorescent beads (Yates et al., 2007). Our quantitative proteomics analyses of stimulated macrophages further support these observations and provide a detailed molecular view of the overall reduction in the degradative capacity of phagosomes.

Macrophage Activation by IFN- γ Increases MHC Class I Crosspresentation

It is commonly known that antigens from phagocytosed microbes are presented on the cell surface via MHC class II molecules (Watts and Amigorena, 2001), which are strongly induced by IFN- γ (Wong et al., 1982). Correspondingly, we saw a strong induction of proteins involved in MHC class II antigen presentation (Figure 5A). We also identified several molecules involved in MHC I antigen processing and presentation, of which four were induced more than 2-fold upon IFN- γ stimulation. Proteins such as tapasin, the transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2), and the immunoproteasome activator 28 α were also upregulated in activated

macrophages (Figure 5A). Interestingly, the aminopeptidase ERAP1, which trims MHC class I peptides (Saric et al., 2002), and proteins such as ERp57 (protein disulfide isomerase associated-3), calreticulin, and calnexin, all involved in MHC class I presentation (Cresswell, 2000), were also identified in the phagosome, although their abundances remained unchanged (Figure 5A).

The role of the MHC class I presentation machinery in displaying antigens from phagocytosed pathogens is not fully understood, although our group (Houde et al., 2003) and others (Guermontprez et al., 2003) have shown the presence of MHC class I molecules on phagosomes. To further investigate the influence of IFN- γ on the presentation of antigens from phagocytosed pathogens via the MHC class I pathway, we developed a system allowing us to study and compare the molecular mechanisms involved in the processing and presentation of endogenous and exogenous antigens by macrophages. The endogenous system consists of infecting macrophages with herpes simplex virus-1 (HSV-1) and monitoring their ability to stimulate a specific CD8⁺ T cell hybridoma. The exogenous system is based on the internalization by phagocytosis of latex beads covered with UV-inactivated HSV-1 particles and the crosspresentation of viral peptides to CD8⁺ T cells (Figures 5B and 5C). By using GFP-expressing HSV, we showed that beads coated with viral proteins were degraded in LAMP-1-positive phagosomal compartments (Figure 5D).

Resting and IFN- γ -activated macrophages were exposed to UV-killed HSV beads or live HSV particles for 30 min, and the specific pharmacological inhibitors were added for evaluating their functional effects on antigen presentation. The cells were fixed with paraformaldehyde 4 hr after internalization for stopping antigen processing and then cocultured with lacZ-inducible gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma for measuring the T cell activation against the HSV-glycoprotein B antigen 12 hr later. We observed a 5-fold increase in MHC class I presentation of exogenous antigens for macrophages stimulated by IFN- γ (Figure 5E). We further examined the involvement of

protein families in antigen crosspresentation and therefore applied the highly specific inhibitors aprotinin (serine-protease inhibitor), calpeptin (calpain inhibitor), PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) (Src-kinase-family inhibitor), and cytochalasin D (inhibitor of actin polymerization), which have all been shown to have no cytotoxic effects in the time course used ([Burden et al., 1978], [Ikewaki et al., 2000], [Lee et al., 2000] and [Sirianni et al., 2001]).

Inhibition of serine proteases by aprotinin had no significant effect on presentation of IFN- γ -activated macrophages, in contrast to its effect in resting macrophages, in which a 2-fold increase was observed, further supporting the proposal that high serine-protease activity in control cells reduces their antigen-presentation capabilities. Conversely, calpeptin, a highly specific calpain inhibitor, almost abolished MHC class I presentation of endogenous and exogenous antigens (Figures 5E and 5F).

Furthermore, depolymerization of the actin cytoskeleton with cytochalasin D quickly after internalization showed a 2-fold reduction in antigen crosspresentation (Figure 5E), whereas endogenous antigen presentation from HSV-infected macrophages was marginally affected (Figure 5F). Because inhibition of actin polymerization might affect antigen presentation from phagosomes by alternate pathways including reduced internalization of beads from the plasma membrane, we performed additional experiments and found that treatment with cytochalasin D lowered the number of internalized beads by only 5% (Figure S9). Furthermore, the processing of viral antigens from HSV latex beads was also dependent on the activation of Src kinases. Antigen crosspresentation in macrophages stimulated with IFN- γ decreases by 70% after inhibition of Src kinases by PP2 (Figure 5E), whereas no notable change in CD8⁺ T cell activation was detected for endogenous antigens (Figure 5F). Taken together, these experiments suggest that Src kinases, calpains, and actin mobilization play important roles in antigen crosspresentation from phagosomes and highlight functional

differences between the presentation of exogenous and endogenous antigens by the MHC class I pathway.

Discussion

The present study describes a comprehensive quantitative proteomics and phosphoproteomics study of a subcellular organelle playing a pivotal role in both innate and adaptive immunity. The development and application of a comprehensive proteomics approach enabling the profiling of protein abundance and the identification of phosphorylation sites on phagosomes from IFN- γ -activated macrophages provided unprecedented molecular details on the dynamic changes in protein composition of this organelle. We achieved this by combining subcellular fractionation, TiO₂-phosphopeptide enrichment, high-resolution mass spectrometry, and comprehensive data-mining tools to create detailed networks of thousands of phagosome proteins with their corresponding phosphorylation sites. High-sensitivity measurements of protein expression and phosphorylation stoichiometry revealed unexpected insights on the modulation of phagosome functions in IFN- γ -treated cells unattainable by previous proteomics approaches ([Beausoleil et al., 2004], [Jutras et al., 2008], [Marcantonio et al., 2008] and [Olsen et al., 2006]). These proteomics data provide a unique resource for immunologists and cell biologists. Our phosphorylation data is also available via the Phospho.ELM database (<http://phospho.elm.eu.org/>, Diella et al., 2004) and the Human Proteome Reference Database (<http://www.hprd.org/>, Peri et al., 2004).

The combination of both protein expression and phosphorylation stoichiometry provides a level of comprehensiveness that would not be available otherwise. For example, we identified two differentially regulated phosphorylation sites (Ser80 and Ser90) on VAMP4. An extended list of identifications displaying the changes in abundance and phosphorylation reveals the complexity of cell signaling for phagosomal proteins upon IFN- γ stimulation. The large number of protein identifications enabled the use of higher stringency levels during Gene Ontology and STRING network analyses for identifying specific phagosome functions and protein groups, a number of which are interconnected. For example, the increased abundance of annexins, which are

Ca²⁺-dependent phospholipid-binding proteins, is presumably associated with changes in lipid-modifying enzymes such as phosphatidylinositol 4-kinase, inositol polyphosphate-5-phosphatase D (SHIP1), and Ca²⁺-regulating proteins including calmodulin and sorcin.

Our analyses also indicated that IFN- γ activation delays the fusion of the phagosome with the lysosome and late endosomes, a process called phagolysosome maturation. This delayed maturation contrasts with previous reports suggesting that IFN- γ activation enhances maturation and bactericidal properties of the phagosome (Via et al., 1998). However, these observations are consistent with those of Yates et al., who reported a delayed acquisition of hydrolase and peptidase activity in phagosomes from activated macrophages (Yates et al., 2007). Our data provide molecular evidence that the phagosomal acquisition of serine proteases, H⁺ transporters, and lysosomal hydrolases are indeed strongly reduced. Furthermore, phagosomes from IFN- γ -activated macrophages displayed an unsuspected level of regulation, attributed in part to the increased levels of serine-protease inhibitors (e.g., protease inhibitors A3F, Spi2, and Serpin B9) together with nonlysosomal proteases (e.g., calpains 1, 2, and 5). It is noteworthy that the proteolytic activity of the lysosome itself remains unchanged, consistent with previous reports (Yates et al., 2007).

The reduced activity of proteases and hydrolases in early phagosomes is possibly used by macrophages for optimizing antigen processing for efficient presentation. Interestingly, DCs, commonly thought to be better antigen-presenting cells (APCs) than macrophages (Banchereau and Steinman, 1998), have limited lysosomal proteolytic capacities (Delamarre et al., 2005). Similarly, our data suggest that the delayed maturation of phagolysosomes in IFN- γ -activated macrophages favors antigen presentation, as evidenced by the increased abundance of MHC class I and II receptors on early phagosomes. Our study thus extends the work of Yates et al. by identifying the enzymes contributing to the differential activity levels and the antigen-processing and -

presentation machineries involved. This proposal was confirmed with an antigen-presentation assay enabling the monitoring of both crosspresentation of exogenous antigens and classical MHC class I presentation of endogenous antigens. The crosspresentation ability of resting macrophages increased 2-fold upon treatment with the serine-protease inhibitor aprotinin, whereas no change was detected in IFN- γ -activated macrophages displaying reduced proteolytic activities.

Taken together, these data enabled us to propose an integrated model of IFN- γ -modulated functions favoring antigen crosspresentation with a level of molecular detail beyond previous investigations from our group (Figure S10) The strongest reduction of MHC class I crosspresentation and presentation of cytosolic antigens were observed after calpain inhibition. Calpains are cysteine proteases previously reported to participate in MHC class II presentation (Lich et al., 2000). Although they were previously reported to associate with autophagosomes (Demarchi et al., 2006), it is unlikely that calpains locate to the early phagosome via the autophagosomal route because markers such as Beclin or LC-3 were present in low abundance. Rather, we propose that cytosolic calpains are recruited to the phagosome and become activated upon elevation of Ca²⁺ concentrations present on early phagosomes of activated macrophages ([Franco and Huttenlocher, 2005], [Myers and Swanson, 2002] and [Perrin and Huttenlocher, 2002]). Calpains have also been reported to modulate cellular functions of adhesion-associated, actin regulatory proteins (Franco and Huttenlocher, 2005) and Src-kinase activity (Frangioni et al., 1993) by cleavage of target proteins. Their specific proteolytic activities are surmised to regulate proteins involved in antigen presentation rather than being associated with antigen processing.

The Src kinases are strongly regulated by IFN- γ activation and play a central role in receptor signaling, actin-cytoskeleton remodeling, vesicle trafficking, and antigen presentation. Pharmacological inhibition of Src kinases with the specific inhibitor PP2 reduced MHC class I crosspresentation of exogenous antigens by 70%, with no

significant change on the presentation of endogenous viral antigens. Previous reports have described the involvement of the Src kinase Fyn and Syk in Fc-receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion through actin polymerization at the phagocytic cup and particle internalization (Majeed et al., 2001). The observation that inhibition of Src-family kinase activities reduced MHC I crosspresentation suggests that they play important roles in the regulation of phagosome maturation events.

Detailed proteomics analyses also indicated that the actin regulator Evl and its binding partner Zyxin (Krause et al., 2003) are localized on the phagosome and that their abundance and phosphorylation are strongly regulated by IFN- γ . Evl is most likely to be responsible for the prolonged actin meshwork surrounding the phagosomes of activated macrophages, and recent reports documented its involvement in phagosome biogenesis ([Jahraus et al., 2001] and [Stockinger et al., 2006]). Although some reports indicated an inhibition of phagolysosome fusion by the actin cytoskeleton (Lerm et al., 2007), others suggested that actin is necessary for the fusion of the phagosome with endosomes and lysosomes ([Jahraus et al., 2001], [Kalamidas et al., 2006] and [Stockinger et al., 2006]). Our data support the former proposal, given that enhanced depolymerization of actin with cytochalasin D strongly reduces MHC class I crosspresentation, possibly through the rapid degradation of viral antigens. Combined evidence from the crosspresentation assay showing the strong inhibition by cytochalasin D while the endogenous presentation remained unaffected suggests the involvement of a unique mechanism by which the prolonged actin meshwork favors epitope generation and enhances antigen presentation.

The detailed molecular interactions and signaling events by which IFN- γ modulates MHC class I antigen presentation still remain ill defined and are under intense investigation. Our quantitative large-scale proteomics investigation provided evidence that the activation of Src kinases and calpain proteases extends the cytoskeleton actin meshwork surrounding the phagosome. The use of a novel

crosspresentation assay further confirmed these findings and indicated that the concerted actions of these cellular events are used advantageously by macrophages for maximizing epitope generation and antigen presentation. Our study also supports the use of systems-biology approaches such as subcellular proteomics analyses for dissecting the important roles of phagosomes in immune and adaptive immunity.

Experimental Procedures

Phagosome Preparation

Phagosomes from RAW 267.4 mouse macrophages were prepared according to previous methods (Desjardins et al., 1994).

Expression Analyses with SDS-PAGE and Mass Spectrometry

20 μg of phagosomal proteins were reduced with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (Pierce), alkylated by iodoacetamide (Sigma-Aldrich), and separated on a 4%–12% precast NuPAGE gel (Invitrogen). The gel was silver stained, and the lanes were cut into 17 equal-sized pieces with an in-house cutting device. The gel pieces were digested by trypsin, and peptides were extracted three times with 90% acetonitrile (ACN) in 0.5 M urea. Combined extracts were dried and resuspended in 5% ACN, 0.1% trifluoro acetic acid (TFA) prior to mass-spectrometry analyses.

Peptides were separated on a 150 μm ID, 10 cm reversed-phase nano-LC column (Jupiter C18, 3 μm , 300 \AA , Phenomex) with a loading buffer of 0.2% formic acid (FA). Peptide elution was achieved by a gradient of 2%–25% ACN in 65 min and 25%–40% ACN in further 25 min on an Eksigent 2D nanoLC operating at a flow-rate of 600 nL/min. The nanoLC was coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo-Electron), and samples were injected in an interleaved manner. The mass spectrometer was operated in a data-dependent acquisition mode with a 1 s survey scan at 60,000 resolution, followed by three product ion scans (MS/MS) of the most abundant precursors above a threshold of 10,000 counts in the LTQ part of the instrument.

Phosphopeptide Enrichment and Mass Spectrometry

Phosphopeptides of not, vert, similar 300 µg/replicate (1D-LC-MS) and 1.2 mg/replicate (2D-LC-MS) of phagosomal proteins were reduced, and cysteines were blocked by carbamidomethylation and digested with trypsin. Subsequently, phosphopeptides were enriched on house-made TiO₂ microcolumns (GL Science) according to the protocol of Thingholm et al. (Thingholm et al., 2006) and eluted with 30 µl 1% NH₄OH. Eluates were acidified by adding TFA to a final concentration of 3%, dried down, resuspended in 2% ACN, 0.1% TFA, and subjected to mass-spectrometric analysis. Peptides were separated on a self-packed 45 mm × 300 µm polysulfethyl column (Nest Group) and online eluted onto a 150 µm ID, 10 cm reversed-phase nano-LC column (Jupiter C18, 3 µm, 300 Å, Phenomex) coupled to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer.

Protein Identification and Bioinformatic Analyses

The centroided MS/MS data were merged into single peak-list files and searched with the Mascot search engine v2.10 (Matrix Science) against the combined forward and reversed mouse IPI database v3.24 containing 52,326 forward protein sequences.

Phosphosites were searched against the SwissProt database (v51.0), PhosphoElm (v6.0) (Diella et al., 2004), and the data from the largest publicly available mouse phosphoproteome study (Villen et al., 2007).

Descriptions of biological functions used were obtained from the Gene Ontology project (www.geneontology.org, as of November 11, 2007) (Ashburner et al., 2000).

Phosphorylation Motif Analyses

Phosphorylation motif analyses were performed with the web-based motif-x tool (<http://motif-x.med.harvard.edu/>) (Schwartz and Gygi, 2005). Prealigned sequences of peptides ± 6 residues around the identified sites of serine phosphorylation were analyzed against the IPI mouse database as a background with the “occurrence” parameter at 20 and the “significance” parameter at 0.000001. Because of the low number of phosphorylation sites on threonine and tyrosine residues, the “occurrence” and “significance” parameters were adjusted to 10 and 0.00001 for threonine phosphorylation and to 5 and 0.0001 for tyrosine phosphorylation, respectively. Web logos were extracted and kept in Figure S6.

GO Analyses

Descriptions of biological functions used were obtained from the Gene Ontology project (www.geneontology.org, as of November 11, 2007). The annotations of the proteins identified in this study were obtained through Biomart (<http://www.biomart.org/>). To identify biological functions that are overrepresented in a given subset of proteins (“sublist”), we performed a statistical analysis with our own software (source code available on demand). The analysis was done by building, for each term of the GO ontology, a 2×2 contingency table indicating the distribution of the whole set of proteins (“background list”) relative to their association with either or both the sublist or the GO term. This table was then used for assessing the overrepresentation of genes annotated with this particular function in the sublist with a Fisher's exact test. After extensive experimentation, we preferred the more liberal approach of relying on the p value returned by the Fisher's test to identify significantly overrepresented GO terms, adjusting the threshold at 0.05. All terms identified as significant and their parents were extracted from the ontology graph.

STRING Network

Sequences of proteins identified were extracted from the IPI database (version 3.23). Using BLAST against mouse and human protein sequences from STRING (<http://string.embl.de/>), we identified the best match and used it as a correspondence between the two databases. Protein networks identified by STRING consisted of protein IDs (nodes) and protein-protein interactions (edges). These networks utilizing mouse and human identifiers were extracted, superimposed, and loaded into Cytoscape v.2.51 (<http://www.cytoscape.org/>) (Shannon et al., 2003) for visualization; only interactions with a minimum STRING combined score of 0.400, which represents the default medium confidence level in STRING, were kept. This resulted in 1,641 nodes and 12,991 edges. From the complex network, subnetworks were extracted with Cytoscape guided by GO terms of the 1,641 proteins extracted from the Ensembl database v48 with Ensembl's BioMart tool (<http://www.ensembl.org/biomart/martview/>). GO terms used for the subnetworks are listed Table S4, and they gained 121 entries for the “cytoskeleton,” 110 for the “vesicle,” 61 for the “Lysosome,” 72 for the “Kinase,” and 58 for the “Immune Response” network, respectively.

CD8+ T Cell Activation Assay

The BMA3.1A macrophage cell line derived from C57BL/6 mice was described previously (Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995). The lacZ-inducible gB HSV-specific CD8⁺ T cell hybridoma HSV-2.3.2E2 was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin.

For HSV latex bead coupling, 1.9 µm NH₂-Latex Beads (LBs) (Estapor) were washed in PBS and precoated with Helix pomatia lectin (EY Laboratories) at 1 mg/ml overnight with agitation. Then, LBs were washed again with PBS and incubated

overnight with purified HSV-1 (strain F) at 4°C with agitation, and finally, HSV-1 particles were inactivated by UV irradiation.

For MHC class I presentation assays, BMA macrophages (2×10^5) were infected with HSV-1 (strain F) at a multiplicity of infection (MOI) of 10 or overlaid with UV-killed HSV LBs for 30 min. Control of UV inactivation was performed by incubating BMA cells for 30 min with UV-inactivated HSV-1 at a MOI of 50. The medium was then changed, and drugs were added at the following concentrations: PP2 (10 μ M), calpeptin (40 μ g/ml) (all Calbiochem), aprotinin (10 μ g/ml), and cytochalasin D (2.5 μ M) (all Sigma-Aldrich). After 4 hr incubation, macrophages were washed in PBS and fixed 10 min at room temperature with 1% paraformaldehyde, followed by three washes in complete Dulbecco's modified Eagle's medium. Antigen-presenting cells were then cocultured with 4×10^5 lacZ-inducible gB-specific CD8⁺ T cell hybridoma HSV-2.3.2E2 for 12 hr at 37°C. After a wash with PBS, cells were lysed (0.125 M Tris Base, 10 mM CDTA, 50% glycerol, and 0.025% Triton X-100, 3 mM DTT at pH 7.8), and then lacZ substrate buffer was added (10 mM MgSO₄, 10 mM KCL, 0.39 M NaH₂PO₄, 0.6 M Na₂HPO₄, 100 mM 2-ME, and 0.15mM chlorophenol red beta-D-galactopyranoside (CPRG) at pH 7.8) for 2–4 hr at 37°C. The cleaved CPRG was quantified in a Gemini plate reader (Molecular Devices) at 595 nm. The data and error bars are shown as means of three experiments with triplicate values and their relative standard deviations, respectively.

Immunofluorescence

Cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's indications (Cytotfix/Cytoperm Kit, BD Biosciences). Infected cells were detected with a rabbit polyclonal anti-HSV-1 (Neomarkers), and phagolysosomal compartments were detected with an anti-Lamp1. Samples were analyzed with a standard fluorescence microscope.

Acknowledgments

We would like to thank T. Stradal for the kind gift of antibodies, P. Desai for GFP-tagged HSV, K. Eng for bioinformatic support, E. Bonneil for help with mass-spectrometric analyses, and C. Perreault for critical review of the manuscript. M.T. acknowledges the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for a fellowship. The Institute for Research in Immunology and Cancer receives infrastructure support funds from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and from a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) multiresource grant. This work was carried out with the financial support of operating grants from the National Science and Engineering Research Council (NSERC), the Canada Research Chair program, and the CIHR.

Author Contributions

L.E. designed and performed antigen-presentation assays. M.T. planned and performed all other experiments and analyzed the data. M.C. and S.L. provided bioinformatic tools. M.T., M.D. and P.T. designed experiments and wrote the manuscript.

References

Angiolillo et al., 1993 A. Angiolillo, M. Bramucci, V. Marsili, F. Panara, A. Miano, D. Amici and G.L. Gianfranceschi, Phosphorylation of synthetic acidic peptides by casein kinase II: Evidence for competition with phosphorylation of proteins involved in transcription, *Mol. Cell. Biochem.* 125 (1993), pp. 65–72.

Ashburner et al., 2000 M. Ashburner, C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight and J.T. Eppig et al., Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nat. Genet.* 25 (2000), pp. 25–29.

Banchereau and Steinman, 1998 J. Banchereau and R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392 (1998), pp. 245–252.

Beausoleil et al., 2004 S.A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villen, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley and S.P. Gygi, Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004), pp. 12130–12135.

Burden et al., 1978 A.C. Burden, R.L. Stacey, R.F. Wood and P.R. Bell, The effect of protease inhibitors on leucocyte migration inhibition to tuberculin extract (P.P.D.), *Immunology* 34 (1978), pp. 217–221.

Cresswell, 2000 P. Cresswell, Intracellular surveillance: Controlling the assembly of MHC class I-peptide complexes, *Traffic* 1 (2000), pp. 301–305.

Delamarre et al., 2005 L. Delamarre, M. Pack, H. Chang, I. Mellman and E.S. Trombetta, Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate, *Science* 307 (2005), pp. 1630–1634.

Demarchi et al., 2006 F. Demarchi, C. Bertoli, T. Copetti, I. Tanida, C. Brancolini, E.L. Eskelinen and C. Schneider, Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells, *J. Cell Biol.* 175 (2006), pp. 595–605.

Desjardins, 1995 M. Desjardins, Biogenesis of phagolysosomes: The ‘kiss and run’ hypothesis, *Trends Cell Biol.* 5 (1995), pp. 183–186.

Desjardins et al., 1994 M. Desjardins, L.A. Huber, R.G. Parton and G. Griffiths, Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus, *J. Cell Biol.* 124 (1994), pp. 677–688.

Diella et al., 2004 F. Diella, S. Cameron, C. Gemund, R. Linding, A. Via, B. Kuster, T. Sicheritz-Ponten, N. Blom and T.J. Gibson, Phospho.ELM: A database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins, *BMC Bioinformatics* 5 (2004), p. 79.

Ehrt et al., 2001 S. Ehrt, D. Schnappinger, S. Bekiranov, J. Drenkow, S. Shi, T.R. Gingeras, T. Gaasterland, G. Schoolnik and C. Nathan, Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: Signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase, *J. Exp. Med.* 194 (2001), pp. 1123–1140.

Franco and Huttenlocher, 2005 S.J. Franco and A. Huttenlocher, Regulating cell migration: Calpains make the cut, *J. Cell Sci.* 118 (2005), pp. 3829–3838.

Frangioni et al., 1993 J.V. Frangioni, A. Oda, M. Smith, E.W. Salzman and B.G. Neel, Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets, *EMBO J.* 12 (1993), pp. 4843–4856.

Greenberg, 1999 S. Greenberg, Modular components of phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 66 (1999), pp. 712–717.

Guermonprez et al., 2003 P. Guermonprez, L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert and S. Amigorena, ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells, *Nature* 425 (2003), pp. 397–402.

Holm et al., 2001 A. Holm, K. Tejle, K.E. Magnusson, A. Descoteaux and B. Rasmusson, *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: Correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation, *Cell. Microbiol.* 3 (2001), pp. 439–447.

Houde et al., 2003 M. Houde, S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M.F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks and M. Desjardins, Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation, *Nature* 425 (2003), pp. 402–406.

Huang et al., 1993 S. Huang, W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R.M. Zinkernagel and M. Aguet, Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor, *Science* 259 (1993), pp. 1742–1745.

Ikewaki et al., 2000 N. Ikewaki, H. Tamauchi, A. Yamada, M. Aoki, R. Yamamoto, A. Sawada and H. Inoko, A microfilament formation inhibitor, cytochalasin strongly enhances the low-affinity Fc epsilon receptor II (CD23) expression on the human monocyte-like cell line, U937, *J. Clin. Immunol.* 20 (2000), pp. 424–433.

Jahraus et al., 2001 A. Jahraus, M. Egeberg, B. Hinner, A. Habermann, E. Sackman, A. Pralle, H. Faulstich, V. Rybin, H. Defacque and G. Griffiths, ATP-dependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001), pp. 155–170.

Jutras et al., 2008 I. Jutras, M. Houde, N. Currier, J. Boulais, S. Duclos, S. Laboissiere, E. Bonneil, P. Kearney, P. Thibault and E. Paramithiotis et al., Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008), pp. 697–715.

Kalamidas et al., 2006 S.A. Kalamidas, M.P. Kuehnel, P. Peyron, V. Rybin, S. Rauch, O.B. Kotoulas, M. Houslay, B.A. Hemmings, M.G. Gutierrez, E. Anes and G. Griffiths, cAMP synthesis and degradation by phagosomes regulate actin assembly and fusion events: Consequences for mycobacteria, *J. Cell Sci.* 119 (2006), pp. 3686–3694.

Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995 M. Kovacsovics-Bankowski and K.L. Rock, A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules, *Science* 267 (1995), pp. 243–246.

Krause et al., 2003 M. Krause, E.W. Dent, J.E. Bear, J.J. Loureiro and F.B. Gertler, Ena/VASP proteins: Regulators of the actin cytoskeleton and cell migration, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19 (2003), pp. 541–564.

Larsen et al., 2005 M.R. Larsen, T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P. Roepstorff and T.J. Jorgensen, Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns, *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005), pp. 873–886.

Lee et al., 2000 M.S. Lee, Y.T. Kwon, M. Li, J. Peng, R.M. Friedlander and L.H. Tsai, Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain, *Nature* 405 (2000), pp. 360–364.

Lerm et al., 2007 M. Lerm, V.P. Brodin, I. Ruishalme, O. Stendahl and E. Sarndahl, Inactivation of Cdc42 is necessary for depolymerization of phagosomal f-actin and subsequent phagosomal maturation, *J. Immunol.* 178 (2007), pp. 7357–7365.

Lich et al., 2000 J.D. Lich, J.F. Elliott and J.S. Blum, Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins, *J. Exp. Med.* 191 (2000), pp. 1513–1524.

Machida et al., 2003 K. Machida, B.J. Mayer and P. Nollau, Profiling the global tyrosine phosphorylation state, *Mol. Cell. Proteomics* 2 (2003), pp. 215–233.

Majeed et al., 2001 M. Majeed, E. Cavegion, C.A. Lowell and G. Berton, Role of Src kinases and Syk in Fcγ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion, *J. Leukoc. Biol.* 70 (2001), pp. 801–811.

Manning et al., 2002 G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome, *Science* 298 (2002), pp. 1912–1934.

Marcantonio et al., 2008 M. Marcantonio, M. Trost, M. Courcelles, M. Desjardins and P. Thibault, Combined enzymatic and data mining approaches for comprehensive phosphoproteome analyses: Application to cell signaling events of interferon-γ-stimulated macrophages, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008), pp. 645–660.

Meresse et al., 2001 S. Meresse, K.E. Unsworth, A. Habermann, G. Griffiths, F. Fang, M.J. Martinez-Lorenzo, S.R. Waterman, J.P. Gorvel and D.W. Holden, Remodelling of

the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella, *Cell. Microbiol.* 3 (2001), pp. 567–577.

Myers and Swanson, 2002 J.T. Myers and J.A. Swanson, Calcium spikes in activated macrophages during Fc γ receptor-mediated phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 72 (2002), pp. 677–684.

Nathan et al., 1983 C.F. Nathan, H.W. Murray, M.E. Wiebe and B.Y. Rubin, Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity, *J. Exp. Med.* 158 (1983), pp. 670–689.

Olsen et al., 2006 J.V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen and M. Mann, Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks, *Cell* 127 (2006), pp. 635–648. Article | PDF (1831 K) | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (341)

Orth et al., 1999 K. Orth, L.E. Palmer, Z.Q. Bao, S. Stewart, A.E. Rudolph, J.B. Bliska and J.E. Dixon, Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector, *Science* 285 (1999), pp. 1920–1923.

Park et al., 2002 J.M. Park, F.R. Greten, Z.W. Li and M. Karin, Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition, *Science* 297 (2002), pp. 2048–2051.

Peri et al., 2004 S. Peri, J.D. Navarro, T.Z. Kristiansen, R. Amanchy, V. Surendranath, B. Muthusamy, T.K. Gandhi, K.N. Chandrika, N. Deshpande and S. Suresh et al., Human protein reference database as a discovery resource for proteomics, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004), pp. D497–D501.

Perrin and Huttenlocher, 2002 B.J. Perrin and A. Huttenlocher, Calpain, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002), pp. 722–725.

Platanias, 2005 L.C. Platanias, Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005), pp. 375–386.

Rosenberger and Finlay, 2002 C.M. Rosenberger and B.B. Finlay, Macrophages inhibit *Salmonella typhimurium* replication through MEK/ERK kinase and phagocyte NADPH oxidase activities, *J. Biol. Chem.* 277 (2002), pp. 18753–18762.

Saric et al., 2002 T. Saric, S.C. Chang, A. Hattori, I.A. York, S. Markant, K.L. Rock, M. Tsujimoto and A.L. Goldberg, An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides, *Nat. Immunol.* 3 (2002), pp. 1169–1176.

Schwartz and Gygi, 2005 D. Schwartz and S.P. Gygi, An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005), pp. 1391–1398.

Sechi and Wehland, 2004 A.S. Sechi and J. Wehland, ENA/VASP proteins: Multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics, *Front. Biosci.* 9 (2004), pp. 1294–1310.

Shannon et al., 2003 P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker, Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.* 13 (2003), pp. 2498–2504.

Singh et al., 2006 S.B. Singh, A.S. Davis, G.A. Taylor and V. Deretic, Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria, *Science* 313 (2006), pp. 1438–1441.

Sirianni et al., 2001 R. Sirianni, B.R. Carr, V. Pezzi and W.E. Rainey, A role for src tyrosine kinase in regulating adrenal aldosterone production, *J. Mol. Endocrinol.* 26 (2001), pp. 207–215.

Stockinger et al., 2006 W. Stockinger, S.C. Zhang, V. Trivedi, L.A. Jarzylo, E.C. Shieh, W.S. Lane, A.B. Castoreno and A. Nohturfft, Differential requirements for actin polymerization, calmodulin, and Ca²⁺ define distinct stages of lysosome/phagosome targeting, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006), pp. 1697–1710

Swanson and Hoppe, 2004 J.A. Swanson and A.D. Hoppe, The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004), pp. 1093–1103.

Thingholm et al., 2006 T.E. Thingholm, T.J. Jorgensen, O.N. Jensen and M.R. Larsen, Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide, *Nat. Protoc.* 1 (2006), pp. 1929–1935.

Via et al., 1998 L.E. Via, R.A. Fratti, M. McFalone, E. Pagan-Ramos, D. Deretic and V. Deretic, Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation, *J. Cell Sci.* 111 (1998), pp. 897–905.

Villen et al., 2007 J. Villen, S.A. Beausoleil, S.A. Gerber and S.P. Gygi, Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007), pp. 1488–1493.

von Mering et al., 2007 C. von Mering, P. Hugenholtz, J. Raes, S.G. Tringe, T. Doerks, L.J. Jensen, N. Ward and P. Bork, Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments, *Science* 315 (2007), pp. 1126–1130.

Watts and Amigorena, 2001 C. Watts and S. Amigorena, Phagocytosis and antigen presentation, *Semin. Immunol.* 13 (2001), pp. 373–379.

Wong et al., 1982 G.H. Wong, I. Clark-Lewis, J.L. McKimm-Breschkin and J.W. Schrader, Interferon-gamma-like molecule induces Ia antigens on cultured mast cell progenitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), pp. 6989–6993.

Xie et al., 1992 Q.W. Xie, H.J. Cho, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T.D. Lee, A. Ding, T. Troso and C. Nathan, Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages, *Science* 256 (1992), pp. 225–228.

Yates et al., 2007 R.M. Yates, A. Hermetter, G.A. Taylor and D.G. Russell, Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome, *Traffic* 8 (2007), pp. 241–250.

Table I: Changes in abundance and phosphorylation of selected phagosome proteins upon IFN-g stimulation**Figure 1. IFN- γ Induces Specific Phagosomal Phosphorylation Motifs**

Serine-phosphorylation sites identified by LC-MS/MS were extracted, and prealigned sequences of peptides ± 6 residues around the identified phosphorylation sites were analyzed against the IPI mouse database as a background with the web-based motif-x tool (<http://motif-x.med.harvard.edu/>) (Schwartz and Gygi, 2005) with default settings. Two and six specific web logos were identified for the 187 upregulated and the 372 downregulated phosphopeptides having significant scores. Scores represent the sum of the negative log of the probabilities used for generating a single motif [Score (motif) = $\sum -\log(P)$]. Sequence motifs were classified according to known recognition motifs of MAP kinase, CDK2, PKA, PKC, CaMK-II, and CK-II.

Figure 2. IFN- γ Modulates the Phagosomal Kinome

Proteins identified by mass spectrometry were analyzed with the InterPro database (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). The figure shows combined expression and phosphorylation data of a subset of 117 identified protein kinases and phosphatases harboring kinase domains. Boxes show kinase families grouped according to the human kinome, with subgroups identified by dotted lines (Manning et al., 2002). Arrows indicate functional assignments of kinases in response to macrophage activation.

Figure 3. Phagosomal Protein Networks

Protein abundance and phosphorylation data was analyzed with the STRING database (<http://string.embl.de>). A GO analysis was performed for extracting significant ($p < 0.1$) subsets of a complex network composed of 1,641 nodes and 12,991 edges. Shown are subnetworks affected by IFN- γ activation, such as vesicle trafficking, cytoskeleton, lipid signaling, notch signaling, lysosome, and immune response.

Figure 4. IFN- γ Delays Phagosome Maturation

(A) Immunoblot kinetic of the three lysosomal markers, β -hexosaminidase A, lysozyme C, and lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1). Latex-bead phagosomes of control macrophages and macrophages activated by IFN- γ for 24 hr were isolated at five different time points (10 min pulse, 0 min chase; 30 min, 0 min; 30 min, 60 min; 30 min, 3 hr; and 30 min, 15 hr). Equal protein amounts were loaded.

(B) Immunoblot kinetic of one of the identified serine-protease inhibitors (Serpin B9). Immunoblots represent data from repeated experiments ($n = 3$).

(C) Table of identified changes for lysosomal hydrolases, proteases, and protease inhibitors.

Figure 5. Influence of IFN- γ on Antigen Presentation

(A) Abundance changes of MHC class I and class II molecules.

(B) Electron microscopy (EM) of HSV bound to beads.

(C) EM of a phagosome from a BMA macrophage after the internalization of a UV-killed HSV latex bead. Arrows show virions inside the phagosomal membrane.

(D) UV-killed HSV opsonized on latex beads are internalized by BMA macrophages over different time periods (0 to 6 hr). Panels (left to right) show GFP expressed by HSV (green), LAMP1 (red), merge view (green and red channels), and bright field.

Phagocytosed HSV latex beads locate to LAMP-1-positive compartments, where they are degraded over time.

(E) IFN- γ strongly enhances MHC class I crosspresentation of antigens from phagocytosed pathogens. Latex beads were coated with UV-killed HSV and phagocytosed by BMA macrophages (control or 24 hr of IFN- γ activation) for 30 min. The medium was then changed, and inhibitors were added. Macrophages were fixed 4 hr after internalization and cocultured with lacZ-inducible gB HSV-specific CD8⁺ T cell hybridoma for 12 hr, and cell activation was measured by analysis of β -Gal hydrolysis with a UV-VIS spectrometer.

(F) Control and IFN- γ -activated BMA macrophages were infected with HSV for 30 min. Conditions for culture, incubation, and visualization of endogenous assays (F) were identical to those of exogenous presentation assays (E). All graphs shown display the mean relative activation levels from at least three independent experiments ($n \geq 3$); error bars represent the standard deviation.

Regulation of phosphorylation motifs

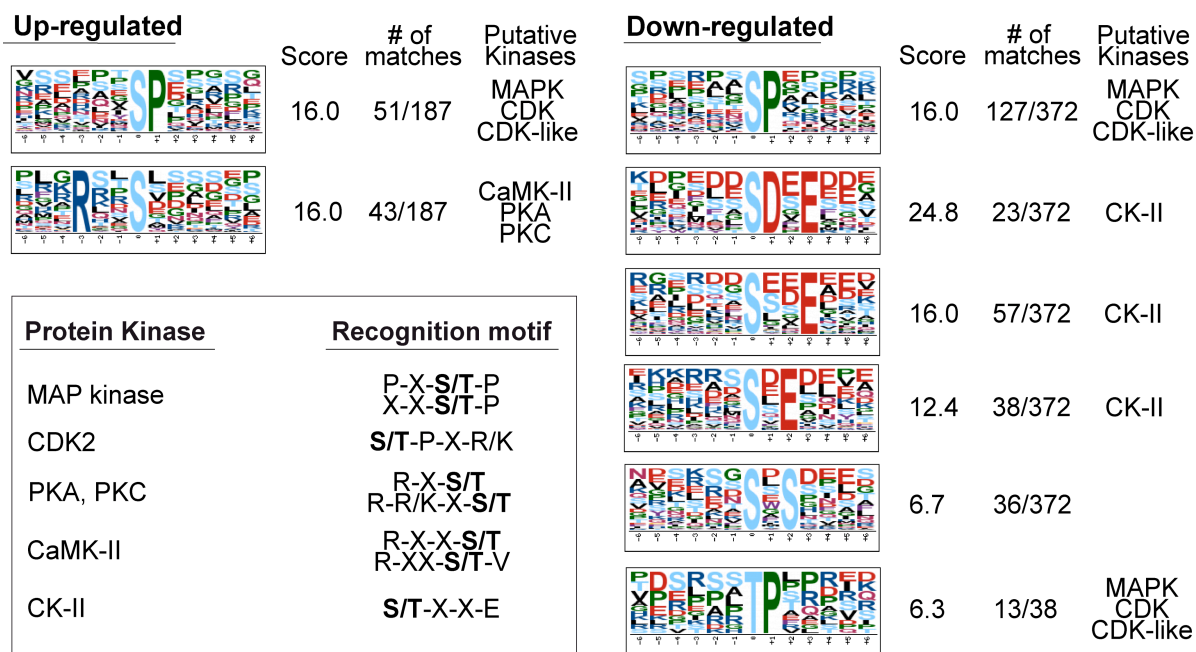


Figure 1

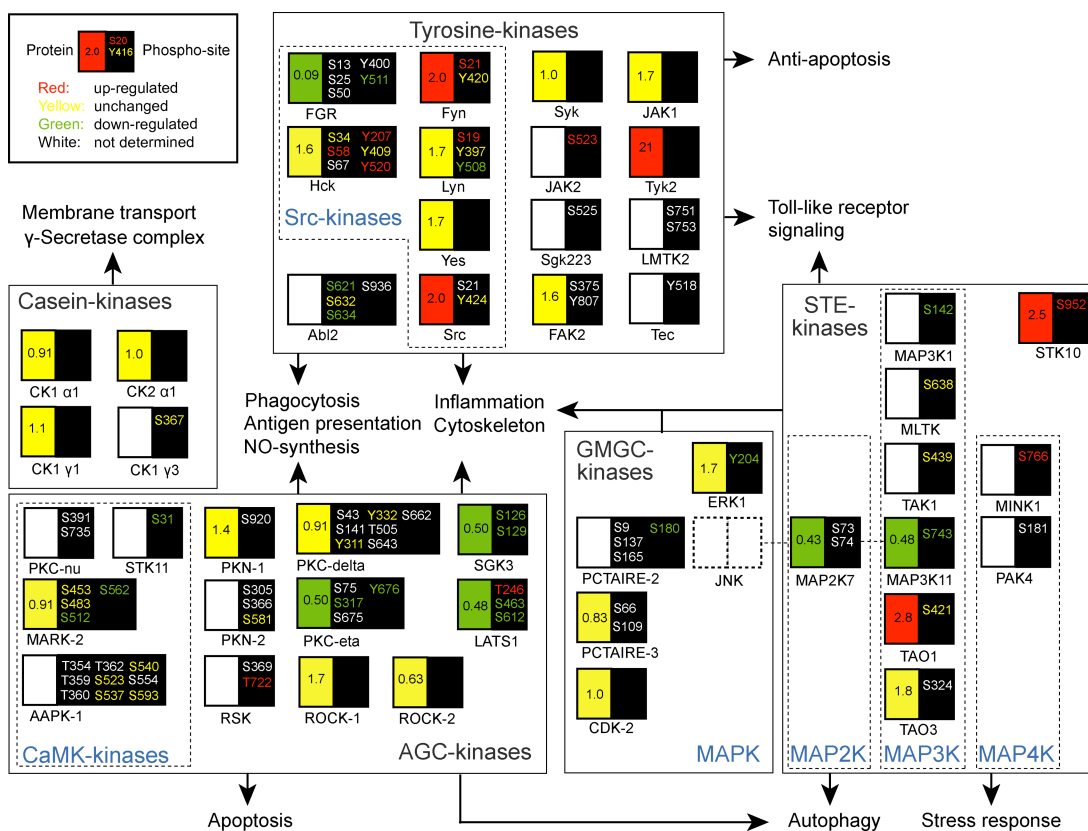


Figure 2

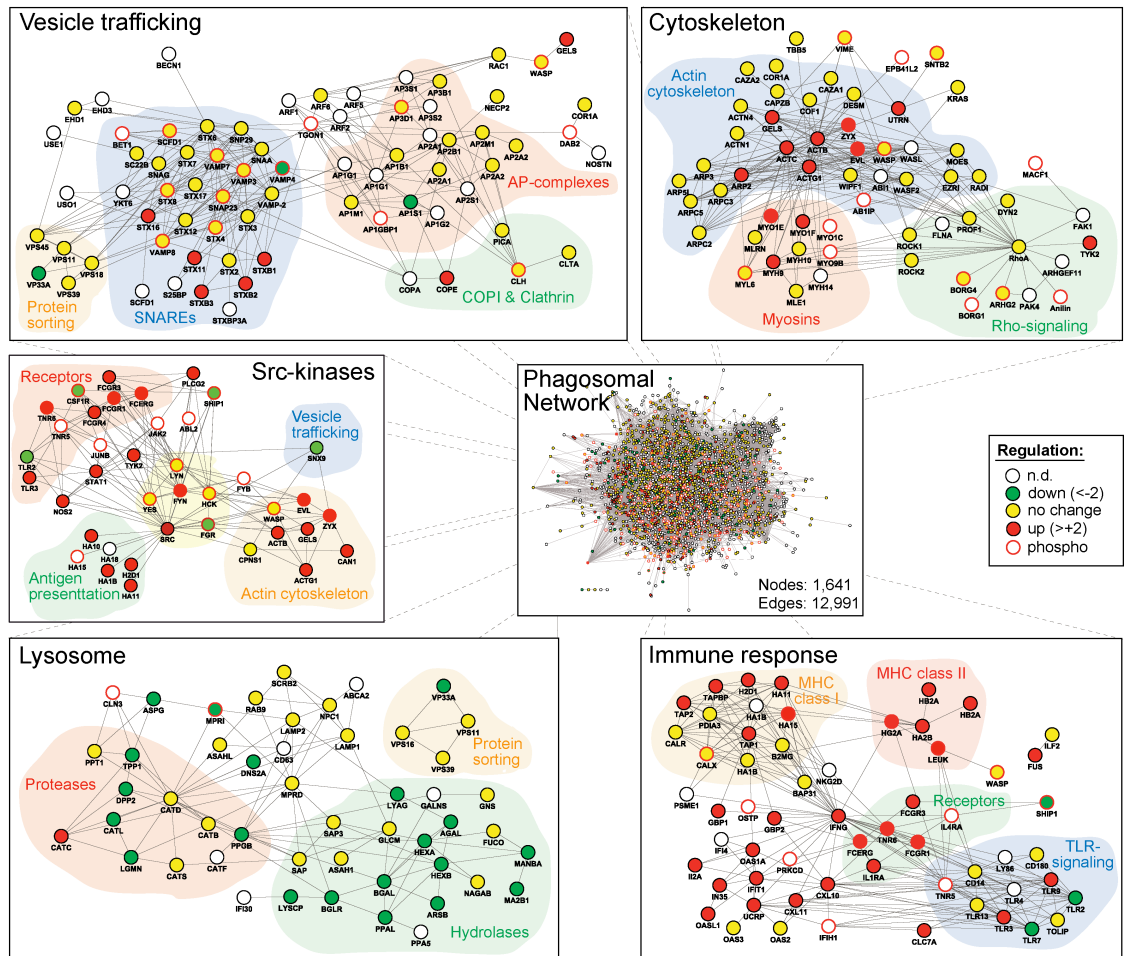


Figure 3

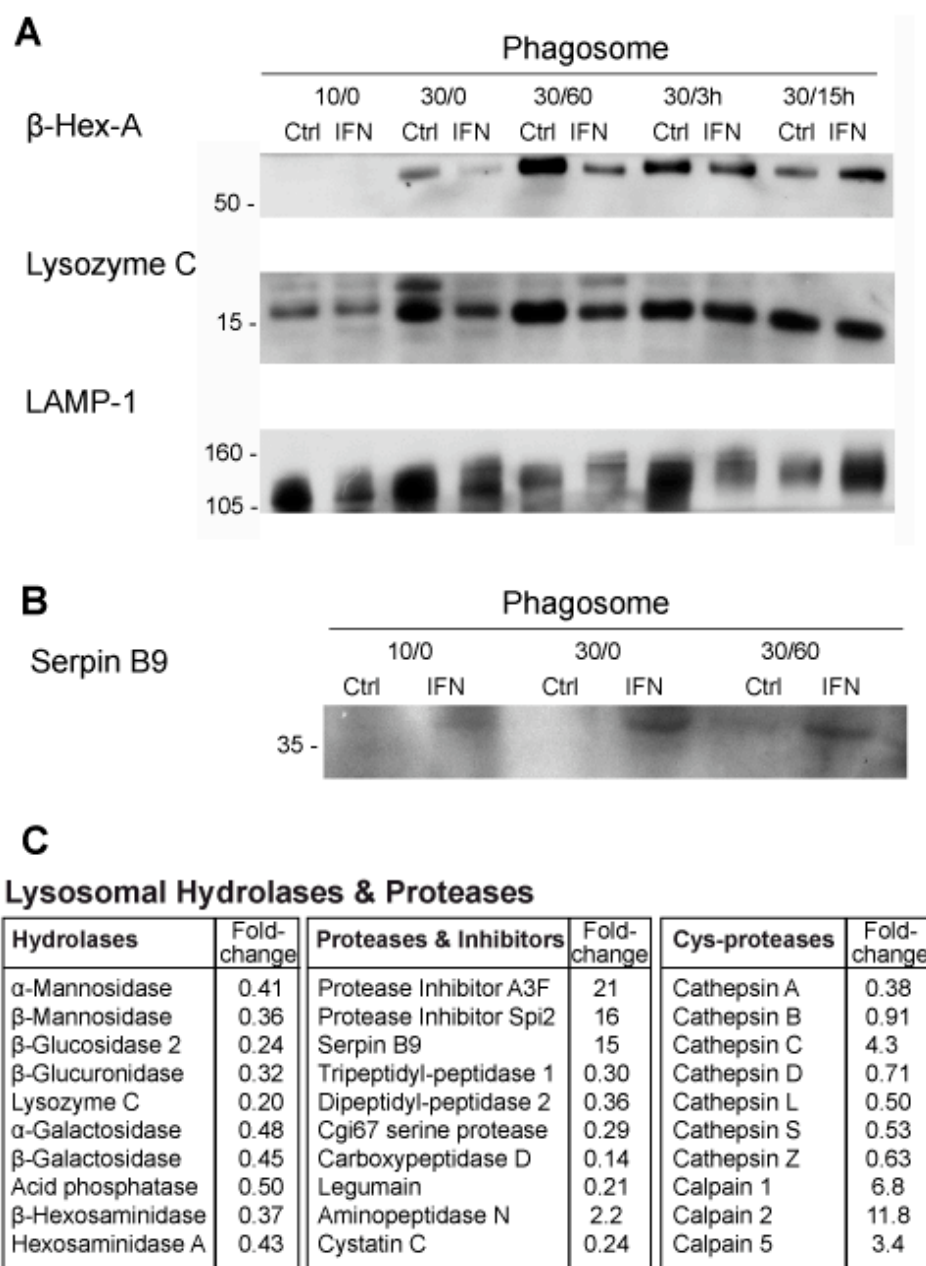


Figure 4

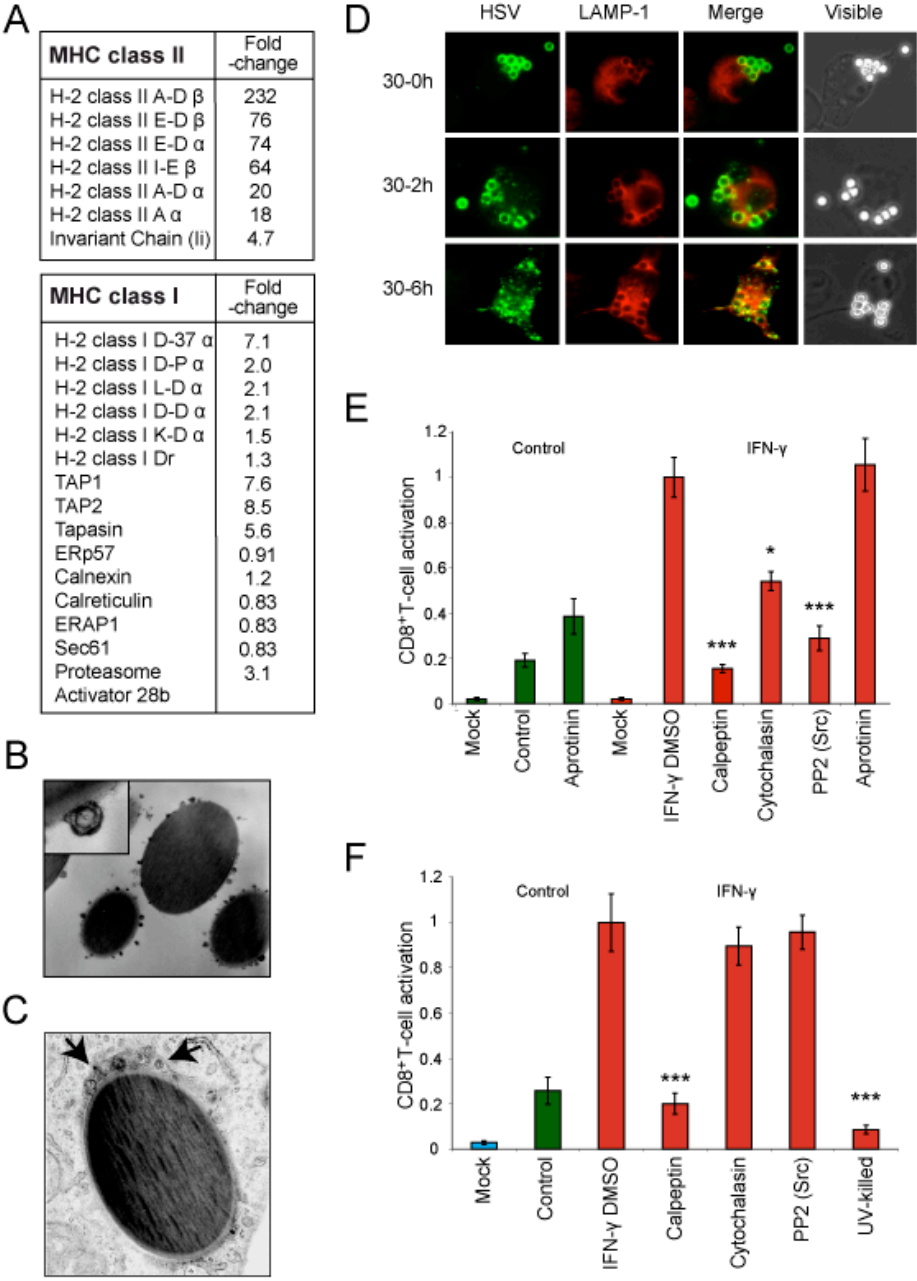


Figure 5

I: Known IFN- γ induced Proteins

	Expression
Nitric Oxide Synthase	71
Fc-receptor I	9.3
IFN-inducible GTPase p47	18
IFN-activable protein 202b	13
IFN-ind. guanylate-binding protein 1,2,5	306, 180, 60
LRG-47	4.2

II: Membrane trafficking

	Expression	Phosphorylation*
VAMP-3	0.71	0.06 ^{Ser67}
VAMP-4	0.19	0.23 ^{Ser30} , 0.07 ^{Ser88} , 0.06 ^{Ser90}
VAMP-8	0.67	0.23 ^{Ser67} , 0.12 ^{Ser18}
Syntaxin-4	1.7	2.2 ^{Ser15} , 1.6 ^{Ser117} , 0.7 ^{Ser248}
Syntaxin-8	0.91	0.17 ^{Ser163}
Syntaxin-11	11.3	-
Syntaxin-binding 1, 2, 3	2.7, 2.8, 2.7	-
Vps-26B	0.67	0.08 ^{Ser302} , 0.08 ^{Ser319} , 0.13 ^{Ser334}
Rab-7b	1.1	0.15 ^{Ser186}
Rab-12	1.0	0.80 ^{Ser15,20} , 1.3 ^{Ser105}
Rab-20	4.8	-
Rab-43	11.2	-
Rab11FIP 5	0.45	0.07 ^{Ser278} , 0.44 ^{Ser307} , 0.06 ^{Ser1212,1218}

Table I: Changes in abundance and phosphorylation of selected phagosome proteins upon IFN- γ stimulation *Location of modified residue is indicated as superscript

III: Cytoskeleton		
	Expression	Phosphorylation*
Ena/VASP-like	5.1	54 ^{Ser329} , 8.1 ^{Ser343,347} , 5.8 ^{Ser367}
Zyxin	6.5	38 ^{S336}
Filamin B	13.5	-
Gelsolin	2.9	-
Actin	2.0	-
Arp2/3	1.6	-
CapG	1.9	-
Cdc42	1.0	-
CDC42 effector 2	-	3.6 ^{Ser137,141,145}
CDC42 effector 4	0.84	0.4 ^{Thr161}
WASP	0.61	1.1 ^{Ser293} , 0.5 ^{Ser501,502}
Vimentin	1.0	0.2 ^{Ser55} , 7 ^{Ser429} , 0.1 ^{Ser458}
Kinesin 5B	3.3	-
Kinesin 16B	1.2	0.3 ^{Ser662} , 0.3 ^{Ser838} , 6.3 ^{Ser1145}
Myosin 18a	8.1	-
Myosin 1c	2.5	21 ^{Ser373}
IV: Signaling		
	Expression	Phosphorylation
SHIP-1	0.48	0.36 ^{Tyr868} , 0.14 ^{Ser935} , 0.35 ^{Ser972}
PI 4-kinase 2 β	2.4	1.9 ^{Ser47} , 1.6 ^{Ser462} , 1.3 ^{Ser85}
Phospholipase C β 4	0.40	0.17 ^{Thr886,Ser889} 0.07 ^{Thr886,Ser889,Ser890}
Phospholipase C γ 2	3.9	-
Man-6-phos. recep.	0.24	0.28 ^{Ser2392} , 0.27 ^{Ser2401}
CSF receptor	0.09	0.04 ^{Ser711, Ser714}

Table I: Changes in abundance and phosphorylation of selected phagosome proteins upon IFN- γ stimulation

Legend to supplementary figures:**Supplementary Fig. 1: Workflow for the proteomic and phospho-proteomic analysis of phagosomes**

Latex-bead phagosomes were prepared from $\sim 5 \times 10^{10}$ cells of either control or IFN- γ activated Raw267.4 mouse macrophages. For the phosphoproteome experiments phagosomal proteins were digested and phosphopeptides enriched using self-made TiO₂-columns. Peptides were separated and analyzed by LC-MS/MS or 2D- LC-MS/MS on an Orbitrap mass spectrometer. Protein abundance and phosphorylation data was analyzed using Gene Ontology and the STRING database.

Supplementary Fig. 2: Additional results of large-scale proteome and phospho-proteome analyses of phagosomes

(A) Results of the protein expression experiments; (B) Volcano plot of the protein abundance data: 169 proteins of resting macrophages and 261 proteins of IFN- γ activated macrophages change significantly (>2 -fold change in abundance, $p < 0.1$); (C) Results of the phosphopeptide experiments; (D) Volcano plot of the phosphopeptide experiments: 525 and 247 phosphopeptides change significantly in resting and IFN- γ activated macrophages respectively (>2 -fold change in abundance, $p < 0.1$); (E) Phospho-site confidence level. 2,241 phosphosites were identified with a high confidence level (class I), while 500 and 245 sites were assigned with medium and low confidence, respectively; (F) Distribution of phosphorylation sites by amino acids showing a relatively large proportion of phosphorylation at tyrosine residues.

Supplementary Fig. 3: Assessment of phagosome purity

Western blot analysis of 8 μ g of protein of phagosome (30/0), total cell lysate (TCL) and total membrane (TM) preparations of control and IFN- γ activated RAW 267.4 mouse macrophages. Western blots confirm the high purity of our phagosome preparations. The following antibodies were used: Early endosomal antigen (EEA1, Endosomes), lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP1, lysosome), gamma-actin (actin cytoskeleton), P2X purinoceptor 7 (P2X7, plasma membrane), mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim23 (TIM23, mitochondrion), ribosome S6 (ribosomes, endoplasmic reticulum), 78 kDa glucose-regulated protein (BiP78, endoplasmic reticulum) and histone H2b (nucleus).

Supplementary Fig. 4: Mass spectrometry is a tool for analyzing protein and phosphorylation abundance

Western Blots confirm mass spectrometric data. (A) Actin changes protein abundance in 30/0 phagosomes by +2.0 as identified by intensity changes of 9 actin-derived peptides and by WB. (B) Protein abundance of the small GTPase Cdc42 stays unchanged upon IFN- γ activation. (C) The actin regulator Ena/VASP-like (Evl) is considerably affected by differential phosphorylation upon IFN- γ activation as shown for 4 different phospho-peptides. Treatment of 30/0 min phagosomes from activated macrophages with Alkaline Phosphatase (AP) confirms a strong shift in relative molecular weight upon dephosphorylation. TCL, total cell lysate; TM, total membrane.

Supplementary Fig. 5: Peptide detection, clustering and identification workflow

In-house software package MassSense generates three-dimensional peptide maps (Retention time, m/z and Intensity) from mass spectrometric raw data. Peptide data is aligned, clustered within replicates and stored in a master cluster file. Mascot-

identifications from the same raw-files are then clustered against these datasets and combined in the database.

Supplementary Fig. 6: Phosphorylation-specific motifs

Phosphorylation-specific motifs for singly-phosphorylated motifs were generated using Motif-X (Schwartz and Gygi, 2005). Not all identified phosphorylation sites could be used for sequence motifs since the Motif-X algorithm requires a 6 amino acids C- and N-terminal to the phosphorylation site. Sequence logos are centered on the phosphorylated residue. Next to the logos: numbers of identified sequences per motifs and their fold increase in our dataset compared to the background of the complete mouse IPI-database. (A) Proline-directed, (B) Arginine-directed, (C) (Phospho)-Serine directed, (D) Acidic-residue directed, (E) bipolar-directed motifs and (F) Tyrosine phosphorylations.

Supplementary Fig. 7: Gene ontology (GO) analysis of regulated phagosomal proteins

(A) Cellular component (localization), (B) biological process and (C) Molecular function or selected terms identified. IFN- γ activation modulates the fusion with other organelles and specific phagosomal functions.

Supplementary Fig. 8: IFN- γ activation conducts a complex interplay of phosphorylation and protein abundance on the phagosome

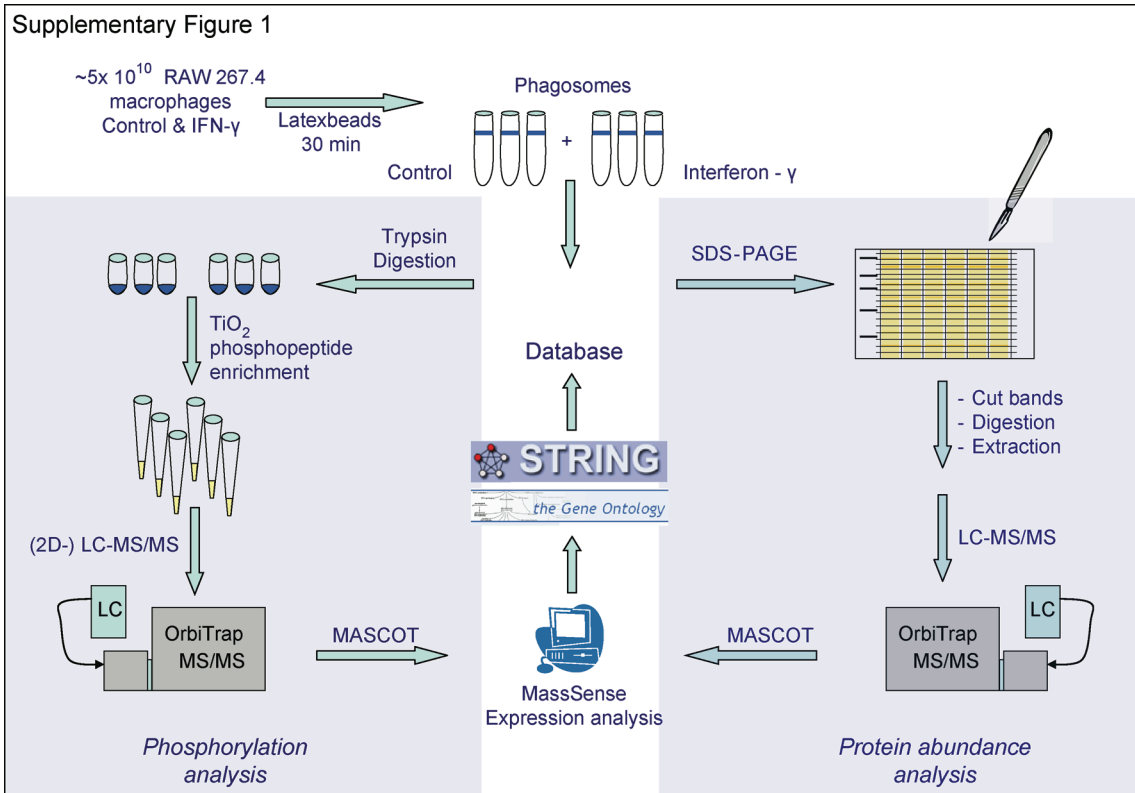
Many proteins are more strongly affected by changes in phosphorylation (blue dots) than by protein abundance (red dots). (A, B) Kinases, (C) proteins of the antigen presentation pathway, (D) proteins involved in innate immunity, (E) trafficking proteins, (F) Lipid signaling, (G) Cytoskeleton and (H) Transporters.

Supplementary Fig. 9: Cytochalasin D treatment does not affect numbers of internalized beads in the antigen cross-presentation experiment

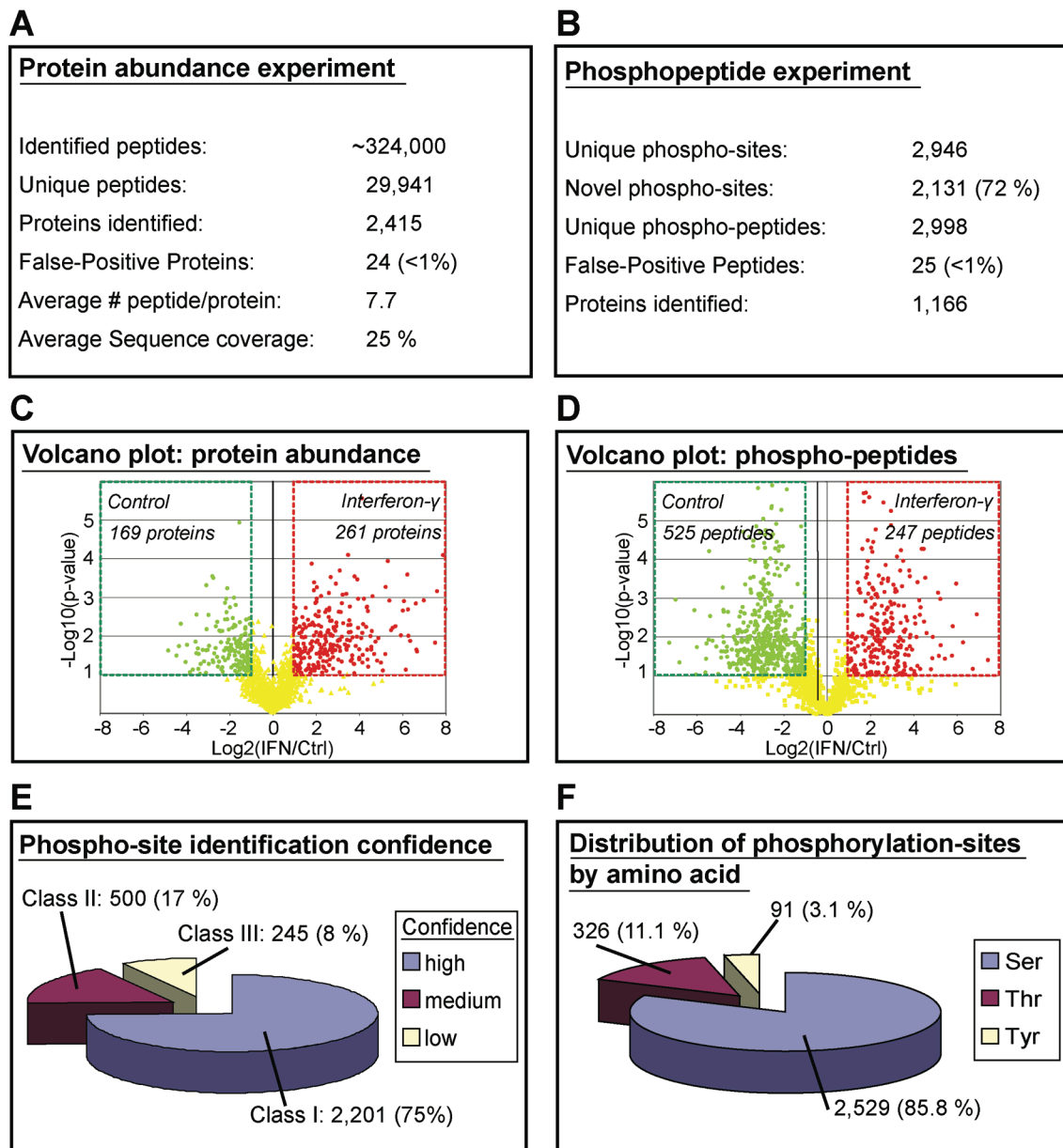
Blue-W dyed latex beads were internalized by IFN- γ activated macrophages for 30 min. Subsequently, cells were treated by 2.5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin D and further incubated for 4 h. Fluorescence of internalized beads versus non-internalized beads was analyzed by flow-cytometry.

Supplementary Fig. 10: Integrated model of the IFN- γ -modulated functions favoring antigen cross-presentation

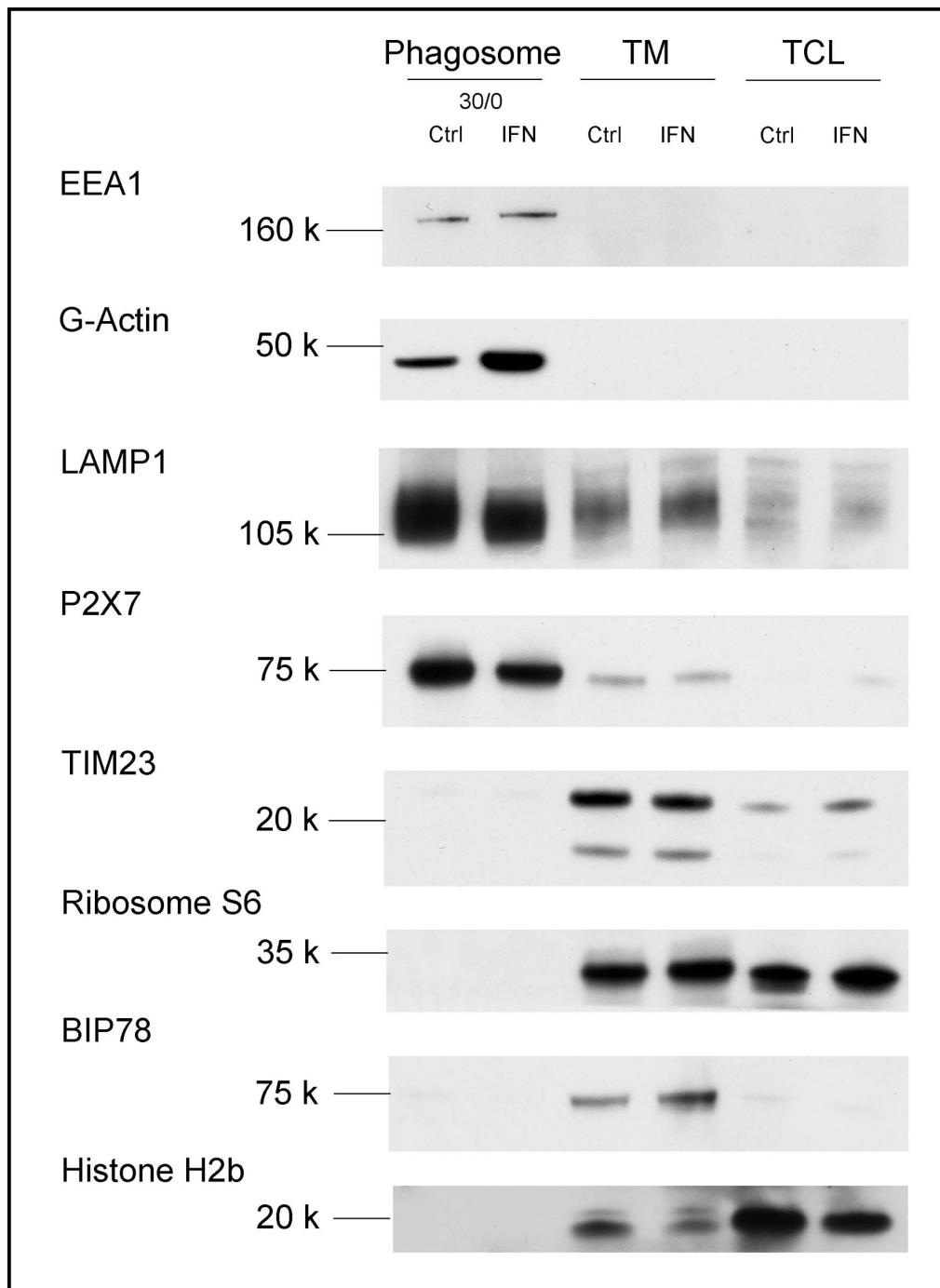
Activation is a complex mechanism modulating the abundance and phosphorylation of specific phagosomal proteins: IFN- γ activation prolongs the presence of the actin cytoskeleton around the phagosome and affects considerably vesicle trafficking proteins such as SNAREs by differential phosphorylation, decreasing phagosomal fusion with endosomes and the lysosome. Furthermore, unspecific serine-proteolytic activity is reduced in activated macrophages, leaving more antigens intact for increased presentation efficiency. The cysteine-proteases Calpains enhance antigen presentation, likely by regulating proteins of antigen presentation machinery. Furthermore, many kinases are differentially regulated on the phagosome. Particularly, members of the Src-kinase family such as Src and Fyn are involved in phagosome biogenesis as inhibition of these kinases reduces antigen presentation drastically.



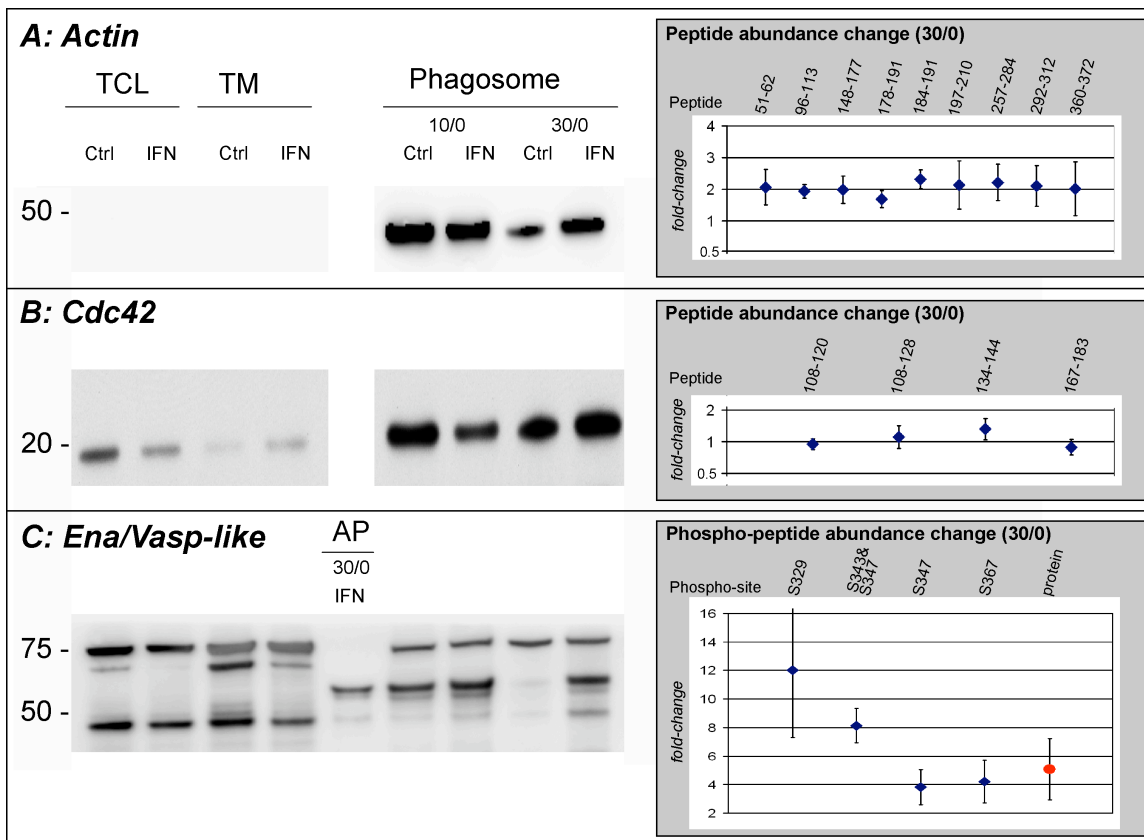
Supplementary Figure 2



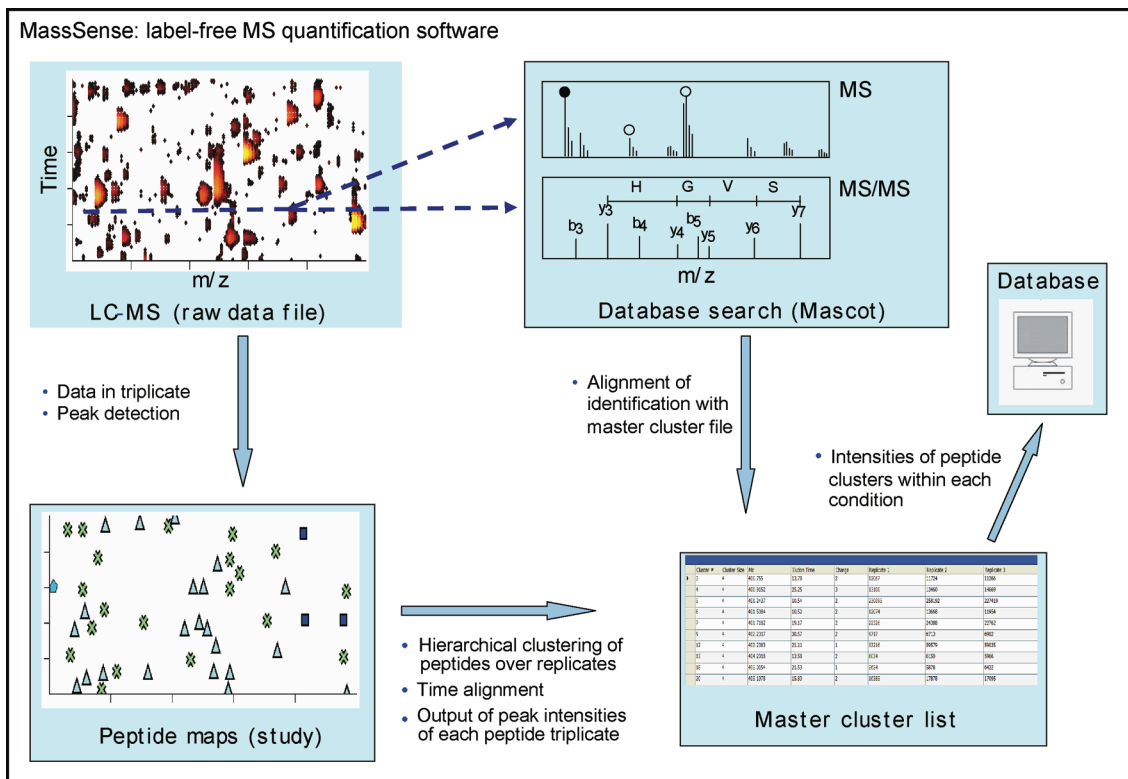
Supplementary Figure 3



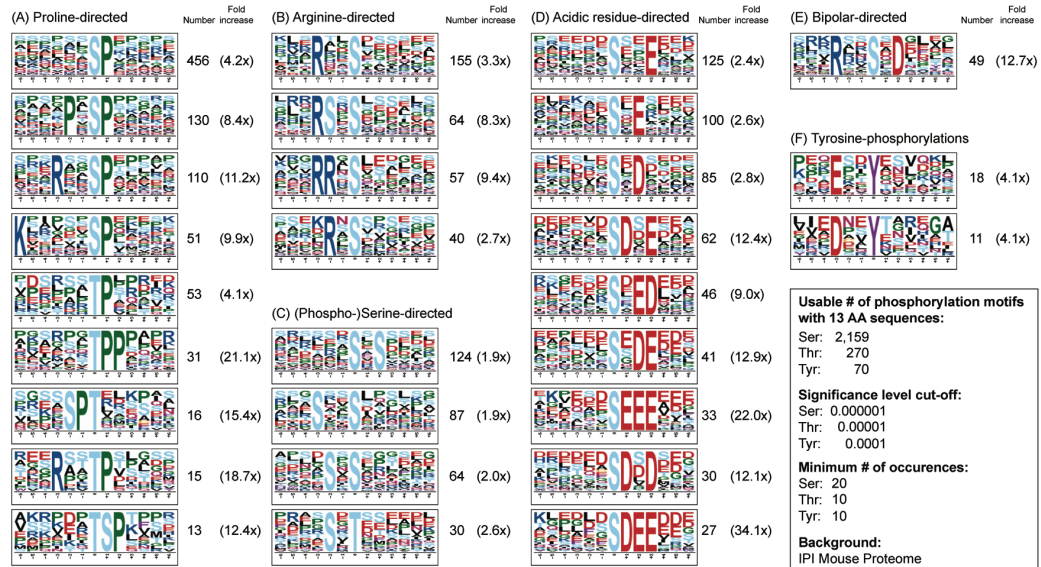
Supplementary Figure 4



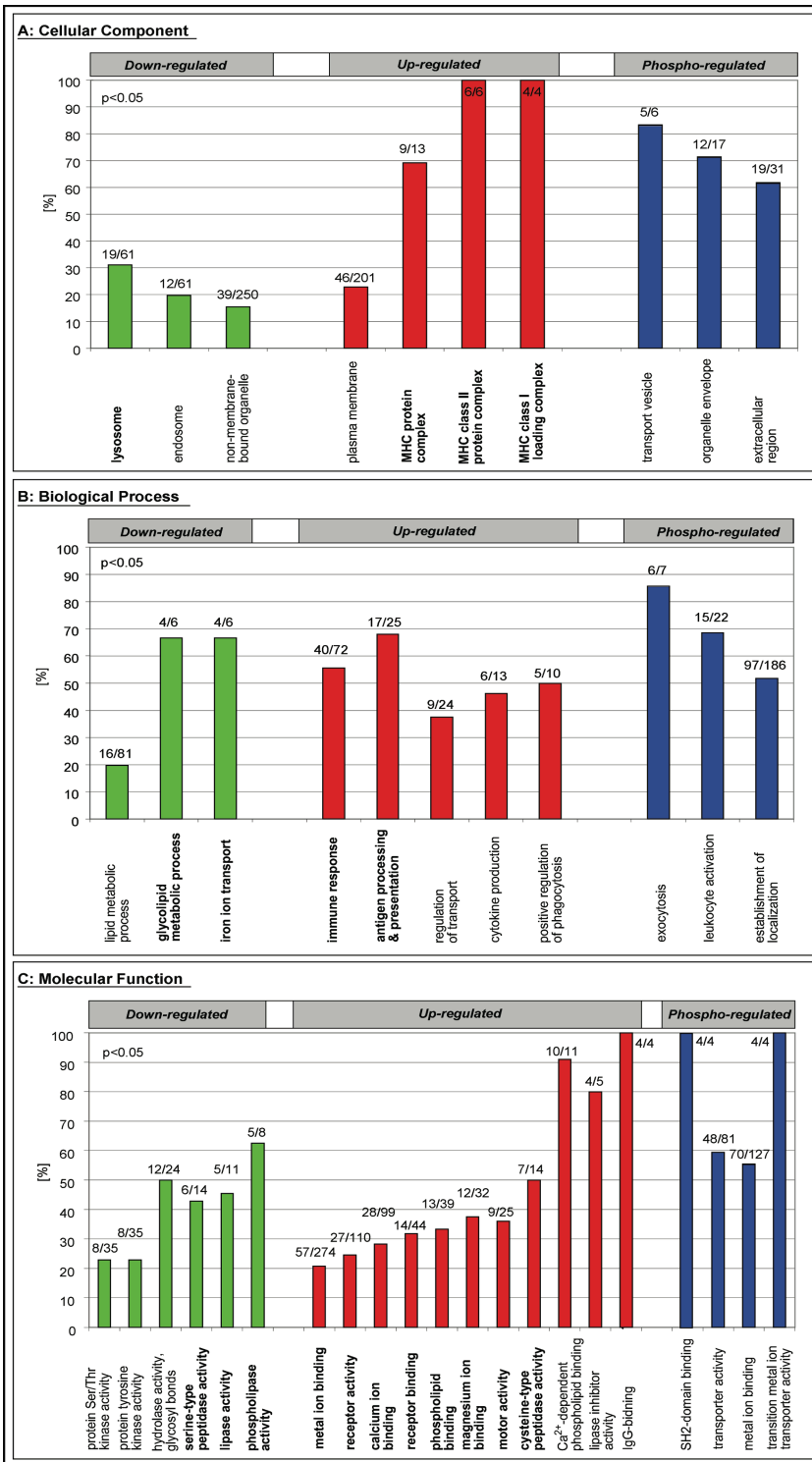
Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

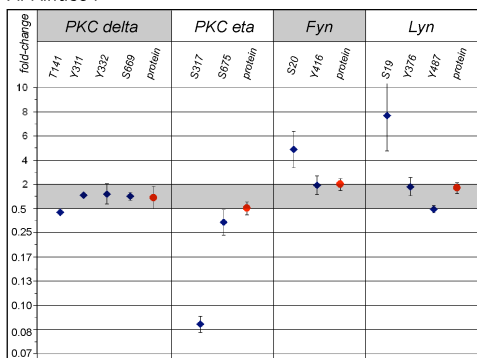


Supplementary Figure 7

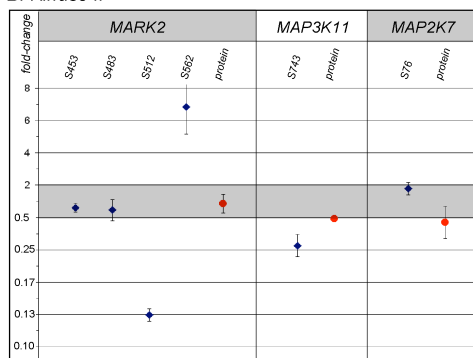


Supplementary Figure 8

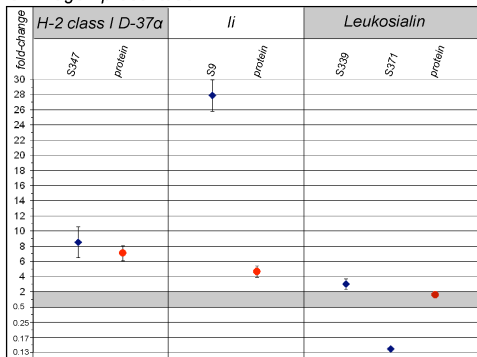
A: Kinase I



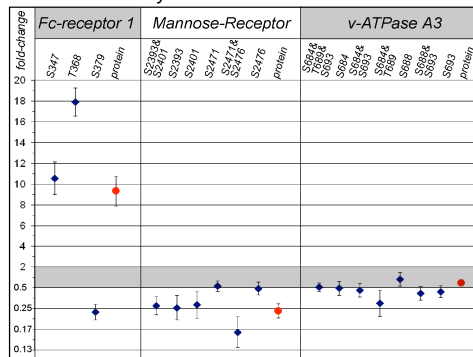
B: Kinase II



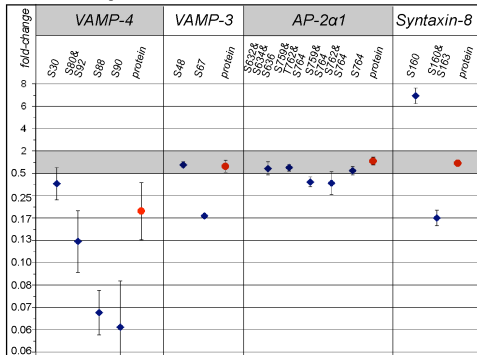
C: Antigen presentation



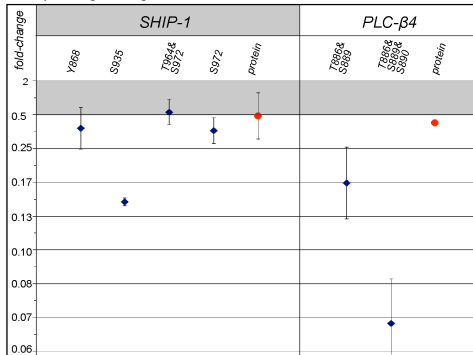
D: Innate Immunity



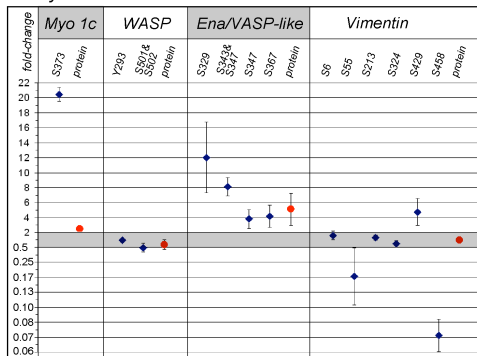
E: Trafficking



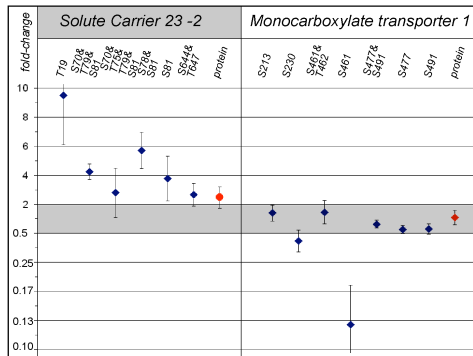
F: Lipid signaling



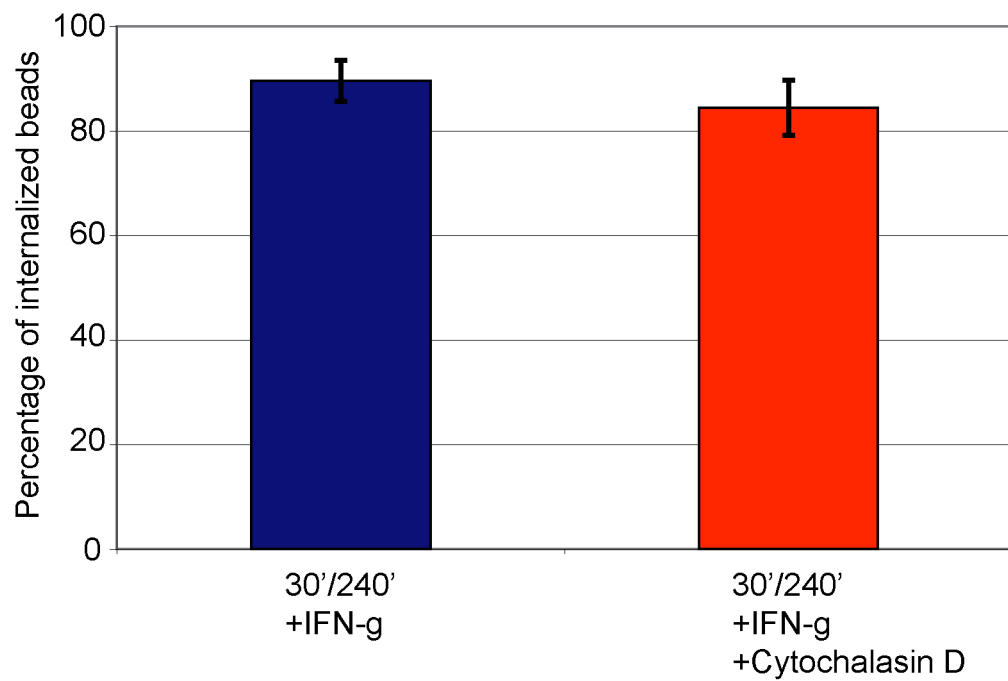
G: Cytoskeleton



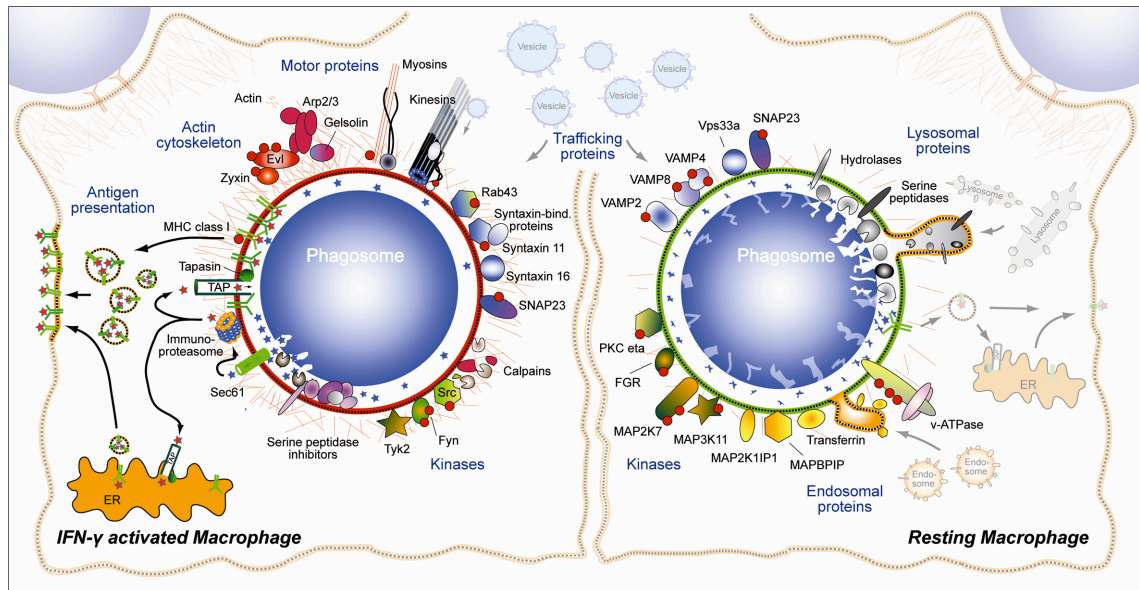
H: Transporters



Supplementary Figure 9



Supplementary Figure 10



ANNEXE II

Addendum,

Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection

Luc English, Magali Chemali, and Michel Desjardins

Autophagy 2009 Oct 3;5(7)

Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection

Luc English, Magali Chemali, and Michel Desjardins
Addendum, *Autophagy* 2009 Oct 3;5(7)

Abstract

Complex membrane trafficking events are involved in the regulation of antigen processing and presentation of both endogenous and exogenous antigens. While these processes were believed to involve mainly organelles along the endo/phagocytic and the biosynthetic pathways, recent studies have shown that autophagy also participates actively in both innate and adaptive immunity. We have shown recently that, in macrophages infected with the *Herpes simplex* type 1 virus, autophagy plays a key role in the targeting of viral proteins to hydrolytic compartments, and their processing for presentation on MHC class I molecules. This pathway involves a novel type of autophagosomes formed by coiling of the nuclear membrane where viral proteins are highly enriched. The ability to enhance the contribution of autophagy to antigen presentation in various conditions suggests that this pathway could be used to boost the immune response against viral infection and develop new vaccines.

A variety of cells are able to present antigens at their cell surface to stimulate T lymphocytes. This process plays a key role in generating a sustained immune response against microbes and infected cells, as well as tumor cells. Two distinct pathways of antigen presentation have been initially proposed for endogenous proteins (either self-antigens or viral proteins expressed in infected cells) or exogenous antigens (coming from bacteria and parasites). In the classical view, endogenous antigens are processed by the proteasome in the cytoplasm and the resulting peptides are loaded on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in the endoplasmic reticulum (ER).¹ Loaded MHC I complexes then reach the cell surface through the biosynthetic pathway where they stimulate a subset of T lymphocytes (CD8⁺). In contrast, exogenous antigens acquired by cells via endocytosis and phagocytosis are processed by hydrolases in endocytic/phagocytic compartments and loaded on MHC class II molecules in the same compartments. Membrane recycling events are then involved in their targeting to the cell surface for stimulation of CD4⁺ T cells. Our growing understanding of membrane trafficking has highlighted the fact that cells divert molecular processes originally assigned specifically to the MHC class I or class II pathway to maximize the efficiency of the immune response against both endogenous and exogenous microbial antigens, as seen during cross-presentation.

The term "cross-presentation" has been coined to account for the fact that exogenous antigens internalized by endocytosis and phagocytosis could be presented on MHC class I molecules to generate a CD8⁺ T cell response.² Conceptually, this process requires the transfer of peptides generated by hydrolytic degradation in vacuolar organelles like endosomes and phagosomes (originally associated with the processing of peptides for MHC class II molecules) to MHC class I molecules present in the ER. Direct interactions between ER and both endosomes and phagosomes have been extensively described in the literature³⁻¹⁰ and linked to cross-presentation. Hence, complex membrane trafficking events and interactions between organelles of the two loading pathways contribute to the formation of competent organelles where loading of exogenous vacuolar antigens on MHC I molecules can occur.

Autophagy joins the club

Autophagy consists of the wrapping of intracellular elements in endomembranes. Those elements are then degraded in the lytic compartment generated by the fusion of autophagosomes with acidic lysosomes to form autolysosomes. Autophagy is hence a key process in the maintenance of cellular homeostasis by allowing the degradation of damaged organelles and the recycling of their components. The intracellular degradation of pathogens such as viruses or bacteria via autophagosomes, a process referred to as xenophagy, turned out to be at the center of both innate and adaptive immunity.¹¹ The ability of autophagy to allow the elimination of pathogens makes this mechanism a key player in innate immunity, whereas the contribution of this mechanism to generate peptides derived from the trapped pathogens for presentation on MHC molecules enables the development of an adaptive immune response. Supporting this idea, Palludan *et al.* demonstrated that autophagy contributes to generate peptides from the viral protein EBNA1 of Epstein-Barr virus-transformed cells and allows their presentation on MHC class II molecules.¹² Recently, we demonstrated that autophagy is also involved in the presentation of viral peptides onto MHC I molecules after infection of murine macrophages by HSV-1.¹³ These studies are the first to demonstrate that autophagy can also contribute to the “cross-presentation” of endogenous antigens, and support the fact that complex interactions among endomembrane organelles regulate and maximize the capacity of antigen presenting cells to contribute to the elaboration of an efficient immune response against both endogenous and exogenous microbial molecules.

Nuclear membrane-derived autophagy

Autophagy is known to be beneficial for certain viruses that replicate within autophagosomes. This is the case for poliovirus that can subvert components of the autophagic machinery and generate autophagosome-like compartments for its

replication.¹⁴ In contrast, *Herpes simplex* type 1 virus (HSV-1) inhibits macroautophagy in a variety of cells.^{15, 16} This process involves the viral protein ICP34.5, which interacts with the host cell protein Beclin 1 to inhibit the early steps of autophagosome assembly.¹⁵ In our recent work, we were able to show that the infection of murine macrophages by HSV-1 is organized in two distinct phases. During the early phase of infection, the wild-type virus is able to inhibit macroautophagy. This inhibition is dependent on the viral protein ICP34.5, as infection with the virus lacking this protein leads to induction of autophagy early after cell entry. However, during the late phase of infection, HSV-1 infection triggers a novel form of autophagy characterized by the formation of autophagosomes by a coiling process of the nuclear membrane.¹³ While classical autophagosomes display a double membrane structure, autophagosomes formed from the nuclear envelope display a 4-layer membrane structure, originating from the use of both the inner and outer nuclear membranes (Fig. 1). We were able to show that the membrane of these organelles displays high levels of the viral glycoprotein B (gB) and LC3, a classical marker of autophagosomes. The formation of this new kind of autophagosomes seems to be favored by the inhibition of “classical” autophagy since cells infected with the mutant virus lacking ICP34.5 protein display mostly classical autophagosomes. Thus, our results suggest that cells infected by the wild-type HSV-1 respond to the virus-induced inhibition of autophagy by triggering this new type of self-eating process leading to CD8⁺ T cell activation. The formation of autophagosomes from the nuclear membrane also allows for the trapping of viral particles present in the cytoplasm of infected cells in the lumen of the 4-layer membrane structures (Fig. 1D), suggesting that peptides from a wide variety of viral proteins could be generated within autolysosomes. This process would arguably enable the presentation of multiple viral peptides on both MHC class I and class II molecules.

Interestingly, the ER origin of the membrane used to form the 4-layer structures in infected macrophages (the nuclear envelope is a continuity of the ER) suggests that these organelles share ER-derived molecular mechanisms described previously for phagosomes and endosomes to link vacuolar antigen processing with presentation on

MHC class I molecules.^{6, 8-10} Our experiments using the mutant virus lacking the ICP34.5 protein seem to indicate that classical autophagosomes, which are abundant in cells infected by this virus, also contribute to the vacuolar processing of viral peptides for MHC I presentation that leads to efficient CD8⁺ T cell activation. Although the nature of the membrane contributing to the formation of classical autophagosomes is still a matter of debate, many lines of evidence point to the implication of ER.^{17, 18} If the contribution of ER is necessary for the formation of organelles competent for “cross-presentation” of endogenous vacuolar antigens on MHC class I molecules as it is for the presentation of exogenous antigens, then our results strongly support the idea of the ER being the source of membrane for classical autophagosomes (Fig. 2). However, further studies will be required to quantitatively compare the contribution of classical versus nuclear-derived autophagosomes in the vacuolar processing of viral antigens leading to MHC class I presentation.

Based on our results, it would be interesting to determine whether autophagy contributes in widening the repertoire of viral antigens presented to T lymphocytes, compared to the classical MHC class I presentation pathway. More studies will also be required to address the molecular mechanisms regulating the formation of nuclear membrane-derived autophagosomes, and to determine the extent of similarity between this process and macroautophagy. It is also unknown whether this process is specific to HSV-1 infection or if it can be triggered in response to a variety of stressful conditions. Finally, our finding that a mild heat shock or treatment with certain cytokines stimulates the contribution of autophagy in the processing of viral antigens for presentation on MHC class I molecules, indicates that this cellular pathway could be exploited to develop novel therapeutic approaches to treat infectious diseases, or develop new vaccines.

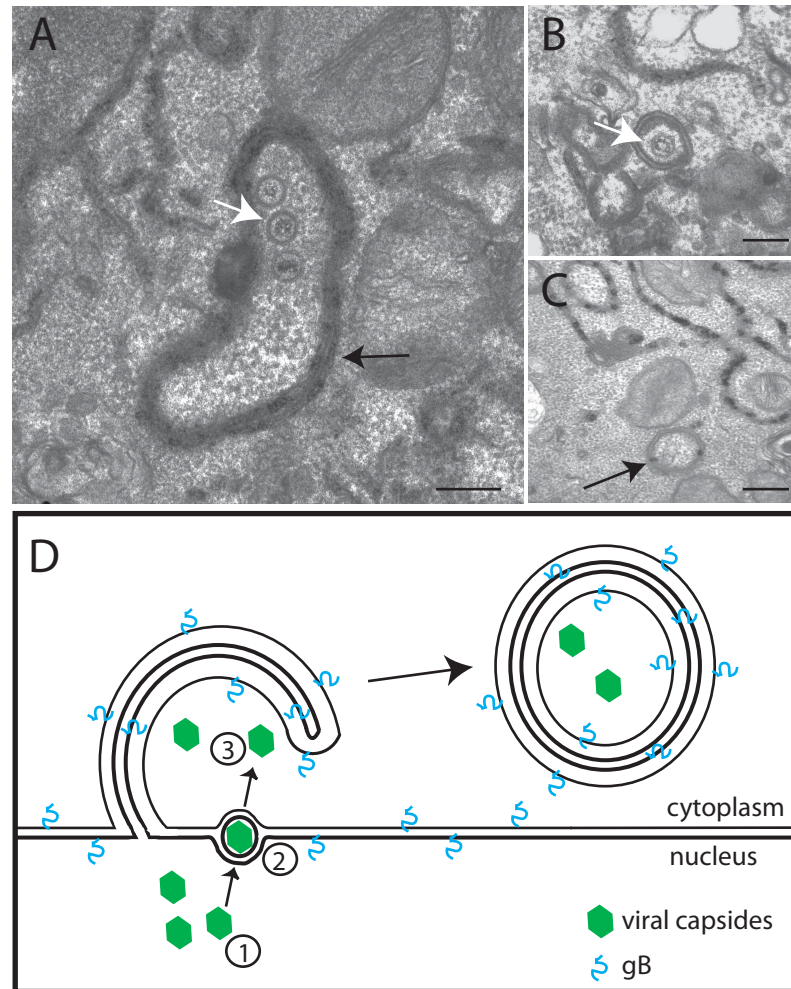


Figure 1. Biogenesis of nuclear membrane-derived autophagosomes. Electron microscopy of macrophages 10 h after infection with HSV-1. **A)** Nuclear-derived autophagosomes containing viral capsids (white arrow) formed from membrane-coiled structures emerging from the nucleus of an infected cell display four layers of membrane (coming from the inner and outer nuclear membrane). Glucose-6-phosphatase labelling (black deposits within the membranes) confirms the ER/nuclear

envelope nature of these autophagosomes (black arrow). **B)** Classical autophagosomes containing a viral particle (white arrow) display a double membrane. **C)** Glucose-6-phosphatase labelling (black deposits) indicates that ER contributes to the formation of classical autophagosomes (black arrow). **D)** Schematic representation of nuclear membrane-derived autophagosome formation and the trapping of viral particles. 1) Viral capsids assemble and accumulate in the nucleus of infected cells. 2) During the egress process, HSV-1 capsids fuse with the inner nuclear membrane and acquire their envelope in the perinuclear space. 3) A second step of fusion releases a naked HSV-1 capsid in the cytoplasm of the cell. During this process some viral capsids are trapped by the emerging nuclear-derived autophagosomes. These autophagosomes then detach from the nucleus (arrow). Scale bars, 250 nm.

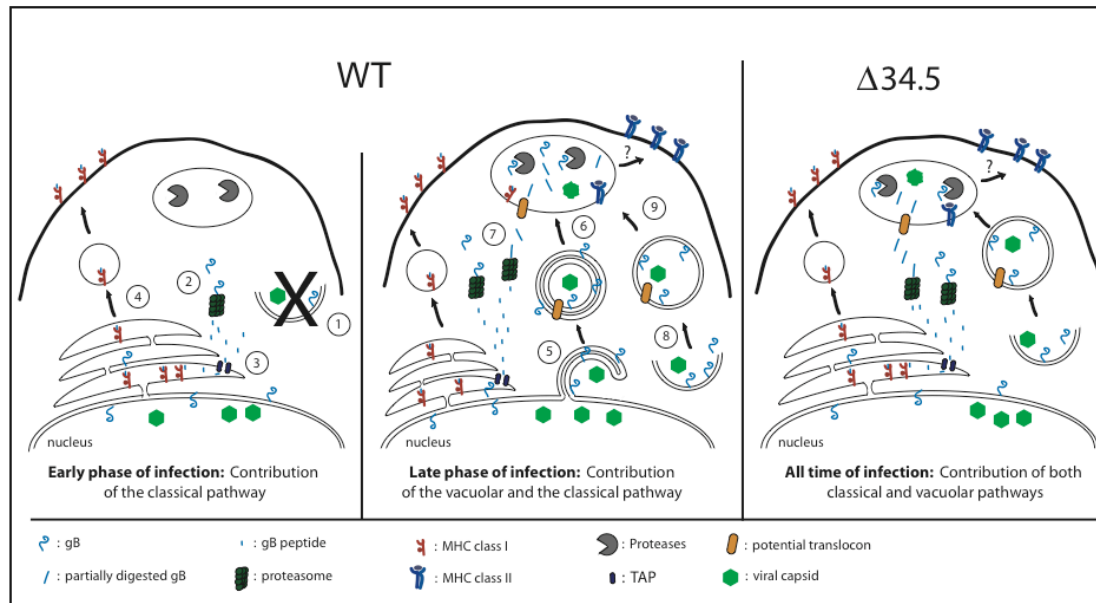


Figure 2. Contribution of autophagy to the vacuolar processing of endogenous viral proteins. When WT HSV 1 viruses infect a murine macrophage, the viral protein ICP34.5 blocks cellular macroautophagy normally induced by the host cell (1). The viral glycoprotein gB is then exclusively processed through the classical MHC class I presentation pathway involving degradation by the proteasome (2), translocation of peptides into the ER (3), and transport of loaded MHC class I molecules to the cell surface (4). During the late phase of infection, a novel form of autophagy implicating the nuclear membrane is triggered. The LC3⁺ structures arising from the coiling of the nuclear envelop, where viral proteins are enriched (5), fuse with lysosomes to form autolysosomes where gB is partly degraded by hydrolases (6). Note that the inner membranes of the autophagosomes are also degraded at that step. The ER nature of these nuclear derived-autophagosomes is likely to provide molecules enabling the translocation of gB peptides from the lumen of autolysosomes to the cytoplasm (7). These peptides are then handled by the classical pathway, as described in steps 2, 3 and 4. In parallel, gB is also processed via more conventional autophagosomes formed from a membrane of unknown origin (8). These classical autophagosomes also fuse

with lysosomes to form autolysosomes where degradation occurs (9). The mutant virus lacking ICP34.5 (Δ 34.5) is unable to block macroautophagy during infection. Consequently, conventional autophagosomes are formed rapidly after virus entry and allow the vacuolar processing of gB antigens from the early phase of infection. Question marks (?) indicate the potential contribution of autophagy in the processing and presentation of HSV-1-derived peptides on MHC class II molecules.

Author Contributions

L.E. planned and realized all the experiments and the figures and wrote the manuscript; M.C. wrote the manuscript and M.D. directed the work and wrote the manuscript.

References

1. Kloetzel, P.M. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* **5**, 661-669 (2004).
2. Kurts, C. *et al.* Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* **184**, 923-930 (1996).
3. Garin, J. *et al.* The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**, 165-180 (2001).
4. Gagnon, E. *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119-131 (2002).
5. Goldszmid, R.S. *et al.* Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med* **206**, 399-410 (2009).
6. Guermonprez, P. *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397-402 (2003).
7. Grotzke, J.E. *et al.* The Mycobacterium tuberculosis phagosome is a HLA-I processing competent organelle. *PLoS Pathog* **5**, e1000374 (2009).
8. Houde, M. *et al.* Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-406 (2003).
9. Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12889-12894 (2003).
10. Burgdorf, S., Scholz, C., Kautz, A., Tampe, R. & Kurts, C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* **9**, 558-566 (2008).
11. Levine, B. & Deretic, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**, 767-777 (2007).
12. Paludan, C. *et al.* Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* **307**, 593-596 (2005).

13. English, L. *et al.* Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* (2009).
14. Taylor, M.P. & Kirkegaard, K. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol* **81**, 12543-12553 (2007).
15. Orvedahl, A. *et al.* HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* **1**, 23-35 (2007).
16. Alexander, D.E., Ward, S.L., Mizushima, N., Levine, B. & Leib, D.A. Analysis of the role of autophagy in replication of herpes simplex virus in cell culture. *J Virol* **81**, 12128-12134 (2007).
17. Simonsen, A. & Stenmark, H. Self-eating from an ER-associated cup. *J Cell Biol* **182**, 621-622 (2008).
18. Axe, E.L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685-701 (2008).

ANNEXE III

Nouvelle,

**Contribution de l'autophagie dans l'apprêtement d'antigènes viraux endogènes
menant à la présentation antigénique par les CMH de classe I**

Luc English¹, Magali Chemali¹ et Michel Desjardins^{1,2},

Médecine/Sciences (sous presse)

Autophagy contributes to endogenous viral antigens processing and improves MHC class I presentation

Contribution de l'autophagie dans l'apprêtement d'antigènes viraux endogènes menant à la présentation antigénique par les CMH de classe I

Luc English¹, Magali Chemali¹ et Michel Desjardins^{1,2},

1. Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Pavillon Roger-Gaudry, 2900 boul. Édouard Monpetit, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4.

2. Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Pavillon Roger-Gaudry, 2900 boul. Édouard Monpetit, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4.

L'autophagie désigne le processus par lequel la cellule capture du matériel cytoplasmique afin de le dégrader dans des lysosomes. Ce mécanisme catabolique permet notamment de recycler les constituants cellulaires et de maintenir l'homéostasie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. La découverte d'un rôle de l'autophagie dans l'immunité remonte déjà à plusieurs années. Pour faire face à l'intrusion de pathogènes comme des bactéries, virus ou parasites, la cellule est en effet capable de détourner l'autophagie de son rôle primordial « d'usine de recyclage » afin de séquestrer l'envahisseur dans une double membrane et de le dégrader [1]. Cette élimination du pathogène par autophagie (appelée xénophagie) constitue un des fondements de l'immunité dite « innée » [2]. En revanche, l'établissement d'un lien direct entre la xénophagie et l'immunité dite « acquise », c'est-à-dire une immunité spécifique permettant d'éliminer le non-soi, a été beaucoup plus récent. En effet, ce n'est qu'en 2005 que le groupe de Munz a montré que l'antigène viral EBNA, une des protéines du virus Epstein Barr, pouvait être transféré dans des autophagosomes et présenté sur des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II [3]. Ces molécules CMH de classe II sont pourtant classiquement décrites comme étant responsables de la présentation d'antigènes extérieurs à la cellule, comme ceux issus de la dégradation protéolytique d'une bactérie ou d'un parasite internalisé par phagocytose. Ces antigènes dits « exogènes » sont dégradés et apprêtés dans un compartiment vacuolaire avant d'être présentés à la surface de la cellule (*Figure 1*). Par opposition, les protéines cellulaires ou les protéines virales synthétisées par une cellule infectée sont présentées à la surface par l'autre classe de molécules présentatrices, les CMH de classe I. Ces antigènes dits « endogènes » sont dégradés par le complexe du protéasome dans le cytoplasme de la cellule, et non par les protéases de compartiments vacuolaires. Les peptides qui résultent de cette digestion sont par la suite transférés dans le réticulum endoplasmique pour être chargés sur les CMH de classe I (*Figure 1*).

Les travaux du groupe de Munz montrent donc que l'autophagie permet de transgresser les lois fondamentales de la présentation antigénique en autorisant la présentation de protéines virales endogènes sur des CMH de classe II. Une question subsistait donc : l'autophagie pouvait-elle à nouveau enfreindre les lois classiques de la présentation en permettant cette fois de dégrader et d'apprêter des antigènes endogènes dans un compartiment vacuolaire avant de les présenter sur des molécules CMH de classe I ? Jusqu'à récemment, de nombreux travaux suggéraient cette possibilité, sans pour autant la valider définitivement. En effet, il a été démontré que l'autophagie permettait d'éliminer des agrégats de protéines cytoplasmiques ubiquitinées [4]. Or, dans les cellules dendritiques, des agrégats similaires appelés DALIS (*DC aggregosome-like structures*) sont reconnus pour influencer fortement le répertoire peptidique présenté par les molécules du CMH de classe I [5]. Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré la présence de pathogènes comme *Toxoplasma gondii* [6], *Listeria monocytogenes* [7] ou encore *Mycobacterium tuberculosis* [8] à l'intérieur de compartiments autophagiques. La découverte parallèle de peptides provenant de ces pathogènes sur des molécules du CMH de classe I (et de classe Ib) laissait entrevoir un rôle possible de l'autophagie dans la génération des peptides servant à cette forme de présentation [9]. Par conséquent, nous avons étudié le rôle de l'autophagie dans le soutien de la présentation de peptides viraux par les CMH de classe I lors d'une infection par le virus *Herpes Simplex* de type 1 (HSV-1) afin de répondre aux nombreuses questions soulevées jusque-là [10].

Nous avons notamment mesuré les niveaux de présentation d'un peptide immunodominant de la glycoprotéine B (gB) du virus HSV-1 par les molécules du CMH de classe I. Nos résultats montrent clairement que l'infection de macrophages par HSV-1 mène à la mise en jeu d'une réponse immune organisée en deux phases. Dans la première phase, les cellules infectées présentent en surface le peptide antigénique issu de la dégradation et de l'apprêtement de la gB via la voie classique de présentation par les CMH de classe I (*Figure 2*). Dans la phase tardive de l'infection, en revanche, la

réponse immunitaire devient fortement dépendante de la dégradation de la gB dans un compartiment vacuolaire impliquant l'autophagie. Par ailleurs, notre étude dévoile l'existence d'un nouveau type d'autophagosomes présents uniquement dans les cellules infectées. Ces autophagosomes sont formés par projection de la membrane nucléaire riche en protéine virale gB dans le cytoplasme, suivi d'un enroulement des feuillettes internes et externes de cette membrane, le tout aboutissant à la formation d'une vésicule à quatre feuillettes pouvant également englober des particules virales. Malgré tout, le rôle distinct ou complémentaire de ces autophagosomes nucléaires par rapport aux autophagosomes classiques (eux-aussi abondants dans la phase tardive de l'infection) dans le processus de présentation de peptides viraux via la voie vacuolaire reste encore à établir. Cependant, la membrane nucléaire, et par conséquent la membrane constituant ces nouveaux autophagosomes, est en continuité avec la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Or, ce compartiment contient toute la machinerie nécessaire à la présentation de peptides antigéniques sur des molécules CMH de classe I. Il est donc logiquement envisageable que les autophagosomes que nous décrivons soient particulièrement compétents pour présenter des antigènes viraux sur des molécules du CMH de classe I du fait de leur origine RE/membrane nucléaire jusque-là insoupçonnée.

Author Contributions

L.E. wrote the manuscript and produced the figures; M.C. wrote the manuscript and M.D. directed the work.

Références

1. Swanson MS. Autophagy: eating for good health. *J Immunol* 2006; 177: 4945-51.
2. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 767-77.
3. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, *et al.* Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 2005; 307: 593-6.
4. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282: 24131-45.
5. Lelouard H, Gatti E, Cappello F, *et al.* Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* 2002; 417: 177-82.
6. Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels MJ, *et al.* CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest* 2006; 116: 2366-77.
7. Py BF, Lipinski MM, Yuan J. Autophagy limits Listeria monocytogenes intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* 2007; 3: 117-25.
8. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 2004; 119: 753-66.
9. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 607-18.
10. English L, Chemali M, Duron J, *et al.* Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* 2009.

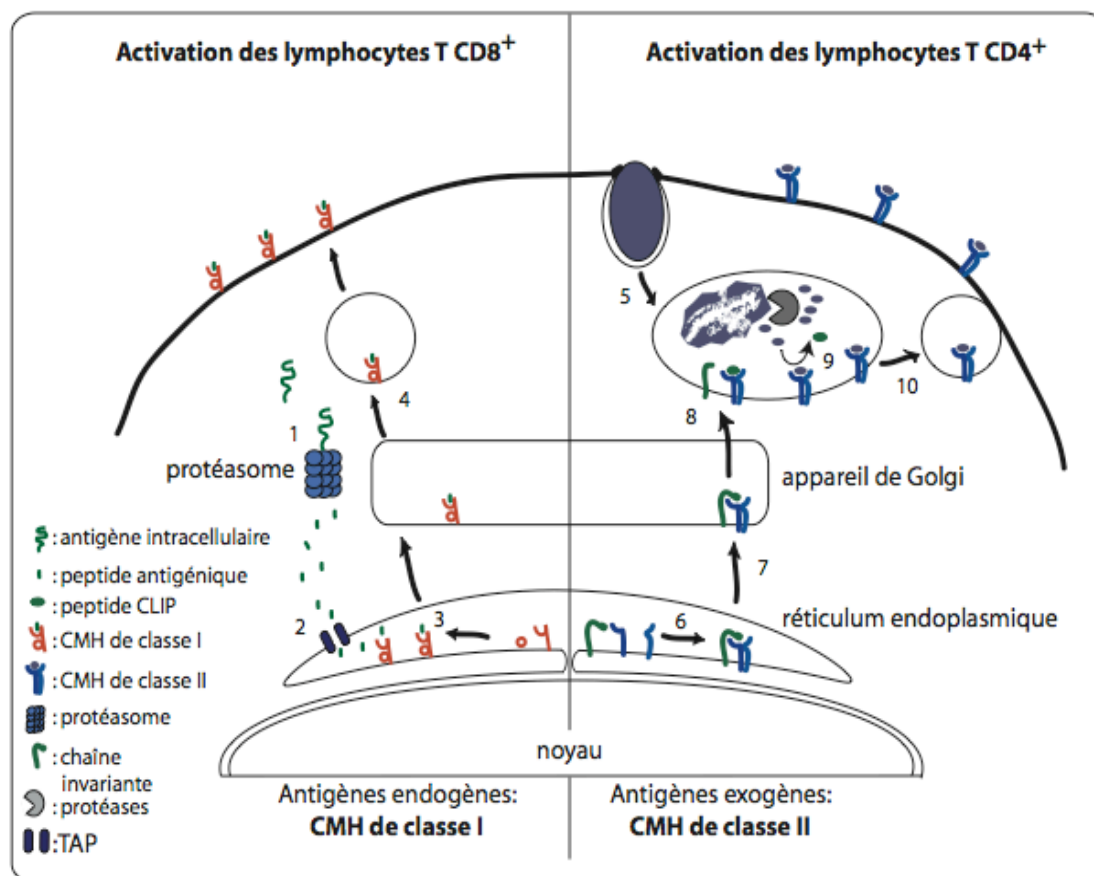


Figure 1. Voies dites “classiques” d’apprêtement des antigènes menant à la présentation antigénique par les molécules du CMH. Les antigènes présentés sur des molécules du CMH de classe I sont exclusivement endogènes à la cellule et sont digérés par le complexe du protéasome dans le cytoplasme (1). Les peptides ainsi formés sont transportés à l’intérieur du réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP (2) afin d’être chargés sur les molécules du CMH de classe I (3). Par la suite, les complexes peptide-CMH de classe I sont exportés à la surface cellulaire par la voie de sécrétion constitutive (4). Les antigènes présentés sur des CMH de classe II sont exclusivement exogènes à la cellule et sont acquis principalement par endocytose ou phagocytose (5). Les deux chaînes constituant les CMH de classe II, synthétisées dans le réticulum endoplasmique, s’associent à la chaîne invariante (6) et sont transportées jusqu’au compartiment endocyttaire (7). La digestion partielle dans ce compartiment libère alors

la chaîne invariante laissant seulement un fragment peptidique (appelé CLIP) dans la niche peptidique des molécules de CMH de classe II (8). Les peptides générés par la dégradation des antigènes exogènes remplacent le peptide CLIP dans la niche peptidique des CMH (9) et les complexes peptide-CMH de classe II sont alors exportés à la surface cellulaire par les endosomes de recyclage (10). *TAP : Transporter associated with Antigen Processing; CLIP : CLass II-associated Invariant chain Peptide.*

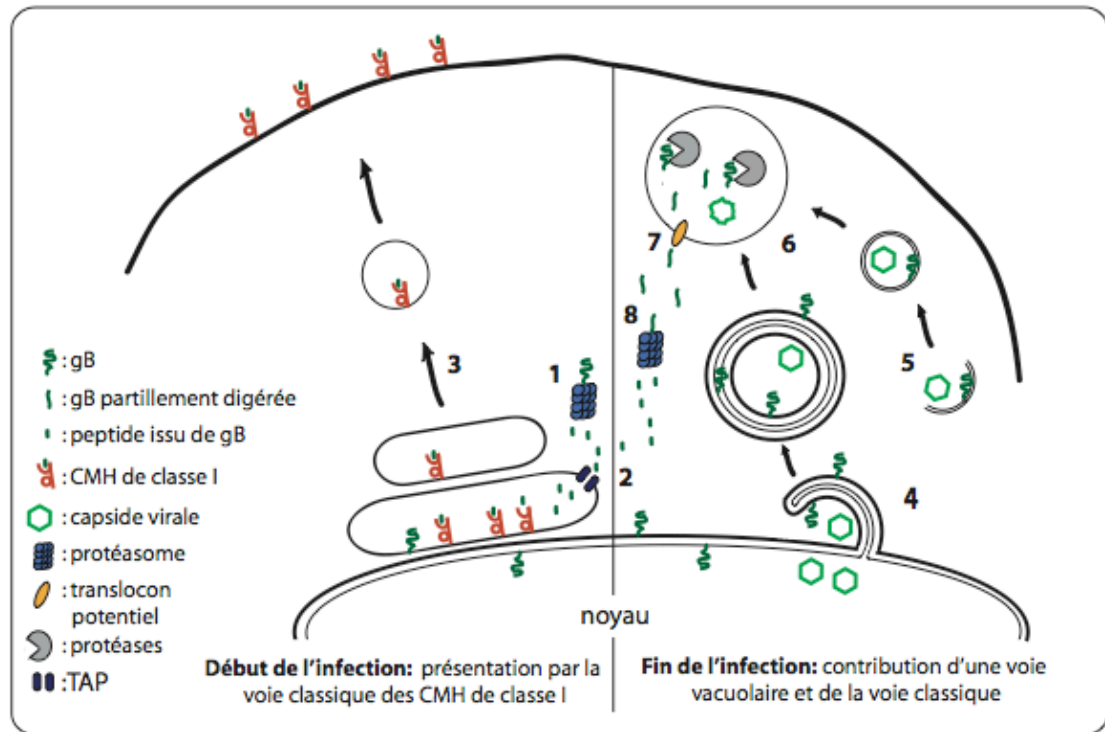


Figure 2. Contribution de l'autophagie à l'apprêtement vacuolaire d'antigènes viraux menant à la présentation antigénique par les CMH de classe I. En début d'infection, l'apprêtement de la gB du virus HSV-1 s'effectue par la voie dite classique de présentation antigénique sur les CMH de classe I. La gB est digérée par le complexe du protéasome dans le cytoplasme (1) et les peptides issus de cette dégradation sont transportés à l'intérieur du réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP (2). C'est à l'intérieur du réticulum endoplasmique que le chargement peptidique a lieu. Les complexes peptide-CMH sont par la suite exportés à la surface cellulaire par la voie de sécrétion constitutive (3). Dans la phase tardive de l'infection, la gB est partiellement apprêtée dans un compartiment vacuolaire impliquant les autophagosomes. Un nouveau type d'autophagosomes, dérivant de l'enveloppe nucléaire (4) ainsi que des autophagosomes classiques (5) permettent le transfert de la gB au niveau d'un compartiment vacuolaire. Dans les deux cas, les autophagosomes interagissent avec le compartiment lysosomal pour former des autophagolysosomes (6). La gB est ainsi

partiellement digérée par les hydrolases de cette organite et les peptides issus de cette dégradation sont ensuite supposément transportés hors des autophagolysosomes (7) pour rejoindre la voie classique de présentation antigénique par les CMH de classe I (8).