



HAL
open science

Bases moléculaires de la clairance des exosomes de réticulocyte.

Lionel Blanc

► **To cite this version:**

Lionel Blanc. Bases moléculaires de la clairance des exosomes de réticulocyte.. Biologie cellulaire. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2008. Français. NNT: . tel-00229752

HAL Id: tel-00229752

<https://theses.hal.science/tel-00229752>

Submitted on 31 Jan 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biochimie et Biologie Cellulaire

Formation Doctorale : Endocrinologie Cellulaire et Moléculaire

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Titre :

**Bases moléculaires de la clairance des exosomes de
réticulocyte**

présentée et soutenue publiquement

par

Lionel BLANC

Le 9 Janvier 2008

JURY

Pr. **Paul MANGEAT**, Professeur, Université Montpellier II.
Pr. **Stephen BAGHDIGUIAN**, Professeur, Université Montpellier II.
Pr. **Narla MOHANDAS**, Professeur, New York, Etats Unis.
Dr. **Graça RAPOSO**, Directeur de Recherche, CNRS, Paris.
Dr. **Michel RECORD**, Directeur de Recherche INSERM, Toulouse.
Dr. **Michel VIDAL**, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier.

Président
Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

Remerciements :

Tout d'abord, je tiens à remercier Michel Vidal, mon directeur de thèse qui m'a permis de réaliser ce travail et aux côtés de qui j'ai pu découvrir le métier de chercheur. Sa gentillesse, son écoute et la confiance qu'il a pu m'accorder m'ont vraiment beaucoup apporté au niveau professionnel, mais également sur un plan plus personnel. Tu m'as appris à ne jamais baisser les bras et à aller de l'avant, je ne pourrai jamais assez t'en remercier. Merci de m'avoir appris la patience et le sens critique, vertus essentielles dans ce métier. Merci pour toutes les discussions que nous avons pu partager, tant au niveau scientifique que dans tout autre domaine, sérieux ou non... Merci de m'avoir envoyé en congrès et en Croatie. Et enfin, merci pour tous les services que tu as pu me rendre, pour ta disponibilité, et d'avoir pris le temps de corriger ce manuscrit.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers Graça Raposo et Michel Record qui ont accepté de faire partie de ce jury en qualité de rapporteurs et de me donner de leur temps afin de juger et d'améliorer ce travail.

Je tiens également à remercier chaleureusement Narla Mohandas, qui me fait l'honneur de faire le déplacement de New York afin de participer à ce jury et d'examiner ce travail.

Un grand merci à Stephen Baghdigian pour avoir accepté d'examiner ce travail et qui m'a souvent montré que tout pouvait être relativisé...

J'exprime ma gratitude envers Paul Mangeat, qui en plus de m'avoir permis d'enseigner à ses côtés a accepté de présider ce jury de thèse.

Merci à Pascale pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son soutien dans les moments difficiles. Merci également de m'avoir appris les bases du métier d'enseignant, et surtout celles de la pédagogie.

L'occasion m'est également donnée de pouvoir remercier tous les membres du laboratoire, notamment Marianne pour tous les conseils qu'elle a pu me fournir, Christian, pour l'aide précieuse qu'il a pu m'apporter dans la préparation du concours d'attribution des bourses de thèse et Catherine pour sa disponibilité et sa gentillesse. Je remercie Céline pour sa bonne humeur quotidienne et son sens de l'entraide dans la vie de doctorants ! Un grand merci à Luc, Mauld, Fabienne, Nadia, Anne, Andreas et Julien, pour tous les bons moments que nous avons pu partager. Enfin, merci à Aude et à Charles qui ont su me faire profiter de leur expérience de doctorant. Merci également à Naomi Taylor, sans l'aide de qui aujourd'hui je chercherai toujours un post-doc.

Je tiens à remercier tous mes amis qui ont su m'épauler durant toutes ces années. Entre autres, merci à Ornella, qui depuis plus de 25 ans a su me montrer combien elle m'était précieuse, à Pierre-Jean, pour son immense générosité et à qui je dois beaucoup. Merci à Marie-Amélie, Lionel, Olivier, Audrey, Freddy, Fred et tous les autres pour tous les bons moments et coups durs que nous avons pu traverser ensemble. Et enfin, merci à Seb, avec qui j'ai effectué mon cursus universitaire et avec qui je partage d'excellents souvenirs sur ces huit années.

Merci à ma famille et à mes parents, pour les valeurs que vous avez pu me transmettre et le soutien que vous avez pu me donner, soyez assurés que j'en ai conscience même si je ne le dis pas souvent...

Enfin, merci à Linda, qui a sacrifié pas mal de choses pour venir me rejoindre en France et qui a su me comprendre. A mon tour maintenant, j'ai hâte de te retrouver.

Je ne saurais terminer ces remerciements sans une pensée pour Christelle. J'espère que tu es plus heureuse là où tu es maintenant. Je ne t'oublierai jamais et je souhaite te dédier ce manuscrit.

Avant propos...

Au cours de leur maturation, les réticulocytes sécrètent des vésicules membranaires appelées exosomes. Cette année, les exosomes fêtent leur 20^{ème} anniversaire. En effet, si l'existence de ces vésicules a été montrée pour la première fois en 1983 par Rose Johnstone, le nom d'exosomes apparaît pour la première fois dans la littérature en 1987. D'abord restreinte au réticulocyte, l'étude de ces vésicules s'est ensuite développée et diversifiée avec la découverte en 1996 de la sécrétion des exosomes par des cellules présentatrices d'antigène. Aujourd'hui, de nombreuses cellules ont été montrées comme sécrétrices d'exosomes. Si leur biogenèse se déroule selon un mécanisme commun, différentes fonctions sont conférées à ces vésicules, depuis l'élimination de protéines inutiles pour la cellule à l'utilisation de ces vésicules en thérapie anti-cancéreuse.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la sécrétion des exosomes par les réticulocytes, et à leur devenir une fois libérés dans la circulation sanguine. Le travail présenté dans ce manuscrit a permis de montrer que l'on pouvait établir un parallèle entre la clairance des exosomes une fois libérés par le réticulocyte d'une part et l'élimination des corps apoptotiques d'autre part.

Dans un premier temps, une revue bibliographique selon trois axes introduira ce manuscrit. Un premier chapitre me permettra de présenter les exosomes, en termes de biogenèse, de composition et de fonctions. Le deuxième chapitre sera consacré à l'érythropoïèse et plus particulièrement au réticulocyte, cellule modèle de mon travail de thèse. Enfin, je m'intéresserai dans un troisième chapitre aux grandes lignes du processus de mort cellulaire programmée (l'apoptose) et plus particulièrement aux mécanismes de clairance de ces cellules apoptotiques.

Puis, je présenterai mes travaux de thèse, ayant conduit à deux publications. Une présentation de la première publication me permettra de replacer ces exosomes dans le contexte général de l'érythropoïèse et plus précisément sur le rôle essentiel des exosomes dans le processus de maturation des réticulocytes. Le deuxième chapitre de ces travaux de thèse insistera sur les bases moléculaires du processus d'élimination des exosomes une fois libérés dans la circulation sanguine ; travaux renforcés par d'autres résultats non publiés, que je présenterai dans un dernier chapitre de cette partie.

Je terminerai enfin ce manuscrit avec une discussion plus générale, axée d'une part sur la sécrétion des exosomes de réticulocyte et leur devenir dans un contexte de tolérance et sur la corrélation pouvant exister entre le processus d'énucléation et la sécrétion d'exosomes d'autre part.

TABLE DES MATIERES

Première partie :	9
Revue Bibliographique.....	9
Chapitre I : Les exosomes :	10
A- Découverte, historique :.....	11
1- Les premiers travaux :	11
2- Du cas historique du réticulocyte à l'urine : les exosomes sont partout ! :	12
B- Trafic endosomal et biogenèse des exosomes :.....	13
1- L'endocytose : de la membrane plasmique au compartiment endosomal :.....	13
a- Voie d'endocytose dépendante de la clathrine :.....	14
b- Voies d'endocytose indépendantes de la clathrine :.....	16
La phagocytose :.....	17
La macropinocytose :	17
Les cavéoles :	17
Les rafts :	19
2- Les différents types d'endosomes :	20
a- Endosomes précoces :.....	20
Endosome de tri :	20
Endosome de recyclage :.....	21
b- Endosomes tardifs :	22
c- Lysosomes :.....	22
3- L'endosome multivésiculaire (EMV) :.....	23
a- L'EMV, un peu d'histoire... ..	23
b- Les signaux de tri vers les EMVs :.....	23
L'ubiquitine comme signal de tri vers les EMVs :.....	23
Signaux de tri indépendants de l'ubiquitine :	24
c- Le rôle des lipides dans le tri vers l'EMV :.....	25
Le phosphatidylinositol 3 phosphate (PI(3)P) et le phosphatidylinositol 3,5 biphosphate (PI(3,5)P2) :.....	25
Le cholestérol :	26
Le lyso- <i>bis</i> phosphatidic acid (LBPA) :	26
d- La machinerie ESCRT dans la biogenèse de l'EMV :	27
ESCRT-0 :	28

ESCRT-I :	28
ESCRT-II :	29
ESCRT-III :	29
e- Virus et EMV :	30
f- Devenir de l'EMV :	32
La dégradation lysosomale :	32
Un stockage temporaire :	32
La sécrétion des ILV : la naissance des exosomes :	33
C- Composition moléculaire des exosomes :	34
1- Compositions protéiques et lipidiques communes à tous les types d'exosomes :	34
a- Protéines ubiquitaires :	35
b- Lipides :	37
2- La spécificité de composition protéique des deux grands types d'exosomes :	38
a- Les exosomes de cellules présentatrices d'antigène :	38
b- Les exosomes de réticulocyte :	38
D- Fonctions des exosomes :	39
1- Exosomes de cellules du système immunitaire :	39
2- Exosomes de cellules épithéliales :	40
3- Exosomes de réticulocyte :	41
E- Exosomes <i>versus</i> ectosomes :	41
Chapitre II : Le réticulocyte :	43
A- L'érythropoïèse et sa régulation :	43
1- Les cellules souches :	43
a- Cellules souches pluripotentes :	44
b- Cellules souches multipotentes :	44
c- Progéniteurs érythroblastiques :	45
2- Les érythroblastes :	46
a- Proérythroblastes :	47
b- Erythroblastes basophiles :	47
c- Erythroblastes polychromatophiles :	47
d- Erythroblastes orthochromatiques :	47
e- L'îlot érythroblastique :	47
3- Les réticulocytes :	48
4- Les érythrocytes :	49

5-	Régulation de l'érythropoïèse :	49
a-	Le Stem Cell Factor (SCF) :.....	50
b-	L'érythropoïétine (EPO) :.....	50
c-	Le fer :	51
B-	La maturation du réticulocyte :.....	51
1-	Généralités :.....	51
2-	Evolution morphologique au cours de la maturation :	52
3-	La synthèse d'hémoglobine :.....	52
4-	Perte de protéines membranaires :.....	53
5-	La perte des organites intracellulaires :.....	54
a-	Les ribosomes :.....	54
b-	Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi :	55
c-	Les lysosomes :	56
d-	Les mitochondries :	56
C-	La dégradation programmée des mitochondries : La Mitoptose :.....	57
1-	Le rôle clé de la 15-lipoxygénase (15-LOX) :.....	57
a-	Synthèse de la 15-LOX :	57
b-	Structure et fonction de la 15-LOX :.....	58
c-	La libération et l'élimination des protéines mitochondriales :	59
2-	L'autophagie :.....	59
Chapitre III : L'apoptose et la clairance des corps apoptotiques :.....		61
A-	Généralités sur l'apoptose :	61
1-	L'apoptose et son impact dans la physiologie cellulaire et tissulaire :.....	61
2-	Apoptose versus nécrose :	62
3-	Changements morphologiques et moléculaires au cours de l'apoptose :	62
B-	Mécanismes moléculaires de l'apoptose :	63
1-	La phase d'engagement :.....	63
a-	La voie des récepteurs de mort cellulaire :.....	63
b-	La voie mitochondriale :.....	64
2-	La phase d'exécution : les Caspases :.....	64
a-	Caractéristiques et modes d'activations des caspases :.....	64
b-	Rôle des caspases :	65
3-	Facteurs de régulation de l'apoptose :	65
C-	La clairance des corps apoptotiques :.....	66

1-	Structure lipidique de la membrane plasmique et changements au cours de l'apoptose :.....	66
a-	Structure générale des membranes :	66
b-	Composition lipidique de la membrane plasmique :	66
c-	L'asymétrie membranaire :	67
2-	Intérêts physiologiques de la clairance des corps apoptotiques :	68
3-	Les grands principes de la clairance :	69
a-	Les signaux « eat-me » :	69
b-	Les signaux « don't eat-me » :	71
c-	Les signaux « find-me » :	72
4-	L'exemple de la signalisation dépendante de l'iPLA2 :	73
a-	Les différentes phospholipases de type A2 :	73
b-	Le rôle de l'iPLA2 dans l'apoptose :	74
c-	iPLA2 et signaux « eat-me » :	75
d-	iPLA2 et signaux « find-me » :	76
5-	La phagocytose des corps apoptotiques :	77
	Deuxième partie :	79
	Travaux de Thèse	79
	LA SECRETION D'EXOSOMES PAR LE RETICULOCYTE : UN PROCESSUS A PART ENTIERE DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROCYTAIRE :	80
	LES EXOSOMES SECRETES PAR LES RETICULOCYTES LIENT DES IgMs NATURELLES : INTERVENTION D'UNE PHOSPHOLIPASE ENDOSOMALE DE TYPE iPLA2 ACTIVABLE PAR LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	89
	LE ROLE D'APOH DANS LA CLAIRANCE DES EXOSOMES DE RETICULOCYTES :	104
1.	Introduction :	104
2.	Matériel et méthodes :	106
a-	Cellules :	106
b-	Anticorps :	106
c-	Préparation des exosomes :	106
d-	Dosage de l'activité Acétylcholinestérase (AChE) :	106
e-	Strip des exosomes :	107
f-	Analyse de la liaison d'ApoH par cytométrie de flux :	107
g-	Compétition avec les liposomes :	107
3.	Résultats : ApoH s'associe aux exosomes de réticulocytes :	107
4.	Discussion :	111
	Troisième partie :	113

Discussion Générale	113
Références Bibliographiques.....	126
Annexe	147

Première partie :

Revue Bibliographique

Chapitre I : Les exosomes :

D'un point de vue étymologique, le terme exosome vient du grec *exô-*, qui signifie hors de, et de *-sôma*, signifiant corps. Les exosomes sont de petites vésicules membranaires, sécrétées dans le milieu extracellulaire par différents types de cellules. Comme nous le discuterons un peu plus loin, la composition moléculaire et la fonction de ces exosomes peuvent varier en fonction du type de cellule libérant les vésicules. Toutefois, un paramètre reste quasi systématique, celui de leur morphologie et de leur taille. De forme sphérique, les exosomes ont un diamètre variant de 50 à 100nm.

Le concept d'exosome est un concept récent, né dans les années 80, lors de l'étude du trafic du Récepteur de la Transferrine (RTf) durant la maturation du réticulocyte. Comme tout nouveau concept en biologie, la communauté scientifique a d'abord été sceptique quant à l'existence de telles structures, les considérant comme un artéfact expérimental. Toutefois, la multiplicité des expériences et des modèles animaux a permis de valider ce concept de sécrétion d'exosomes par les réticulocytes (Johnstone, Bianchini et al. 1989). La fonction proposée alors, était d'envisager la sécrétion d'exosomes comme un moyen mis en place par la cellule pour éliminer des protéines devenues inutiles, telles que le RTf. Dix ans plus tard, les études concernant les exosomes se sont multipliées, à la suite de la découverte d'exosomes sécrétés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA). De plus, il s'est avéré que dans certaines conditions, ces exosomes pouvaient stimuler la prolifération des lymphocytes T *in vitro*, et d'induire une réponse anti-tumorale *in vivo*. Il a donc été suggéré que les exosomes de CPA pouvaient avoir un rôle dans la réponse immunitaire. Depuis ces premières découvertes, des exosomes ont pu être isolés à partir de divers surnageants de culture de nombreux autres types cellulaires tels que des lymphocytes T, des mastocytes, des plaquettes, et différentes cellules épithéliales ou lignées de cellules tumorales.

Je reviendrai dans un premier temps sur la découverte des exosomes, puis je présenterai les bases moléculaires de la biogenèse de ces vésicules, en faisant un bilan des connaissances actuelles dans ce domaine. Enfin, un chapitre sur la structure moléculaire des différents types d'exosomes me permettra d'amener les différentes fonctions que l'on peut prêter aux exosomes.

A- Découverte, historique :

1- Les premiers travaux :

Si le terme d'exosome est apparu pour la première fois dans la littérature en 1987 (Johnstone, Adam et al. 1987), les études qui ont mené à la découverte de ces vésicules ont commencé dans les années 70. A l'origine, on pensait que ces vésicules résultaient d'un phénomène de bourgeonnement de la membrane plasmique. Rose Johnstone et son équipe travaillaient à l'époque sur le transport des acides aminés dans une lignée de cellules tumorales et recherchaient une méthode pour identifier spécifiquement un transporteur dans la membrane plasmique, afin de pouvoir le purifier (Bardin and Johnstone 1978; Johnstone 1979). Elle montra alors que le réticulocyte de mouton transportait certains acides aminés par une voie dépendante du sodium, appelée transport actif secondaire. Or, dans les réticulocytes de mouton, cette fonction de transporteur est perdue lors de la maturation des cellules en érythrocytes (Benderoff, Blostein et al. 1978) en même temps que le Récepteur de la Transferrine (RTf). Néanmoins, depuis plusieurs années, le devenir du RTf était sujet à controverse. Alors que l'on savait que la capture du fer s'arrêtait quand la cellule mûrissait et que ces cellules ne pouvaient plus lier la Transferrine, la protéine du sérum en charge du fer (Jandl and Katz 1963); la question d'une dégradation ou d'une inactivation du RTf lors de la maturation du réticulocyte restait ouverte (Leibman and Aisen 1977). Alors que le transporteur d'acides aminés représente une part mineure en termes de quantité de protéines de la membrane plasmique, le Récepteur de la Transferrine (RTf), *a contrario*, est une protéine majoritaire. Le groupe décida alors de se pencher sur le devenir du RTf lors de la maturation du réticulocyte. En utilisant un

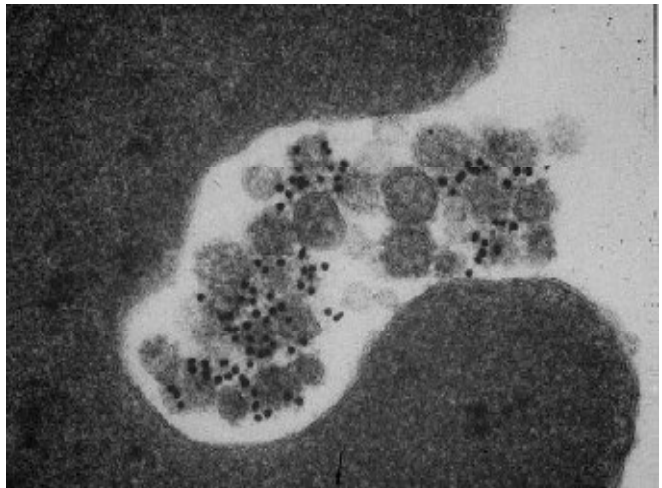


Figure 1 : Photo de microscopie électronique à transmission (MET) de la libération d'exosomes par le réticulocyte de mouton. Le RTf est marqué à l'aide d'un anticorps monoclonal couplé à l'or colloïdal. (D'après R. Johnstone, *Blood Cells Mol. Dis.* **34** p. 214-219, 2005)

anticorps monoclonal dirigé contre le RTf et couplé à l'or colloïdal, ils suivirent la maturation en microscopie électronique (Pan, Teng et al. 1985) et observèrent l'endocytose¹ de l'anticorps conjugué à l'or suivi d'un bourgeonnement dans un compartiment vacuolaire interne, l'endosome multivésiculaire (EMV). Après 3 heures d'incubation, il y avait accumulation de petites vésicules d'environ 50nm dans la lumière du compartiment vacuolaire ; compartiment dont la taille augmentait, se chargeait en vésicules marquées et qui, finalement, fusionnait avec la membrane plasmique, libérant alors les vésicules (Figure 1). Après 24 heures d'incubation à 37°C, le processus était terminé et aucune structure marquée à l'or ne subsistait dans la cellule (Pan, Teng et al. 1985). Le RTf est donc perdu au cours de la maturation du réticulocyte, associé à des vésicules, qui prirent alors le nom d'exosomes.

2- Du cas historique du réticulocyte à l'urine : les exosomes sont partout ! :

Depuis l'exemple de la libération d'exosomes par les réticulocytes, il a été montré que d'autres types cellulaires sécrètent des exosomes. En effet, la fusion de l'EMV avec la membrane plasmique libérant les exosomes dans le milieu extracellulaire a été observée dans des cellules impliquées dans la réponse immunitaire comme : les lymphocytes B (Raposo, Nijman et al. 1996; Escola, Kleijmeer et al. 1998), les lymphocytes T (Peters, Geuze et al. 1989; Blanchard, Lankar et al. 2002), les cellules dendritiques (Thery, Regnault et al. 1999; Thery, Boussac et al. 2001), les mastocytes (Raposo, Tenza et al. 1997; Skokos, Le Panse et al. 2001) et les cellules épithéliales de l'intestin (Karlsson, Lundin et al. 2001; van Niel, Raposo et al. 2001). Les exosomes issus de ces cellules possèdent à leur surface le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et de classe II (CMH-II) présentant l'antigène², suggérant un rôle potentiel de ces vésicules dans le processus de défense immunitaire. Dans ces cellules, le CMH-II est concentré dans le compartiment MIIC (compartiment de charge du peptide antigénique), qui après fusion avec la membrane plasmique libère des exosomes dans le milieu extracellulaire (Raposo, Nijman et al. 1996;

1 Endocytose : L'endocytose (du grec *endon* (dedans) et *kutos* (cellule)) est le mécanisme de transport de molécules voire de particules (virales, bactériennes, etc.) vers l'intérieur de la cellule. L'endocytose (ou internalisation) a lieu quand une partie de la membrane entoure complètement une particule ou une grosse molécule et la fait pénétrer de l'extérieur vers l'intérieur d'une cellule.

2 Le CMH-I est présent à la surface de toutes les cellules nucléées. Il présente le peptide antigénique issu de la dégradation par le protéasome de la protéine antigénique. L'association CMH-I/peptide a lieu dans le réticulum endoplasmique.

Le CMH-II n'est présent qu'à la surface des CPA (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages, cellules épithéliales de l'intestin...). Le peptide antigénique est un produit de dégradation ayant lieu durant l'endocytose, l'association avec le CMH-II se fait dans l'endosome tardif/MIIC.

Wubbolts, Fernandez-Borja et al. 1996). D'un point de vue quantitatif cependant, un travail réalisé par Graça Raposo a permis de montrer que (i) 90% du complexe était présenté en surface de la cellule et que (ii) dans le même temps, 10% du CMH-II était libéré associé à ces vésicules (Raposo, Nijman et al. 1996).

Des cellules cancéreuses issues de tumeurs sont également capables de sécréter des exosomes. Les cellules de mélanomes (Riteau, Faure et al. 2003) et d'adénocarcinome mammaire (Wolfers, Lozier et al. 2001) présentent des structures internes identiques aux EMVs, qui fusionnent et libèrent des vésicules d'un diamètre compris entre 60 et 90nm (Wolfers, Lozier et al. 2001). Ces exosomes contiennent des protéines retrouvées de manière conservée (*e.g.* tétraspanines) dans ces structures mais aussi des antigènes tumoraux portés par les molécules CMH-I (Wolfers, Lozier et al. 2001; Riteau, Faure et al. 2003).

Des vésicules de diamètre variable (entre 30 et 100nm), possédant les caractéristiques des exosomes, sont retrouvées dans le surnageant de culture d'autres types cellulaires comme les plaquettes sanguines (Heijnen, Debili et al. 1998) ou les cellules épithéliales de la prostate (Utleg, Yi et al. 2003).

Enfin, l'étude protéomique des exosomes de l'urine a permis de mettre en évidence la libération par les cellules du tubule rénal de l'aquaporine 2 (AQP2) associée à des exosomes (Pisitkun, Shen et al. 2004).

Les exosomes sont donc retrouvés dans différents fluides corporels (*e.g.* plasma, effusion pleurale, urine, lait) et proviennent de différents types cellulaires, n'ayant pas forcément les mêmes caractéristiques (Bard, Hegmans et al. 2004; Pisitkun, Shen et al. 2004; Caby, Lankar et al. 2005; Admyre, Johansson et al. 2007). Néanmoins, quel que soit le type cellulaire, de nombreuses études ont permis de converger sur un mécanisme de biogenèse commun, indépendant du type cellulaire dont sont issues ces vésicules.

B- Trafic endosomal et biogenèse des exosomes :

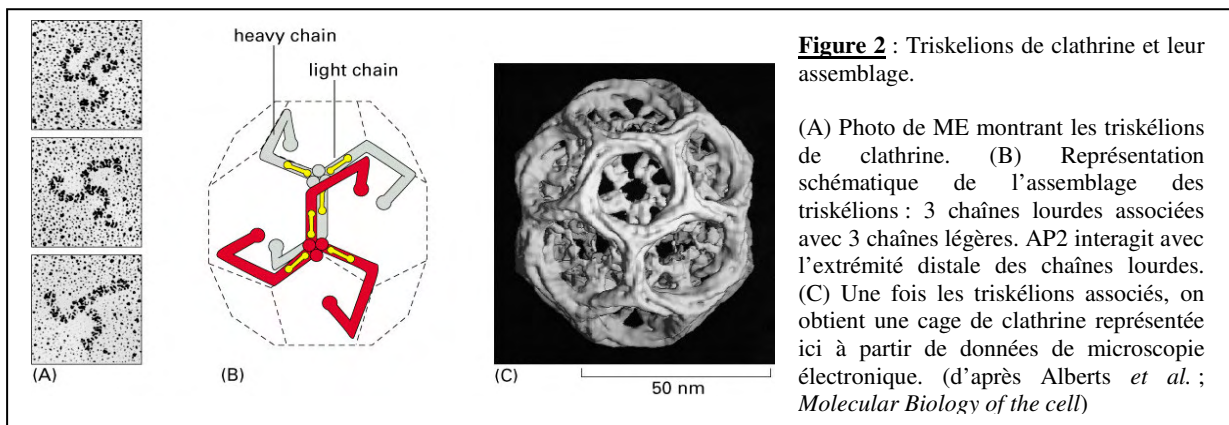
1- L'endocytose : de la membrane plasmique au compartiment endosomal :

L'entrée d'une protéine ou d'une particule dans une cellule eucaryote peut se faire selon deux voies distinctes, selon que le mécanisme d'internalisation repose ou non sur une protéine cytosolique : la clathrine. Ce mécanisme, appelé endocytose, concerne la plupart des récepteurs membranaires, et s'effectue par l'intermédiaire de vésicules formées par invagination de portions de la membrane plasmique.

a- Voie d'endocytose dépendante de la clathrine :

La première observation de l'internalisation de portions de la membrane plasmique remonte à 1964, avec les travaux de microscopie électronique de Roth et Porter. Ces derniers ont en effet observé des structures denses aux électrons ayant l'apparence de puits et de vésicules recouvertes (Roth and Porter 1964). Il faudra pourtant attendre la fin des années 70 pour connaître les bases moléculaires de ces structures, avec la découverte de la clathrine (Pearse 1975).

La clathrine est un hétérodimère composé d'une chaîne lourde de 180 kDa et d'une chaîne légère de 30 kDa. Dans le cytosol, cette protéine est associée en trimères de chaînes lourdes chacune associées à une chaîne légère, lui donnant l'aspect de trois bras reliés par un connecteur central en microscopie électronique et cette structure est appelée triskélion (Figure 2A) (Ungewickell and Branton 1981). L'association de plusieurs triskélions aboutit à une structure tridimensionnelle capable de former une cage autour des vésicules membranaires (Figure 2B-C) (Crowther and Pearse 1981) (Kirchhausen and Harrison 1981) (Kirchhausen 2000).



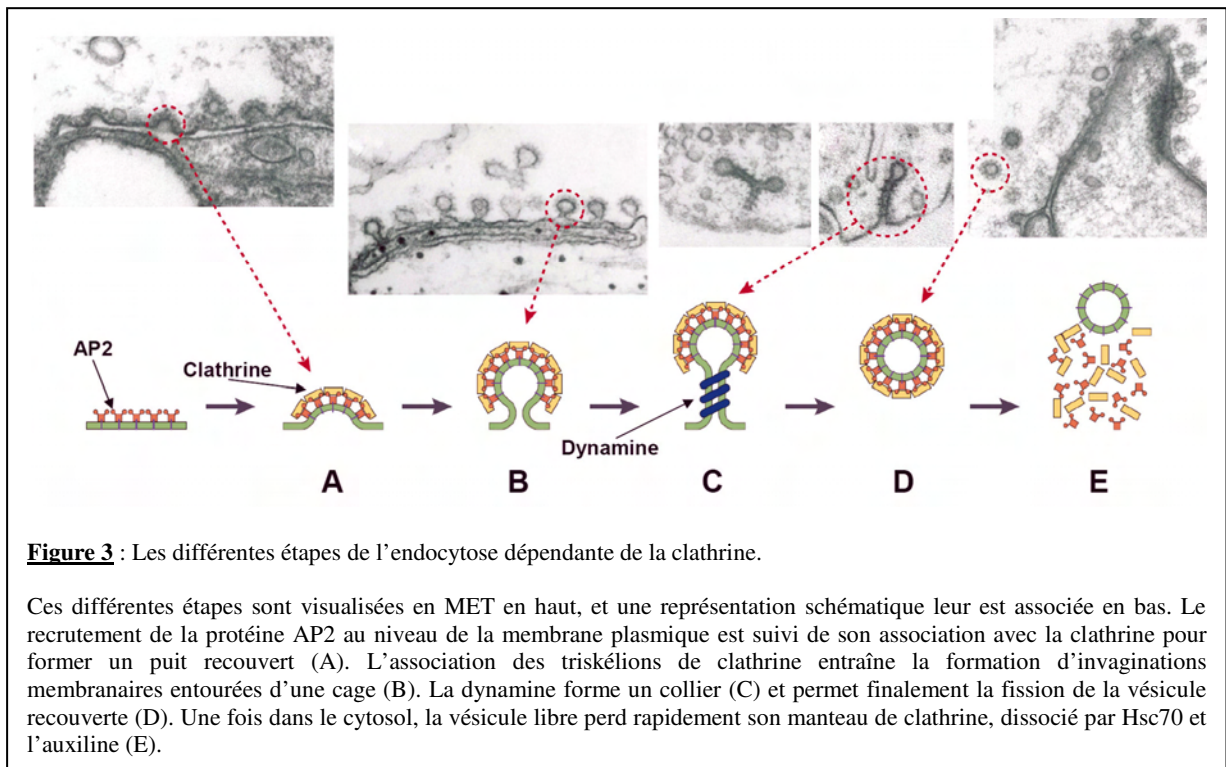
Cependant, la formation des cages de clathrine nécessite le recrutement d'autres protéines cytosoliques accessoires : les complexes hétérotétramériques AP (Adaptor Protein) (Pearse and Robinson 1984).

Quatre membres de cette famille de protéines AP sont connus, AP1 à AP4, mais seule AP2 est associée à la membrane plasmique et aux vésicules recouvertes de clathrine qui en dérivent (Robinson 1987; Ahle, Mann *et al.* 1988). AP2 est un hétérotétramère, dont la structure caractéristique dite en « tête de Mickey » (Heuser and Keen 1988) présente quatre sous-unités, et plus particulièrement une, la sous-unité μ 2, qui interagit avec les protéines transmembranaires destinées à l'endocytose par les puits recouverts de clathrine (Ohno, Stewart *et al.* 1995). Cette interaction est possible grâce à un motif peptidique spécifique sur

le domaine cytosolique de protéines cargos³. En effet, la sous-unité $\mu 2$ reconnaît deux principaux types de motifs : les signaux tyrosine $Yxx\phi$ et dileucine $(D/E)xxxLLI$ (où x représente n'importe quel acide aminé, ϕ un acide aminé hydrophobe volumineux, les autres acides aminés étant représentés par le code standard à une lettre) (Bonifacino and Traub 2003). AP2 permet de concentrer les cargos dans les puits recouverts et l'assemblage de la clathrine peut alors se poursuivre (Conner and Schmid 2003).

Après formation du manteau de clathrine, il y a invagination de la membrane plasmique, mais la fission de cette portion de membrane nécessite l'intervention d'une autre protéine : la dynamine (De Camilli, Takei et al. 1995). Cette GTPase d'environ 100kDa s'associe en multimères et forme un collier autour du col de membrane reliant la vésicule à la membrane plasmique (Takei, McPherson et al. 1995). L'hydrolyse du GTP induit un changement de conformation qui entraîne la séparation de la vésicule de la membrane plasmique, par constriction ou par étirement en recrutant d'autres partenaires (Hinshaw and Schmid 1995; Takei, McPherson et al. 1995). La vésicule est alors libérée dans le cytosol et perd son manteau de clathrine en moins d'une minute (Cremona 2001). Le désassemblage du manteau nécessite de l'énergie et fait intervenir la protéine chaperon ubiquitaire Hsc70 (Heat Shock Cognate 70kDa) impliquée généralement dans le contrôle du repliement des protéines (Schlossman, Schmid et al. 1984). L'activité ATPase d'Hsc70 est nécessaire au désassemblage de la clathrine, néanmoins elle n'est pas suffisante (Ungewickell, Ungewickell et al. 1997). C'est pourquoi, un cofacteur liant à la fois la clathrine et Hsc70, l'auxiline, est également nécessaire à la libération des molécules de clathrine en induisant l'hydrolyse de l'ATP (Ungewickell, Ungewickell et al. 1995; Holstein, Ungewickell et al. 1996). Une fois qu'Hsc70 est liée à l'ADP, elle adopte une conformation qui stabilise le complexe formé avec la clathrine (Prasad, Heuser et al. 1994). Ainsi, celle-ci est présente sous forme de triskélion unique dans le cytosol, devenant ainsi disponible pour la formation d'un nouveau puits recouvert (Jiang, Gao et al. 2000). L'endocytose *via* les puits recouverts met donc en jeu la protéine adaptatrice AP2, l'assemblage de la clathrine et d'autres protéines cytosoliques (*e.g.* la dynamine) afin de permettre la fission de la vésicule et le désassemblage des cages de clathrine (Figure 3). Une fois libérée de son manteau, la vésicule d'endocytose peut fusionner avec l'endosome précoce.

³ Une protéine cargo est une protéine transmembranaire (*e.g.* un récepteur transmembranaire) qui est transportée dans la cellule associée à une vésicule.



b- Voies d'endocytose indépendantes de la clathrine :

La mise en évidence de l'existence de voies d'internalisation différentes de l'endocytose dépendante de la clathrine a été appuyée par des travaux morphologiques et biochimiques. En effet, la présence d'invaginations membranaires et de vésicules lisses non recouvertes du manteau de clathrine avait été observée depuis longtemps sur des coupes de microscopie électronique, mais aucun ligand physiologique n'avait encore été identifié (Huet, Ash et al. 1980). De plus, lorsque l'assemblage de la clathrine est bloqué, l'entrée de marqueurs mesurant l'endocytose totale comme la Peroxydase de Raifort (HRP : Horse Radish Peroxydase) se trouve réduite de 50% ; ce qui suggère que l'endocytose dépendante de la clathrine n'est responsable que de la moitié des entrées de molécules par phase fluide dans la cellule (Lamaze and Schmid 1995). Enfin, l'utilisation de mutants de la dynamine a permis de montrer que l'endocytose en phase fluide est stimulée en réponse à l'inhibition de la voie dépendante de la clathrine (Damke, Baba et al. 1995).

Par la suite, l'utilisation de divers mutants de protéines impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine, notamment de protéines accessoires liant le complexe AP2 (Benmerah, Bayrou et al. 1999), a permis de déterminer si un récepteur, un lipide ou un ligand donné entre dans la cellule de façon dépendante ou indépendante de la clathrine, ou par les deux voies. Aujourd'hui, quatre voies majeures d'endocytose indépendantes de la clathrine ont pu être identifiées et caractérisées (figure 4).

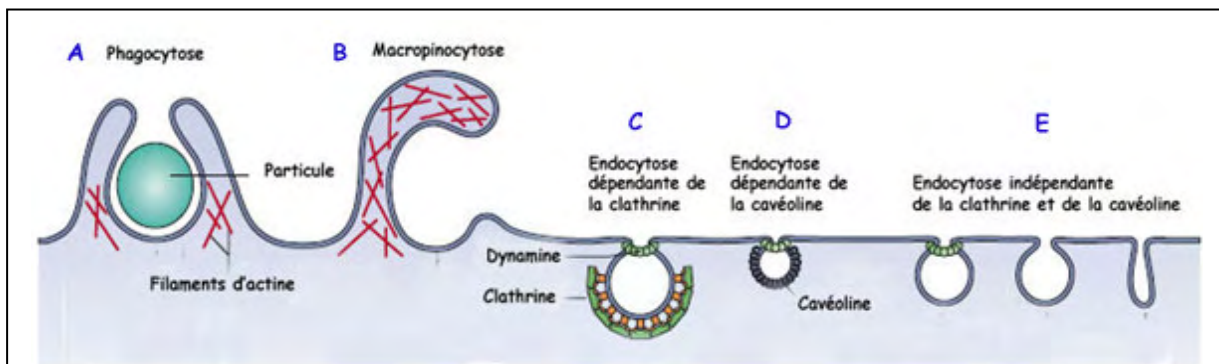


Figure 4 : Les différentes voies d'endocytose.

Les grosses particules sont internalisées par phagocytose (A) alors que la macropinocytose permet de capturer les molécules solubles (B). La voie d'endocytose dépendante de la clathrine (C). L'endocytose dépendante de la cavéoline (D) forme des vésicules riches en sphingolipides et cholestérol comme dans le cas de l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline (E). La dynamine est impliquée dans trois des voies d'endocytose (C, D, E). Modifié à partir de Mayor S. & Pagano R.E., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8(3) p.603-612, 2007

La phagocytose :

Ce mode particulier d'endocytose n'est présent que dans certains types de cellules spécialisées comme les macrophages (Rabinovitch 1995). Il représente un processus d'élimination de microorganismes et de cellules mortes en facilitant (i) leur internalisation et (ii) leur dégradation. Cette phagocytose sera détaillée lors d'un paragraphe consacré à la phagocytose des corps apoptotiques dans le troisième chapitre de cette introduction.

La macropinocytose :

La macropinocytose correspond à la formation de vésicules hétérogènes de grande taille (0,5 à 5µm) appelées macropinosomes. Ce processus dynamique, sous-tendu par le cytosquelette d'actine, est présent dans certaines lignées tumorales mais est le plus souvent induit par les facteurs de croissance ou les agents mitogènes et est contrôlé par la production de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate à la membrane (Honda, Nogami et al. 1999). La macropinocytose participe à la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques (Watts 1997) et à l'entrée de bactéries et de virus dans les macrophages (Watarai, Derre et al. 2001) (Marechal, Prevost et al. 2001).

Les cavéoles :

Leur forme caractéristique en oméga inversé a permis leur observation en microscopie électronique par G. Palade en 1953. Ces cavéoles sont nombreuses dans les cellules épithéliales (figure 5) et endothéliales, alors qu'elles sont absentes des lymphocytes (Fra,

Williamson et al. 1994). Du point de vue de la composition moléculaire, leur caractérisation a été facilitée par l'identification en 1992 de la cavéoline (Rothberg, Heuser et al. 1992), une protéine intégrale impliquée dans leur formation et qui se lie au cholestérol. Les cavéoles sont spécifiquement enrichies en cholestérol et en glycosphingolipides, ce qui leur confère les propriétés caractéristiques des rafts (détaillées dans le paragraphe suivant). Elles sont également enrichies en intermédiaires de voies de signalisation, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle important dans ces processus.

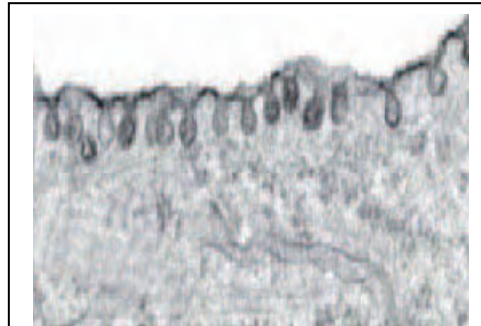


Figure 5 : Observation en MET de cavéoles d'adipocytes.

Tiré de Parton R. G., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**(3), p.185-194, 2007

Leur rôle dans l'endocytose est resté très controversé (Sandvig and van Deurs 1991), néanmoins certains travaux ont permis d'établir un certain consensus. Dans la plupart des cellules, à l'état basal, les cavéoles seraient des structures très peu dynamiques, qui ne sont pas endocytées de manière constitutive (Thomsen, Roepstorff et al. 2002). Cependant, la présence de dynamine et de protéines de la famille des SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) indique que ces domaines possèdent l'équipement protéique nécessaire pour se détacher de la membrane et fusionner avec les compartiments intracellulaires (Henley, Krueger et al. 1998). De fait, l'internalisation par les cavéoles peut être effective pour certains virus (*e.g.* SV40) (Pelkmans, Kartenbeck et al. 2001), pour des toxines bactériennes (*e.g.* toxine cholérique) (Orlandi and Fishman 1998) ou encore en réponse à l'agrégation de protéines glypiées⁴ (Kurzchalia and Parton 1999). On peut également noter que la cavéoline augmente l'endocytose de l'hormone de croissance (Lobie, Sadir et al. 1999), alors qu'elle bloque l'endocytose du facteur autocrine de mobilité AMF (Autocrine Mobility Factor) (Le, Guay et al. 2002). Il apparaît donc que le rôle des cavéoles dans l'endocytose indépendante de la clathrine est lié au type de molécule étudiée.

⁴ La glypiation est une modification post-traductionnelle, qui ajoute un groupement GPI (Glycosyl-Phosphatidylinositol) sur un acide aminé en Cterminal de la protéine. Du fait qu'elles ne sont ancrées dans la membrane que par des phospholipides, les protéines GPI possèdent une grande mobilité dans le plan de la membrane.

Les rafts :

L'hypothèse des rafts, ou microdomaines lipidiques, proposée en 1997 par K. Simons a fait reconsidérer le rôle des lipides dans les membranes biologiques (Simons and Ikonen 1997). La répartition de certains lipides dans le plan latéral des membranes crée des microdomaines particuliers permettant de concentrer sélectivement certaines protéines. La composition lipidique particulière des microdomaines les rend résistants à l'action de détergents non ioniques à 4°C (comme le Triton-X100) (London and Brown 2000), une propriété utilisée pour les isoler sur gradient de sucrose sous forme de DRM (Detergent-Resistant Membranes) (Simons and Ikonen 1997). Ces rafts sont enrichis en cholestérol, glycosphingolipides et sphingomyéline, tout comme les cavéoles qui constituent une variété de microdomaines. Plusieurs études ont démontré l'existence des microdomaines à la surface des cellules intactes (Brown and London 2000). Les protéines concentrées dans ces rafts présentent alors les propriétés caractéristiques des DRM et sont résistantes à l'action du Triton X-100 à 4°C. A l'image des cavéoles, les microdomaines sont enrichis en molécules de signalisation et en protéines glypiées (Simons and Toomre 2000). C'est l'étude de l'endocytose de protéines ancrées par un GPI qui a suggéré que les microdomaines seraient impliqués dans leur internalisation. Depuis, les microdomaines ont été impliqués dans des phénomènes d'endocytose plus conventionnels, notamment l'internalisation du récepteur de l'interleukine-2. Ce récepteur, associé de façon constitutive aux rafts de la membrane plasmique, n'est en effet ni endocyté par les puits recouverts de clathrine, ni par les cavéoles, mais il est pourtant présent dans les endosomes précoces (Lamaze, Dujeancourt et al. 2001). L'endocytose du récepteur de l'interleukine-2 dépend de la dynamine, une propriété partagée avec les cavéoles. Il a également été montré que le ganglioside GM1, récepteur lipidique de la toxine du choléra, est concentré dans les microdomaines où il subit une internalisation de manière fortement dépendante des rafts (Orlandi and Fishman 1998; Wolf, Fujinaga et al. 2002). Après liaison à son récepteur et internalisation, la toxine du cholera est observée en microscopie électronique dans un endosome précoce contenant également des couples récepteur-ligand endocytés par la voie dépendante de la clathrine (Montesano, Roth et al. 1982; Tran, Carpentier et al. 1987). On peut donc en conclure que ces deux voies d'endocytose peuvent converger vers le même endosome précoce. Les microdomaines de la membrane plasmique présentent donc des caractéristiques leur permettant d'assurer l'endocytose efficace de lipides et de récepteurs, indépendamment de la clathrine et des cavéoles. Il n'existe pas d'inhibiteurs sélectifs de l'endocytose par les microdomaines. En effet, si les substances qui interfèrent avec le cholestérol membranaire (*e.g.* la méthyl- β -

cyclodextrine) empêchent la concentration des protéines dans les rafts ; elles déstabilisent également la formation des puits recouverts de clathrine (Rodal, Skretting et al. 1999).

2- Les différents types d'endosomes :

Après leur endocytose, les protéines et les lipides internalisés rejoignent la voie endosomale. Il existe deux grandes classes d'endosomes au sein de la cellule : (i) les endosomes précoces, qui comprennent les endosomes de recyclage et les endosomes de tri et (ii) les endosomes tardifs. Un troisième compartiment peut également être ajouté, du fait de son importance dans la voie endosomale : le lysosome, siège de la dégradation des protéines. Différents marqueurs protéiques ont été identifiés, permettant ainsi une discrimination relativement précise entre les différents types d'endosomes et les lysosomes. Les membres de la famille des GTPases Rab représentent les marqueurs les plus utilisés. En effet, alors que Rab4, Rab5 et Rab11 sont généralement associés aux endosomes précoces (Bucci, Parton et al. 1992; van der Sluijs, Hull et al. 1992; Daro, van der Sluijs et al. 1996; Ullrich, Reinsch et al. 1996), Rab7 et Rab9 sont associés aux endosomes tardifs (Lombardi, Soldati et al. 1993; Papini, Satin et al. 1997). Ces petites GTPases régulent le transport vésiculaire dans les voies d'endo/exocytose, en contrôlant entre autres l'attachement et la fusion des vésicules membranaires. Par exemple, Rab5 et EEA1 (Early Endosome Antigen 1, une protéine de liaison aux phosphoinositides) régulent la fusion entre les vésicules endocytées et l'endosome précoce (Mills, Jones et al. 1999). Les lysosomes, quant à eux, sont enrichis en glycoprotéines spécifiques (*e.g.* lamp : lysosomal-associated membrane protein), absentes de la membrane plasmique et des endosomes précoces (Eskelinen 2006).

a- Endosomes précoces :

Endosome de tri :

Une fois endocytés, les récepteurs associés à leur ligand rejoignent le premier compartiment de la voie endosomale : l'endosome de tri. L'acidité (pH voisin de 6) de la lumière de ce compartiment permet la dissociation des couples récepteur-ligand (Johnson, Dunn et al. 1993). A ce moment là, certains récepteurs sont rapidement triés pour être transportés le long de la voie de recyclage, tandis que les ligands et les récepteurs non recyclés partent vers la voie de dégradation. L'endosome de tri est donc le premier point de routage de la voie endosomale, et comme son nom l'indique, dirige les molécules internalisées vers l'une des trois destinations possibles : (i) la membrane plasmique, (ii) l'endosome de recyclage ou (iii) l'endosome tardif.

La structure particulière de ce compartiment est en relation avec sa fonction. En effet, il se compose d'une région centrale d'aspect vésiculaire à partir de laquelle se développe un réseau de fins tubules d'environ 60 nm de diamètre (Gruenberg and Maxfield 1995). Ce réseau tubulaire peut être apparenté à l'endosome de recyclage, qui lui se constitue uniquement de longs tubules membranaires. La région vésiculaire quant à elle se spécialise plutôt dans le tri vers la voie de l'endosome tardif. De telles différences morphologiques au sein d'un même compartiment, mais également entre les différents endosomes (*i.e.* de recyclage et tardif), pourraient mettre en jeu une machinerie moléculaire permettant le partage de protéines et de lipides dont la structure influencerait la géométrie membranaire dans des régions bien précises. De plus, le ratio « surface membranaire/volume » de la région tubulaire est supérieur à celui de la région vésiculaire. Une protéine internalisée, dépourvue de signaux de tri spécifiques, suivra donc le flux membranaire et sera concentrée au niveau des tubules. Par conséquent, elle sera de manière dynamique préférentiellement dirigée vers la voie de recyclage à la membrane plasmique (Maxfield and McGraw 2004). Aucun signal de tri spécifique de la voie de recyclage n'a pu être mis en évidence jusqu'à présent sur le domaine cytosolique des récepteurs internalisés dans l'endosome de tri. Ce processus de recyclage pourrait donc être suivi par défaut par des protéines transmembranaires ne possédant pas de signaux qui les dirigeraient vers les endosomes tardifs et la dégradation (Gruenberg and Maxfield 1995). *A contrario*, les récepteurs possédant des motifs spécifiques sur leur domaine cytoplasmique, seront dégradés suite à leur adressage dans la portion vésiculaire de l'endosome de tri et leur envoi vers la voie de dégradation.

Endosome de recyclage :

Certains récepteurs sont réutilisés par la cellule après internalisation, dissociation de leur ligand et recyclage vers la membrane plasmique. Deux voies de recyclage sont possibles : soit directement, de l'endosome de tri vers la membrane (Mayor, Presley et al. 1993) ; soit indirectement, via l'endosome de recyclage. Comme discuté précédemment, la structure de l'endosome de recyclage est tubulaire et ce compartiment se localise généralement à proximité des centrioles (Maxfield and McGraw 2004). Le pH dans sa lumière est également moins acide que celui de l'endosome de tri (voisin de 6,4) (Mellman, Fuchs et al. 1986). Le transport des récepteurs dans cette voie de recyclage est sous dépendance directe de l'actine et des myosines de type I et de type V (Soldati and Schliwa 2006).

b- Endosomes tardifs :

D'apparence plus sphérique que l'endosome de tri en microscopie électronique, ce compartiment pré-lysosomal est enrichi en protéines membranaires issues de l'endosome de tri et destinées à la dégradation d'une part, mais également en protéines issues de la voie de néosynthèse. Situé à proximité du noyau, ce compartiment se différencie des endosomes précoces par un pH plus acide (entre 5 et 6), sa composition protéique différente et sa morphologie. Son enrichissement en récepteur du mannose-6-phosphate le différencie également des lysosomes (Maxfield and McGraw 2004). De nombreuses membranes internes sont présentes dans ce compartiment. Elles apparaissent comme des petites vésicules internes d'un diamètre de 40 à 60 nm, ou comme des réseaux multilamellaires. Suivant l'apparence des membranes internes, le compartiment tardif est appelé endosome multivésiculaire (dans le cas de vésicules internes) ou endosome multilamellaire (dans le cas des réseaux multilamellaires) (Piper and Luzio 2001).

Dans la cellule, les compartiments multivésiculaires peuvent fusionner entre eux (Antonin, Holroyd et al. 2000) ou avec les lysosomes (Luzio, Rous et al. 2000; Pryor, Mullock et al. 2000), entraînant finalement la dégradation de la totalité de leur contenu. Des molécules internalisées dans l'endosome de tri et ne devant pas être recyclées à la membrane plasmique seront donc triées pour se concentrer dans les vésicules internes de l'endosome multivésiculaire, alors que d'autres molécules impliquées dans la fonction et la structure de ce compartiment restent au niveau de la membrane limitante.

L'endosome tardif peut enfin représenter une plateforme de tri dans la voie endosomale. En effet, certaines molécules rejoignent l'endosome tardif directement après leur synthèse. C'est le cas du CMH de classe II, qui est accumulé dans les vésicules internes de l'endosome multivésiculaire ; mais qui est efficacement transporté vers la membrane plasmique lors de la maturation des cellules dendritiques, afin d'assurer sa fonction de présentation de l'antigène (Kleijmeer, Ramm et al. 2001).

c- Lysosomes :

L'endosome tardif peut fusionner avec le compartiment lysosomal et former ainsi un compartiment hybride dans lequel les vésicules internes sont lysées sous l'action des enzymes lysosomales, hydrolases actives à pH acide (Mullock, Bright et al. 1998; Pryor, Mullock et al. 2000).

C'est donc au sein de ces organites que les protéines et les lipides membranaires sont dégradés. Les lysosomes ont un diamètre de 500nm environ (Luzio, Rous et al. 2000). La

membrane limitante de ce compartiment est riche en glycoprotéines de la famille lamp (lysosomal-associated membrane protein) (Eskelinen 2006). Les contenus des vésicules d'autophagie et de phagocytose sont également dégradés dans ce compartiment (Lawrence and Brown 1992; Funato, Beron et al. 1997).

3- L'endosome multivésiculaire (EMV) :

a- L'EMV, un peu d'histoire...

Il y a environ cinquante ans, lors des premières expériences de microscopie électronique, deux équipes ont mis en évidence des structures intracellulaires riches en vésicules (Palade 1955; Sotelo and Porter 1959). Néanmoins, à cette époque, ces données morphologiques ne furent pas complétées par des données fonctionnelles et ces structures furent finalement appelées « corps multivésiculaires », les vésicules internes prenant quant à elles le nom d'ILV (IntraLumenal Vesicles). Un peu plus tard, à la fin des années 60, l'observation d'une invagination de la membrane limitante de ces corps suggéra que ces structures pouvaient représenter une forme d'autophagie (Hirsch, Fedorko et al. 1968). Et finalement, l'étude du suivi de protéines internalisées permit de définir les corps multivésiculaires comme faisant partie de la voie d'endocytose, et les ILV comme éléments de la voie de dégradation de protéines, telles que le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Gorden, Carpentier et al. 1978; Felder, Miller et al. 1990; van Deurs, Holm et al. 1993).

Aujourd'hui, ces endosomes multivésiculaires (EMV) possèdent plusieurs fonctions au sein de la voie d'endocytose et peuvent montrer une morphologie et une composition moléculaire différente. Néanmoins, les EMVs contiennent des marqueurs de l'endocytose (tels que les protéines des familles Rab et LAMP), ce qui les distingue d'autres organites avec des membranes internes comme les corps d'autophagie ou les lysosomes multilamellaires.

b- Les signaux de tri vers les EMVs :

Les protéines membranaires internalisées et les lipides recyclent par défaut à la surface cellulaire. Comme je l'ai décrit précédemment, il s'agit de la voie d'endocytose/recyclage. Le transport des protéines vers l'EMV doit nécessairement s'accompagner de signaux positifs : les signaux de tri vers l'EMV. Deux types majeurs de signaux de tri vers l'EMV ont été mis en évidence, selon qu'ils dépendent ou non de l'ubiquitine.

L'ubiquitine comme signal de tri vers les EMVs :

Le rôle de l'ubiquitine dans le tri a d'abord été décrit dans un organisme unicellulaire : la levure *Saccharomyces cerevisiae* à partir de plusieurs études montrant une corrélation entre

la dégradation vacuolaire d'un certain nombre de protéines transmembranaires et leur ubiquitinylation (Hicke and Dunn 2003). Il a par la suite été montré que l'ubiquitine pouvait être un signal suffisant, entraînant systématiquement une dégradation de la protéine la portant (Reggiori and Pelham 2001). Depuis, beaucoup d'études à la fois chez la levure et chez les cellules animales ont confirmé un rôle universel de l'ubiquitine dans le tri des protéines transmembranaires vers les EMVs. En effet, l'analyse du trafic intracellulaire des récepteurs hormonaux tels que le récepteur à l'EGF, l'EGF-R, a montré que cette protéine pouvait être ubiquitinylée sur son domaine cytosolique, grâce à une ubiquitine-ligase appelée C-Cbl (Levkowitz, Waterman et al. 1998). Contrairement à d'autres fonctions dépendantes de l'ubiquitine, qui nécessitent l'ajout de plusieurs molécules (*i.e.* la voie de dégradation par le protéasome), ce mécanisme nécessite l'ajout d'une seule molécule d'ubiquitine à la protéine concernée (Dupre, Volland et al. 2001; Hicke and Dunn 2003). Cette ubiquitine est reconnue par plusieurs protéines endosomales, formant les complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport), qui, comme nous le verrons plus tard, agissent comme des récepteurs responsables de la liaison et du tri de la protéine vers les ILVs.

D'un point de vue structural, l'ubiquitine est composée de cinq feuillets β (la face avant de la protéine) et d'une hélice α (la face arrière de la protéine). Toutes les protéines endosomales de liaison à l'ubiquitine reconnaissent la face avant de la protéine, et plus particulièrement un domaine hydrophobe (Hurley, Lee et al. 2006).

Cette ubiquitine n'est que transitoirement associée à la protéine triée. En effet, l'ubiquitine est clivée juste avant l'incorporation de la protéine dans l'ILV. Il existe des enzymes chargées de ce mécanisme, appelées « enzymes de dé-ubiquitinylation », telle que Doa4/Ubp4 chez la levure (Amerik, Nowak et al. 2000).

Signaux de tri indépendants de l'ubiquitine :

Le tri des protéines transmembranaires peut s'effectuer également de manière indépendante de l'ubiquitine, et plusieurs travaux allant dans ce sens ont émergé ces dernières années. Chez la levure par exemple, Sna3, une petite protéine comportant deux domaines transmembranaires, utilise deux voies distinctes de tri. En effet, alors que Sna3 peut être ubiquitinylée, des formes non-ubiquitinylées de la protéine continuent d'être triées vers la vacuole en utilisant les mêmes complexes ESCRT. Les signaux de tri pour Sna3 incluent une séquence en Nterminal contenant une tyrosine, et un motif PPAY, qui interagit avec l'ubiquitine ligase Rsp5 (McNatt, McKittrick et al. 2007; Oestreich, Aboian et al. 2007). L'interaction entre Rsp5 et Sna3 est nécessaire pour le tri de la protéine vers l'EMV, même en

l'absence d'ubiquitylation. Rsp5 ajoute une molécule d'ubiquitine sur un certain nombre de cargos triés vers les EMVs, mais les envoie également partiellement vers les endosomes, et interagit avec certaines molécules de la machinerie de tri. Ainsi, l'interaction avec Rsp5 pourrait servir de signal de tri, en faisant un pont entre Sna3 et la machinerie ESCRT. Néanmoins, l'activité enzymatique de Rsp5 est requise pour le tri des formes non ubiquitylées de Sna3, ce qui suggère un niveau de régulation supplémentaire par cette ligase.

Un deuxième exemple intéressant concerne le tri du récepteur de la transferrine vers les EMVs lors de la maturation du réticulocyte. En effet, lors de travaux effectués lors de mon stage de DEA, nous n'avons jamais pu montrer de forme ubiquitylée de ce récepteur. Néanmoins, nous avons pu montrer que son tri vers les EMV était dû à un motif tyrosine (YTRF), normalement reconnu par le complexe adaptateur AP2 lors de l'endocytose du RTf. Lors de la maturation du réticulocyte, AP2 est dégradé par le protéasome, ce qui permet la liaison de la protéine Alix au niveau du motif tyrosine. Alix peut à son tour interagir avec des protéines de la machinerie ESCRT et ainsi diriger le RTf vers les EMVs (Article en annexe). Ces deux exemples montrent que l'ubiquitine n'est pas le seul signal de tri vers les EMVs mais que par contre, ces signaux sont reconnus par la même machinerie (protéique et lipidique) nécessaire à la formation de cette structure endosomale particulière.

c- Le rôle des lipides dans le tri vers l'EMV :

La formation de sous domaines lipidiques particuliers et le tri différentiel des lipides jouent un rôle majeur dans la biogenèse de l'EMV. Je vais plus particulièrement m'intéresser à quatre types de lipides : (i) le phosphatidylinositol 3 phosphate (PI(3)P) et son dérivé le phosphatidylinositol 3,5 biphosphate (PI(3,5)P₂), (ii) le cholestérol et (iii) le lyso-bisphosphatidic acid (LBPA) qui semblent chacun jouer un rôle dans l'organisation en sous domaine, la formation des vésicules et la dégradation des ILV.

Le phosphatidylinositol 3 phosphate (PI(3)P) et le phosphatidylinositol 3,5 biphosphate (PI(3,5)P₂) :

Le PI(3)P est enrichi au niveau de la face cytosolique des endosomes précoces, où il recrute plusieurs protéines contenant des motifs FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) ou des domaines PX (phox homology) créant des sous domaines spéciaux des endosomes. La protéine Hrs (Hepatocyte growth factor Regulated tyrosine kinase Substrate) est un exemple d'effecteur recruté par son domaine FYVE sur le PI(3)P à la membrane endosomale (Raiborg, Bremnes et al. 2001). Une fois associée à la membrane endosomale par son interaction avec le

PI(3)P, Hrs (ou Vps27 chez la levure) peut recruter la clathrine et les protéines ubiquitinylées dans des domaines spécifiques (Clague 2002). Plusieurs protéines clés composant la machinerie de tri de l'EMV lient le PI(3)P, et la présence de ce lipide et de domaines de liaisons au PI(3)P au niveau de la machinerie de tri sont critiques pour la formation de l'EMV (Piper, Cooper et al. 1995; Odorizzi, Babst et al. 1998; Futter, Collinson et al. 2001; Teo, Gill et al. 2006). La quasi-totalité du PI(3)P endosomal chez la levure ou chez les mammifères est retrouvée au sein de la lumière endosomale associée aux ILVs, ce qui renforce l'observation que la quantité de PI(3)P est élevée chez des mutants de la levure dans lesquelles les hydrolases vacuolaires sont inactivées (Wurmser and Emr 1998; Gillooly, Morrow et al. 2000). Le PI(3)P est également le précurseur du phosphatidylinositol 3,5-biphosphate (PI(3,5)P₂), généré par l'action de la protéine kinase PIKfyve. Le PI(3,5)P₂ est essentiel pour le recyclage de la membrane à partir du compartiment vacuolaire ou lysosomal (Ikonomov, Sbrissa et al. 2001; Dove, McEwen et al. 2002), pour l'emballage des protéines dans les endosomes multivésiculaires de façon dépendante de l'ubiquitine (Odorizzi, Babst et al. 1998; Dove, McEwen et al. 2002) et pour l'acidification de la vacuole (Bonangelino, Catlett et al. 1997). Un des effecteurs du PI(3,5)P₂ est par exemple la protéine Vps24, au niveau du complexe ESCRT-III (Whitley, Reaves et al. 2003).

Le cholestérol :

Ce lipide est également impliqué dans la biogenèse des EMVs de par son enrichissement dans ces structures (Hornick, Hamilton et al. 1985). L'analyse des exosomes a permis de montrer que la plupart du cholestérol des EMVs se trouve dans les ILVs (Mobius, van Donselaar et al. 2003; Wubbolts, Leckie et al. 2003). Le blocage de la formation de l'EMV par un dominant négatif de Vps4 (une ATPase de type AAA : ATPase Associated with diverse cellular Activities) met en évidence l'accumulation d'endosomes aberrants riches en cholestérol (Bishop and Woodman 2000; Yang, Coppens et al. 2004). Le cholestérol peut faciliter le tri dans les EMVs et la formation des ILVs en créant localement, à la surface de l'endosome, des domaines et un environnement favorable au regroupement de certaines protéines (*e.g.* les tétraspanines) (Charrin, Manie et al. 2003; Silvie, Charrin et al. 2006) et à l'invagination de la membrane (Wang, Yang et al. 2007).

Le lyso-bisphosphatidic acid (LBPA) :

Enrichi dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Kobayashi, Stang et al. 1998), ce lipide non conventionnel des cellules de mammifères n'est pourtant pas détecté dans les compartiments endosomaux précoces, là où la formation des ILV est très active. De plus, les

membranes intraluminales contenant le LBPA sont distinctes de celles contenant le PI(3)P (Gillooly, Morrow et al. 2000; Kobayashi, Beuchat et al. 2002) et sont exemptes de récepteurs destinés à la dégradation lysosomale (*e.g.* le récepteur à l'EGF) (White, Bailey et al. 2006) et de MHC de classe II dans le compartiment MIIC (Mobius, van Donselaar et al. 2003). Le LBPA n'a pas non plus été trouvé dans les EMVs ou les vacuoles chez la levure qui par contre accumulent des ILVs enrichis en PI(3)P et PI(3,5)P₂. Enfin, des ILV contenant du LBPA peuvent se former en l'absence de PI(3)P, ce qui suggère que ce procédé est indépendant de certaines protéines de la machinerie qui contrôle les ILV enrichis en PI(3)P/cholestérol utilisés pour la dégradation des protéines (Matsuo, Chevallier et al. 2004; White, Bailey et al. 2006).

Des études *in vitro* sur des liposomes contenant du LBPA ont montré que ces derniers bourgeonnent spontanément et forment des petites vésicules dans leur lumière de manière dépendante du pH, ce qui suggère que le LBPA peut aider à la formation de structures multi-vésiculaires (Matsuo, Chevallier et al. 2004). Une protéine pouvant contrôler la formation de ces vésicules enrichies en LBPA est Alix. En effet, Alix lie le LBPA dans les endosomes tardifs (Matsuo, Chevallier et al. 2004).

L'impact des lipides sur le tri des protéines vers les EMV se trouve donc à plusieurs niveaux : le recrutement des protéines effectrices, la formation des ILV et la sensibilité relative des ILV face aux hydrolases lysosomales. De plus, le tri vers les EMV touche le métabolisme du PI(3)P, du cholestérol et d'autres lipides, ce qui met en avant l'importance de cette voie dans un contexte de dynamique cellulaire.

d- La machinerie ESCRT dans la biogenèse de l'EMV :

La machinerie ESCRT est composée de quatre complexes protéiques qui sont recrutés au niveau des endosomes grâce à des interactions protéiques et lipidiques. ESCRT-0, -II et -III interagissent avec les phosphoinositides-3, enrichis dans les endosomes. Alors que des études de fractionnement cellulaires ont permis de montrer que la majorité des protéines constituant ces complexes sont cytosoliques et sont recrutées au niveau des endosomes, des études ultrastructurales quantitatives sur des lymphocytes T et des macrophages indiquent que, au moins pour ces cellules, la majorité (80%) des protéines d'ESCRT-0 et -I sont associées aux membranes, avec une abondance (45%) au niveau des structures tubulo-vésiculaires (Welsch, Habermann et al. 2006).

ESCRT-0, -I et -II possèdent des modules d'interaction avec l'ubiquitine. Curieusement, alors que l'épitope ubiquitine reconnu est similaire, il n'existe pas deux

complexes ESCRT similaires en termes de module permettant l'interaction avec l'ubiquitine. A l'inverse, ESCRT-III ne contient pas de module d'interaction avec l'ubiquitine, mais recrute des enzymes de déubiquitinylation pour cliver l'ubiquitine des cargos, avant leur incorporation dans les ILVs (Amerik, Nowak et al. 2000), et recrute également la machinerie nécessaire au désassemblage des complexes ESCRT de la membrane endosomale (Babst, Wendland et al. 1998).

Je vais à présent présenter brièvement ces quatre complexes, dans l'ordre chronologique d'assemblage au niveau de la membrane endosomale.

ESCRT-0 :

Hrs (Hepatocyte growth factor Regulated tyrosine kinase Substrate, ou Vps 27 chez la levure) et STAM (Signal Transducing Adaptor Molecule ou Hse1 chez la levure) composent le complexe ESCRT-0, qui est essentiel pour la sélection initiale des cargos ubiquitinylés au niveau de la membrane endosomale. ESCRT-0 s'associe aux endosomes au travers de l'interaction du domaine FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 Early endosome antigen 1) de Hrs avec le PI(3)P (Raiborg, Bremnes et al. 2001). Ce complexe recrute alors la clathrine et séquestre le cargo ubiquitinylé dans des microdomaines couverts de clathrine (Clague 2002). Hrs joue également un rôle important dans le recrutement des ESCRT en aval, en interagissant directement avec les composants du complexe ESCRT-I notamment la protéine Tsg101 (Tumor suppressor gene 101) (Clague and Urbe 2003).

ESCRT-I :

Le complexe ESCRT-I de la levure *S.cerevisiae* a été caractérisé comme étant un complexe hétérotrimérique composé de Vps23, Vps28 et Vps37 (Katzmann, Babst et al. 2001). Plus récemment, plusieurs groupes ont identifié Mvb12 comme étant une sous-unité supplémentaire d'ESCRT-I et qui interagit avec le complexe hétérotrimérique (Oestreich, Davies et al. 2007). Chez l'homme, le complexe ESCRT-I est composé des protéines Tsg101, Vps28 et d'un des quatre isotypes de Vps37 (Vps37 A-D) (Bishop and Woodman 2001; Eastman, Martin-Serrano et al. 2005). L'homologue humain de Mvb12 n'est pour l'instant pas connu.

ESCRT-I lie l'ubiquitine par l'intermédiaire du domaine UEV (Ubiquitin E2 Variant) en N terminal de Vps23 (Tsg101). Il existe deux régions adjacentes du domaine UEV qui interagissent avec l'ubiquitine liée (Sundquist, Schubert et al. 2004; Teo, Veprintsev et al. 2004), et ces régions coopèrent pour augmenter l'efficacité du tri du cargo ubiquitinylé (Bilodeau, Winistorfer et al. 2003).

Chez la levure, il existe un lien entre ESCRT-I et -II, matérialisé par le domaine C terminal de Vps28 (ESCRT-I), qui lie la protéine Vps36 (ESCRT-II) au niveau d'un domaine en doigt de zinc (Teo, Gill et al. 2006; Gill, Teo et al. 2007). Par contre, l'analogue mammalien de Vps36 ne possédant pas de domaine en doigt de zinc et aucun lien n'a pour l'instant été mis évidence entre ESCRT-I et -II, même si des études de double hybride ont montré une interaction entre (i) Tsg101 et Vps22 et (ii) Tsg101 et Vps36 (Langelier, von Schwedler et al. 2006).

ESCRT-II :

ESCRT-II est composé de Vps22, Vps25 et Vps36. Le cœur de ce complexe est un hétérotétramère contenant une copie de Vps22, une de Vps36 et deux copies de Vps25 (Hierro, Sun et al. 2004; Teo, Perisic et al. 2004). Le domaine Cterminal de Vps25 permet un lien direct du complexe ESCRT-II avec ESCRT-III en interagissant avec Vps20, à la fois chez la levure et chez les mammifères (Teo, Perisic et al. 2004; Yorikawa, Shibata et al. 2005; Langelier, von Schwedler et al. 2006). La protéine Alix, évoquée précédemment, est une des protéines accessoires de ce complexe.

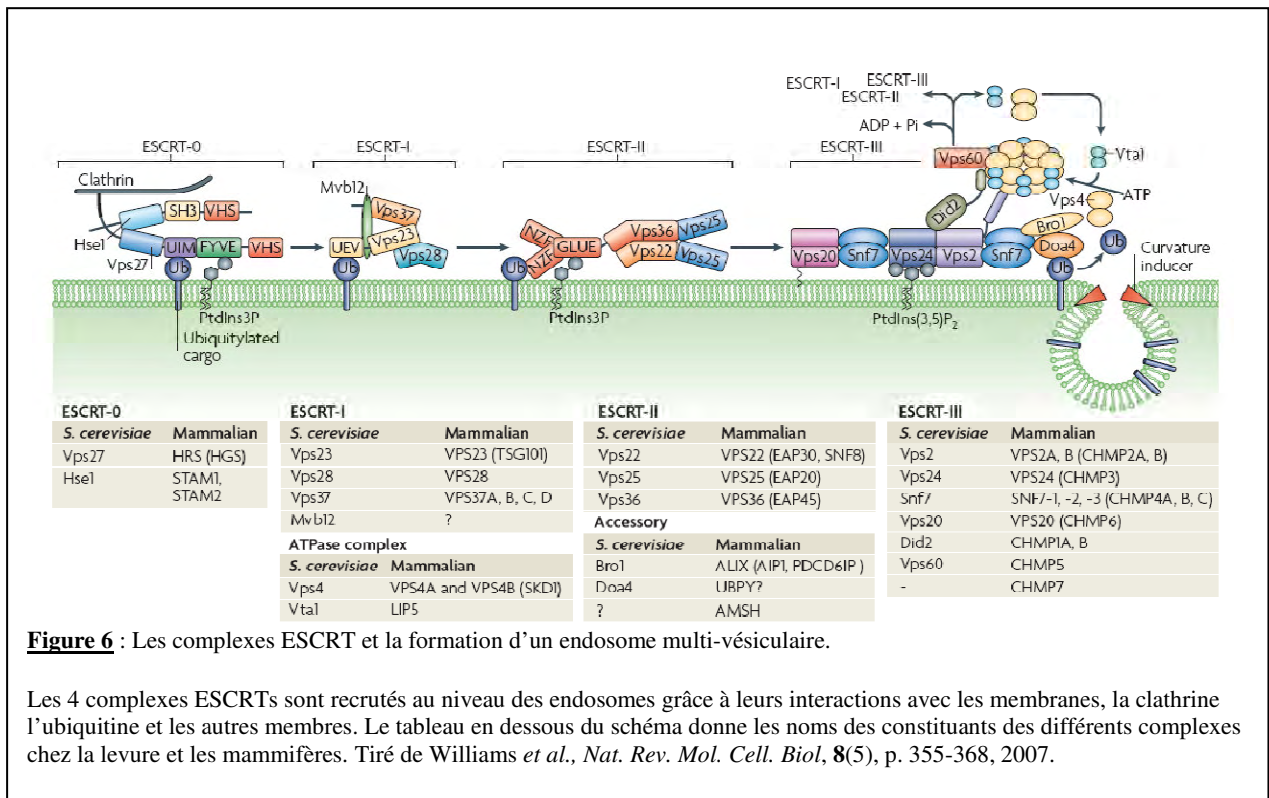
Chez la levure, ESCRT-II s'associe transitoirement avec les endosomes et facilite le recrutement d'ESCRT-III au niveau de la membrane endosomale (Babst, Katzmann et al. 2002).

ESCRT-III :

Ce dernier complexe de la machinerie ESCRT est composé des protéines Vps2, Vps24, Snf7 et Vps20 chez la levure (Babst, Katzmann et al. 2002). Ces protéines semblent former deux sous complexes au sein d'ESCRT-III.

Après association d'ESCRT-III, l'enzyme Doa4 débiquitinylye les cargos qui se regroupent dans les invaginations membranaires formant les vésicules (Amerik, Nowak et al. 2000). Parallèlement, la protéine Vps4 (une ATPase de type AAA : ATPase Associated with diverse cellular Activities) s'associe à ESCRT-III pour désassembler les complexes et permettre le recyclage de leurs composants vers le cytoplasme où ils pourront être à nouveau utilisés (Babst, Wendland et al. 1998).

La figure 6 présentée ci-dessous permet de résumer le rôle de ces complexes et leur association lors de la biogenèse des EMV.



e- Virus et EMV :

La machinerie ESCRT et son implication dans le tri des protéines vers l'EMV sont au cœur d'un nombre important de travaux. D'un point de vue topologique, si le bourgeonnement interne de la membrane endosomale est inverse par rapport à celui observé lors de l'endocytose, il est par contre similaire au bourgeonnement des virus à ARN enveloppés, tels que le virus Ebola ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Garrus, von Schwedler et al. 2001). Ce type de virus ne possède pas de machinerie de bourgeonnement et doit donc nécessairement détourner un mécanisme cellulaire pour accomplir ce processus. Dans cette optique, des études ont permis de montrer que ces virus peuvent détourner à leur avantage la machinerie de bourgeonnement dans les EMVs.

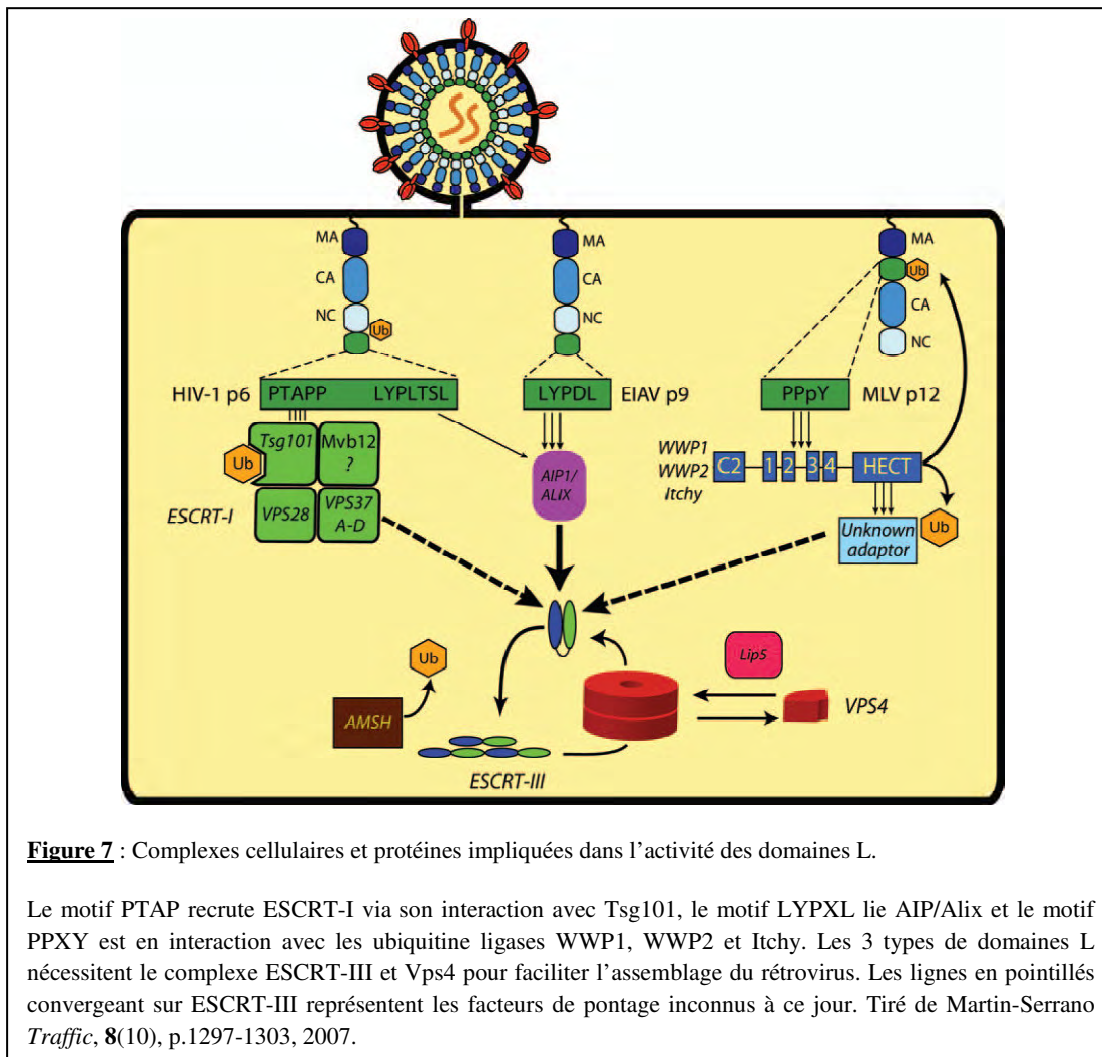
Ces études se sont focalisées sur la protéine Gag ; protéine de structure virale associée à la membrane et qui est suffisante pour l'assemblage et le bourgeonnement du virus (Gottlinger 2001). Plus particulièrement, Gag possède un « domaine L » dans lequel on trouve deux motifs, P(S/T)AP et PPXY, essentiels au bourgeonnement viral. Il a été montré que ces deux motifs interagissent avec des composants de la machinerie ESCRT. En effet, dans le cas de la protéine Gag du VIH, le motif PTAP est reconnu par Tsg101 (membre du complexe ESCRT-I). Cette reconnaissance est essentielle pour le bourgeonnement du virus, puisque le virus est incapable de bourgeonner à la membrane plasmique de lymphocytes infectés dépourvus de Tsg101 (Garrus, von Schwedler et al. 2001; Pornillos, Alam et al. 2002). Ce

bourgeonnement nécessite également l'analogue humain de l'ATPase Vps4, renforçant l'hypothèse selon laquelle le virus utilise la machinerie cellulaire de tri des protéines dans les EMVs pour libérer les particules virales à partir de la membrane plasmique (Garrus, von Schwedler et al. 2001).

Le motif PPXY quant à lui est reconnu par le domaine WW de Nedd4, protéine appartenant à la famille des ubiquitine ligases. Le recrutement de cette enzyme pourrait expliquer le fait que la protéine Gag du VIH soit ubiquitinylée (Pornillos, Garrus et al. 2002). Le rôle précis de cette ubiquitinylation n'est pas encore bien déterminé, mais des études *in vitro* ont permis de montrer que l'interaction entre Tsg101 et le motif PTAP de la protéine Gag du VIH était largement favorisée lorsque Gag était ubiquitinylée.

Enfin, un dernier motif indispensable au bourgeonnement a été mis en évidence sur la protéine Gag du virus de l'anémie infectieuse du cheval (EIAV). Ce motif YPDL (de type YxxL) recrute la protéine Alix (protéine accessoire du complexe ESCRT-II), qui est capable de s'associer à ESCRT-I *via* Tsg101 et à ESCRT-III, établissant ainsi un lien entre ces deux complexes (Martin-Serrano, Yarovoy et al. 2003). Dans le cas du VIH, une étude récente a montré qu'un motif YPLTSL (apparenté au motif de type YXXL), pouvait également lier la protéine Alix (Munshi, Kim et al. 2007).

Le domaine L de la protéine Gag des rétrovirus peut donc s'associer à un ensemble de protéines cellulaires de la machinerie de biogenèse des EMVs (figure 7) ; ces protéines étant soit des composants directs de la machinerie ESCRT (*e.g.* Tsg101) soit des adaptateurs permettant d'établir un lien entre les complexes (*e.g.* Alix) (Martin-Serrano 2007). Néanmoins, il subsiste beaucoup de zones d'ombres dans la compréhension moléculaire exacte du mécanisme de bourgeonnement associé à la machinerie cellulaire (figure 7).



f- Devenir de l'EMV :

La dégradation lysosomale :

La fusion d'un EMV avec le lysosome entraîne la dégradation des protéines et des lipides associés aux ILV. Ce processus permet à la cellule d'éliminer des protéines transmembranaires (Futter, Pearse et al. 1996). La dégradation des protéines transmembranaires joue un rôle important dans la désensibilisation des récepteurs activés en surface de la cellule (Ceresa and Schmid 2000). Par exemple, de nombreux récepteurs de facteurs de croissance (*e.g.* le récepteur à l'EGF) sont internalisés une fois activés par leur ligand et sont triés dans les ILVs de l'EMV, pour être ensuite dégradés dans le lysosome (Figure 8A).

Un stockage temporaire :

Dans les cellules dendritiques, l'EMV pourrait jouer un rôle de compartiment de stockage pour les molécules du CMH de classe II (Kleijmeer, Ramm et al. 2001). Le

compartiment de charge du peptide (MIIC) présente en effet une structure multivésiculaire. Cependant, il peut se produire une fusion des ILVs (enrichis en complexes CMH-II/peptide antigénique) avec la membrane limitante de ce compartiment, entraînant le retour des molécules du CMH de classe II avec le continuum membranaire et la présentation de l'antigène par les molécules de classe II à la surface de la cellule (Figure 8B) (Kleijmeer, Ramm et al. 2001).

La sécrétion des ILV : la naissance des exosomes :

Les EMVs peuvent aussi directement fusionner avec la membrane plasmique, permettant la libération des vésicules internes dans le milieu extracellulaire. C'est à ce moment là que naissent les exosomes (Figure 8C). Comme nous l'avons discuté dans le paragraphe A-2 de ce premier chapitre d'introduction, les exosomes sont sécrétés par un grand nombre de types cellulaires, principalement les cellules de la lignée hématopoïétique.

Les ILVs peuvent également être libérées dans des types cellulaires spécialisés, sans pour autant posséder les caractéristiques des exosomes. En effet, l'EMV peut servir de compartiment intermédiaire (i) pour les lysosomes sécrétoires⁵ comme par exemple les mélanosomes dans les mélanocytes⁶, ou (ii) aux granules lytiques des lymphocytes sécrétoires⁷ (Burkhardt, Hester et al. 1990; Blott and Griffiths 2002). La formation de ces organites spécialisés nécessite le tri spécifique des molécules dans les différentes membranes qui les composent. Ces lysosomes sécrétoires, sous l'action d'un stimulus biologique, peuvent ensuite fusionner avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu.

5 Les lysosomes sécrétoires sont des compartiments particuliers qui combinent les fonctions de dégradation des lysosomes conventionnels et de stockage de protéines néosynthétisées devant être sécrétées suite à un stimulus biologique. Ils divergent des lysosomes classiques par leur capacité à réguler leurs activités pour sécréter leur contenu.

6 Les mélanocytes sont les cellules pigmentées de la peau pouvant synthétiser et stocker la mélanine dans les mélanosomes.

7 Les cellules T cytolytiques et les cellules tueuses reconnaissent des cellules infectées ou tumorales et les détruisent en sécrétant des protéines cytolytiques stockées dans les granules lytiques.

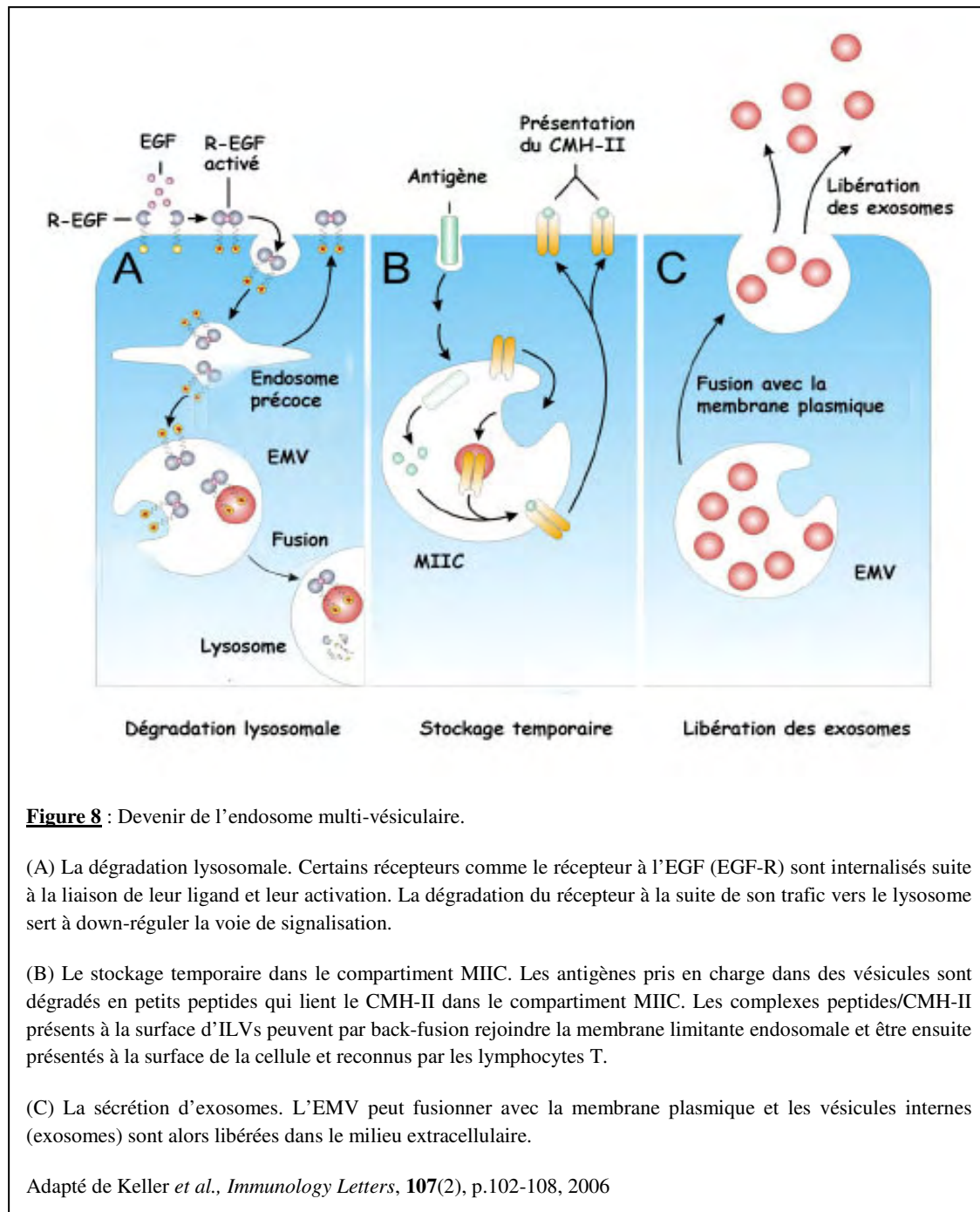


Figure 8 : Devenir de l'endosome multi-vésiculaire.

(A) La dégradation lysosomale. Certains récepteurs comme le récepteur à l'EGF (EGF-R) sont internalisés suite à la liaison de leur ligand et leur activation. La dégradation du récepteur à la suite de son trafic vers le lysosome sert à down-réguler la voie de signalisation.

(B) Le stockage temporaire dans le compartiment MIIC. Les antigènes pris en charge dans des vésicules sont dégradés en petits peptides qui lient le CMH-II dans le compartiment MIIC. Les complexes peptides/CMH-II présents à la surface d'ILVs peuvent par back-fusion rejoindre la membrane limitante endosomale et être ensuite présentés à la surface de la cellule et reconnus par les lymphocytes T.

(C) La sécrétion d'exosomes. L'EMV peut fusionner avec la membrane plasmique et les vésicules internes (exosomes) sont alors libérées dans le milieu extracellulaire.

C- Composition moléculaire des exosomes :

1- Compositions protéiques et lipidiques communes à tous les types d'exosomes :

L'étude de la structure moléculaire des exosomes repose sur la qualité de la purification des vésicules. Pour des caractérisations morphologiques et biochimiques précises, les exosomes peuvent être purifiés à partir de fluides biologiques, (*i.e.* plasma, urine), ou de surnageants de cultures cellulaires, par ultracentrifugation différentielle (Pan and Johnstone 1983; Raposo, Nijman et al. 1996). Une première centrifugation à basse vitesse permet

l'élimination des débris cellulaires, et les exosomes sont collectés à partir du surnageant par ultracentrifugation à 100 000g. Une dernière étape de purification peut être réalisée en déposant le culot exosomal récupéré après ultracentrifugation au sommet d'un gradient de sucrose (Raposo, Nijman et al. 1996; Escola, Kleijmeer et al. 1998). Les exosomes flottent à une densité allant de 1,13g/ml à 1,19g/ml en fonction des cellules utilisées et de la composition des vésicules. Les exosomes peuvent alors être caractérisés morphologiquement grâce à la technique de microscopie électronique (couplée ou non à un immunomarquage), ou biochimiquement à l'aide de différents marqueurs.

En microscopie électronique, les exosomes apparaissent comme des vésicules membranaires d'un diamètre de 50 à 100nm. L'analyse biochimique, quant à elle, doit être comparative ; entre les lysats cellulaires d'une part et les exosomes d'autre part, ceci pour mettre en évidence (i) un enrichissement de protéines propres aux vésicules internes des EMVs dans les vésicules purifiées et (ii) l'absence de protéines issues de compartiments cellulaires ou de structures membranaires différents de l'EMV.

a- Protéines ubiquitaires :

Un premier groupe de protéines exosomales ubiquitaires est représenté par certaines protéines du cytosquelette, comme l'actine, la moésine ou la tubuline (Thery, Regnault et al. 1999; Skokos, Le Panse et al. 2001; Thery, Boussac et al. 2001; van Niel, Raposo et al. 2001). Elles ne représentent toutefois qu'une faible proportion des protéines exosomales et aucun rôle dans la biogenèse ou le maintien de ces vésicules ne leur a pour l'instant été attribué.

Une deuxième famille de protéines constitutivement retrouvée dans les exosomes est celle des tétraspanines. Ces protéines possèdent quatre domaines transmembranaires et forment des réseaux au sein des membranes grâce à leur capacité de s'associer entre elles, avec d'autres protéines comme les intégrines (Berditchevski and Odintsova 1999; Berditchevski 2001; Hemler 2003) et avec le cholestérol (Charrin, Manie et al. 2003). CD9, CD81, CD82 et CD63 sont présentes dans les exosomes de lymphocytes B, lymphocytes T, cellules dendritiques, plaquettes, mastocytes et cellules épithéliales de l'intestin (Escola, Kleijmeer et al. 1998; Zitvogel, Regnault et al. 1998; Thery, Regnault et al. 1999; Skokos, Le Panse et al. 2001) (Vincent-Schneider, Stumptner-Cuvelette et al. 2002).

Certaines molécules d'adhésion comme les intégrines sont également associées aux exosomes (Thery, Regnault et al. 1999; Rieu, Geminard et al. 2000; Skokos, Le Panse et al. 2001; Blanchard, Lankar et al. 2002; Wubbolts, Leckie et al. 2003).

Plusieurs GTPases de la famille Rab ont aussi été trouvées dans les exosomes. C'est par exemple le cas de Rab11 et Rab7, présentes dans les vésicules issues de cellules dendritiques (Thery, Boussac et al. 2001), mais aussi de Rab4 et Rab5, retrouvées quant à elles dans la lumière des exosomes de réticulocyte (Vidal and Stahl 1993). Le rôle physiologique de ces différentes GTPases dans le phénomène de sécrétion des exosomes n'est actuellement pas connu. Cependant, leur localisation cellulaire (*i.e.* endosome tardif pour Rab7 et endosome précoce pour Rab4, Rab5 et Rab11) peut servir d'indicateur du compartiment endosomal à l'origine de la formation des vésicules, mais aussi de marqueur pour suivre le mécanisme de formation des exosomes.

Plusieurs protéines ancrées par un glycoposphatidylinositol (GPI) sont enrichies dans ces vésicules. En effet, l'acétylcholinestérase a d'abord été mise en évidence dans les exosomes de réticulocytes (Johnstone, Adam et al. 1987). C'est également le cas des protéines CD55, CD58 et CD59 à la fois dans les exosomes de réticulocytes (Rabesandratana, Toutant et al. 1998) et dans les exosomes de cellules présentatrices d'antigènes (Clayton, Court et al. 2001; Clayton, Harris et al. 2003).

Les fonctions cellulaires de la plupart de ces protéines sont plus ou moins bien connues (*e.g.* maintien du cytosquelette, fusion, adhésion, prolifération), cependant aucun rôle spécifique dans la formation ou la fonction physiologique éventuelle des exosomes n'a actuellement pu leur être attribué.

Depuis quelques années, un enjeu essentiel dans l'analyse protéique des exosomes est la recherche de protéines impliquées dans la biogenèse des EMV (Katzmann, Odorizzi et al. 2002; Raiborg, Rusten et al. 2003). Il a ainsi été montré que des protéines de la machinerie ESCRT impliquée dans le tri des protéines dans les vésicules internes de l'EMV comme Tsg101 (Katzmann, Babst et al. 2001) et Alix (Martin-Serrano, Yarovoy et al. 2003; Bowers, Lottridge et al. 2004), sont présentes dans les exosomes sécrétés par les cellules dendritiques (Thery, Boussac et al. 2001). Malgré les données montrant que les complexes ESCRT se dissocient de la membrane endosomale à la fin du processus de bourgeonnement sous l'action de Vps4, il est possible que des traces de ces protéines restent associées à la membrane et soient ainsi incorporées dans les vésicules internes.

La majorité des exosomes contiennent également des protéines à activité chaperon, telles que la Hsc70 et la Hsp90. C'est le cas des exosomes de réticulocyte (Johnstone, Adam et al. 1987), de cellules dendritiques (Thery, Regnault et al. 1999), de cellules épithéliales de l'intestin (van Niel, Raposo et al. 2001), de cellules tumorales (Wolfers, Lozier et al. 2001) et de mastocytes (Skokos, Le Panse et al. 2001). Ces protéines chaperon ont initialement été

décrites pour leur association à des protéines possédant des défauts de repliement (Palleros, Welch et al. 1991; Hohfeld and Hartl 1994). Elles seraient également impliquées dans le chargement des peptides antigéniques sur les molécules de CMH (Li, Menoret et al. 2002) et dans le transfert d'antigène entre des cellules parenchymateuses et des CPA (Srivastava 2002). Bien que controversés, ces résultats ont amené certains auteurs à penser que la présence de protéines chaperons dans les exosomes, enrichis également en CMH de classe I et II, pourrait être due à leur implication dans la charge des peptides antigéniques et leur pouvoir dans l'activation de la réponse immunitaire (Chaput, Taieb et al. 2004). Cependant, les exosomes de réticulocyte, pourtant totalement dépourvus de molécules de classe I, sont eux aussi très enrichis en Hsc70 (Davis, Dansereau et al. 1986). D'autre part, dans les exosomes de réticulocyte, Hsc70 a été démontrée interagir avec le domaine cytosolique du RTf (Davis, Dansereau et al. 1986). L'étude de cette interaction, d'abord envisagée comme un moteur dans le tri spécifique du RTf dans les exosomes (Davis, Dansereau et al. 1986; Johnstone 1992), a ensuite été caractérisée de manière plus précise, ce qui a permis de montrer qu'elle faisait intervenir l'activité chaperon de la Hsc70 (Geminard, Nault et al. 2001). De plus, l'inhibition de la liaison entre cette chaperonne et le RTf aboutit à un tri plus efficace du récepteur dans les exosomes. Il était donc vraisemblable que cette interaction ne soit pas le moteur du tri du RTf mais plutôt la conséquence d'une modification du récepteur au cours de la maturation des réticulocytes (Geminard, Nault et al. 2001).

b- Lipides :

Peu de données existent sur la composition lipidique des exosomes. Quatre types d'exosomes ont été étudiés quant à leur composition lipidique : les exosomes issus (i) de réticulocytes (Vidal, Sainte-Marie et al. 1989), (ii) d'une lignée cellulaire de lymphocytes B (Wubbolts, Leckie et al. 2003), (iii) de mastocytes et (iv) de cellules dendritiques (Laulagnier, Motta et al. 2004). En termes de phospholipides, la composition des exosomes de réticulocyte est voisine de celle de la membrane plasmique et le ratio cholestérol/phospholipide n'est pas augmenté, contrairement aux exosomes de lymphocytes B, enrichis en cholestérol (Subra, Laulagnier et al. 2007).

L'étude du trafic intracellulaire d'analogues lipidiques fluorescents a permis de montrer qu'il existe un tri spécifique des lipides dans la cellule en fonction de leur nature. En effet, après incorporation dans la membrane plasmique, un analogue fluorescent de la sphingomyéline (C6-NBD-SM), possédant une chaîne d'acides gras courte et insaturée, est internalisé et recycle rapidement à la membrane plasmique (Mayor, Presley et al. 1993). Par

contre, un analogue de la phosphatidyléthanolamine (N-Rh-PE) qui possède deux longues chaînes d'acides gras saturées, est internalisé puis suit la voie de dégradation lysosomale (Willem, ter Beest et al. 1990). Cet exemple reflète l'importance de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras : un lipide à longue chaîne s'assemble plus facilement dans des domaines rigides alors qu'un lipide à chaîne courte, plus fluide dans la membrane, peut recycler rapidement (Mukherjee, Soe et al. 1999). L'étude du tri des lipides dans les exosomes est en accord avec ces résultats. En effet, la N-RH-PE incorporée dans la membrane de réticulocytes est retrouvée dans les exosomes de réticulocytes (Vidal, Mangeat et al. 1997). Enfin, l'analyse des exosomes de mastocytes ou de cellules dendritiques montre également la présence de lipides saturés (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine) (Laulagnier, Motta et al. 2004).

Le LBPA, qui s'associe avec le cholestérol (Kobayashi, Beuchat et al. 1999), s'accumule dans les EMVs. Néanmoins, les études biochimiques d'exosomes issus de mastocytes ou de lymphocytes B n'ont pas mis en évidence d'enrichissement en LBPA dans les vésicules (Wubbolts, Leckie et al. 2003; Laulagnier, Motta et al. 2004). Il se pourrait donc que le LBPA reste au niveau de la membrane limitante de l'EMV lorsque les ILVs sont libérées dans le milieu extracellulaire.

2- La spécificité de composition protéique des deux grands types d'exosomes :

a- Les exosomes de cellules présentatrices d'antigène :

Les exosomes sécrétés par les CPA sont enrichis en molécules CMH-II et CMH-I. En effet, les cellules dendritiques, les cellules tumorales, les lymphocytes B et T, les mastocytes et les cellules épithéliales de l'intestin libèrent des exosomes contenant de grandes quantités de molécules du CMH et la molécule de costimulation CD86 (Thery, Regnault et al. 1999; Thery, Boussac et al. 2001; van Niel, Raposo et al. 2001; Wubbolts, Leckie et al. 2003; van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006). La présence du CMH dans les exosomes peut être expliquée par l'origine intracellulaire des vésicules, qui proviennent du compartiment MIIC correspondant au compartiment de charge des peptides antigéniques sur les molécules du CMH-II (Benaroch, Yilla et al. 1995; Raposo, Nijman et al. 1996).

b- Les exosomes de réticulocyte :

Le marqueur principal des exosomes de réticulocyte est le RTf. Néanmoins, ce type d'exosome porte également à sa surface les transporteurs de nucléosides, de glucose et d'acides aminés, et l'acétylcholinestérase (Johnstone, Bianchini et al. 1989; Johnstone and

Ahn 1990; Johnstone 1992; Johnstone, Mathew et al. 1998). Le fait que le réticulocyte soit la seule cellule sécrétrice d'exosomes dont la maturation nécessite la perte de ces fonctions membranaires, peut expliquer la présence de ces diverses molécules au sein des exosomes.

Une enzyme, appartenant à la famille des phospholipases A2 (PLA2) est aussi présente dans les exosomes de réticulocyte (Bette-Bobillo and Vidal 1995). Cette phospholipase particulière, indépendante du calcium, n'est pour l'instant été décrite que dans ce type d'exosomes. Toutefois, l'équipe de Michel Record a montré la présence d'une isoforme d'une autre phospholipase, la phospholipase D, dans les exosomes issus de mastocytes (Laulagnier, Grand et al. 2004).

D- Fonctions des exosomes :

1- Exosomes de cellules du système immunitaire :

La présence de molécules impliquées dans la présentation de l'antigène confère aux exosomes issus de cellules immunitaires la potentialité de moduler la réponse immunitaire. Les premières études menées sur les lignées de lymphocytes B ont montré la capacité des CPAs à sécréter des exosomes (Raposo, Nijman et al. 1996). De par la présence des molécules du CMH-I et du CMH-II, de molécules d'adhérence et de costimulation, les exosomes de lymphocytes B possèdent une capacité à induire la réponse de lymphocytes T *in vitro* (Raposo, Nijman et al. 1996). Un devenir possible des exosomes de lymphocyte B *in vivo* est leur adressage vers les cellules dendritiques folliculaires. En effet, les cellules dendritiques folliculaires des amygdales acquièrent des molécules du CMH de classe II via les exosomes avec lesquels elles entrent en contact (Denzer, van Eijk et al. 2000).

Les exosomes issus de cellules dendritiques présentent également les molécules de classe I et II à leur surface. Ces exosomes sont capables d'activer les lymphocytes T cytotoxiques *in vivo*, quand ils sont chargés en antigènes tumoraux et après injection dans des souris portant des tumeurs, bien qu'ils ne soient pas capables d'induire une stimulation directe des cellules T (Zitvogel, Regnault et al. 1998). Les exosomes de cellules dendritiques permettent enfin d'assurer le transfert de complexes peptides/CMH-II vers une cellule réceptrice intermédiaire, telle qu'une cellule dendritique voisine, qui sera ensuite capable d'activer un lymphocyte T CD4+ (Thery, Duban et al. 2002). Un tel transfert entraîne l'amplification de la réponse immune, par une augmentation du nombre de cellules portant les complexes peptides/CMH-II. Ces interactions sont vraisemblablement amorcées par les molécules d'adhésion présentes en surface des exosomes et des cellules cibles. Des études récentes indiquent que la capacité des exosomes de cellules dendritiques à stimuler

directement les cellules T dépend de leur composition, qui évolue lors de la maturation des cellules dendritiques (Segura, Amigorena et al. 2005). La présence d'ICAM-1 dans les exosomes de cellules dendritiques matures apparaît comme essentielle pour une stimulation indirecte des cellules T (Segura, Nicco et al. 2005). En plus de la présentation de l'antigène, les exosomes de cellules dendritiques peuvent aussi permettre la survie des lymphocytes T CD4+ via l'activation de NFκB (Matsumoto, Morisaki et al. 2004). Dans ces études, les exosomes issus de CPAs peuvent agir directement une fois liés à la surface de la cellule ou après leur capture par une cellule cible. L'internalisation d'exosomes par une cellule cible est un mécanisme possible, mais le mode d'endocytose permettant cette internalisation n'est pas clairement établi (Morelli, Larregina et al. 2004). Les cellules T sont elles aussi capables de sécréter des exosomes, qui pourraient être impliqués dans la régulation de CD3 (complexe de protéines transmembranaires associées au récepteur des cellules T) (Blanchard, Lankar et al. 2002).

2- Exosomes de cellules épithéliales :

La capacité des cellules épithéliales à pouvoir sécréter des exosomes a été décrite lors de l'étude des cellules épithéliales de la bordure en brosse intestinale (van Niel, Raposo et al. 2001). Les analyses biochimiques et morphologiques ont montré que les exosomes étaient sécrétés au niveau du pôle apical et du pôle basolatéral de ces cellules. Les deux populations exosomales portent des protéines communes, telles que le CMH-I, des tétraspanines et des chaperons de la famille Hsp ; mais portent également des protéines spécifiques. Par exemple, les exosomes issus du pôle apical contiennent la syntaxine 3 et CD26 (une dipeptidase). Ces exosomes sont sécrétés dans la lumière du tube digestif, ce qui suggère leur implication dans un processus d'élimination, même si ce rôle n'est pas démontré (Mallegol, van Niel et al. 2005). Les exosomes issus du pôle basolatéral, quant à eux, sont constitutivement enrichis en antigène A33, mais également en molécules du CMH-II après activation par l'interféron-γ (Van Niel, Mallegol et al. 2003).

Pour certains auteurs, les exosomes de l'épithélium intestinal pourraient donc être des structures transportant des antigènes, établissant un lien entre les antigènes de la lumière et le système immunitaire local. Ils pourraient servir de sonde de l'information antigénique présente dans la lumière intestinale et leur capacité à induire une réponse immunitaire pourrait être influencée par l'inflammation.

3- Exosomes de réticulocyte :

Lors de sa maturation en érythrocyte, le réticulocyte élimine les protéines devenues inutiles à son métabolisme en les sécrétant associées aux exosomes. La totalité du RTf est ainsi éliminé de la cellule par ce processus. Un grand nombre de vésicules est sécrété chaque jour dans la circulation sanguine, permettant alors une élimination efficace des protéines obsolètes pour la cellule rouge.

Contrairement aux CPA ou aux cellules épithéliales, les réticulocytes ne sont pas impliqués dans la réponse immunitaire. Les exosomes issus de réticulocyte, contrairement à ceux issus de CPA ne sont donc pas impliqués dans la présentation de l'antigène. De plus, les protéines éliminées par le réticulocyte et véhiculées par ces vésicules ne doivent pas être reconnues comme un signal de danger par l'organisme. Les exosomes de réticulocyte représentent donc un système efficace d'élimination de protéines dans un contexte de tolérance.

E- Exosomes *versus* ectosomes :

En 1981, Trams *et al.* isolèrent des vésicules membranaires à partir de surnageants de lignées cellulaires néoplasiques (Trams, Lauter et al. 1981). Ces vésicules, d'un diamètre oscillant entre 40 et 100nm possèdent une activité 5'-nucléotidase. Ces fragments de membrane plasmique contiennent une forte concentration d'antigènes tumoraux et il a été montré que ces vésicules sont libérées avec un plus fort taux par les cellules métastatiques (Taylor, Taylor et al. 1988). Ces vésicules, également appelées microvésicules, sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique (figure 9A), et l'équipe de Schifferli a proposé de leur attribuer le terme d'ectosomes (Hess, Sadallah et al. 1999). La biogenèse des exosomes, comme discuté dans le paragraphe B de ce chapitre, résulte de la libération des vésicules dans le milieu extracellulaire lors de la fusion de l'EMV avec la membrane plasmique. La biogenèse de ces deux types de vésicules est donc différente : (i) bourgeonnement de la membrane plasmique dans le cas des ectosomes et (ii) fusion d'un EMV avec la membrane dans le cas des exosomes. Cependant il existe peut-être un recouvrement moléculaire entre ces deux types de vésicules. En effet, il a été récemment montré que des composés directement impliqués dans la biogenèse de l'EMV sont également associés avec des domaines de la membrane plasmique qui donnent naissance à un bourgeonnement vésiculaire à la surface cellulaire (Taylor and Gercel-Taylor 2005; Booth, Fang et al. 2006).

Il est donc difficile actuellement de différencier les deux types de vésicules, et seule une analyse en microscopie électronique, montrant la fusion de l'EMV avec la membrane plasmique, permet aujourd'hui la discrimination entre les deux types (figure 9B).

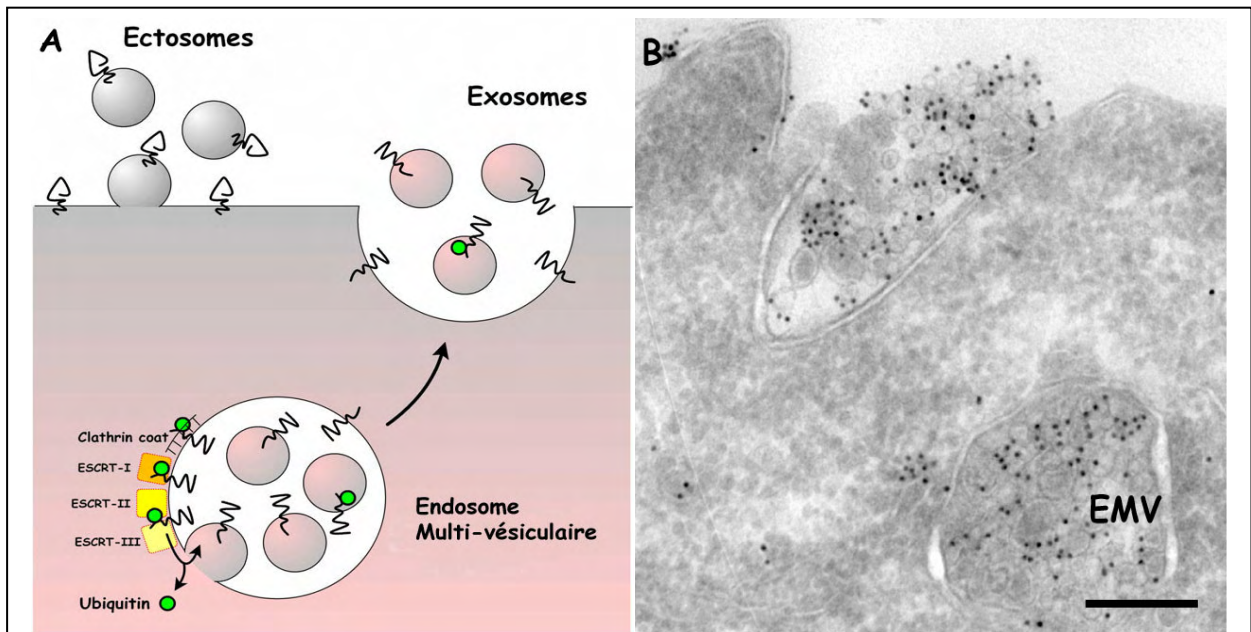


Figure 9 : Exosomes *versus* ectosomes.

(A) Les ectosomes résultent du bourgeonnement de la membrane plasmique, alors que les exosomes sont sécrétés après fusion de l'endosome multivésiculaire avec la membrane plasmique.

(B) Image de MET mettant en évidence la fusion de l'EMV avec la membrane plasmique, menant à la libération des exosomes (la barre représente 200nm). Tiré de Möbius *et al.*, *Journal of histochemistry & cytochemistry*, **50**, p. 43-56, 2002.

Chapitre II : Le réticulocyte :

Le sang contient plusieurs types de cellules, dont les globules rouges (encore appelés hématies ou érythrocytes), les globules blancs (ou leucocytes) et les plaquettes. Les érythrocytes sont des cellules anucléées responsables du transport de l'oxygène (O₂) depuis les poumons vers les différents organes et tissus de l'organisme, et de l'élimination du dioxyde de carbone (CO₂) généré par le métabolisme cellulaire. Les plaquettes participent à la réparation des vaisseaux sanguins ainsi qu'au processus de coagulation du sang, et les globules blancs participent aux processus de l'immunité. Toutes les cellules sanguines doivent être produites tout au long de la vie. Le mécanisme général de production de ces cellules est appelé hématopoïèse, dont fait partie l'érythropoïèse, responsable de la production des globules rouges.

Pendant l'embryogenèse des vertébrés, l'érythropoïèse se produit en plusieurs vagues. Chez les mammifères, au cours du développement embryonnaire, les globules rouges sont produits par la membrane vitelline de l'œuf. Cette érythropoïèse est appelée érythropoïèse primitive. Au milieu de la gestation, le processus de différenciation se poursuit dans le foie fœtal, avant de s'installer définitivement dans la moelle osseuse très peu de temps avant la naissance (Orkin 1995). On parle alors d'érythropoïèse définitive.

Au cours de cette érythropoïèse définitive, une grande majorité du processus de différenciation a lieu dans la moelle osseuse, où sont localisées les cellules souches. Seule la dernière étape de la différenciation, donnant naissance à l'érythrocyte à partir du réticulocyte, a lieu dans la circulation sanguine.

Je commencerai cette seconde partie par un rappel sur les différentes étapes de différenciation permettant la formation des hématies, puis je présenterai le réticulocyte, cellule sécrétrice d'exosomes, qui a été le modèle cellulaire de mes travaux de thèse. Enfin, je reviendrai sur un évènement particulier et programmé entraînant la dégradation des mitochondries (*i.e.* la mitoptose) au cours de la maturation du réticulocyte.

A- L'érythropoïèse et sa régulation :

1- Les cellules souches :

Les cellules sanguines sont produites à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (HSC : Hematopoietic Stem Cell). Ces cellules sont localisées dans la moelle osseuse et sous la stimulation de plusieurs hormones et cytokines, une série d'évènements de

maturation se produit générant de nombreux érythrocytes fonctionnels (Spangrude, Heimfeld et al. 1988).

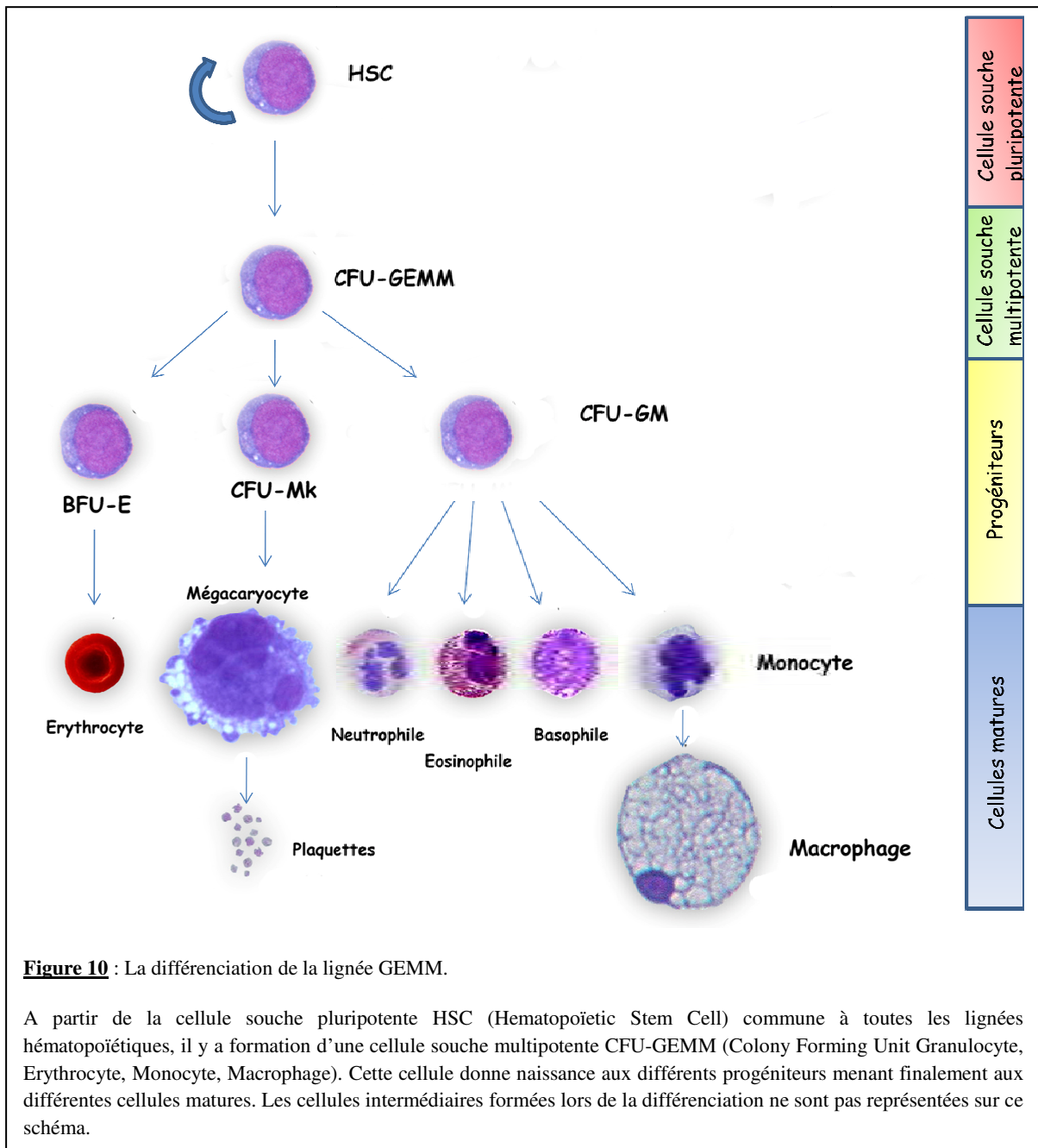
Trois types de cellules souches sont à la base de ce processus et correspondent à trois stades de maturation : les cellules souches pluripotentes, les cellules souches multipotentes et les progéniteurs érythroblastiques.

a- Cellules souches pluripotentes :

Ces cellules correspondent à un stock permanent de cellules capables d'auto renouvellement par multiplication et de différenciation sous l'action de divers *stimuli* spécifiques. Elles donnent naissance à l'ensemble des lignées myéloïdes et lymphoïdes. C'est une sorte de réserve de cellules sanguines, située dans la moelle osseuse.

b- Cellules souches multipotentes :

Ce sont des cellules qui proviennent des cellules souches pluripotentes. Elles possèdent une capacité limitée de renouvellement, mais sont capables d'évoluer vers différentes lignées et notamment vers les colonies mixtes composées de plusieurs types cellulaires : CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megacaryocyte (cf figure 10)). Ces cellules ont donc la capacité de se différencier en granulocytes, érythrocytes, macrophages ou mégacaryocytes (figure 10).



c- Progéniteurs érythroblastiques :

Ce sont des cellules déjà orientées qui donnent naissance à des colonies de cellules morphologiquement reconnaissables. Dans le cas de l'érythropoïèse, le progéniteur le plus précoce est appelé BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid). Les BFU-E sont des cellules hautement prolifératives, particulièrement en présence d'une hormone : l'érythropoïétine (Epo). Les BFU-E expriment à leur surface une grande quantité de récepteur à l'hormone SCF (Stem Cell Factor) et peu de récepteurs à l'Epo. Ils se développent en progéniteurs tardifs formant des colonies de 10 à 100 érythroblastes. Ces cellules sont appelées CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid). La survie et la différenciation des CFU-E sont fortement

dépendantes de l'Epo. Les CFU-E expriment donc moins de récepteurs au SCF mais plus de récepteurs à l'Epo en surface de la cellule au fur et à mesure de la différenciation. A partir de ces cellules, la maturation en érythrocytes s'effectue en 6 à 7 jours, tout d'abord dans la moelle osseuse puis dans la circulation sanguine.

2- Les érythroblastes :

La maturation des érythroblastes nécessite plusieurs étapes. Sa principale caractéristique est la production et l'accumulation d'hémoglobine dans le cytosol. Elle s'accompagne également d'un certain nombre de divisions cellulaires permettant une amplification de la production des cellules matures. Du proérythroblaste à l'érythrocyte, quatre mitoses successives, en quatre jours, permettent d'obtenir seize cellules matures à partir d'une cellule engagée dans la lignée. Des changements rapides et importants entraînant des modifications biochimiques et morphologiques permettent de distinguer les stades nucléés suivants : proérythroblaste, érythroblastes basophiles I et II, érythroblaste polychromatophile et érythroblaste acidophile (encore appelé orthochromatique). A ce stade, la cellule perd son noyau et devient un réticulocyte qui, par diapédèse, traverse la paroi capillaire d'un sinus de la moelle osseuse pour atteindre la circulation sanguine où il achève sa maturation en un ou deux jours (figure 11). Pendant cette période, le réticulocyte perd tous ses compartiments intracellulaires et devient un « sac à hémoglobine » : l'érythrocyte. Dans le même temps, la synthèse d'hémoglobine continue et le volume cellulaire diminue, ce qui entraîne une concentration de l'hémoglobine et l'augmentation de la densité cellulaire.

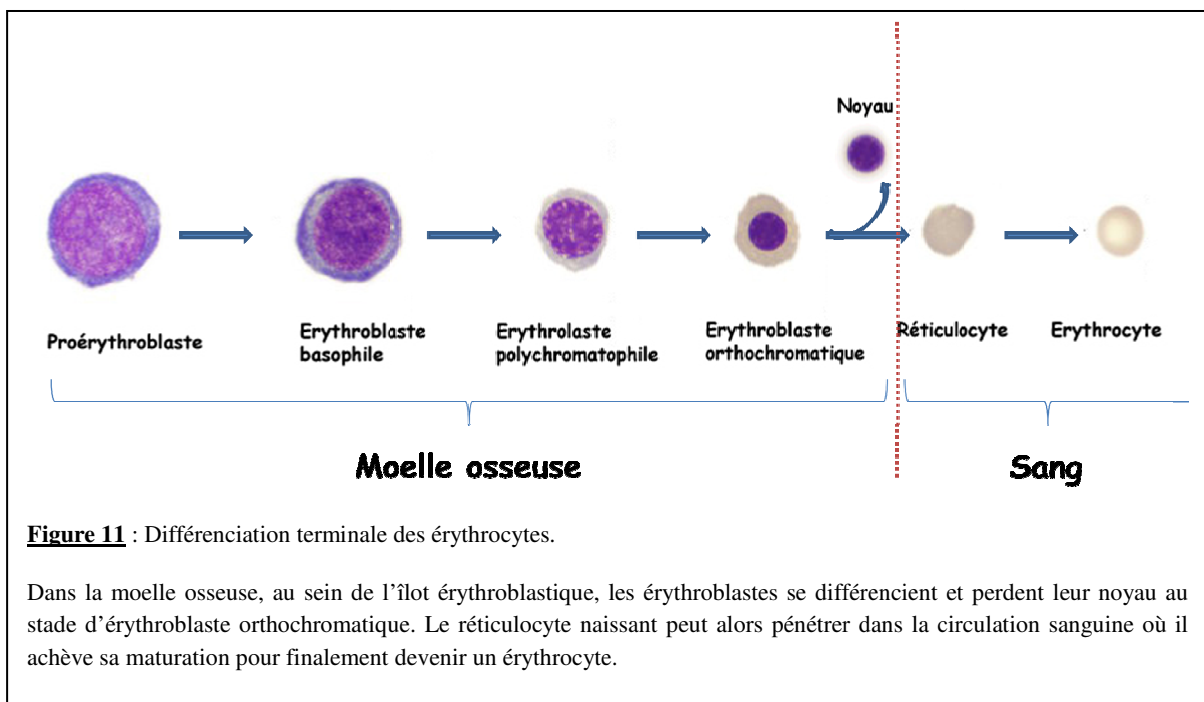


Figure 11 : Différenciation terminale des érythrocytes.

Dans la moelle osseuse, au sein de l'îlot érythroblastique, les érythroblastes se différencient et perdent leur noyau au stade d'érythroblaste orthochromatique. Le réticulocyte naissant peut alors pénétrer dans la circulation sanguine où il achève sa maturation pour finalement devenir un érythrocyte.

a- Proérythroblastes :

Le proérythroblaste est la cellule la plus jeune engagée dans la lignée érythroïde. Il représente environ 1% des éléments nucléés de la moelle osseuse. C'est une cellule arrondie, de grande taille (environ 20 à 25µm de diamètre). Son noyau, parfaitement rond, est situé au centre de la cellule et occupe les 8/10 du volume cellulaire. La chromatine est homogène et présente un ou deux nucléoles. Le cytoplasme forme une sorte de couronne d'environ 2µm de large contenant une grande quantité de ribosomes.

b- Erythroblastes basophiles :

Ces cellules constituent environ 5% des cellules des cellules nucléées de la moelle osseuse et ont une taille plus réduite (environ 15µm de diamètre). Le noyau présente une chromatine condensée en paquets réguliers, les nucléoles ont disparu et le cytoplasme est toujours autant chargé en ribosomes.

c- Erythroblastes polychromatophiles :

La taille de ces cellules est encore réduite (environ 10µm de diamètre). Le volume cellulaire représente environ quatre fois le volume du noyau. La quantité d'hémoglobine augmente, mais il reste encore des ARN ribosomaux.

d- Erythroblastes orthochromatiques :

A ce stade, l'érythroblaste orthochromatique (encore appelé acidophile) expulse le noyau et devient un réticulocyte. Le noyau expulsé emporte avec lui une portion de membrane plasmique (figure 12).



Figure 12 : L'érythroblaste orthochromatique.

La cellule en train de suivre le processus d'énucléation est visualisée par microscopie en contraste de phase (A), par microscopie à balayage (B) et par MET (C).

Tiré de Chasis *et al.*, *Blood*, 74(3), p.1112-1120, 1989

e- L'îlot érythroblastique :

Les érythroblastes de mammifères prolifèrent, se différencient et subissent le processus d'énucléation dans des microenvironnements de la moelle osseuse ou du foie fœtal, appelés îlots érythroblastiques (Bessis 1958; Mohandas and Prenant 1978; Allen and Dexter

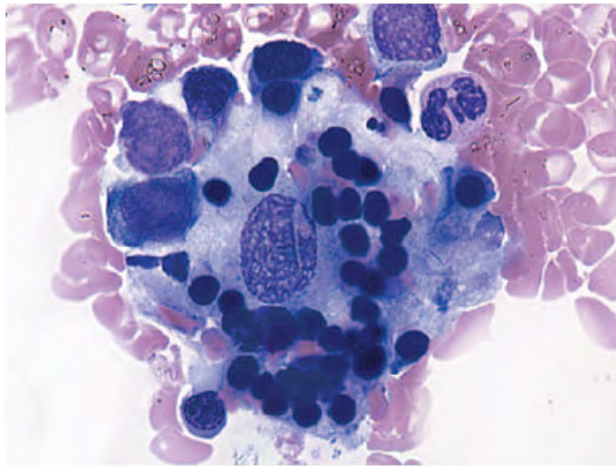


Figure 13 : L'îlot érythroblastique.

Cette image montre l'organisation de l'îlot érythroblastique dans la moelle osseuse. Les érythroblastes en cours de différenciation entourent un macrophage. Ce macrophage est responsable de l'élimination du noyau extrudé. Tiré de *Blood*, cover art 1/11/2004.

1982). Cet îlot est composé d'un macrophage entouré d'érythroblastes en cours de différenciation (Figure 13), depuis les cellules CFU-E devenant pro-érythroblastes jusqu'aux jeunes réticulocytes multilobés (Bessis, Mize et al. 1978). Plusieurs facteurs permettent le maintien de ces érythroblastes au sein de l'îlot, notamment des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire, telles que l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ qui lie son récepteur VCAM-1 (Vascular Cell-Adhesion Molecule-1) présent au niveau du

macrophage (Sadahira, Yoshino et al. 1995), ou ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) liant l'intégrine αV sur le macrophage (Lee, Lo et al. 2006).

Le macrophage au centre de cet îlot permet l'élimination rapide du noyau expulsé par l'érythroblaste par un mécanisme de phagocytose (Seki and Shirasawa 1965; Skutelsky and Danon 1972). En effet, une étude récente a permis de montrer que, dans le foie foetal, le noyau extrudé montre une réexposition de la phosphatidylsérine⁸ à la surface de la membrane qui l'entoure, ce qui entraîne sa phagocytose (Yoshida, Kawane et al. 2005). Une protéine, isolée dans les années 1990 par Manjit Hanspal, et appelée EMP (Erythroblast Macrophage Protein) (Hanspal and Hanspal 1994) est également retrouvée au niveau de la couronne membranaire entourant le noyau (Lee, Gimm et al. 2004). L'EMP est aussi retrouvée à la surface de la membrane plasmique du macrophage (Hanspal, Smockova et al. 1998), et pourrait permettre l'attachement du noyau au macrophage, facilitant ainsi sa phagocytose (Chasis 2006). Ces différents arguments indiquent que le processus d'élimination du noyau de l'érythroblaste présente des similitudes avec celui conduisant à la clairance des corps apoptotiques.

3- Les réticulocytes :

⁸ La réexposition de la phosphatidylsérine, un phospholipide constitutif des membranes biologiques, joue un rôle majeur dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques (Chapitre III, paragraphe C-3)

C'est en perdant son noyau que l'érythroblaste devient un réticulocyte (figure 14). Cette cellule est donc anucléée, mesure environ 8µm de diamètre, et possède encore quelques organites cellulaires : mitochondries, réticulum endoplasmique, ribosomes et appareil de Golgi. Le réticulocyte néo formé traverse la paroi d'un capillaire pour entrer dans la circulation sanguine où il mature en un à deux jours pour finalement donner naissance à l'érythrocyte. Le réticulocyte étant la cellule modèle de mon travail de thèse, nous reviendrons plus en détail sur cette cellule dans un chapitre qui lui sera concerné.

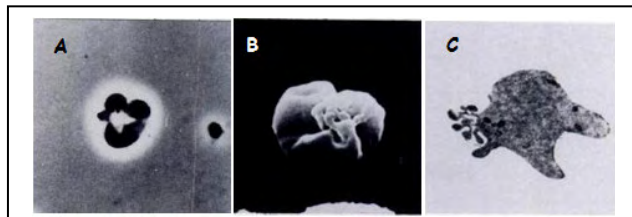


Figure 14 : Le réticulocyte.

Le jeune réticulocyte formé après le processus d'énucléation est visualisé par microscopie en contraste de phase (A), par microscopie à balayage (B) et par MET (C).

Tiré de Chasis *et al.*, *Blood*, **74**(3), p.1112-1120, 1989

4- Les érythrocytes :

Le globule rouge mature possède une forme caractéristique de disque biconcave (figure 15) d'environ 8µm de diamètre dont l'épaisseur est variable (de 2,5µm au bord à 1µm au centre). Cette forme correspond à un rapport surface/volume favorable à la déformabilité (flexibilité) et aux échanges gazeux (grande surface d'échange). La forme biconcave des cellules rouges, ainsi que la flexibilité de la membrane cellulaire permet à

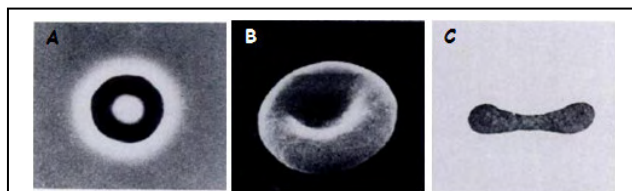


Figure 15 : L'érythrocyte.

Finalement, après remodelage de la membrane plasmique et perte des organites internes, le réticulocyte donne naissance à l'érythrocyte, dont l'aspect caractéristique de disque biconcave est visualisé par microscopie en contraste de phase (A), par microscopie à balayage (B) et par MET (C).

Tiré de Chasis *et al.*, *Blood*, **74**(3), p.1112-1120, 1989

la cellule d'augmenter son volume ou d'entrer dans les capillaires très fins par déformation. Cette capacité à se déformer est néanmoins diminuée chez l'érythrocyte en fin de vie. Les érythrocytes ont une durée de vie d'environ 120 jours, puis sont éliminés de la circulation sanguine par les macrophages, à la suite de la réorientation de phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique (McEvoy, Williamson *et al.* 1986; Connor, Pak *et al.* 1994).

5- Régulation de l'érythropoïèse :

La régulation de l'érythropoïèse est sous l'influence de différents facteurs dont certains lui sont propres. De cette façon, certaines protéines peuvent servir de marqueurs de

différenciation. C'est le cas notamment des antigènes CD33 et CD34 (protéines transmembranaires glycosylées), CD36 (glycoprotéine IV), CD71 (récepteur de la transferrine), mais aussi de la glycophorine A et de la bande 3 (protéine échangeuse d'anion 1) qui sont les deux protéines les plus abondantes de la membrane du globule rouge mature. (Poole 2000). Toutes ces protéines ont un profil d'expression différent selon le stade de différenciation. Ainsi, si CD33 et CD34 sont majoritairement exprimés dans les stades précoces (CFU-GEMM et BFU-E) (Buhring, Asenbauer et al. 1989), la glycophorine A et la bande 3 sont exprimées tardivement, dans les derniers stades de l'érythropoïèse (Anstee and Tanner 1986).

a- Le Stem Cell Factor (SCF) :

Ce facteur agit en synergie avec d'autres cytokines (Epo, IL-1, IL-3; IL-6) en présence desquelles il augmente à la fois la taille et le nombre des colonies. Ce SCF est produit de manière constitutive par les cellules endothéliales et les fibroblastes de la moelle osseuse (Broudy 1997). Egalement appelé c-kit ligand, il trouve son récepteur (c-kit) à la surface de la membrane plasmique des cellules BFU-E majoritairement, puis son rôle dans la régulation de l'érythropoïèse diminue avec l'avancée dans la différenciation, au profit d'une autre hormone, l'érythropoïétine.

b- L'érythropoïétine (EPO) :

Cette glycoprotéine de 165 acides aminés, correspondant à une masse moléculaire de 34kDa, circule dans le sang. Elle se fixe au niveau d'un récepteur transmembranaire spécifique appartenant à la superfamille des récepteurs aux cytokines. Ce récepteur est présent en surface des cellules érythroïdes immatures de la moelle osseuse. L'Epo est synthétisée principalement dans le rein chez l'individu adulte et la régulation de cette synthèse est corrélée à la quantité d'oxygène présente dans les tissus. En effet, alors que l'hypoxie stimule la synthèse d'Epo, l'hyperoxie la diminue (Jelkmann and Hellwig-Burgel 2001). La fonction principale de l'Epo est d'agir en synergie avec d'autres facteurs de croissance pour réduire l'apoptose et stimuler la prolifération et la différenciation des cellules proérythropoïétiques de la moelle osseuse. Cette régulation n'affecte ni les cellules souches pluripotentes, ni les cellules souches multipotentes. Par contre, l'Epo accélère la synthèse d'hémoglobine, diminue le temps de différenciation et entraîne une libération précoce des réticulocytes ; notamment en augmentant l'affinité de l'IRP-1 (Iron Regulatory Protein) pour des structures d'ARN appelés IRE (Iron Responsive Element), ce qui augmente la quantité d'ARN messager codant pour le

RTf. Cette cascade d'évènements a pour conséquence l'augmentation de la quantité de molécules de fer internalisées (Ponka 1997)

c- Le fer :

Dans les cellules rouges sanguines, ce métal joue un rôle fondamental dans la structure de l'hémoglobine (Hb), protéine responsable de l'apport d'oxygène aux tissus, en entrant directement dans la composition du noyau hème. L'Hb prend en charge 60 à 70% du fer total de l'organisme par l'intermédiaire de l'internalisation de la transferrine *via* les puits recouverts de clathrine. Les hématies contiennent quasiment tout leur fer sous forme d'Hb, ce qui impose un couplage entre acquisition et utilisation de ce composé lors de la synthèse de l'hème. En effet, l'hème peut effectuer un rétrocontrôle, spécifique des cellules synthétisant l'Hb, par lequel il régule l'acquisition de fer à partir de la transferrine. Cette action est spécifique des cellules synthétisant l'hémoglobine (Ponka 1997).

B- La maturation du réticulocyte :

1- Généralités :

Après la perte du noyau, l'érythroblaste devient un réticulocyte. En quelques jours, ces cellules suivent un processus de maturation (i) en terminant les synthèses d'hémoglobine et d'autres protéines caractéristiques des érythrocytes matures, (ii) en changeant de forme, passant d'une forme irrégulière et assez grande à une forme plus petite et plus uniforme (le disque biconcave) (Mel, Prenant et al. 1977) et (iii) en dégradant les organites internes (Gronowicz, Swift et al. 1984) et en perdant certaines protéines membranaires (Johnstone 1992). En plus de ces changements propres à la cellule, les réticulocytes migrent vers la circulation sanguine en traversant la paroi endothéliale du capillaire d'un sinus de la moelle osseuse (Tavassoli 1978).

Comme cette étape de maturation ne dure que quelques jours, le nombre de réticulocytes circulants est un bon indicateur clinique du taux d'érythropoïèse ; les réticulocytes représentant généralement 1 à 3% de la quantité totale de cellules rouges circulantes. Cette quantité peut toutefois être augmentée, lors de la stimulation de l'érythropoïèse, suite à des saignements répétés ou à l'injection chroniques de substances chimiques (*e.g.* phénylhydrazine) qui entraîne une anémie hémolytique (Coulombel, Tchernia et al. 1979).

Les populations de réticulocytes elles mêmes sont très hétérogènes du fait des différentes étapes de maturation de chaque réticulocyte. Un réticulocyte immature est plus

mobile qu'un réticulocyte plus avancé dans ces étapes de maturation (Mel, Prenant et al. 1977).

2- Evolution morphologique au cours de la maturation :

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, le processus de maturation s'accompagne d'évènements entraînant la perte des organites intracellulaires et le remodelage de la membrane plasmique. Une étude de microscopie électronique, menée par G. Gronowicz en 1984 a permis de mieux visualiser ces changements en termes de modification de la morphologie cellulaire. En effet, l'observation de réticulocytes précoces, issus de sang de rats anémiés, montre que les réticulocytes contiennent de nombreux organites internes :

ribosomes, mitochondries, réticulum endoplasmique rugueux, appareil de Golgi, endosomes multivésiculaires, lysosomes et vacuoles autophagiques

(Gronowicz, Swift et al. 1984).

Lors de la maturation, ces réticulocytes perdent leurs organites internes. Les réticulocytes les plus jeunes sont de plus grande taille et de forme lobulée et possèdent le plus de matériel interne (figure 16).

La diminution du volume et l'acquisition d'une forme sphérique est donc corrélée avec la maturation



Figure 16 : Observation en microscopie électronique à transmission d'un jeune réticulocyte humain. Notons la forme plurilobée et la présence des organites internes, témoignant du degré d'immatunité de ce réticulocyte.

Tiré de Chasis *et al.*, *Blood*, **74**(3), p.1112-1120, 1989

et notamment la perte du matériel intracellulaire (Gronowicz, Swift et al. 1984). Depuis cette étude, ce changement de morphologie a été observé entre autres lors de la maturation de réticulocytes humains obtenus sur des patients présentant une réticulocytose élevée) (Chasis, Prenant et al. 1989), ou murins (obtenus à partir de la différenciation de proérythroblastes infectés par une souche du virus de Friend) (Koury, Koury et al. 2005).

3- La synthèse d'hémoglobine :

La fonction essentielle d'un érythrocyte est le transport et la livraison de l'oxygène dans l'organisme par l'intermédiaire de l'hémoglobine. Le réticulocyte a donc comme

fonction principale de produire de grandes quantités de cette protéine. Cette production par le réticulocyte repose sur une synthèse protéique très efficace associée à une forte capacité à accumuler le fer.

Ce fer, constituant central de l'hémoglobine, est incorporé dans le noyau prosthétique de l'hémoglobine : l'hème. L'hème est une molécule très conservée et synthétisée dans de très nombreux organismes, des plantes aux mammifères. Ce noyau hème est un complexe Fe(III)-proto-porphyrine IX (du grec *porphyreos* signifiant pourpre) et donne sa couleur caractéristique au sang (Ponka 1999). Le mécanisme impliqué dans la synthèse de ce composé est connu depuis les années 50, avec les travaux de David Shemin et d'Albert Neuberger et la synthèse d'hème a été décrite à cette même époque dans les réticulocytes (Ponka 1997). Pendant les dernières étapes de la différenciation érythrocytaire, de grandes quantités de molécules de globine et d'hème sont synthétisées avant d'être assemblées en tétramères d'hémoglobine. Dans le réticulocyte au stade précoce, la synthèse protéique de la globine est très efficace ; les ribosomes étant les structures intracellulaires les plus abondantes de la cellule. Ils sont associés en polysomes et traduisent quasi exclusivement l'ARN messager de la globine dont la prépondérance est due à sa très grande stabilité, supérieure à 60 heures (Stolle and Benz 1988). La synthèse d'hème en revanche diminue et s'arrête au stade réticulocyte, tandis que son assemblage avec la globine se poursuit (Sadlon, Dell'Oso et al. 1999). Un tiers de l'hémoglobine totale présente dans le globule rouge mature est produit au cours du seul stade réticulocyte.

4- Perte de protéines membranaires :

Cette dernière étape de maturation consiste également en un remodelage membranaire important, et de nombreuses activités associées à la membrane plasmique diminuent, allant même jusqu'à la disparition totale pour certaines d'entre elles. Par exemple, l'activité acétylcholinestérase est diminuée de 50% chez l'homme dans l'érythrocyte par rapport au réticulocyte (Johnstone, Adam et al. 1987). De la même façon, il y a diminution du transport des nucléosides et des acides aminés (Tucker and Young 1980) et de l'activité Na⁺/K⁺ ATPase (Blostein and Grafova 1987). Il y a par contre perte complète de la capacité de liaison à la transferrine par exemple (Frazier, Caskey et al. 1982; Pan and Johnstone 1983).

On sait aujourd'hui que la diminution de ces activités membranaires au cours de la maturation du réticulocyte est due à la perte (partielle ou totale) des protéines assurant ces activités (Johnstone, Adam et al. 1987), ces protéines étant libérées associées aux exosomes,

comme présenté dans le chapitre relatif à la composition protéique des exosomes de réticulocyte.

Une question se pose alors : Pourquoi le réticulocyte en cours de maturation a-t-il besoin d'éliminer ces activités membranaires ?

Un premier élément de réponse se trouve dans le métabolisme propre de l'érythrocyte. Sa seule fonction est d'assurer le transport des gaz dans le sang. Il semble donc que les autres activités, jusque là nécessaires au bon déroulement de la différenciation, deviennent « obsolètes » au stade réticulocyte. En effet, si l'on reprend l'exemple du RTf, sa fonction principale est d'apporter le fer dans toutes les cellules de l'organisme, grâce à sa liaison à la transferrine et à l'internalisation du complexe RTf/transferrine par endocytose *via* les puits recouverts de clathrine (Dautry-Varsat 1986). Le fer, une fois importé dans la cellule, est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques (Baker, Anderson et al. 2003), mais surtout, dans le cas de la lignée érythroïde, à la formation de l'hémoglobine, en représentant le cœur du noyau hème (Ponka 1999). Or, comme discuté au chapitre précédent, au stade réticulocyte, la synthèse d'hème s'arrête. Il n'y a donc plus besoin d'amener du fer. On peut donc imaginer que la perte du RTf soit corrélée à une économie faite par le réticulocyte, le fer circulant étant alors mobilisé pour d'autres cellules le nécessitant.

Une deuxième possibilité consiste à envisager la perte de ces activités membranaires comme un mécanisme de protection développé par le réticulocyte. Toujours sur l'exemple du RTf, le fer, possédant un fort pouvoir oxydo-réducteur, peut également être dangereux pour la cellule, si son apport n'est pas régulé. En effet, l'accumulation de fer sous forme libre dans le cytoplasme est propice à la formation par « effet Fenton », de radicaux libres (Pierre and Fontecave 1999), fortement oxydants et toxiques pour la cellule.

Le fer n'étant plus nécessaire à la cellule, et son accumulation étant toxique sont donc deux arguments en faveur d'une nécessité de la perte de l'activité membranaire (*i.e.* internalisation du fer *via* le RTf) en perdant la protéine en charge de cette activité : le récepteur de la Transferrine.

5- La perte des organites intracellulaires :

a- Les ribosomes :

Les ribosomes représentent la structure la plus abondante dans le réticulocyte. En effet, on considère qu'au stade précoce il existe plus de 100 000 ribosomes par cellule. Comme décrit dans le paragraphe sur la synthèse de l'hémoglobine, ils s'associent en polysomes de cinq unités et sont impliqués quasi exclusivement dans la synthèse de la

globine. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus sur la distribution des ribosomes dans le réticulocyte au cours de la maturation. Certains auteurs observent là une diminution de la quantité de polysomes et de ribosomes libres (Glowacki and Millette 1965), alors que d'autres observent que, si la quantité de polysomes diminue, le nombre de ribosomes libres augmente de façon concomitante et proportionnelle (Marbaix, Burney et al. 1970). Parallèlement, Marbaix *et al.* observent que le messenger codant pour la globine se trouve sous forme libre dans le cytosol du réticulocyte, et proposent que les ribosomes ne peuvent plus se fixer sur les ARN messagers (Marbaix, Huez et al. 1976). Ces éléments suggèrent que la diminution de la synthèse protéique au cours de la maturation du réticulocyte n'est pas seulement due à la diminution du nombre de ribosomes, mais peut être également à une modification structurale et fonctionnelle de ces derniers. En effet, suite à l'expulsion du noyau, les ARN ribosomiaux ne sont plus synthétisés et le pool de ribosomes n'est donc plus renouvelé.

b- Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi :

Le réticulum endoplasmique est le siège de la synthèse des protéines et des lipides membranaires. Il est formé par un réseau de tubules membranaires interconnectées, qui ne sont que très peu présents dans les précurseurs des érythrocytes à l'inverse des érythroblastes en prolifération (Heynen and Verwilghen 1982). Dans les réticulocytes précoces, le réticulum endoplasmique peut être composé de quelques tubules et d'un réservoir clair non granulaire tout au plus, et ces structures sont absentes de l'érythrocyte mature. Il existe donc un mécanisme cellulaire permettant la disparition de ces vestiges. Il se pourrait notamment que certaines régions spécialisées de l'organite soient mobilisées dans le processus d'autophagie, afin de former le phagophore. Ceci permettrait de favoriser sa disparition lors de la maturation. Quelques minutes après leur synthèse, la majorité des protéines quittent le réticulum endoplasmique *via* un transport vésiculaire et rejoignent l'appareil de Golgi où elles subissent des modifications post-traductionnelles. Cette structure est très développée dans les érythroblastes où elle se compose de cinq ou six réservoirs empilés. L'appareil de Golgi diminue cependant considérablement durant la différenciation érythropoïétique. En effet, il représente 3% du volume cytoplasmique des érythroblastes, 1% après la dernière division cellulaire de la lignée, seulement 0,2% dans le réticulocyte et il est totalement absent du cytoplasme de l'érythrocyte mature (Heynen and Verwilghen 1982).

Ces deux structures, réticulum endoplasmique et appareil de Golgi, disparaissent de manière concomitante après l'expulsion du noyau. En effet, l'absence de synthèse des ARN

messagers, couplée à la disparition des ribosomes, rend obsolète la machinerie de maturation et de transport des protéines néosynthétisées.

c- Les lysosomes :

Le lysosome est un organite membranaire chargé de la dégradation de nombreux constituants cellulaires, dont les membranes et les protéines membranaires. Le lysosome, comme les autres organites, disparaît au cours de la maturation érythrocytaire. Cette disparition a été mise en évidence en microscopie électronique (Gronowicz, Swift et al. 1984), ainsi que par des méthodes biochimiques montrant la perte des activités hydrolytiques associées au fonctionnement du lysosome (Thorburn and Beutler 1991).

La disparition de cet organite est un élément très important de la maturation du réticulocyte. En effet, cette cellule qui élimine beaucoup de protéines membranaires perd progressivement sa machinerie principale de dégradation.

Le réticulocyte utilise donc d'autres mécanismes pour éliminer les molécules ne pouvant plus être dégradées par le lysosome, notamment l'expulsion dans le milieu de vésicules membranaires : les exosomes.

d- Les mitochondries :

Le profil métabolique du réticulocyte est différent de celui de l'érythrocyte, surtout au niveau de la respiration qui est quasiment absente de la cellule rouge mature. En effet, les érythrocytes ont une consommation d'oxygène très inférieure à celle des réticulocytes (d'un facteur 50 environ). De la même façon, la production d'ATP dans les réticulocytes est 70 fois plus importante que dans les érythrocytes. Cette consommation d'oxygène, ainsi que la production d'ATP diminuent progressivement au cours de la maturation, en accord avec la disparition des mitochondries, siège de la voie respiratoire, menant à la formation de l'ATP après consommation d'O₂ (Skulachev 1999).

La mitochondrie est un organite constitué de deux compartiments bien définis : la matrice entourée par la membrane interne et l'espace intermembranaire délimité à l'extérieur par la membrane externe. La membrane interne est repliée, formant un grand nombre de crêtes qui augmentent considérablement sa surface. Elle contient des complexes protéiques formant la chaîne de transport des électrons : l'enzyme ATP Synthase et le transporteur de nucléotides ANT (Adenine Nucleotide Translocator). La membrane interne est imperméable aux ions et aux métabolites en conditions physiologiques, ce qui permet à la chaîne respiratoire de créer un gradient électrochimique ($\Delta\Psi_m$) indispensable à la formation d'ATP par l'enzyme ATP synthase. L'ATP ainsi formé est exporté de la matrice vers l'espace

intermembranaire grâce au transporteur ANT. La protéine la plus abondante de la membrane externe est le canal anionique voltage dépendant VDAC (Voltage Dependent Anionic Channel), perméable aux solutés de masse moléculaire allant jusqu'à 5000 daltons, maintenant le $\Delta\Psi_m$ constant. L'espace intermembranaire possède une composition et une concentration en solutés équivalentes au cytosol. La matrice quant à elle, contient de petites molécules dont la nature est différente de celles présentes dans l'espace intermembranaire (Kroemer and Reed 2000). La fonction principale de la mitochondrie est la formation d'énergie sous forme d'ATP. Cet organite est ainsi responsable de la production de 90% de la totalité de l'ATP formé dans les cellules (Skulachev 1999).

Des mitochondries sont retrouvées dans la cellule au stade réticulocyte circulant (Gronowicz, Swift et al. 1984; Koury, Koury et al. 2005). Au fur et à mesure de sa maturation en érythrocyte, le nombre de mitochondries présentes dans le cytoplasme diminue, entraînant une perte du métabolisme aérobie (Skulachev 1999). La production d'ATP ainsi que la synthèse d'hème étant encore requises dans des stades intermédiaires de maturation des réticulocytes, les mitochondries sont les derniers organites à être perdus, mais ils disparaissent complètement avant que la cellule ne devienne un érythrocyte.

C- La dégradation programmée des mitochondries : La Mitoptose :

1- Le rôle clé de la 15-lipoxygénase (15-LOX) :

La 15-LOX appartient à la famille des lipoxygénases dont la fonction enzymatique est la dioxygénation des acides gras polyénoliques (Brash 1999). Ces enzymes sont retrouvées dans beaucoup d'organismes (végétaux et animaux), mais leur niveau d'expression dépend du type cellulaire dans lequel elles sont exprimées (Brash 1999). Cette 15-LOX est spécifique de la lignée érythroïde et a été décrite pour la première fois dans les réticulocytes de lapin, et représente la deuxième protéine majoritaire du réticulocyte après l'hémoglobine (Rapoport, Schewe et al. 1979).

a- Synthèse de la 15-LOX :

La synthèse de la 15-LOX commence très tôt dans l'érythropoïèse par la transcription de son ARN messenger (Thiele, Andree et al. 1982). Ce messenger est décrit comme étant le plus abondant après celui de la globine dans les cellules érythroïdes, et est synthétisé dans les cellules précurseurs situées dans la moelle osseuse (Thiele, Andree et al. 1982). Cependant, la traduction de ce messenger est réprimée jusqu'à ce que le réticulocyte atteigne la circulation sanguine et commence la dernière étape de maturation (Schewe, Rapoport et al. 1986). Des

études ont pu montrer que cette restriction temporelle serait due à l'inhibition de la traduction du messenger par l'intermédiaire de protéines régulatrices. En effet, à l'extrémité 3' non traduite (3' UTR : UnTranslated Region) de ce messenger existe une séquence de régulation composée d'un motif répétitif riche en nucléotides CU. Deux protéines, hnRNP K et hnRNP E1 (hnRNP : heterogenous nuclear RiboNucleoProtein), se fixent spécifiquement sur cette séquence, connue sous le nom de DICE (Differentiation Control Element) et bloquent ainsi la traduction du messenger. Les cibles de ces protéines hnRNP K et E1 sont les protéines eIFs (Eukaryotic Initiation Factor) responsables de l'initiation de la traduction par le recrutement de la sous-unité 60S des ribosomes. Dans le réticulocyte circulant, la traduction du messenger de la 15-LOX est activée. En effet, à ce stade, la protéine hnRNP K se lie spécifiquement à la tyrosine kinase c-src. Il y a alors activation de c-src, qui à son tour va permettre la phosphorylation de l'hnRNP K. Cette phosphorylation a pour conséquence l'inhibition de la liaison entre hnRNP K et DICE, activant ainsi la traduction du messenger (Messias, Harnisch et al. 2006).

b- Structure et fonction de la 15-LOX :

Cette enzyme est une protéine composée d'une chaîne polypeptidique unique de 78kDa, contenant du fer mais sans noyau hème. La fonction commune aux lipoxygénases est l'oxygénation des acides gras polyénoliques, tels que l'acide arachidonique ou l'acide linoléique (Brash 1999). La 15-LOX peut se lier sur les membranes de différents organites : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, peroxyosomes et mitochondries (Brinckmann, Schnurr et al. 1998; van Leyen, Duvoisin et al. 1998). Toutefois, les travaux de Van Leyen *et al.* ont montré que la 15-LOX ne peut pas s'associer *in vitro*, avec la face cytosolique de la membrane plasmique des érythrocytes (van Leyen, Duvoisin et al. 1998). Dans le réticulocyte, l'interaction de la 15-LOX avec les membranes dépend du calcium, notamment pour la fixation de la lipoxygénase sur la membrane des mitochondries entraînant ainsi la peroxydation des lipides (Watson and Doherty 1994). La peroxydation va fluidifier la membrane mitochondriale, avec pour conséquence sa déstabilisation matérialisée par la diminution du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). De plus, la 15-LOX est capable de s'oligomériser pour constituer des pores de 3 à 10 nm de diamètre, taille suffisante pour permettre le passage de protéines dont la masse moléculaire est inférieure à 400kDa (van Leyen, Duvoisin et al. 1998). Ainsi, la diminution du $\Delta\Psi_m$ et la formation de ces pores pourraient jouer un rôle déterminant dans la dégradation des protéines mitochondriales en plus de l'inactivation de ces organites. En effet, lorsque des réticulocytes sont mis en

maturation *in vitro* en présence d'acide eicosatétraénoïque (ETYA), un inhibiteur de lipoxgénase, la dégradation des mitochondries est retardée. Ces travaux, conduits par Grulich *et al.*, ont permis de montrer, par microscopie électronique, la maintien de mitochondries intactes et la présence de protéines mitochondriales actives dans les réticulocytes (Grulich, Duvoisin et al. 2001). Ces résultats confirment un rôle de la 15-LOX dans la dégradation programmée de ces organites.

c- La libération et l'élimination des protéines mitochondriales :

Après la formation des pores au niveau de la membrane, des protéines normalement confinées dans le compartiment mitochondrial peuvent passer dans le cytosol du réticulocyte. Ces protéines ne sont pas accumulées dans le cytoplasme, mais sont dégradées, d'une manière dépendante de l'ATP (Muller, Dubiel et al. 1980). Suite à cette dégradation, les acides aminés libérés peuvent alors être réutilisés pour la synthèse de l'hémoglobine. Le système ubiquitine/protéasome, chargé de la dégradation des protéines cytosoliques, pourrait être impliqué dans ce processus. Dans ce contexte, une étude a pu mettre en évidence une très forte expression de protéines impliquées dans cette voie de dégradation (*e.g.* des enzymes de conjugaison E2) au stade réticulocyte précoce (Wefes, Mastrandrea et al. 1995) et l'induction du système ubiquitine/protéasome a été mis en évidence *in vitro* dans les derniers stades de différenciation de cellules induites par le virus de Friend (Chen, Pajak et al. 2002). Ainsi, la 15-LOX et le système ubiquitine/protéasome contribueraient au processus de différenciation érythrocytaire et pourraient agir en synergie, afin d'éliminer convenablement les mitochondries et leur contenu protéique lors de la maturation du réticulocyte, sans entraîner la dégradation de la cellule (Dubiel and Rapoport 1989; van Leyen, Duvoisin et al. 1998).

2- L'autophagie :

L'observation en microscopie électronique de cellules érythroïdes met en évidence la présence dans le cytoplasme de vésicules de grande taille, de structure autophagique, contenant des mitochondries (Kent, Minick et al. 1966; Gronowicz, Swift et al. 1984). Le phénomène d'autophagie est une activité phagocytaire auto-lysosomale, définie comme le processus de dégradation en masse de protéines cytoplasmiques et d'organites. Le processus d'autophagie est présent dans toutes les cellules eucaryotes, avec des vésicules morphologiquement identiques chez la levure, les plantes et les cellules animales (Klionsky and Emr 2000).

Chez les mammifères, le mécanisme menant à l'autophagie (figure 17) se manifeste par l'apparition dans le cytoplasme de vésicules délimitées par une double membrane, appelées autophagosomes. L'origine de ces membranes limitantes reste assez obscure, mais l'hypothèse la plus vraisemblable est qu'elles dérivent du réticulum endoplasmique. Les

vésicules englobent une région du cytoplasme et tous les éléments qui s'y trouvent, notamment les mitochondries. Les vésicules fusionnent ensuite avec le compartiment lysosomal, entraînant la destruction des éléments capturés (Kelekar 2005). Ce processus peut être impliqué, en partie, dans la disparition des mitochondries lors de la différenciation terminale des érythrocytes (Takano-Ohmuro, Mukaida et al. 2000), soit par digestion autolyosomale des vésicules autophagiques contenant des mitochondries fusionnées avec les lysosomes, soit après fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique et expulsion des organites dans le milieu extracellulaire (Takano-Ohmuro, Mukaida et al. 2000). L'existence de ce processus est particulièrement séduisante chez le réticulocyte. En effet, ce mécanisme serait un moyen d'éliminer trois types d'organites à la fois : (i) le réticulum endoplasmique, formant le phagophore, (ii) le lysosome permettant la formation

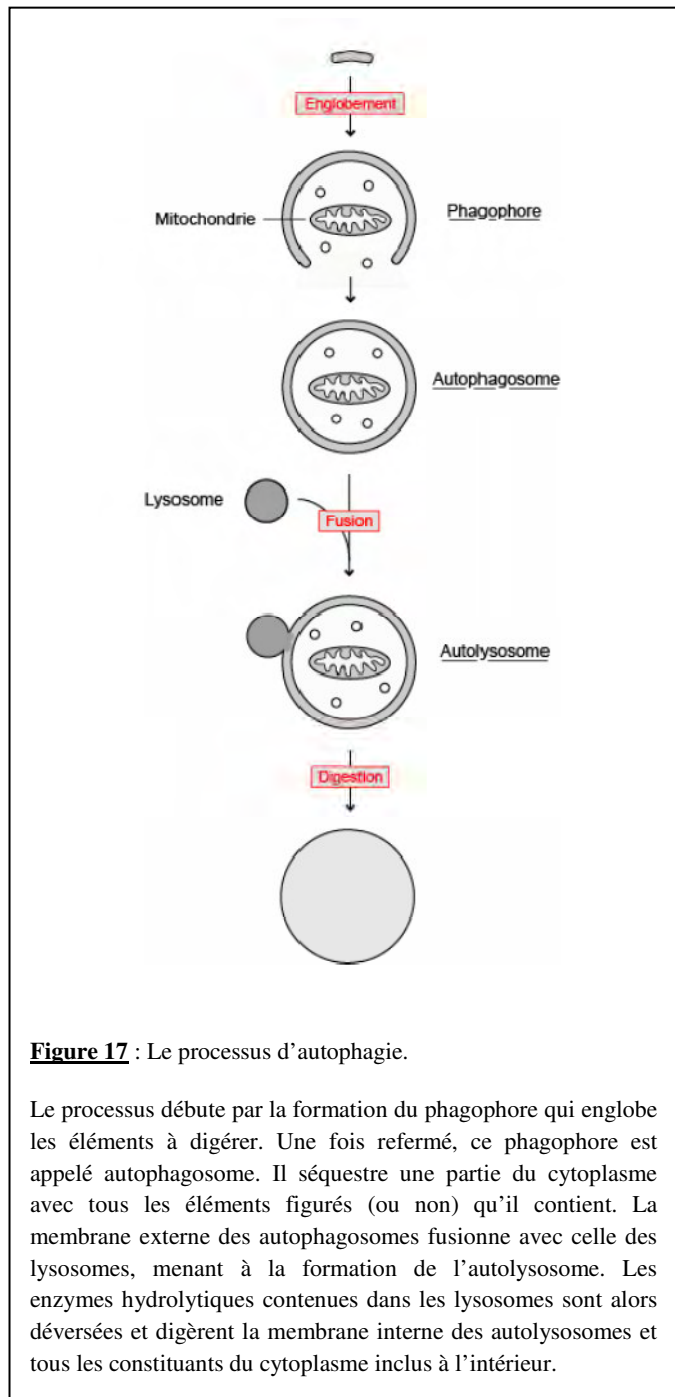


Figure 17 : Le processus d'autophagie.

Le processus débute par la formation du phagophore qui englobe les éléments à digérer. Une fois refermé, ce phagophore est appelé autophagosome. Il séquestre une partie du cytoplasme avec tous les éléments figurés (ou non) qu'il contient. La membrane externe des autophagosomes fusionne avec celle des lysosomes, menant à la formation de l'autolysosome. Les enzymes hydrolytiques contenues dans les lysosomes sont alors déversées et digèrent la membrane interne des autolysosomes et tous les constituants du cytoplasme inclus à l'intérieur.

de l'autolysosome et (iii) les mitochondries, partiellement dégradées par la 15-LOX et la formation de pores dans la membrane.

Chapitre III : L'apoptose et la clairance des corps apoptotiques :

A- Généralités sur l'apoptose :

1- L'apoptose et son impact dans la physiologie cellulaire et tissulaire :

Le nombre de cellules au sein d'un organe est déterminé par les taux de migration cellulaire, de division cellulaire et de mort cellulaire (Raff 1996).

L'apoptose représente une forme de mort cellulaire, physiologique et programmée (Kerr, Wyllie et al. 1972; Sulston and Horvitz 1977). Ce processus dépend de l'activation d'une machinerie interne à la cellule et nécessite l'activation de gènes menant à la synthèse de protéines spécifiques, effectrices de ce processus de dégradation cellulaire. Elle s'oppose à la nécrose, qui résulte d'une destruction des cellules par des facteurs exogènes physiques, chimiques ou biologiques et qui aboutit à la lyse des cellules et à la dispersion de leurs constituants dans le milieu extracellulaire.

L'apoptose est un mécanisme universel chez les êtres vivants, uni ou pluricellulaires. Au sein des métazoaires, elle représente le mécanisme fondamental assurant, de façon permanente, le maintien de l'homéostasie, l'intégrité et les fonctions des tissus.

Au cours de l'embryogenèse, par exemple, la formation des organes dépend de l'élimination massive de certaines ébauches selon un mécanisme apoptotique. Ainsi, la formation des espaces interdigitaux, la régression des ébauches urogénitales lors de la différenciation sexuelle sont deux exemples illustrant un rôle de l'apoptose au cours de la morphogenèse (Jacobson, Weil et al. 1997).

De la même façon, dans le système nerveux central, les neurones générés en excès, qui ne peuvent établir de connexions fonctionnelles et ne reçoivent pas de signaux de survie⁹ de leurs homologues sont éliminés par ce processus (Oppenheim 1989). Dans le système immunitaire, l'apoptose permet l'élimination des clones de lymphocytes auto-réactifs (Scaffidi, Kirchhoff et al. 1999).

Enfin, l'apoptose joue également un rôle dans l'érythropoïèse et sa régulation (Testa 2004).

Après avoir fait une comparaison de l'apoptose et de la nécrose, je reviendrai sur une présentation détaillée de l'apoptose, et sur les mécanismes moléculaires menant à la formation

⁹ Il existe une balance dans la cellule entre signaux de survie et signaux de mort. Le fait d'un déséquilibre en faveur des signaux de mort entraîne la cellule vers la voie de dégradation par apoptose.

des corps apoptotiques. Enfin, je ferai un bilan des connaissances actuelles sur la clairance de ces corps apoptotiques.

2- Apoptose versus nécrose :

L'apoptose, processus actif finement régulé génétiquement, se distingue classiquement de la nécrose qui résulte d'une destruction pathologique passive des cellules. Néanmoins, ces deux formes de mort cellulaire ne sont pas exclusives (Kanduc, Mittelman et al. 2002).

La nécrose se caractérise essentiellement par la destruction massive et rapide des cellules par lyse osmotique. Il y a dans ce cas une entrée massive d'eau suite à l'arrêt de l'activité des pompes membranaires, ce qui induit un gonflement de la cellule suivi d'une rupture des membranes, de la destruction des compartiments intracellulaires et la libération du contenu cellulaire dans le milieu extérieur. Il y a notamment libération d'enzymes lytiques et la lyse de la cellule engendre une réponse de type inflammatoire qui accentue les lésions tissulaires (Kanduc, Mittelman et al. 2002).

L'apoptose au contraire élimine sélectivement les cellules, provoque une condensation de la cellule et préserve l'intégrité des compartiments internes et des macromolécules jusqu'à un stade avancé. L'ensemble du processus se déroule sur plusieurs heures et n'entraîne pas de réaction inflammatoire (Kanduc, Mittelman et al. 2002).

3- Changements morphologiques et moléculaires au cours de l'apoptose :

L'analyse par microscopie électronique a permis d'identifier les changements morphologiques qui surviennent lors de l'apoptose, notamment la condensation de la chromatine, le rétrécissement du cytoplasme et le bourgeonnement de la membrane plasmique (Kerr, Wyllie et al. 1972; Wyllie, Kerr et al. 1980). Ce bourgeonnement a pour conséquence la libération de sacs membranaires contenant des fragments de cytoplasme ou de chromatine : les corps apoptotiques. La face externe des membranes de ces corps apoptotiques présente des molécules qui seront ensuite reconnues comme signaux de phagocytose par les macrophages environnants, permettant l'élimination rapide de ces corps. Ces différents signaux seront présentés dans le paragraphe C de ce chapitre, consacré à la clairance des corps apoptotiques. Les études de microscopie électronique ont également montré un gonflement de la membrane externe de la mitochondrie (Vander Heiden, Chandel et al. 1997) et une libération de cytochrome c (Kluck, Bossy-Wetzel et al. 1997).

Les changements moléculaires induits lors de l'apoptose incluent le clivage de l'ADN internucléosomal en fragments d'environ 200pb (Wyllie 1980), et la perte de l'asymétrie membranaire avec la redistribution aléatoire de la phosphatidylsérine entre les feuillettes interne

et externe de la membrane plasmique (Fadok, Voelker et al. 1992). Des techniques basées sur la détection de certains de ces changements, comme (i) l'utilisation de la terminal transférase qui incorpore les nucléotides marqués au niveau des sites de coupure de l'ADN (Gavrieli, Sherman et al. 1992), (ii) le marquage de la surface cellulaire par l'annexine V (Koopman, Reutelingsperger et al. 1994) et (iii) la détection de cellules avec un contenu en ADN apparemment subdiploïde par marquage avec des sondes s'intercalant dans l'ADN (Nicoletti, Migliorati et al. 1991), sont maintenant des outils standards pour démontrer un phénomène d'apoptose.

Ces changements d'ordres morphologique et moléculaire sont observés dans différents tissus et différentes espèces, et ont permis de renforcer l'idée selon laquelle des voies de signalisation indépendantes convergent sur une machinerie effectrice commune menant à la mort de la cellule et conservée d'un point de vue évolutif (Vaux and Strasser 1996). A présent, je vais m'attacher à présenter les mécanismes moléculaires de l'apoptose, les différents acteurs protéiques et les voies de régulation de cette voie de mort cellulaire.

B- Mécanismes moléculaires de l'apoptose :

1- La phase d'engagement :

La machinerie apoptotique peut être activée par deux voies différentes mais interconnectées entre elles. La voie extrinsèque d'une part, qui dépend de l'activation de récepteurs membranaires par des ligands spécifiques, et la voie intrinsèque d'autre part qui met en jeu les mitochondries.

a- La voie des récepteurs de mort cellulaire :

Les récepteurs de mort cellulaire sont des protéines transmembranaires, capables d'induire la cascade apoptotique (lorsqu'ils fixent les ligands appropriés) par l'intermédiaire de protéines adaptatrices qui recrutent et activent les caspases.

Ces récepteurs appartiennent à la superfamille du TNF-R (Tumor Necrosis Factor-Receptor). Ils sont activés par un groupe de ligands, proches en termes de structure, qui appartiennent à la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor). Plus de quarante membres de la famille du TNF-R ont été identifiés, le mieux connu étant Fas (encore appelé CD95 ou Apo-1) (Nagata and Golstein 1995).

L'analyse structurale de ces récepteurs montre qu'ils sont constitués de quelques centaines d'acides aminés. Leur ligand (TNF-L : Tumor Necrosis Factor-Ligand) vient

s'associer dans la partie Nterminale (extracellulaire) de ces protéines. Il y a alors activation du récepteur sous forme de trimère (Schneider, Holler et al. 1998).

L'activation de ce complexe récepteur/ligand entraîne le recrutement d'une protéine adaptatrice, au niveau du domaine cytosolique du récepteur (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). Ceci entraîne la formation rapide du complexe de signalisation de mort induite et l'activation des caspases initiatrices : les caspases 8 et 10 (Salvesen and Dixit 1999).

b- La voie mitochondriale :

La deuxième voie entraînant la mort de la cellule prend naissance au sein de la cellule. On la nomme communément voie intrinsèque ou mitochondriale. En effet, la mitochondrie est l'organite central de cette voie apoptotique. Dans cette voie, l'activation des caspases est corrélée à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par des protéines membres de la famille proapoptotique Bcl (Green and Kroemer 2004). Après rupture de la membrane externe de la mitochondrie, certaines protéines, normalement localisées dans l'espace intermembranaire, sont libérées ; (*e.g.* le cytochrome c). La libération de ces protéines et la chute du potentiel de membrane mitochondrial marquent une étape irréversible dans le processus d'apoptose, appelée point de non retour.

Une fois dans le cytosol, ces protéines apoptotiques déclenchent le processus de mort cellulaire en promouvant l'activation des caspases ou en agissant comme des effecteurs de mort indépendants des caspases (Saelens, Festjens et al. 2004). En effet, une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c s'associe à une protéine adaptatrice appelée Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) qui s'oligomérisse de façon dépendante de l'ATP et qui recrute à son tour la procaspase-9. Le complexe formé par le cytochrome c, Apaf-1 et la procaspase-9 est appelé Apoptosome. Ce complexe va ensuite activer la caspase-3, on entre alors dans la phase d'exécution de l'apoptose.

2- La phase d'exécution : les Caspases :

a- Caractéristiques et modes d'activations des caspases :

Les Caspases représentent une famille de protéases comprenant actuellement 14 membres (Nicholson and Thornberry 1997). Ces enzymes tirent leur nom de leur mécanisme d'action (Cystein ASpartate specific ProteASE) (Thornberry and Lazebnik 1998). En effet, leur site catalytique contient une séquence de cinq acides aminés centrés sur une cystéine, et elles reconnaissent comme motif un térapeptide pour finalement cliver leurs substrats en Cterminal d'un résidu aspartate (Thornberry and Lazebnik 1998). La spécificité de substrat de

chaque caspase est déterminée par la séquence d'acides aminés en amont du site de clivage (les positions P2-P4) (Nicholson and Thornberry 1997).

b- Rôle des caspases :

Les caspases initiatrices, dont l'activation est issue de l'étape d'engagement apoptotique, ont pour but d'activer à leur tour le second groupe de caspases, les caspases effectrices (Nicholson and Thornberry 1997).

Les caspases effectrices clivent sélectivement et simultanément un grand nombre de substrats provoquant en général leur dégradation et des modifications dans la morphologie de la cellule. Par exemple, la destruction des lamines par les caspases entraîne la fragmentation et le bourgeonnement du noyau (Rao, Perez et al. 1996; Buendia, Santa-Maria et al. 1999), et le clivage de protéines du cytosquelette (*e.g.* actine et gelsoline) provoque une densification et une déformation de la cellule (Kothakota, Azuma et al. 1997).

La protéolyse de certaines enzymes par les caspases permet aussi leur activation. En effet, l'endonucléase CAD (Caspase-Activated DNase) est normalement inactivée dans la cellule, par sa liaison à un inhibiteur, iCAD (inhibitor of CAD). Au cours de l'apoptose, iCAD est clivé par la caspase 3, ce qui permet la libération de l'endonucléase active, responsable du clivage de l'ADN internucleosomal (Enari, Sakahira et al. 1998; Sakahira, Enari et al. 1998).

3- Facteurs de régulation de l'apoptose :

Une activation inopportune des caspases pourrait avoir des effets dévastateurs sur un tissu. Il est donc nécessaire que cette étape d'activation soit finement régulée.

L'identification des gènes régulant l'apoptose a bénéficié de l'étude de l'apoptose contrôlant les populations cellulaires au cours du développement du ver *Caenorhabditis elegans*. L'analyse de mutants de l'apoptose a permis d'identifier des gènes appelés CED (*C. elegans* cell Death) (Hengartner and Horvitz 1994) qui exercent une fonction pro- ou anti-apoptotique, et dont les homologues ont été caractérisés chez les mammifères. Une classification de ces facteurs de régulation peut être réalisée, selon qu'ils agissent au niveau des mitochondries ou du cytoplasme.

C- La clairance des corps apoptotiques :

1- Structure lipidique de la membrane plasmique et changements au cours de l'apoptose :

a- Structure générale des membranes :

La structure de base des membranes cellulaires est constituée d'une double couche de phospholipides. Au sein de cette double couche, des protéines sont intégrées, afin de former une barrière sélectivement perméable. Les débuts de la microscopie électronique, dans les années 1950, ont permis de visualiser la membrane plasmique et de dévoiler sa structure en triple feuillet d'une épaisseur d'environ 75 Å. Les membranes de la plupart des cellules eucaryotes sont principalement constituées de phospholipides de sphingolipides et de cholestérol, mais également de nombreuses protéines. Ces protéines diffusent latéralement et librement dans la matrice lipidique à moins que leurs déplacements ne soient freinés par des associations avec d'autres constituants cellulaires (Singer and Nicolson 1972). Dans ce modèle, proposé par Singer et Nicolson en 1972 et connu sous le nom de mosaïque fluide, les protéines transmembranaires ressemblent à des icebergs, flottant sur une mer de lipides en deux dimensions (Singer and Nicolson 1972).

b- Composition lipidique de la membrane plasmique :

Les principaux lipides membranaires des cellules eucaryotes sont les phospholipides, le cholestérol et les sphingolipides. Ces molécules lipidiques sont synthétisées dans la cellule par le réticulum endoplasmique lisse (Cinti, Cook et al. 1992). Lors de sa synthèse, la bicouche lipidique de la membrane plasmique acquiert une structure asymétrique. En effet, le feuillet externe contient en majorité des glycolipides alors que le feuillet interne est composé en majorité de phospholipides (Rothman and Lenard 1977). Je ne détaillerai ici que la structure des phospholipides, molécules jouant un rôle important lors de l'apoptose et dans les phénomènes de clairance des corps apoptotiques.

Ces phospholipides (encore appelés glycérophospholipides) résultent de l'estérification du glycérol par deux acides gras et l'acide phosphorique (figure 18). Une grande variété de phospholipides existe dans la membrane plasmique ; ils diffèrent selon (i) la nature des acides gras liés au glycérol (en général une des deux chaînes est insaturée) et (ii) le

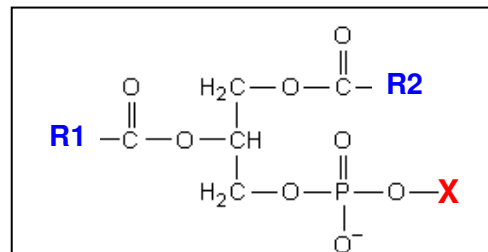
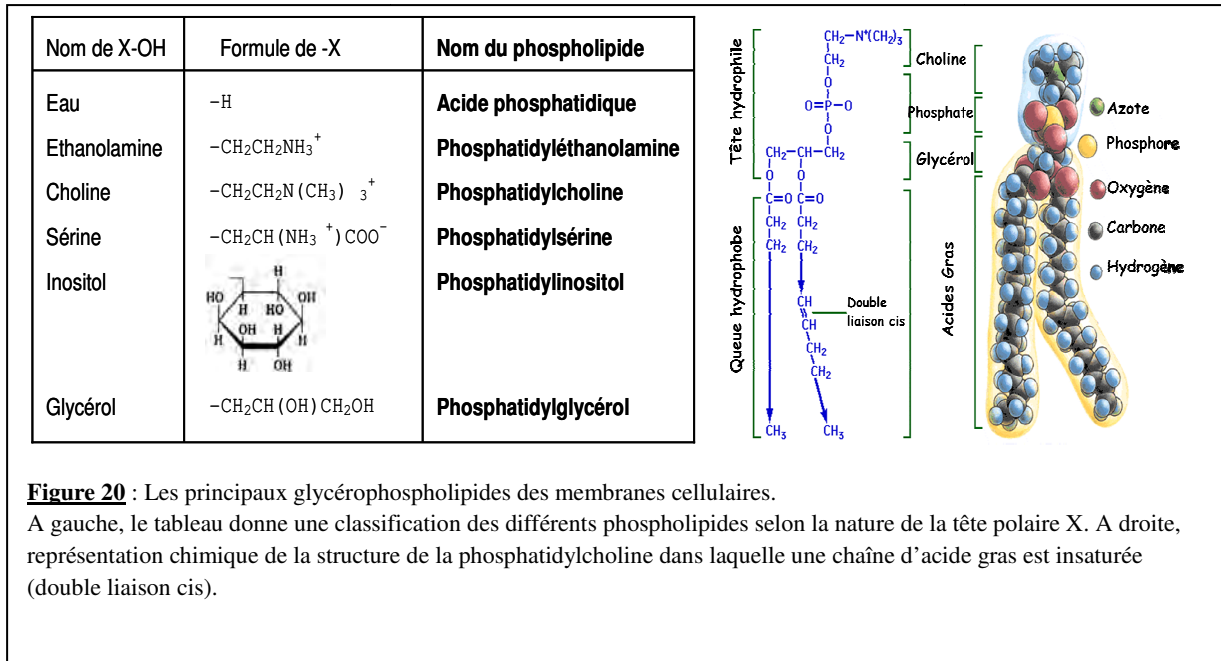


Figure 18 : Formule générale des glycérophospholipides. R1 et R2 représentent les chaînes d'acides gras, et X la tête polaire identifiant le type de phospholipide.

groupement chimique associé au phosphate du glycérol. Ces phospholipides sont des molécules à caractère amphipatique, la partie glycérol/phosphate étant hydrophile (la tête polaire) alors que les chaînes d'acides gras sont hydrophobes (queue apolaire). La figure 20 ci-dessous représente une classification des phospholipides présents dans la membrane plasmique selon la nature de leur tête polaire.



c- L'asymétrie membranaire :

La composition lipidique des deux feuilletts de la double couche est très différente. En effet, alors que les sphingolipides et la phosphatidylcholine se localisent majoritairement dans le feuillet externe de la membrane, les phospholipides à tête polaire aminée (*i.e.* phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine) sont majoritairement retrouvés dans le feuillet interne (Bretscher 1973). Cette asymétrie des phospholipides est maintenue, entre autres, par l'activité d'une protéine : l'aminophospholipide translocase (Seigneuret, Zachowski et al. 1984). Or, lors de l'apoptose, il y a perte de cette asymétrie membranaire et la phosphatidylsérine se redistribue dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Balasubramanian and Schroit 2003). En effet, l'aminophospholipide translocase est inhibée, par un mécanisme encore peu connu (Verhoven, Schlegel et al. 1995) et une scramblase est activée, grâce à l'entrée d'ions Ca^{2+} et à la phosphorylation de l'enzyme par une protéine kinase de type C (Frasch, Henson et al. 2000). Il existe néanmoins une maladie, appelée syndrome de Scott dans laquelle la scramblase ne peut pas être activée par une entrée de calcium, et pourtant, l'enzyme est activée normalement au cours de l'apoptose. Deux voies

distinctes pourraient donc activer la scramblase menant à la perte de l'asymétrie membranaire (Williamson, Christie et al. 2001).

Il se pourrait enfin que le transporteur ABC1 soit impliqué dans la redistribution des phospholipides au cours de l'apoptose (Hamon, Broccardo et al. 2000), mais sa contribution précise dans ce scénario reste à élucider.

2- Intérêts physiologiques de la clairance des corps apoptotiques :

L'élimination des cellules apoptotiques intervient grâce au mécanisme de phagocytose. Deux types de cellules (communément nommées phagocytes) peuvent être impliqués dans ce processus : les phagocytes dits « amateurs » ou ceux dits « professionnels ». Les phagocytes « professionnels », tels que les macrophages et les cellules dendritiques, sont des cellules mobiles capables d'infiltrer un grand nombre de tissus (Ablin, Verbovetski et al. 2005). Bien que ces cellules soient responsables de la phagocytose de la plupart des corps apoptotiques, un nombre croissant d'études tendent à montrer que d'autres cellules sont capable de prendre en charge l'élimination d'une cellule voisine mourante (*e.g.* les cellules endothéliales) (Williams, Colman et al. 2005). Néanmoins, ces phagocytes « amateurs » éliminent les cellules mortes plus lentement que les phagocytes « professionnels » (Clark, Palaniyar et al. 2002).

Cette clairance des corps apoptotiques est cruciale pour la formation et la transformation des organes pendant le développement, mais également pour l'homéostasie tissulaire. Par exemple, les macrophages peuvent induire l'apoptose et l'élimination de cellules endothéliales non désirées au cours de la régression des capillaires dans l'œil, processus essentiel dans le développement oculaire (Lang, Lustig et al. 1994).

La phagocytose des cellules apoptotiques entraîne également des conséquences importantes en termes de réponse immunitaire. En effet, la prise en charge des corps apoptotiques induit au niveau des macrophages (i) la libération de médiateurs anti-inflammatoires, tels que le TGF- β (Transforming Growth Factor- β), l'IL-10 (InterLeukin-10) ou la PGE2 (Prostaglandine E2) (Fadok, Bratton et al. 1998) ; mais également (ii) l'inhibition de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, comme le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) (Fadok, McDonald et al. 1998; McDonald, Fadok et al. 1999). Cette clairance « silencieuse » est importante afin d'éviter des réponses immunes contre des antigènes du soi¹⁰ dérivant de la cellule morte.

10 Toutes les cellules de l'organisme possèdent une marque particulière et reconnaissable permettant leur identification. Cette « carte d'identité » moléculaire est le système HLA (pour l'homme). Ce sont des molécules

3- Les grands principes de la clairance :

Beaucoup de récepteurs, d'adaptateurs et de molécules chimiotactiques sont impliquées dans la clairance des corps apoptotiques de plusieurs types cellulaires. Dans ce chapitre, je m'attacherai à présenter trois catégories de signaux : les signaux « eat-me », « don't eat-me » et « find-me », responsables de la clairance des corps apoptotiques. La liste des molécules impliquées dans ces mécanismes est longue et certainement non définitive aujourd'hui ; c'est pourquoi je ne prendrai que quelques exemples de molécules impliquées dans ces voies de signalisation, illustrant de façon claire les mécanismes d'élimination des cellules apoptotiques.

a- Les signaux « eat-me » :

Les signaux « eat-me » présents en surface des cellules apoptotiques représentent des marqueurs pour les phagocytes, afin d'identifier et d'éliminer ces cellules mourantes (figure 21). Parmi ces signaux, on retrouve des molécules qui apparaissent en surface des cellules, comme la phosphatidylsérine (PS) ou l'annexine I ; des molécules préexistantes mais modifiées, telles que ICAM-3 et CD31 ; et des changements de la charge globale de la surface cellulaire.

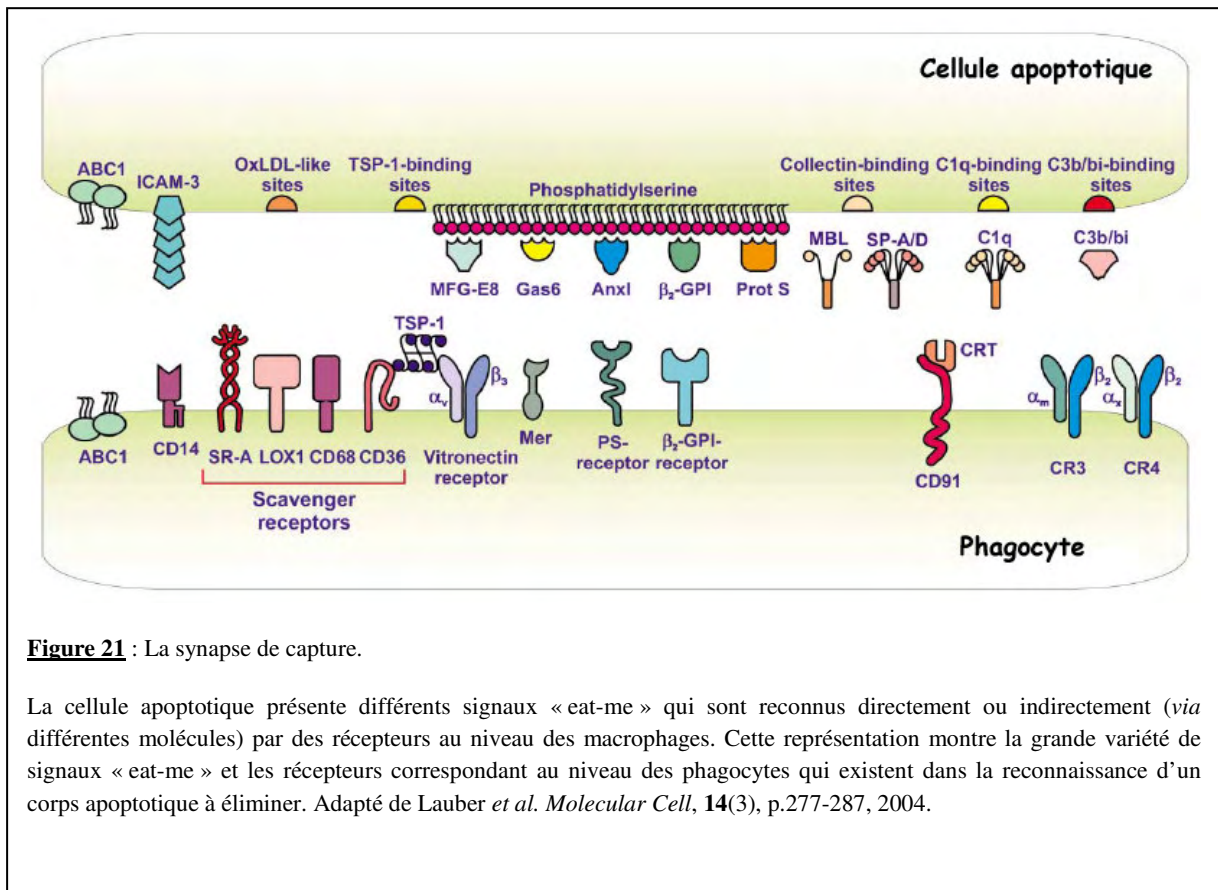
Le plus connu des signaux « eat-me » est la présence de PS. Une fois en surface de la cellule apoptotique, la PS est reconnue par différents récepteurs de phagocytes, le plus représentatif étant le récepteur de la PS (Fadok, Voelker et al. 1992). Plus récemment, il est apparu que la PS ne lierait pas directement son récepteur, mais de manière indirecte *via* l'Annexine I, une protéine intracellulaire, qui, au cours de l'apoptose, suit une translocation du cytosol vers des domaines riches en PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique (Arur, Uche et al. 2003). Ce principe basique de la reconnaissance de la PS par son récepteur *via* une molécule adaptatrice est également vrai pour certains des autres récepteurs en surface des phagocytes, comme le récepteur de la fibronectine (intégrine $\alpha V\beta 3$), le récepteur tyrosine kinase Mer, et le récepteur de la $\beta 2$ -GPI ($\beta 2$ -GlycoProtein I), qui mettent en jeu les molécules de pontage correspondantes MFG-E8 (Milk Fat Globule Epidermal growth factor-8), Gas6 et $\beta 2$ -GPI (Balasubramanian, Chandra et al. 1997; Rubartelli, Poggi et al. 1997; Ishimoto, Ohashi et al. 2000; Scott, McMahon et al. 2001; Hanayama, Tanaka et al.

portées par la membrane cellulaire de toutes les cellules nucléées. Le complexe majeur d'histocompatibilité et le complexe mineur (les groupes sanguins) représentent des molécules marqueurs du soi.

Le non-soi d'un individu est défini par des récepteurs cellulaires ou toute autre molécule différente du soi et ainsi reconnus comme étrangers par notre organisme. Le non-soi déclenche une réaction immunitaire.

2002; Borisenko, Iverson et al. 2004). Notons qu'une autre protéine de pontage liant la PS a été récemment identifiée : la protéine S (ProtS), connue pour se lier aux récepteurs de la famille des récepteurs tyrosine kinase Mer (Anderson, Maylock et al. 2003).

En plus de la réorientation de la PS, il existe d'autres signaux « eat-me » en surface de la cellule apoptotique, mais ceux-ci restent toutefois moins bien caractérisés. C'est par exemple le cas de sites évoquant les lipoprotéines de faible densité oxydées (oxLDL) (Chang, Bergmark et al. 1999), de sites liant la thrombospondine-1 (TSP-1) (Stern, Savill et al. 1996) ou les protéines de la voie du complément C1q ou C3b/bi (Takizawa, Tsuji et al. 1996), des sites de liaison pour différentes collectines, telles que la lectine liant le mannose (MBL : Mannose Binding Lectin) ou les protéines du surfactant pulmonaire A et D (SP-A et -D) (Vandivier, Ogden et al. 2002). Les sites oxLDL sont reconnus par divers membres de la famille des récepteurs de type scavenger, tel que le récepteur SR-A (class A macrophage Scavenger Receptor) (Platt, Suzuki et al. 1996), le récepteur LOX-1 (Lectin-like oxLDL-receptor 1) (Oka, Sawamura et al. 1998), CD 68 (Erdosova, Hlavkova et al. 2002) et CD36 (Ren, Silverstein et al. 1995). D'autres membres de la famille des intégrines, également connus sous le nom de récepteurs du complément 3 et 4 (CR3 et CR4), sont responsables de la reconnaissance des sites de liaison de C3b/bi au niveau des corps apoptotiques (Takizawa, Tsuji et al. 1996) (Mevorach, Mascarenhas et al. 1998).



Pour terminer avec ces signaux « eat-me » je citerai enfin le rôle de la lysophosphatidylcholine (LPC), générée dans un contexte apoptotique par un type particulier de phospholipase A2. Ayant fait l'objet d'une grande partie de mon travail de thèse, je consacrerai un paragraphe relatif à cette signalisation particulière.

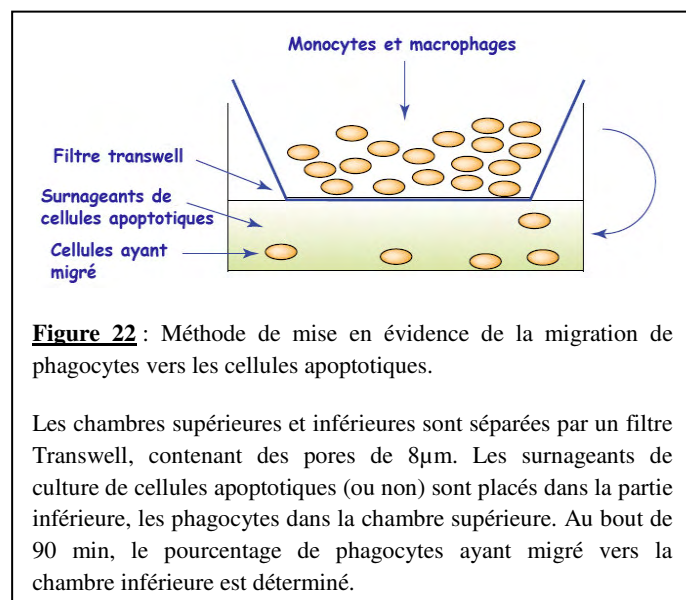
b- Les signaux « don't eat-me » :

Les cellules vivantes empêchent leur propre digestion en présentant aux phagocytes des signaux « don't eat-me ». Brown et ses collaborateurs ont montré qu'une interaction homophile entre des molécules de CD31, présentes en surface des lymphocytes vivants et des macrophages, entraînait le détachement, actif et température dépendant, des lymphocytes vis-à-vis des macrophages (Brown, Heinisch et al. 2002). Donc, CD31, peut fonctionner comme un signal « don't eat-me ». Au cours de l'apoptose par contre, ce signal de détachement est désactivé, entraînant l'élimination de la cellule mourante (Brown, Heinisch et al. 2002). L'utilisation de signaux de répulsion sur les cellules peut s'étendre à d'autres types cellulaires. En surface de cellules vivantes, les marqueurs du soi sont constamment utilisés par le système immunitaire pour distinguer les corps étrangers des cellules hôtes. C'est par exemple le cas de CD47 en surface des cellules rouges, qui agit comme un signal « don't eat

me », en envoyant un message négatif de phagocytose aux macrophages de la rate *via* le récepteur SIRP α (Oldenborg, Zheleznyak et al. 2000). La régulation négative de la phagocytose peut donc être un mécanisme général pour empêcher activement l'ingestion de cellules non apoptotiques.

c- Les signaux « find-me » :

Les signaux « eat-me » et les signaux « don't eat-me » sont donc cruciaux pour la reconnaissance des corps apoptotiques par les macrophages. Néanmoins, ces signaux sont des signaux de proximité et ne peuvent agir si le phagocyte et la cellule apoptotique se trouvent à distance l'un de l'autre. Il existe donc des signaux qui induisent la migration des macrophages au niveau des sites d'apoptose, afin de faciliter l'élimination rapide des corps apoptotiques. Dans cette idée, Kirsten Lauber et ses collaborateurs ont montré que les surnageants de culture de plusieurs types de cellules apoptotiques contenaient une activité chimio-attractante pour les monocytes et les macrophages primaires (Lauber, Bohn et al. 2003). Dans cette étude, dont le protocole est repris en figure 22, des monocytes et des macrophages ont été placés dans la partie supérieure d'une chambre Transwell (contenant un filtre poreux), et les surnageants de culture de cellules apoptotiques (ou non) ont été placés dans la chambre inférieure. En déterminant le pourcentage de cellules migrant à travers le filtre vers le surnageant, les auteurs démontrèrent que les cellules apoptotiques uniquement sécrétaient un facteur chimiotactique dans le surnageant. En utilisant plusieurs techniques, dont la spectrométrie de masse, les auteurs ont pu identifier ce facteur comme étant la lysophosphatidylcholine (LPC). Lauber *et al.* ont pu montrer qu'une phospholipase A2 indépendante du calcium (iPLA2) pouvait être clivée par la caspase-3 dans les cellules apoptotiques et ainsi générer de la LPC à partir de la phosphatidylcholine membranaire. Dans cette même étude, les auteurs ont finalement démontré que l'injection intrapéritonéale ou sous-cutanée de surnageants de cellules apoptotiques ou de LPC purifiée pouvait également induire une attraction de macrophages *in vivo* (Lauber, Bohn et al. 2003).



4- L'exemple de la signalisation dépendante de l'iPLA2 :

a- Les différentes phospholipases de type A2 :

La superfamille des PLA2 constitue un groupe hétérogène d'enzymes dont la caractéristique commune est l'hydrolyse d'un glycérophospholipide en position *sn*-2. Aujourd'hui, on dénombre 22 gènes encodant différentes PLA2 chez les mammifères. On peut classer ces enzymes en quatre familles principales : les sPLA2 (secretory PLA2), les cPLA2 (cytosolic PLA2), les iPLA2 (Ca²⁺ independent PLA2), et les PAF-AH (Platelet Activating Factor AcetylHydrolase). La classification d'une phospholipase A2 dans une de ces familles repose sur le mécanisme catalytique et les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'enzyme. Le tableau présenté ci-dessous propose une classification de ces enzymes, selon les besoins en calcium et la localisation cellulaire de l'enzyme.

Famille	Groupes compris	Besoin de Calcium pour l'activité	Localisation cellulaire
sPLA2	I-III, V, IX-XIV	Oui	Extracellulaire
cPLA2	IV	Oui	Intracellulaire
iPLA2	VI	Non	Intracellulaire
PAF-AH	VII, VIII	Non	Extra et Intracellulaire

Tableau 1 : Classification des Phospholipases A2.

Les 14 groupes de phospholipases A2 peuvent être classés en 4 familles principales, selon leurs besoins en calcium et leur localisation cellulaire.

La famille des sPLA2 constitue un groupe d'enzyme de faible masse moléculaire (environ 14kDa) qui ne manifeste pas de spécificité envers l'acide gras situé en position 2 du phospholipide qu'elle clive. Son mode d'action, extracellulaire, nécessite des concentrations de calcium de l'ordre du micromolaire. Les sPLA2 participent à de nombreux processus pathologiques en libérant l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires qui induit la production des médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, les leucotriènes ou les thromboxanes (Balsinde, Balboa et al. 1999; Six and Dennis 2000).

Les cPLA2 ont une masse moléculaire de 85 kDa et sont retrouvées dans le cytosol de quasiment toutes les cellules et clivent préférentiellement les phospholipides possédant l'acide arachidonique en position 2. Les phospholipases de ce groupe peuvent être phosphorylées par des kinases de la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), ce qui suggère une

fonction de cette famille d'enzymes dans les cascades de signalisation cellulaire (Balsinde, Balboa et al. 1999; Gijon, Spencer et al. 2000).

L'enzyme PAF-AH catalyse l'hydrolyse de la liaison ester en position *sn*-2 du PAF et des autres phospholipides pro-inflammatoires, atténuant ainsi leur activité biologique (Tjoelker and Stafforini 2000).

La dernière famille, représentée par les iPLA2, présente certaines caractéristiques communes avec les sPLA2 et les cPLA2. En effet, les iPLA2 ne présentent pas de spécificité vis-à-vis de l'acide gras en position 2 (comme une sPLA2). Elles ont par contre une masse moléculaire et une localisation intracellulaire communes avec les cPLA2. Néanmoins, les iPLA2 ont un caractère propre, permettant leur classification dans un groupe à part : elles ne nécessitent pas la présence de calcium pour fonctionner (Balsinde, Balboa et al. 1999; Six and Dennis 2000).

b- Le rôle de l'iPLA2 dans l'apoptose :

L'iPLA2-VIA est une enzyme cytosolique de 85kDa. Plusieurs éléments distinguent cette enzyme des autres PLA2, notamment la présence de sept à huit domaines ankyrines dans la partie Nterminale de la protéine, l'existence de multiples variants d'épissage et la présence de sites consensus de clivage par la caspase-3.

L'iPLA2-VIA joue un rôle dans le maintien des niveaux homéostatiques de LPC dans les cellules vivantes. En effet, l'inhibition de l'activité enzymatique par le bromoenol lactone (BEL), un inhibiteur suicide spécifique de la famille iPLA2, entraîne des diminutions notables de l'équilibre de la LPC cellulaire (Balsinde and Dennis 1997; Winstead, Balsinde et al. 2000).

Les premières indications d'un rôle de l'iPLA2-VIA dans l'apoptose ont été apportées par Atsumi et ses collaborateurs, lors de leurs études sur les promonocytes U937 traités avec le ligand Fas ou le TNF α en présence de cycloheximide (Atsumi, Tajima et al. 1998; Atsumi, Murakami et al. 2000). L'apoptose induite par ces agents était accompagnée du clivage des phospholipides membranaires et de la libération d'acides gras, notamment l'acide arachidonique. Un clivage de l'enzyme par la Caspase-3 fut également mis en évidence, donnant naissance à une PLA2 tronquée d'un des domaines ankyrines, d'une masse moléculaire d'environ 70 kDa et présentant une augmentation de son activité.

D'autres études, menées par Turk et ses collaborateurs, ont mis en évidence que, dans des cellules induites en apoptose, la surexpression de l'iPLA2 VI-A accélère l'hydrolyse de la membrane plasmique et l'ampleur de l'apoptose sur cette dernière (Ramanadham, Hsu et al.

2004). Au contraire, l'inhibition de cette iPLA2 par le BEL (BromoEnol Lactone) empêchait l'apoptose dans ces cellules induites. De la même façon que dans les travaux d'Atsumi *et al.*, Turk mit en évidence un clivage de l'iPLA2 par la caspase-3, générant un fragment de 62 kDa, plus actif et associé au noyau (Ramanadham, Hsu *et al.* 2004).

Ces différents arguments convergent donc vers un rôle de l'iPLA2 dans l'apoptose. Mais à quel(s) niveau(x) cette enzyme intervient-elle ? Si l'iPLA2 joue un rôle mineur dans le mécanisme apoptotique à proprement parler, elle joue par contre un rôle majeur dans la formation de signaux « find-me » et « eat-me » menant à la clairance des corps apoptotiques (Savill and Fadok 2000; Grimsley and Ravichandran 2003).

c- iPLA2 et signaux « eat-me » :

Les phospholipases A2 clivent un phospholipide en position 2, pour former un lysophospholipide et libérer un acide gras. Dans le cadre de l'apoptose, une étude parue en 2002 a permis de montrer que l'iPLA2, au cours de l'apoptose, clivait la phosphatidylcholine de la membrane plasmique afin

de générer de la lysophosphatidylcholine (LPC) (Kim, Gershov *et al.* 2002). Dans cette même étude, Kim *et al.* ont montré que la formation de LPC entraînait par la suite la liaison d'une classe particulière d'immunoglobulines en surface de la cellule apoptotique. Ces immunoglobulines sont les IgM, connues pour activer la voie du complément menant finalement à la phagocytose. De plus, l'ajout de BEL induit l'inhibition de la liaison de ces IgM en surface des cellules induites en apoptose. Il existe donc une corrélation entre l'activité iPLA2, la formation de LPC et la liaison des IgM lors de l'apoptose. La LPC générée par l'action de l'iPLA2 peut donc servir de signal « eat-me » en recrutant les IgM circulantes. Une fois liées en surface de la cellule mourante, les IgM peuvent recruter à leur tour la protéine C1q, qui active alors la voie du complément *via* C3b/bi ou bien interagit avec CD91 par l'intermédiaire de la calréticuline, les deux phénomènes menant à l'ingestion de la cellule par les phagocytes (figure 23) (Lauber, Blumenthal *et al.* 2004).

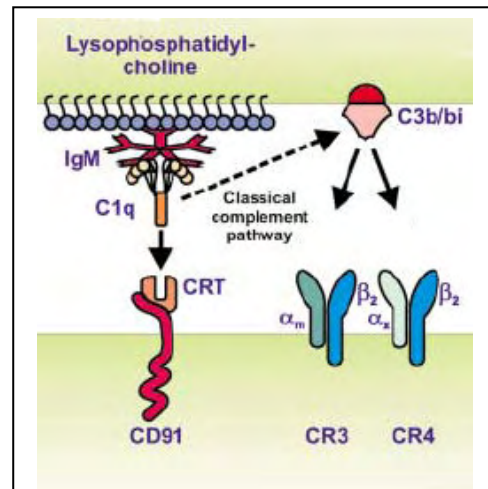


Figure 23 : Signalisation de type « eat-me » induite par l'iPLA2.

La formation de LPC à partir de la PC conduit au recrutement des IgM naturelles à la surface du corps apoptotique. La protéine adaptatrice C1q peut alors se lier aux IgM et induire la voie du complément (avec liaison de C3b/bi) ou interagir directement avec son récepteur (CD91) au niveau du macrophage. Adapté de Lauber *et al.* *Molecular Cell*, **14**(3), p.277-287, 2004.

d- iPLA2 et signaux « find-me » :

Comme discuté dans le paragraphe relatif aux signaux « find-me », la LPC générée par l'iPLA2 peut recruter directement les phagocytes. Dans ce contexte, l'iPLA2 est clivée par la caspase-3, ce qui permet la formation d'une forme tronquée de l'enzyme (26kDa) hautement active. L'iPLA2 clivée hydrolyse alors la phosphatidylcholine au niveau de la membrane plasmique, et la LPC générée est externalisée, sécrétée et migre vers les macrophages, en surface desquels elle trouve son récepteur. Il y a alors migration des phagocytes et ingestion du corps apoptotique (figure 24) (Lauber, Bohn et al. 2003). Dans ce modèle, un point reste à éclaircir. En effet, les mécanismes d'externalisation de la LPC ne sont pas élucidés. Il se pourrait que la translocation de la LPC du feuillet interne vers le feuillet externe se déroule de la même façon que dans le cas de la réorientation de PS. Dans ce cas, le mélange des phospholipides (« scrambling ») permettrait son externalisation, comme pour la libération du PAF (un médiateur lipidique dont la structure est similaire à celle de la LPC) à partir de la membrane plasmique des neutrophiles activés (Bratton 1993).

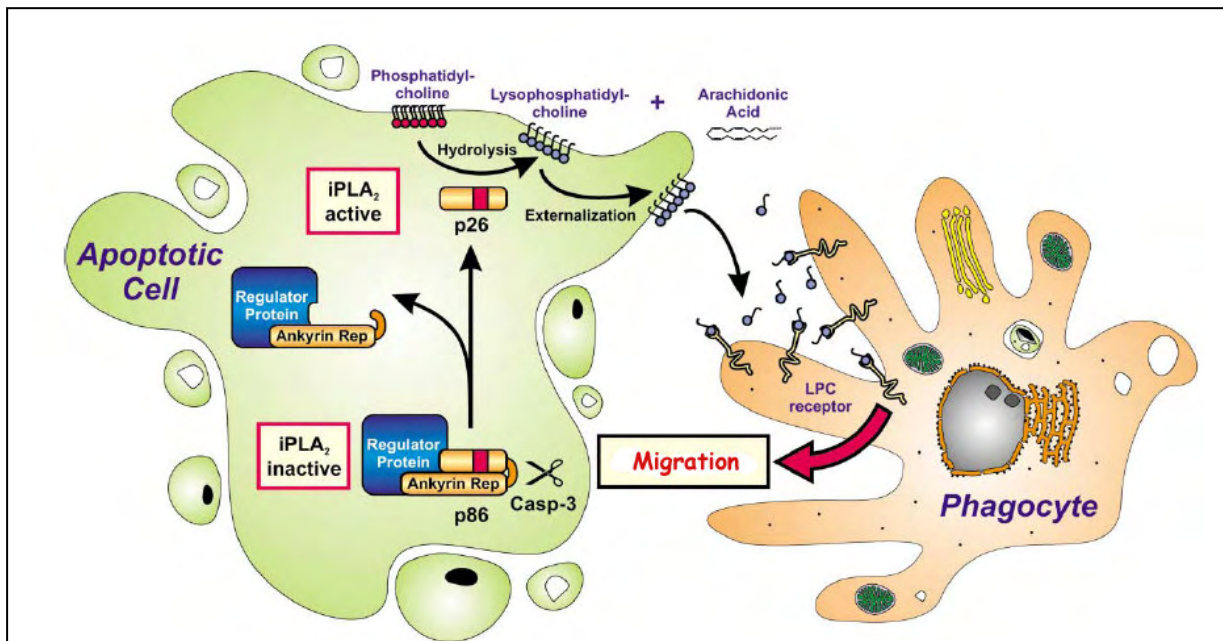


Figure 24 : La signalisation de type « find-me » induite par l'iPLA2.

Au cours de l'apoptose, l'iPLA2 est clivée et activée par la caspase-3 facilitant ainsi le clivage de la PC membranaire. Il y a alors formation de LPC et d'acide arachidonique. Cette LPC est alors libérée par un mécanisme encore inconnu et trouve son récepteur (LPC receptor) au niveau de la membrane des phagocytes. La liaison de la LPC avec son récepteur induit la migration du phagocyte vers le corps apoptotique à éliminer. Adapté de Lauber *et al. Molecular Cell*, **14**(3), p.277-287, 2004.

5- La phagocytose des corps apoptotiques :

Que se passe-t-il après la reconnaissance d'un corps apoptotique et son contact avec le macrophage ? Les voies de signalisation impliquées dans la réorganisation du cytosquelette du macrophage qui permettent finalement l'internalisation du corps apoptotique ne sont pas encore clairement définies. Néanmoins, des données sur la machinerie de phagocytose ont été obtenues, à partir de l'analyse génétique de défauts de clairance des corps chez le ver *C.elegans*. Dans cet organisme, sept gènes indépendants impliqués dans l'élimination des cellules apoptotiques ont été identifiés (Gumienny and Hengartner 2001). Les protéines correspondantes

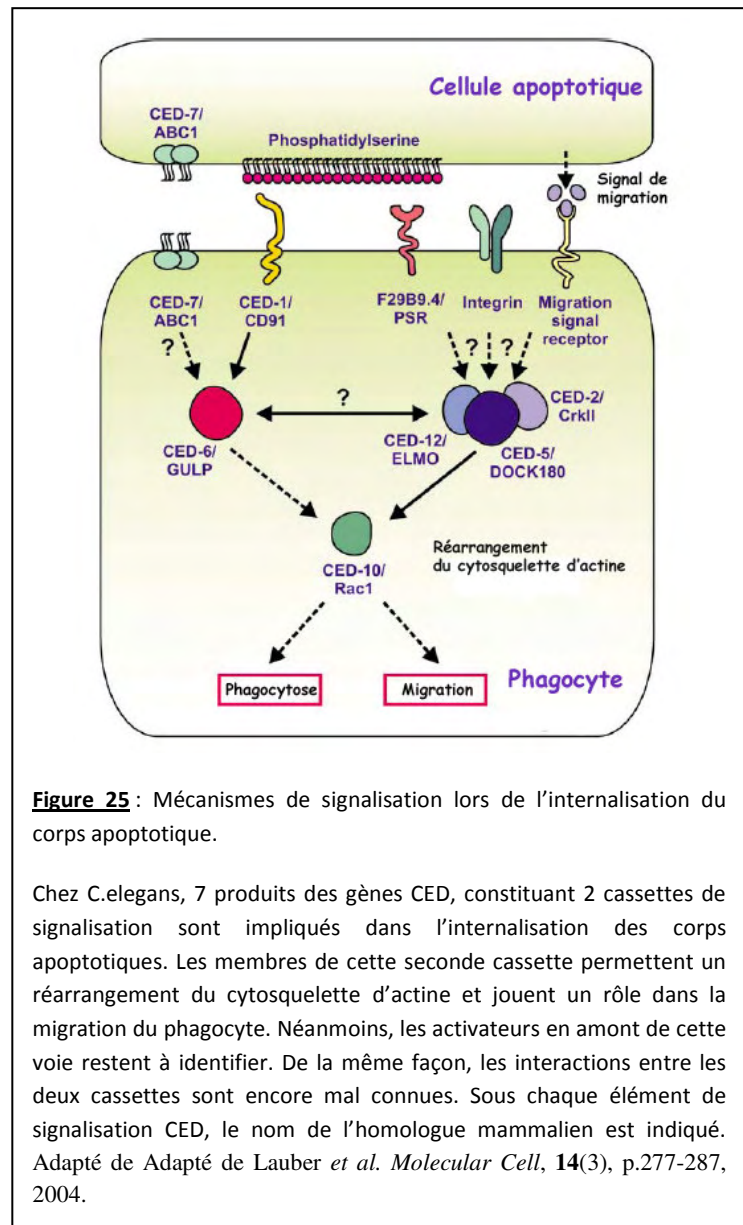


Figure 25 : Mécanismes de signalisation lors de l'internalisation du corps apoptotique.

Chez *C.elegans*, 7 produits des gènes CED, constituant 2 cassettes de signalisation sont impliqués dans l'internalisation des corps apoptotiques. Les membres de cette seconde cassette permettent un réarrangement du cytosquelette d'actine et jouent un rôle dans la migration du phagocyte. Néanmoins, les activateurs en amont de cette voie restent à identifier. De la même façon, les interactions entre les deux cassettes sont encore mal connues. Sous chaque élément de signalisation CED, le nom de l'homologue mammalien est indiqué. Adapté de Lauber *et al. Molecular Cell*, **14**(3), p.277-287, 2004.

sont classées en deux cassettes de signalisation : (i) le module de signalisation comprenant *ced-1*, *ced-6* et *ced-7* et (ii) la voie *ced-2- ced-5-ced-10-ced-12*. (figure 25).

Les protéines transmembranaires CED-1 et CED-7 et leurs homologues mammaliens, la calreticuline/heat shock protein CD91 et le transporteur ABC1, sont impliqués, de façon directe ou indirecte, dans la reconnaissance des corps (Moynault, Luciani et al. 1998; Wu and Horvitz 1998; Zhou, Hartweg et al. 2001) ; alors que CED-6/GULP représente une protéine adaptatrice, avec des domaines typiques d'interaction protéine-protéine, comme un domaine de liaison à la phosphotyrosine, un motif « Leucine zipper » et une région riche en proline (Liu and Hengartner 1999; Su, Nakada-Tsukui et al. 2002). Les mécanismes détaillés de leurs interactions mutuelles restent encore à déterminer. Néanmoins, au vue des avancées expérimentales dans la détermination des signaux « eat-me » chez les mammifères, nous

pouvons imaginer un scénario dans lequel CED-7/ABC1 serait responsable de l'externalisation de PS au niveau de la cellule apoptotique (Marguet, Luciani et al. 1999), qui est à son tour reconnue par le macrophage via CED-1/CD91 (figure 25). Dans cette optique, CED-7 tient une position centrale, puisqu'il joue un double rôle, à la fois au niveau du phagocyte, mais aussi au niveau de la surface de la cellule apoptotique. La protéine adaptatrice CED-6/GULP, qui interagit physiquement avec CED-1/CD91 (Su, Nakada-Tsukui et al. 2002) pourrait transduire le signal de reconnaissance à l'intérieur du macrophage afin d'amorcer les réarrangements du cytosquelette nécessaires à la phase de phagocytose. Les acteurs engagés dans la suite du processus comprennent la seconde partie de la cassette identifiée chez *C.elegans*, appelés *ced-2*, *ced-5*, *ced-10* et *ced-12*, et leurs homologues mammaliens respectifs : CrkII, Dock180, Rac et ELMO (Wu and Horvitz 1998; Reddien and Horvitz 2000; Gumienny and Hengartner 2001; Wu, Tsai et al. 2001; Zhou, Hartweg et al. 2001). Des études de génétique inverse ont démontré que la surexpression de CED-10 peut compenser des défauts de CED-2, CED-5 et CED-12, ce qui suggère que CED-10 fonctionne en aval de CED-2, CED-5 et CED-12 (Reddien and Horvitz 2000; Gumienny and Hengartner 2001; Wu, Tsai et al. 2001; Zhou, Hartweg et al. 2001).

Ces données ont également été vérifiées dans le système mammifère, et le tableau 2 présenté ci-dessous présente les homologues de ces protéines CED chez les mammifères et leurs fonctions respectives.

<i>C.elegans</i>	Homologue mammalien	Fonction
CED-1	CD91	Récepteur transmembranaire
CED-6	GULP	Protéine adaptatrice
CED-7	ABC1	Transporteur (ATP Binding Cassette)
CED-2	CrkII	Protéine adaptatrice
CED-5	Dock180	fonctionne avec ELMO comme un facteur d'échange GTP/GDP pour Rac
CED-10	Rac	Petite GTPase
CED-12	ELMO	fonctionne avec Dock180 comme un facteur d'échange GTP/GDP pour Rac

Tableau 2 : Les gènes chez *C.elegans* et leurs homologues mammaliens impliqués dans la clairance des corps apoptotiques. Dans la colonne de droite, les différentes fonctions attribuées à chacun de ces gènes sont résumées.

Deuxième partie :

Travaux de Thèse

LA SECRETION D'EXOSOMES PAR LE RETICULOCYTE : UN PROCESSUS A PART ENTIERE DE LA DIFFERENCIATION ERYTHROCYTAIRE :

Article n°1 : La sécrétion d'exosomes dans le contexte de la maturation du réticulocyte.

Depuis la découverte des exosomes dans les années 1980 par R. Johnstone, ces vésicules ont fait l'objet de nombreux travaux et aujourd'hui, les mécanismes conduisant à leur formation commencent à être élucidés. En effet, tous les exosomes dérivent de la fusion d'un EMV avec la membrane plasmique, libérant alors les vésicules internes dans le milieu extracellulaire. Selon le type cellulaire par contre, les molécules associées aux vésicules varient. Ainsi, si les exosomes de réticulocyte véhiculent de grandes quantités de récepteur de la transferrine, les exosomes issus de cellules présentatrices d'antigène, n'en contiennent que peu mais sont par contre enrichis en molécules du CMH-II. Cette différence de composition entraîne la différence de fonction proposée pour les différents groupes d'exosomes selon le type cellulaire étudié. Ainsi, du fait de leur enrichissement en molécules de classe II, les exosomes de cellules présentatrices d'antigène pourraient être impliqués dans la communication intercellulaire au cours de la réponse immunitaire.

Les exosomes issus de réticulocyte, par contre, pourraient représenter un mode d'élimination efficace de protéines inutiles voire dangereuses pour la cellule en mature. Dans ce contexte de différenciation érythropoïétique, les réticulocytes sécrètent un grand nombre d'exosomes dans la circulation sanguine. En effet, le corps humain contient environ 5 litres de sang, ce qui correspond à un total de $2,5 \times 10^{13}$ cellules rouges. Or, chaque jour, 2×10^{11} érythrocytes âgés meurent et le même nombre de réticulocytes rejoignent la circulation sanguine où ils achèvent leur maturation en 48 heures. Au cours de cette maturation, le réticulocyte élimine tous ses compartiments internes et remodèle sa membrane afin d'acquérir la forme typique de disque biconcave. En tenant compte de la surface membranaire perdue lors de la maturation du réticulocyte (entre 9 et $30 \mu\text{m}^2$) (Waugh, McKenney et al. 1997; Da Costa, Mohandas et al. 2001), nous pouvons envisager la libération d'environ 1500 exosomes par cellule, ce qui correspondrait à 10^{14} vésicules libérées chaque jour dans la circulation sanguine.

Lors de la maturation des réticulocytes, il y a une grande perte de lipides. Environ 8% de la quantité totale des phospholipides sont perdus sous forme d'exosomes (Vidal, Sainte-Marie et

al. 1989). Ces exosomes contribuent donc à la diminution de membrane observée lors de la maturation. Dans le cas des réticulocytes, la composition lipidique des exosomes est voisine de celle de la membrane plasmique, en terme de contenu phospholipidique, et de ratios protéines/lipides et phospholipides/cholestérol (Johnstone, Adam et al. 1987; Vidal, Sainte-Marie et al. 1989). Néanmoins, il apparaît qu'il pourrait y avoir une réelle sélection des lipides lors de la biogenèse des exosomes, probablement en relation avec la longueur et la saturation des chaînes d'acides gras, comme démontré auparavant lors de l'étude du trafic intracellulaire d'analogues lipidiques fluorescents (Vidal, Mangeat et al. 1997). De plus, les rafts lipidiques sont présents dans les exosomes de réticulocyte contribuant à la libération de plusieurs protéines spécifiquement, associées à ces domaines lipidiques (de Gassart, Geminard et al. 2003). C'est le cas par exemple de l'acétylcholinestérase, une protéine ancrée par un GPI dont la perte associée aux exosomes représente 50% de sa quantité totale (Johnstone, Adam et al. 1987). D'autres protéines ancrées par un GPI sont également retrouvées associées aux exosomes, comme CD55 et CD59 (Rabesandratana, Toutant et al. 1998).

La maturation des réticulocytes détermine également l'acquisition de la forme biconcave. Cette forme optimise la surface d'échange par rapport au volume cellulaire. La diminution de volume permettant d'atteindre une surface cellulaire correcte est probablement rendue possible grâce à la sécrétion d'exosomes et au volume qu'ils cumulent. Néanmoins, le volume de la cellule rouge est conditionné par son contenu en eau, lui-même dépendant de la pompe ATPase Na⁺ K⁺. Cette pompe est également partiellement sécrétée avec les exosomes (Johnstone, Adam et al. 1987), suggérant ainsi que les exosomes contribuent également à la régulation du volume cellulaire.

D'autres protéines membranaires sont éliminées par les exosomes de réticulocyte. Comme évoqué auparavant, le RTf est l'exemple le plus frappant, puisque la totalité du récepteur est éliminée par le réticulocyte, *via* les exosomes. Les mécanismes de tri du RTf vers les exosomes de réticulocyte ne sont toujours pas complètement élucidés, néanmoins, lors de mon stage de DEA, j'ai pu, en collaboration avec Aude De Gassart et Charles Geminard (alors étudiants en thèse), mettre en évidence que la protéine adaptatrice AP2, était dégradée par le protéasome lors de la maturation des réticulocytes, le signal d'internalisation YTRF du RTf étant ainsi laissé libre et pouvant interagir avec la protéine Alix. Cette interaction pourrait être un élément clé pour la compréhension des mécanismes de tri du RTf vers les exosomes, puisqu'Alix interagit avec les complexes ESCRT, eux-mêmes impliqués dans la biogenèse des EMVs (Article en annexe).

Enfin, concernant la sécrétion d'exosomes dans le contexte de différenciation érythrocytaire, plusieurs éléments permettent de considérer cette sécrétion comme un évènement cellulaire relié à l'expulsion du noyau et à la mitoptose. En effet, l'énucléation des érythroblastes est l'un des évènements cellulaires principaux de la différenciation des cellules rouges de mammifère. Ce processus précède la perte des mitochondries, autre évènement majeur de la différenciation. La chronologie de ces évènements n'est sûrement pas fortuite, si l'on considère le rôle des mitochondries dans l'apoptose. Cette perte programmée des mitochondries, appelée mitoptose (Skulachev 2001), met en jeu une 15-LOX spécifique, dont la traduction est spécifiquement activée au stade de réticulocyte circulant (van Leyen, Duvoisin et al. 1998). L'enzyme peut se lier à la membrane mitochondriale induisant la rupture de la membrane externe. De plus, Bcl-xL, une protéine antiapoptotique qui s'accumule dans les érythroblastes avant l'énucléation, diminue progressivement lors de la maturation des réticulocytes (Koury, Koury et al. 2005). La libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors de la dégradation des mitochondries peut également induire l'oxydation des protéines cytosoliques au cours de la maturation et leur dégradation par le protéasome (Grune, Reinheckel et al. 1996). Enfin, soulignons qu'une activité caspase-3 a également été trouvée dans les exosomes de réticulocyte (de Gassart, Geminard et al. 2003).

Considérant le tri des protéines, il existe des similitudes entre l'énucléation et la sécrétion d'exosomes. Des protéines (*e.g.* intégrine $\beta 1$) perdues lors de l'énucléation en étant spécifiquement enrichies dans la membrane plasmique entourant les noyaux (Lee, Gimm et al. 2004), sont également préférentiellement associées aux exosomes libérés lors de la maturation des réticulocytes (Rieu, Geminard et al. 2000). A l'inverse, certaines protéines retenues à la surface du réticulocyte naissant lors de l'énucléation (*e.g.* glycophorines, bande 3) ne sont pas retrouvées dans les exosomes. Tout se passe comme si les deux phénomènes (énucléation et sécrétion d'exosomes) concouraient au remodelage de la membrane plasmique de la cellule rouge mature en éliminant spécifiquement les mêmes protéines.

Les exosomes jouent donc un rôle majeur dans le processus de maturation du réticulocyte, et ce phénomène de sécrétion peut donc être assimilé à une étape clé dans la différenciation de la lignée érythropoïétique. Ces notions sont reprises dans l'article n°1.

LES EXOSOMES SECRETES PAR LES RETICULOCYTES LIENT DES IgMs NATURELLES : INTERVENTION D'UNE PHOSPHOLIPASE ENDOSOMALE DE TYPE iPLA2 ACTIVABLE PAR LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

Article n°2 : Bases moléculaires de la clairance des exosomes de réticulocyte :

Nous venons de voir que les exosomes sécrétés par les réticulocytes sont sécrétés en grande quantité, qu'ils permettent l'élimination de protéines obsolètes et un remodelage membranaire participant probablement à l'acquisition de la forme de disque biconcave de l'érythrocyte naissant.

Néanmoins, une question persiste : Quel est le devenir de ces exosomes de réticulocyte, une fois libérés dans la circulation sanguine ?

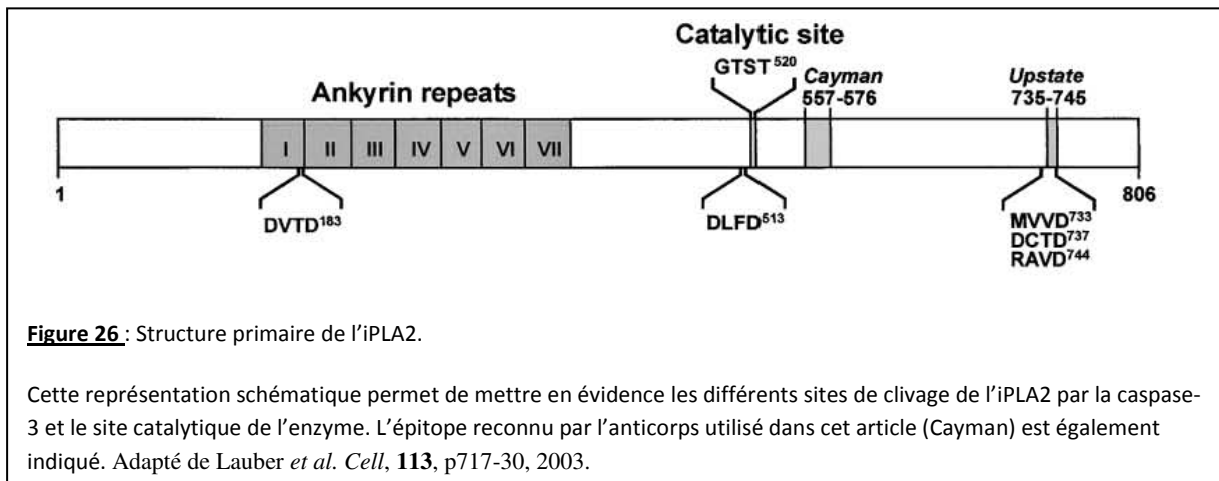
On peut imaginer que les vésicules, une fois libérées, soient ingérées par des cellules spécialisées, mais contrairement aux exosomes de cellules présentatrices d'antigène, les exosomes de réticulocyte ne présentent pas l'antigène et ne transmettent pas non plus de signal pouvant entraîner une réponse immunitaire. Par contre, ces exosomes doivent être reconnus comme du soi, et leur élimination doit toujours avoir lieu dans un contexte de tolérance, empêchant les réactions inflammatoires et des réponses non souhaitées contre le soi.

Ce processus d'élimination rappelle celui des cellules apoptotiques que j'ai détaillé dans le dernier chapitre de l'introduction. En effet, l'apparition des signaux « eat-me » en surface des corps apoptotiques permet leur reconnaissance par les phagocytes dans un contexte non-inflammatoire. Parmi eux, nous nous sommes intéressés à la formation de lysophosphatidylcholine à partir de la phosphatidylcholine membranaire. La formation de cette LPC est assurée par une activité enzymatique iPLA2, pouvant elle-même être activée par une activité caspase 3. Cette LPC peut alors recruter les IgM naturelles en surface du corps à éliminer et activer en aval la voie du complément, permettant à terme l'ingestion du corps à éliminer par les phagocytes.

Or, deux études menées au laboratoire ont permis de mettre en évidence (i) une activité de type iPLA2 (Bette-Bobillo and Vidal 1995) et (ii) une activité caspase 3 (de Gassart, Geminard et al. 2003) dans les exosomes de réticulocyte. Nous avons donc voulu voir si, comme dans le cas des corps apoptotiques, l'activité iPLA2 contenue dans les exosomes de réticulocyte était, au moins pour partie, responsable de leur clairance une fois libérés par le réticulocyte. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article n°2.

Récapitulatif des résultats :

La présence d'une activité de type iPLA2 associée aux exosomes de réticulocyte nous a conduit à déterminer l'origine cellulaire de l'enzyme. Le premier point de cette étude a donc été de définir le compartiment d'où est issue l'enzyme. Par fractionnement subcellulaire, nous avons pu montrer que la forme native de l'enzyme (85kDa) provenait majoritairement du compartiment endosomal. Nous avons également trouvé une forme tronquée de l'enzyme, à la fois dans les endosomes et les exosomes de réticulocytes. Cette forme de 30kDa peut correspondre à un clivage de l'enzyme par la caspase-3 (figure 26), protéase effectrice du processus d'apoptose qui est retrouvée également dans les exosomes de réticulocyte.



Au cours de la maturation du réticulocyte, l'expression de la 15-lipoxygénase permet l'élimination des mitochondries, par la création de pores et la libération de molécules, notamment les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Or, les ROS peuvent également activer l'enzyme iPLA2. Nous avons donc utilisé l' H_2O_2 sur des endosomes, afin de mimer une activité des ROS et nous avons obtenu, par spectrofluorimétrie, une augmentation de l'activité enzymatique associée aux vésicules endosomales. L'activité iPLA2 retrouvée dans les exosomes de réticulocyte peut donc être stimulée par deux voies : (i) une activation par les ROS au niveau du compartiment endosomal, et (ii) un clivage de l'enzyme par l'activité caspase-3 au sein même des exosomes.

Des travaux récents ont montré que l'iPLA2 pouvait entraîner l'apparition de signaux « eat-me » favorisant la clairance des corps apoptotiques, en générant de la lysophosphatidylcholine à partir de la phosphatidylcholine. Cette LPC peut alors recruter les IgMs naturelles. Or, nous avons mis en évidence la présence d'IgM en surface des exosomes

de réticulocytes. Ces IgMs lient les exosomes en surface, et nous pouvons les dissocier et les réassocier aux vésicules grâce à un choc de pH. Ces IgMs sont également capables de reconnaître spécifiquement les cellules apoptotiques. En effet, après dissociation des IgMs de la surface des exosomes et mise en présence de cellules Jurkat induites en apoptose, nous avons pu mettre en évidence par cytométrie de flux, la liaison de ces IgMs aux cellules apoptotiques mais pas aux cellules saines. De la même manière, si nous réalisons la pré-incubation de ces IgMs issues des exosomes avec de la LPC, nous avons pu observer une diminution de la quantité d'IgMs se liant aux cellules apoptotiques. Les IgMs sont donc associées aux exosomes de réticulocyte par l'intermédiaire de la LPC présente en surface des vésicules et vraisemblablement issue du clivage de la phosphatidylcholine par l'iPLA2 activée dans les exosomes.

Une fois liées en surface des cellules apoptotiques, les IgMs peuvent activer la voie du complément. Il y a alors dépôt de C3b/bi en surface du corps à éliminer. Dans le cas des exosomes, nous avons observé un dépôt de C3 en surface des vésicules. Ce résultat vient renforcer l'idée d'une élimination des exosomes de réticulocyte qui utilise les mêmes mécanismes que ceux utilisés lors de la clairance des corps apoptotiques. La figure 27 ci-dessous illustre la cascade physiologique menant à la clairance des vésicules.

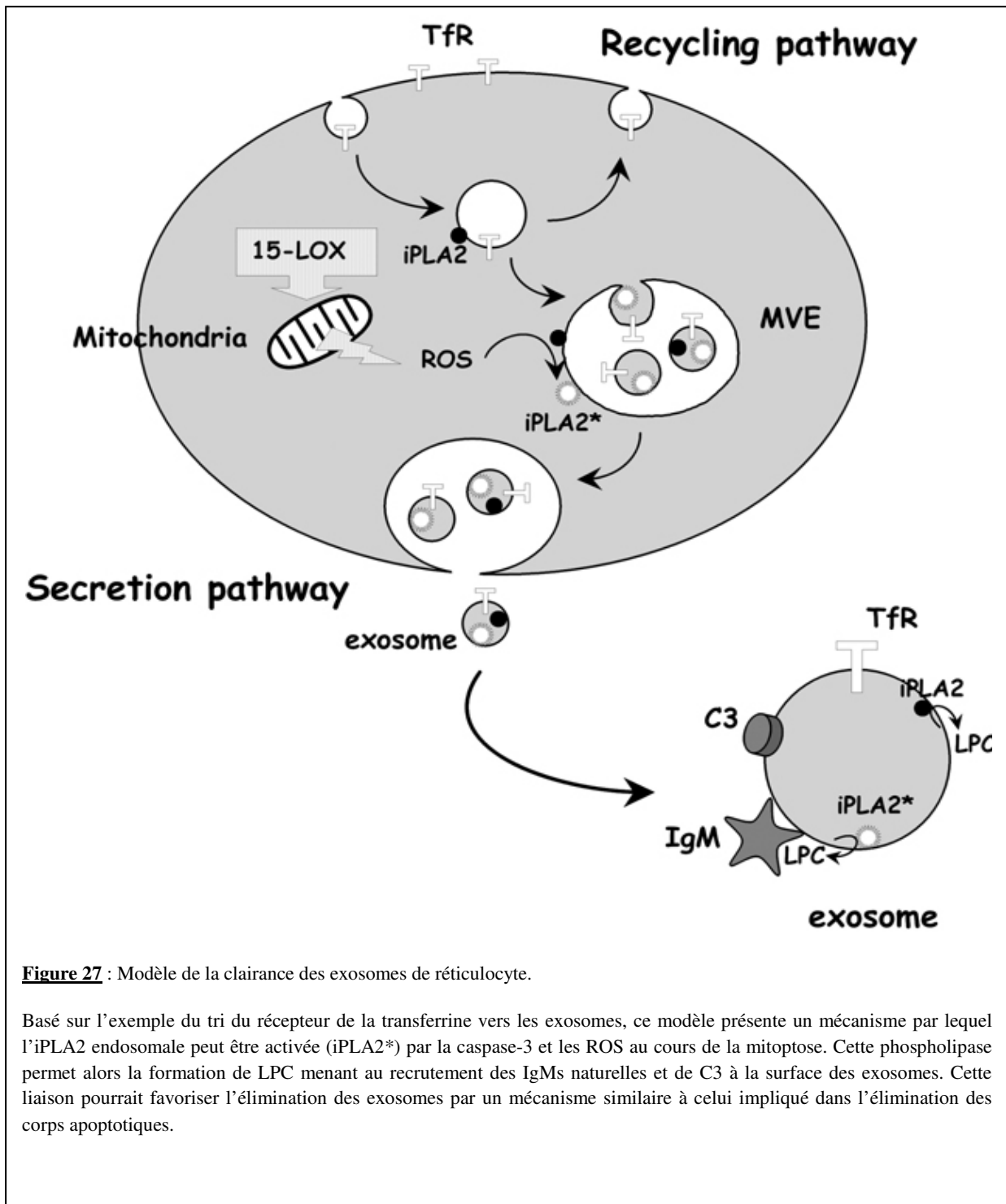


Figure 27 : Modèle de la clairance des exosomes de réticulocyte.

Basé sur l'exemple du tri du récepteur de la transferrine vers les exosomes, ce modèle présente un mécanisme par lequel l'iPLA2 endosomale peut être activée (iPLA2*) par la caspase-3 et les ROS au cours de la mitoptose. Cette phospholipase permet alors la formation de LPC menant au recrutement des IgMs naturelles et de C3 à la surface des exosomes. Cette liaison pourrait favoriser l'élimination des exosomes par un mécanisme similaire à celui impliqué dans l'élimination des corps apoptotiques.

LE ROLE D'APOH DANS LA CLAIRANCE DES EXOSOMES DE RETICULOCYTES :

1. Introduction :

Comme nous venons de le présenter, les exosomes de réticulocytes contiennent de la lysophosphatidylcholine à leur surface, et ce lysophospholipide contribue au recrutement des IgMs naturelles favorisant probablement la clairance des vésicules une fois libérées dans la circulation sanguine. Ce mécanisme peut donc s'apparenter au processus d'élimination des corps apoptotiques. Toutefois, le signal membranaire le plus connu permettant l'élimination des corps apoptotiques reste la translocation de phosphatidylsérine (PS) dans le feuillet externe de la membrane plasmique du corps à éliminer. En effet, l'inhibition de l'aminophospholipide translocase doublée de l'activation de la scramblase sont deux mécanismes menant conjointement à la perte de l'asymétrie membranaire. De ce fait, la PS se retrouve sur le feuillet externe de la membrane. Ce processus est un évènement précoce de l'apoptose. Ce phénomène est observé avant la dégradation de l'ADN et la formation des corps apoptotiques. La PS est un phospholipide chargé négativement, et plusieurs ligands (appelés opsonines) lui sont connus dans le cas de

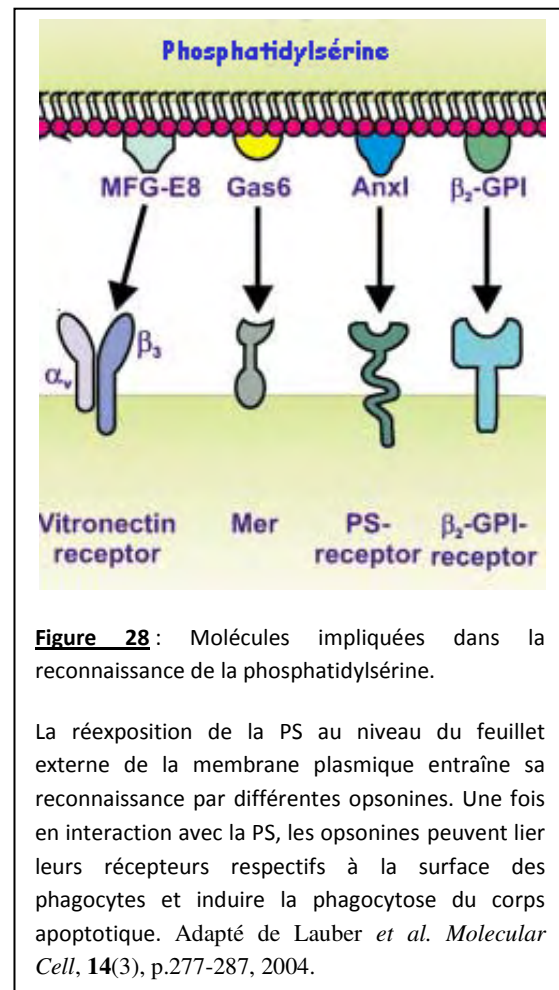


Figure 28 : Molécules impliquées dans la reconnaissance de la phosphatidylsérine.

La réexposition de la PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique entraîne sa reconnaissance par différentes opsonines. Une fois en interaction avec la PS, les opsonines peuvent lier leurs récepteurs respectifs à la surface des phagocytes et induire la phagocytose du corps apoptotique. Adapté de Lauber *et al. Molecular Cell*, **14**(3), p.277-287, 2004.

l'élimination des cellules apoptotiques. Par exemple, les molécules Annexine I, MFG-E8, Gas6 et β₂-GPI peuvent se lier à la PS et être reconnues par leurs récepteurs respectifs en surface des macrophages (figure 28) (Balasubramanian, Chandra *et al.* 1997; Rubartelli, Poggi *et al.* 1997; Ishimoto, Ohashi *et al.* 2000; Scott, McMahon *et al.* 2001; Hanayama, Tanaka *et al.* 2002; Borisenko, Iverson *et al.* 2004).

La β₂-GPI (également appelée ApolipoprotéineH ou ApoH), une glycoprotéine de 50 kDa, est la protéine majeure de liaison aux lipides dans le plasma. Elle joue un rôle dans

l'auto-immunité (Matsuura, Igarashi et al. 1990; Chamley, McKay et al. 1991; Roubey 1994), la coagulation (Brighton, Hogg et al. 1996) et comme nous venons de le préciser, dans la clairance des cellules apoptotiques (Balasubramanian, Chandra et al. 1997). La liaison de la β 2-GPI avec les membranes des cellules cibles se fait au niveau des lipides chargés négativement (Wurm 1984).

Notre hypothèse a donc été la suivante : puisqu'ApoH peut lier les corps apoptotiques contribuant à leur ingestion par les macrophages et que cette glycoprotéine est une des protéines majeures du plasma ; si les exosomes de réticulocytes sont effectivement éliminés par des processus analogues à ceux de la clairance des corps apoptotiques, il est envisageable qu'il y ait une exposition de PS en surface des vésicules menant à sa reconnaissance par ApoH et à terme, à l'ingestion des exosomes par les phagocytes.

Dans ce sens, plusieurs résultats de l'équipe mais aussi d'autres laboratoires laissent envisager une exposition de PS en surface des exosomes. En effet, une étude au laboratoire a permis de montrer que des exosomes de réticulocytes, obtenus après la maturation *in vitro* des cellules, présentaient une asymétrie membranaire lorsque l'analyse était effectuée dès leur purification (Vidal, Sainte-Marie et al. 1989). Dans cette même étude, il a également été montré que l'aminophospholipide translocase était absente de ces vésicules. On peut donc imaginer que pour ce qui est des exosomes de réticulocyte, la perte de l'asymétrie se produise naturellement au cours du temps par diffusion passive des phospholipides de part et d'autre de la membrane, entraînant l'exposition de PS en surface des vésicules. Des études ont d'ailleurs permis de montrer la présence d'aminophospholipides au niveau de la membrane des exosomes (Laulagnier, Motta et al. 2004; Morelli, Larregina et al. 2004). De plus, des exosomes issus de différents types cellulaires présentent une association avec la molécule MFG-E8 (Wubbolts, Leckie et al. 2003; Fevrier, Vilette et al. 2004; Morelli, Larregina et al. 2004; Segura, Nicco et al. 2005).

Dans cette troisième partie de mon travail de thèse, nous montrons que la liaison des IgMs à la lysophosphatidylcholine n'est pas le seul signal « eat-me » en surface des exosomes. En effet, nous avons pu, par différentes approches, montrer qu'ApoH avait la capacité de s'associer aux exosomes de réticulocytes, suggérant un rôle de cette protéine dans la clairance des vésicules, et renforçant ainsi le parallèle pouvant être fait entre l'élimination des corps apoptotiques et la clairance des exosomes.

2. Matériel et méthodes :

a- Cellules :

Des rats Sprague-Dawley sont anémiés par injection quotidienne de 1ml de phénylhydrazine (10mg/ml) pendant quatre jours. Au 7^{ème} jour, les rats sont sacrifiés et le sang est prélevé par ponction cardiaque.

b- Anticorps :

Les anticorps monoclonaux de souris anti-RTf spécifiques du domaine cytosolique du récepteur (clone C64) ou de son domaine extracellulaire (CL071) viennent respectivement des laboratoires Zymed (San Francisco, CA), et Cedarlane (Hornby, Canada). L'anticorps monoclonal de souris anti-ApoH (clone 8C3) dirigé contre le domaine 1 de ApoH (Regnault, Arvieux et al. 1999) nous a été fourni gracieusement par la société ApoH technologies (Montpellier, France). Les anticorps secondaires anti IgG de souris couplés à la peroxydase proviennent des laboratoires Jackson Immunoresearch (West Grove, PA).

c- Préparation des exosomes :

Après lavage dans du liquide de Ringer, les réticulocytes sont cultivés 48 heures à 37°C dans du RPMI 1640 enrichi en glutamine (5mM), adénosine (5mM), inosine (10mM) et pénicilline (50U/ml) streptomycine (50µg/ml). Suivant le type d'expérience, le milieu est supplémenté ou non en sérum humain (3%). Après avoir culotté les cellules, le surnageant de culture est centrifugé (20 000g pendant 20min) afin d'éliminer les débris cellulaires. Les exosomes sont isolés de ce surnageant par ultracentrifugation (100 000g pendant 2heures) et sont repris dans du PBS. Après un lavage (100 000g, 30min), les vésicules sont resuspendues dans du PBS et la quantité de protéines contenue dans les exosomes est dosée par la méthode de Bradford.

d- Dosage de l'activité Acétylcholinestérase (AChE) :

Des concentrations croissantes d'exosomes (5, 10 et 20µg protéines) sont incubées pendant une heure avec ApoH, dans des plaques 96 puits recouverts avec la protéine pure (ApoH technologies S.A, Montpellier). Après incubation, les exosomes sont repris dans une solution tampon phosphate 0,1M pH 7 contenant du triton X100 0,2%, du 5,5'Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB 4mg/ml, Interchim France) et de l'acétylthiocholine (ATC 3,5mg/ml) permettant le dosage de l'activité Acétylcholinestérase, par lecture de l'absorbance à 405nm.

e- Strip des exosomes :

Des exosomes (100µg protéine) isolés à partir de plasma de rat sont repris par un tampon carbonate 0,5M pH 11 pendant 1 heure à température ambiante puis sont ultracentrifugés (100 000g, 30min). Le culot contenant les exosomes « strippés » est repris par du tampon de Laemmli. Les protéines contenues dans le surnageant (strip) sont précipitées par de l'acide trichloroacétique (TCA 10%) pendant 1heure à 4°C. Les protéines sont ensuite culottées par centrifugation (20 000g 20min) et reprises par du tampon de Laemmli. Les exosomes strippés et le strip sont alors déposés sur SDS-PAGE 10% et analysés par western blot pour la présence d'ApoH.

f- Analyse de la liaison d'ApoH par cytométrie de flux :

La taille des exosomes (environ 60nm) est trop petite pour pouvoir les utiliser directement en cytométrie de flux. Pour pallier à ce problème, des complexes exosomes/billes de latex sont préparés en incubant pendant une heure les exosomes avec des billes de latex de 4µm de diamètre (Interfacial Dynamics, Portland, OR). Après lavages, les complexes billes/exosomes sont incubés pendant 45 min avec l'anti-ApoH (8C3) ou l'anti-RTf (CL071), suivi d'une incubation d'une heure avec les anticorps secondaires anti IgG de souris, couplés au fluorochrome Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR).

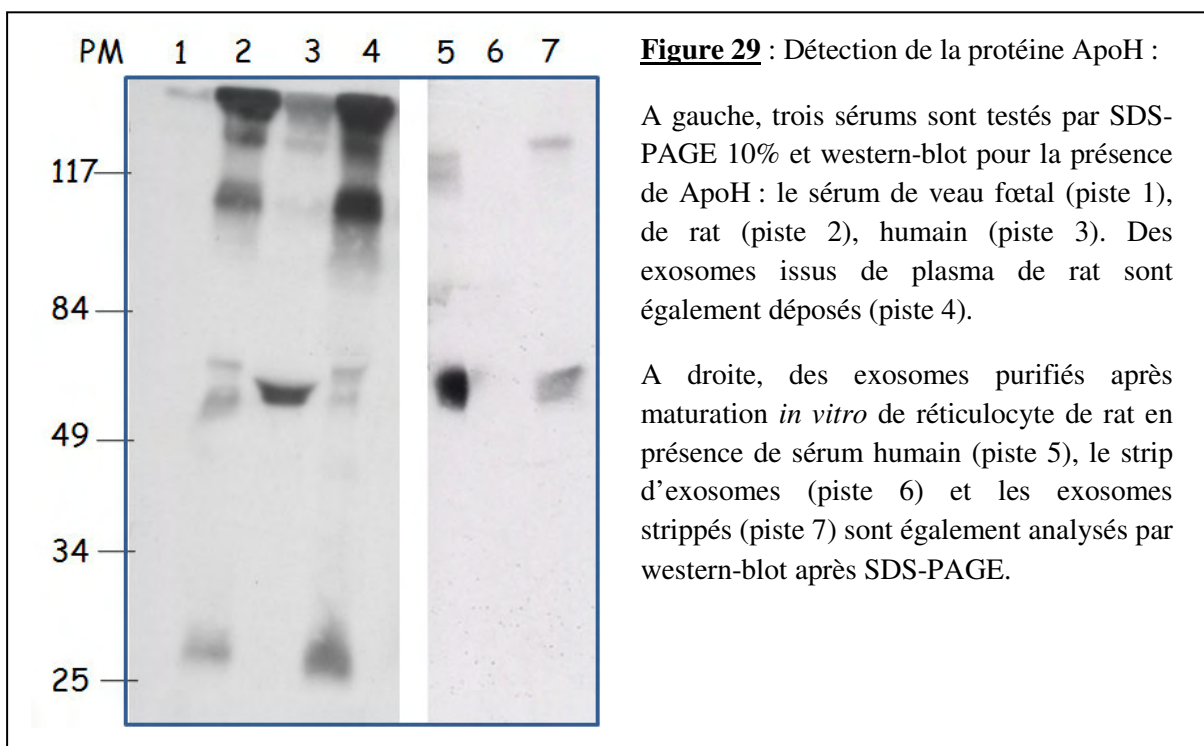
g- Compétition avec les liposomes :

De la phosphatidylsérine et/ou de la phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich) sont repris dans du PBS (concentration 2mg/ml) afin de préparer des liposomes. Après sonication, les liposomes (20µg) sont mis en présence d'ApoH purifiée (2µg) pendant 1heure à température ambiante. Une ultracentrifugation (200 000g, 10 min) permet de culotter les liposomes. Les surnageants et les culots sont repris par du tampon de Laemmli et déposés sur SDS-PAGE 10%. Après transfert, ApoH est détectée par western blot.

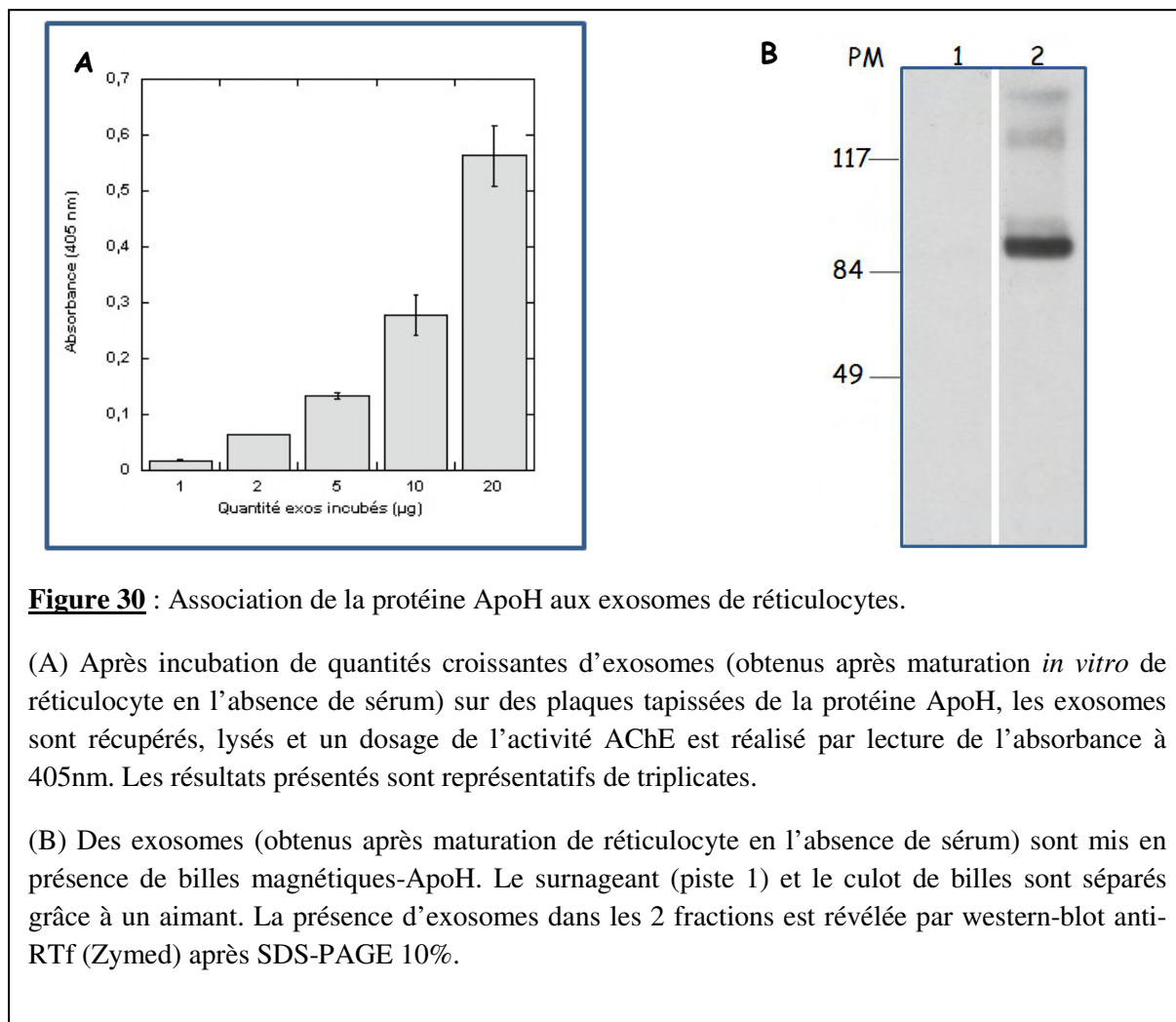
3. Résultats : ApoH s'associe aux exosomes de réticulocytes :

Tout d'abord, nous avons testé par western-blot la cross-réactivité de l'anticorps 8C3. Cet anticorps, fourni par la société ApoH technologies, est un anticorps dirigé contre la protéine humaine (Regnault, Arvieux et al. 1999). Néanmoins, au vu de la forte homologie de séquence qui existe entre les formes humaine, bovine et de rat, nous avons testé les trois types de sérum. Le résultat (figure 29, pistes 1 à 4) montre que l'anticorps dont nous disposons ne croise pas avec l'ApoH bovine et faiblement avec l'ApoH du sérum de rat. De manière intéressante, nous pouvons observer la présence d'ApoH au niveau de la piste correspondant à

des exosomes directement issus de plasma de rat. Ce résultat nous a amené à procéder à des maturations de réticulocytes de rat en présence de sérum humain afin d'optimiser la sensibilité de détection de la protéine ApoH. Des réticulocytes ont donc été mis en maturation *in vitro* pendant 48 heures en présence de sérum humain, et les exosomes ont été isolés par ultracentrifugation à partir de surnageant de culture. L'analyse par western-blot des exosomes a permis de vérifier que la protéine ApoH était présente associée à ces vésicules. La liaison d'ApoH se fait en surface des exosomes de réticulocyte, et un choc de pH par un traitement carbonate permet de dissocier ApoH des exosomes (figure 29, pistes 5 à 7). En contrôle, le RTf et Hsc70 sont également détectés par western-blot, afin de vérifier l'intégrité des vésicules lors du traitement carbonate.



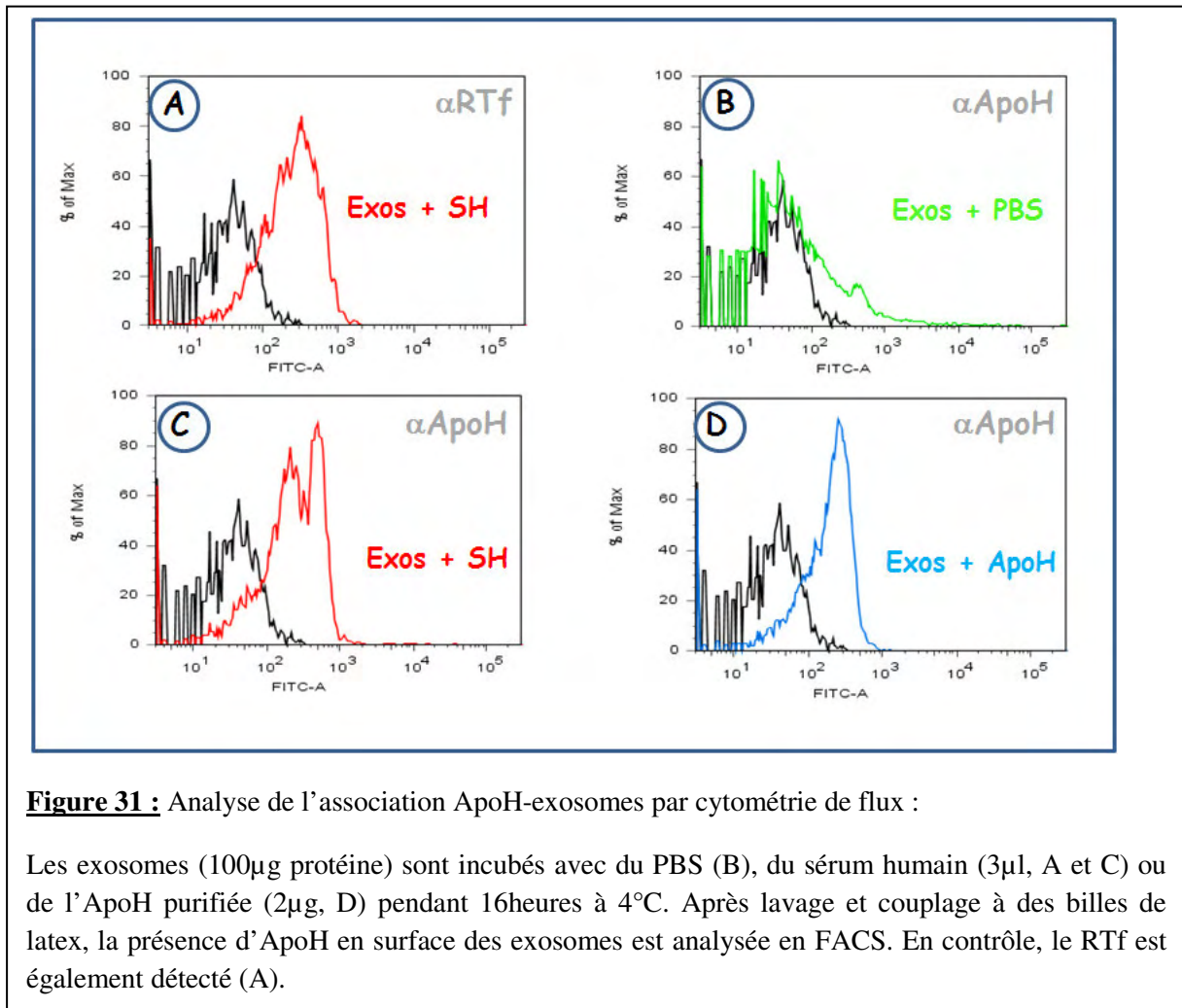
Pour confirmer l'interaction entre les exosomes de réticulocytes et la protéine ApoH, une deuxième approche a été développée. Des quantités croissantes d'exosomes obtenus lors d'une maturation de réticulocytes en l'absence de sérum ont été incubés dans des plaques 96 puits tapissés de la protéine ApoH. Le dosage de l'activité acétylcholinestérase par lecture de l'absorbance à 405nm a alors permis de mettre en évidence l'augmentation de l'activité associée à la quantité d'exosomes incubés (figure 30A).



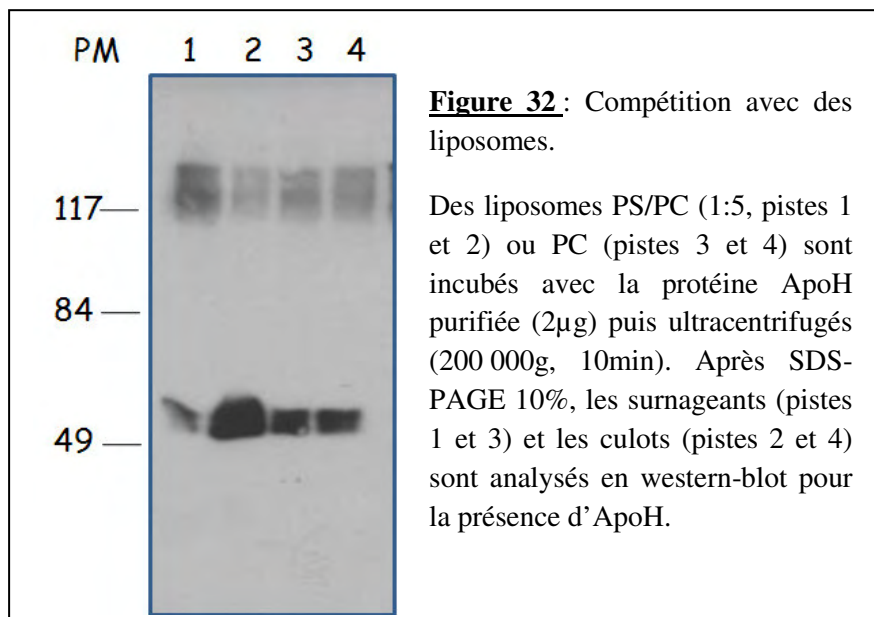
Une expérience complémentaire, consistant à incuber des billes magnétiques-ApoH avec des exosomes obtenus après maturation de réticulocytes en l'absence de sérum a été réalisée. Après cette incubation, les billes ont été séparées du surnageant grâce à un aimant et chaque fraction (*i.e.* surnageant et culot) analysée par western-blot. La figure 30B montre que les exosomes sont co-isolés avec les billes-ApoH, comme en témoigne la présence du RTf dans la piste correspondant au culot de billes.

Dans une troisième approche, des exosomes ont été incubés avec du sérum humain ou avec de l'ApoH purifiée pendant 16 heures. Après couplage des vésicules à des billes de latex, la présence d'ApoH associée aux vésicules a été mise en évidence par cytométrie de flux. La figure 31A représente un contrôle positif. En effet, des exosomes incubés avec du sérum humain puis couplés aux billes présentent un marquage positif pour le RTf. Les exosomes incubés en présence de sérum humain (figure 31C) ou d'ApoH purifiée (figure 31D)

présentent un marquage positif pour la protéine ApoH. A l'inverse, des exosomes incubés avec du PBS (figure 31B) ne présentent aucun marquage.



Ces résultats suggèrent donc que la protéine ApoH peut lier les exosomes de réticulocyte. Afin d'aller plus loin dans cette interaction, nous nous sommes demandés quel était le ligand d'ApoH en surface des exosomes. ApoH est connue pour lier les phospholipides chargés négativement comme la PS ou les cardiolipides. Une expérience préliminaire de co-sédimentation avec des liposomes nous a permis de mettre en évidence une association avec des liposomes chargés en phosphatidylsérine (PS). Comme le montre la figure 32, ApoH s'associe en effet plus fortement à des liposomes contenant de la PS que de la phosphatidylcholine (PC), le ratio (lipides/total) étant de 95% environ pour les liposomes PS/PC contre 45% pour les liposomes PC. Il reste à vérifier ce résultat avec des expériences de compétition avec les exosomes de réticulocytes, afin de vérifier que la PS est bien le ligand d'ApoH en surface des exosomes.



4. Discussion :

Les exosomes de réticulocytes sont libérés en grande quantité chaque jour dans la circulation sanguine et la fonction de ces exosomes semble être la clairance de molécules obsolètes voire dangereuses pour la cellule. Or, la cellule rouge ne dégrade pas elle-même ces vésicules. La question qui se pose alors est de savoir comment ces exosomes sont éliminés une fois libérés dans la circulation sanguine. Les érythrocytes âgés, après 4 mois dans la circulation sanguine, sont phagocytés, principalement dans la rate, après exposition de phosphatidylsérine à leur surface. L'apparition de « nouvelles » molécules en surface du globule rouge permet la discrimination entre hématies « normales » et hématies âgées. Notre hypothèse est qu'un mécanisme similaire pourrait être impliqué dans l'élimination des exosomes de réticulocyte. Ces dernières années, des études ont montré que des cellules apoptotiques expriment des signaux « eat-me », permettant leur reconnaissance et leur phagocytose par les macrophages. La deuxième partie de ces travaux de thèse met l'accent sur le rôle de la lysophosphatidylcholine dans le processus de clairance des exosomes, et sur le parallèle pouvant être établi avec l'élimination d'un corps apoptotique. Cependant, il est probable que cette LPC ne soit pas le seul signal « eat-me » en présence des exosomes de réticulocyte et que d'autres signaux puissent être présents afin de contribuer à la clairance optimale des vésicules. La translocation de la phosphatidylsérine du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane est un événement précoce et spécifique d'une cellule en cours d'apoptose. Cette PS peut alors être reconnue directement par son récepteur en surface des phagocytes mais également via des protéines liant la PS. Parmi ces protéines, ApoH, une protéine sérique joue un rôle d'adaptateur entre la PS et le récepteur à l'ApoH en surface des

macrophages. Dans le cas des exosomes, une translocation de PS est également possible, de par l'absence dans ces vésicules de l'aminophospholipide translocase en charge du maintien de l'asymétrie membranaire. Comme dans le cas des cellules apoptotiques, cette PS pourrait alors être reconnue par ApoH, facilitant alors le processus de clairance des exosomes de réticulocyte.

En accord avec cette hypothèse, nous avons pu mettre en évidence une association entre les exosomes de réticulocyte et ApoH. Un aspect intéressant de cette interaction est que l'on retrouve une bande correspondant à une forme dimérique d'ApoH dans les exosomes de réticulocyte issus de plasma de rat (figure 29) mais également dans les exosomes issus de réticulocytes ayant mûri en sérum humain. Or la liaison d'ApoH en surface des cellules apoptotiques induit un changement de conformation de la protéine (Wang, Cai et al. 1999), qui induit son oligomérisation (Hammel, Schwarzenbacher et al. 2001) et une augmentation de son affinité pour la membrane ciblée (Lutters, Meijers et al. 2001). Il se pourrait donc que le même cas de figure se présente dans le cas des exosomes de réticulocyte. En termes de quantité, la PS compte pour environ 16% de la quantité totale des phospholipides retrouvée au niveau des exosomes de réticulocytes (Vidal, Sainte-Marie et al. 1989). La diffusion passive de la PS du feuillet interne vers le feuillet externe devrait donc en l'espace de quelques heures (Zachowski and Devaux 1990) faire en sorte que la PS représente environ 10% des phospholipides du feuillet externe de la membrane des exosomes, et puisse alors être reconnue par ApoH. Néanmoins, des études complémentaires de compétition par exemple seront nécessaires afin de montrer que la PS est effectivement le ligand d'ApoH au niveau des exosomes de réticulocytes.

Finalement, mes travaux de thèse ont permis de montrer que la sécrétion d'exosomes au cours de la maturation du réticulocyte est un processus issu d'un programme cellulaire permettant un remodelage membranaire en éliminant spécifiquement certaines protéines. Le processus de formation des exosomes ne se limite pas au tri des protéines, mais est finement connecté à des événements accompagnant la dernière étape de maturation (mitoptose) et à la clairance des vésicules (*via* le recrutement des IgMs et très certainement d'ApoH).

Troisième partie :

Discussion Générale

Lors de la dernière étape de différenciation des cellules rouges, la capacité de liaison et d'internalisation de la Transferrine est totalement perdue par la cellule. Durant de nombreuses années, la question d'une dégradation ou d'une inactivation de ce récepteur majoritaire (environ 200 000 copies par cellule) est restée ouverte. C'est dans les années 80 que Rose Johnstone démontra le mode d'élimination du RTf mis en place par le réticulocyte en cours de maturation. En effet, le RTf est libéré, associé à des vésicules d'environ 50nm de diamètre. Elle attribua alors à ces vésicules le nom d'exosomes (Johnstone, Adam et al. 1987).

Le processus d'élimination du RTf par les exosomes requiert deux étapes successives. Après tri et concentration du récepteur dans des portions de la membrane endosomale, le bourgeonnement interne de cette membrane mène à la formation d'un endosome multivésiculaire (EMV). La fusion de cet EMV avec la membrane plasmique permet alors la libération dans l'espace extracellulaire des vésicules internes : les exosomes (Harding, Heuser et al. 1984; Pan, Teng et al. 1985; Johnstone, Adam et al. 1987). Ainsi, par ce mécanisme, le réticulocyte peut éliminer totalement le RTf de la surface cellulaire. Par la suite, d'autres études ont permis de montrer que ce processus de sécrétion d'exosomes ne se limitait pas au seul exemple du RTf, mais également à d'autres protéines, devenues inutiles au métabolisme de l'érythrocyte (*e.g.* les transporteurs de nucléoside, d'acides aminés) (Johnstone, Mathew et al. 1991). Néanmoins, ce processus semblait spécifique de l'élimination de protéines obsolètes et restreint au réticulocyte en cours de maturation. Pourtant, en 1996, un processus similaire fut décrit chez les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Raposo, Nijman et al. 1996) ce qui suscita un regain d'intérêt pour cette sécrétion de vésicules, de par l'importance fonctionnelle que l'on pouvait leur attribuer. En effet, les exosomes sécrétés par les CPA portent à leur surface le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) et sont capables dans certaines conditions de stimuler la prolifération de lymphocytes T *in vitro* (Raposo, Nijman et al. 1996) voire même d'induire une réponse anti-tumorale *in vivo* (Zitvogel, Regnault et al. 1998). A ce jour, le concept de sécrétion d'exosomes a tendance à se généraliser puisque l'on retrouve ce type de vésicules dans les surnageants de culture de plusieurs autres types cellulaires (*e.g.* cellules de la lignée hématopoïétique, cellules épithéliales) ou dans différents fluides biologiques (*e.g.* urine, lait, effusion pleurale).

Le mécanisme de biogenèse menant à leur formation est commun à tous ces « types » d'exosomes. Ainsi, il est admis que les exosomes, quel que soit le type de cellule leur donnant naissance, dérivent de la fusion de l'EMV avec la membrane plasmique. Les mécanismes moléculaires permettant la formation de l'EMV font d'ailleurs l'objet de nombreuses investigations et commencent à être bien caractérisés. Par contre, la fonction de ces vésicules

diverge selon le type de cellule qui les sécrète. La fonction la plus séduisante restant celle de l'induction de la réponse anti-tumorale *in vivo*, tant les retombées médicales en découlant pourraient être prometteuses en thérapie anti-cancéreuse.

Dans le cas des exosomes de réticulocytes nous pensons que la sécrétion de ces vésicules fait partie du programme de différenciation de la cellule rouge et qu'une fois libérés, ces exosomes mettent en place une voie de signalisation permettant leur élimination sans entraîner de réaction inflammatoire.

Je conduirai cette dernière partie de ma thèse selon 3 axes : (i) la mitoptose et son impact dans la sécrétion d'exosomes, (ii) le parallèle pouvant exister entre la clairance des exosomes et celle des corps apoptotiques et (iii) la corrélation que l'on peut faire entre le processus de sécrétion des exosomes et celui de l'énucléation.

La mitoptose dans la maturation du réticulocyte :

La dégradation des mitochondries, véritable processus programmé au cours de l'érythropoïèse, intervient au stade de réticulocyte. Cette mitoptose, induite par la traduction du messenger de la 15-lipoxygénase, entraîne la déstabilisation de la membrane externe mitochondriale et la formation de pores (van Leyen, Duvoisin et al. 1998). Les conséquences directes de ce processus sont la perte du potentiel de membrane mitochondrial et la libération dans le cytosol de protéines contenues dans l'espace intermembranaire. Parmi elles, on trouve le cytochrome c qui une fois libéré dans le cytosol des cellules en apoptose peut former un complexe (l'apoptosome) (Zou, Li et al. 1999) avec le facteur cytosolique Apaf-1 (Apoptosis-Activating Factor-1). La formation de l'apoptosome entraîne alors l'hydrolyse et l'activation de la procaspase-9 qui induit à son tour l'activation de la caspase-3 (Thornberry and Lazebnik 1998). Ce mécanisme pourrait également être mis en place dans le réticulocyte, la caspase-3 étant retrouvée dans les réticulocytes sous forme activée, véritable signal de danger pour la cellule en cours de maturation. Or, la caspase-3 est également présente et active dans les exosomes sécrétés par les réticulocytes (de Gassart, Geminard et al. 2003). Dans les exosomes, nous avons pu montrer que l'iPLA2 pouvait lui servir de substrat, générant une forme plus active de la phospholipase (Blanc, Barres et al. 2007). Il se pourrait donc que la mitoptose entraîne l'activation de la caspase-3, mais que celle-ci ne reste pas dans la cellule, étant plutôt sécrétée *via* les exosomes. Une étude a d'ailleurs permis de mettre en évidence la localisation de la caspase-3 au niveau de microdomaines (Oxhorn and Buxton 2003). Ces microdomaines étant retrouvés dans les exosomes, on peut imaginer que la caspase-3 soit

entraînée dans les vésicules. Ce n'est qu'à ce moment précis que la caspase-3 jouerait un rôle, dans le clivage et l'activation de l'iPLA2 par exemple. La caspase-3 n'aurait dans ce cas pas un rôle dans la phase d'exécution de l'apoptose, mais dans la phase en aval, celle d'élimination. A ce sujet, la caspase-3 a été décrite comme acteur de la différenciation érythropoïétique sans entraîner de mort par apoptose (Zermati, Garrido et al. 2001). Une étude de Carlile *et al.* en 2004 a suggéré un rôle pour la caspase-3 dans le processus d'énucléation (Carlile, Smith et al. 2004), mais ces résultats restent l'objet de discussions (Krauss, Lo et al. 2005). En effet, dans l'étude de Krauss *et al.*, les auteurs montrent que la caspase-3 n'induit pas le clivage de protéines du compartiment nucléaire (*e.g.* la lamine B) et qu'elle ne jouerait aucun rôle dans le processus d'extrusion du noyau. Toutefois, l'accumulation de caspase-3 sous forme active reste dangereuse pour la cellule et la libération de cette enzyme associée aux exosomes aurait alors deux fonctions : (i) préserver le réticulocyte de son activité, (ii) participer à l'élimination des exosomes une fois libérés dans la circulation sanguine.

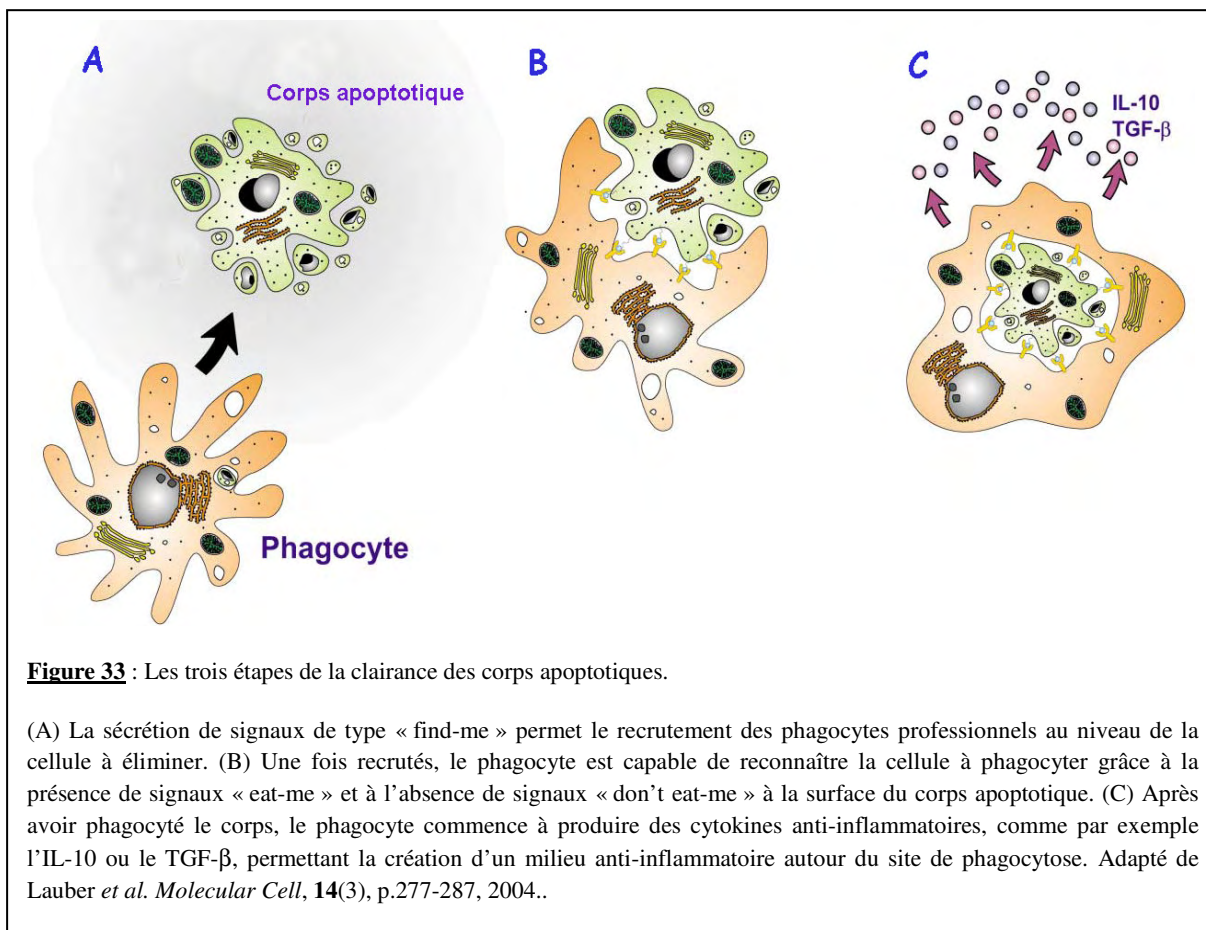
Un deuxième point intéressant de cette mitoptose est la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le cytoplasme (Skulachev 1999). Ces ROS possèdent un fort pouvoir oxydant et sont normalement confinées et éliminées dans la mitochondrie, notamment par action de l'enzyme SOD (SuperOxyde Dismutase) (Skulachev 1996). Or, lors de la maturation du réticulocyte, l'élimination des mitochondries entraîne la libération de ces ROS dans le cytosol. De par leur fort pouvoir oxydant, les ROS peuvent oxyder les acides aminés (notamment les résidus lysine) de certaines protéines (Dalle-Donne, Rossi et al. 2003), entraînant leur perte de fonction et leur dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Reinheckel, Ullrich et al. 2000). Il a été montré dans des macrophages que les ROS peuvent également activer l'iPLA2. Dans le cas du réticulocyte, nous avons pu mettre en évidence l'activation *in vitro* de cette enzyme par l'ajout d'H₂O₂, dont l'effet est comparable à celui des ROS *in vivo*. La présence des ROS est vraisemblablement transitoire dans le processus de maturation, et nous n'avons pas mis en évidence leur présence au stade érythrocyte (Blanc, Barres et al. 2007). On peut donc supposer que, lorsque le réticulocyte détecte un niveau d'oxydation anormalement élevé, il mette en place des mécanismes assurant un retour à la normale en terme de balance oxydo-réductrice. On connaît notamment des systèmes tampons endogènes, tel le glutathion, qui permettent de rétablir un équilibre cellulaire dans cette balance oxydo-réductrice.

La mitoptose pourrait également agir comme un signal favorisant la disparition du compartiment endosomal par la sécrétion d'exosomes. En effet, nous avons pu observer que lorsque nous inhibons la 15-LOX par l'ETYA, la quantité d'exosomes sécrétés diminuait

également. Un mécanisme envisageable serait que l'activation de l'iPLA2 par les ROS pourrait entraîner un remodelage du compartiment endosomal. En effet, on peut penser que les phospholipides de ce compartiment soient clivés par l'iPLA2 activée, libérant localement des acides gras pouvant entraîner une fusion membranaire, comme cela a été décrit pour l'acide arachidonique dans différents systèmes (Meers, Hong et al. 1988; Burger and Verkleij 1990). Ainsi, l'activation de l'iPLA2 par les ROS lors de la mitoptose pourrait favoriser la formation de l'EMV et finalement la formation des exosomes. On ne peut cependant pas écarter un effet direct du changement d'état d'oxydo-réduction de la cellule, sur le processus de biogenèse des EMVs.

La clairance des exosomes dans un contexte de tolérance : un parallèle avec la clairance des corps apoptotiques :

Contrairement aux exosomes sécrétés par les CPA, l'élimination des exosomes de réticulocyte doit se faire dans un contexte de tolérance, en empêchant l'apparition de réactions inflammatoires ou de réponses non souhaitées face à du soi. Ce mode d'élimination rappelle celui des cellules apoptotiques, les cellules mourantes étant reconnues et ingérées par les macrophages. Ce mode de clairance des corps apoptotiques peut être divisé en trois stades successifs : (i) la reconnaissance de la cellule à éliminer, (ii) l'internalisation par le phagocyte et (iv) la digestion de la cellule au sein du phagocyte en charge de son élimination et la libération de cytokines inhibant le processus d'inflammation (figure 33).



L'étape de la reconnaissance de la cellule à éliminer passe par l'apparition de signaux de type « eat-me » et la disparition de signaux « don't eat-me » en surface de la cellule mourante (Lauber, Blumenthal *et al.* 2004). La translocation de la phosphatidylsérine (PS) représente le signal « eat-me » le mieux caractérisé, et plusieurs molécules lient ce phospholipide. C'est notamment le cas d'ApoH, une des protéines sériques majeures chez les mammifères (Balasubramanian, Chandra *et al.* 1997). Nous avons pu montrer dans ce travail de thèse qu'ApoH interagissait également avec les exosomes sécrétés par les réticulocytes. Nous pouvons donc imaginer que cette liaison se fasse par l'intermédiaire de la PS, qui, au cours du temps, subirait une translocation du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane exosomale. Ceci permettrait d'expliquer comment ApoH peut être retrouvée associée aux exosomes sécrétés par les réticulocytes et cette association pourrait constituer un signal de type « eat-me » pour les phagocytes.

La formation de lysophosphatidylcholine à partir de la phosphatidylcholine peut également induire la cascade physiologique menant à la clairance des corps apoptotiques par les phagocytes professionnels. La formation de cette LPC est sous la dépendance d'une activité iPLA2, activité retrouvée dans les exosomes de réticulocyte. Après clivage par la

caspase-3, l'iPLA2 voit son activité augmentée, permettant la formation de LPC. Dans les exosomes issus de réticulocyte la LPC, générée par l'iPLA2 activée à la fois par les ROS au cours de la mitoptose et la caspase-3 présente dans les vésicules, peut être présentée au niveau du feuillet externe de la membrane et ainsi recruter les IgMs naturelles circulantes. Une fois recrutées, ces IgMs peuvent alors activer la voie du complément, et notamment C3 qui peut venir s'associer aux exosomes de réticulocyte afin de favoriser leur clairance.

Dans la littérature, il est également décrit que la LPC générée par l'iPLA2 puisse servir, en plus de signal « eat-me », de signal « find-me » (Lauber, Bohn et al. 2003). Dans ce cas, la LPC attire les macrophages vers la zone où se situe la cellule apoptotique. Néanmoins, en ce qui concerne les exosomes, cette signalisation de type « find-me » reste difficile à imaginer. En effet, comme nous l'avons déjà abordé, les exosomes sont sécrétés en grande quantité chaque jour dans la circulation sanguine. Il est alors plus que probable que ces vésicules, une fois libérées dans la circulation, suivent le flux sanguin. Dans cette optique, il est difficile d'envisager la LPC générée comme un signal de type « find-me », attirant les macrophages vers les exosomes.

Par contre, nous pouvons imaginer qu'au cours de leur « voyage » au sein de la circulation, la signalétique « eat-me » se mette en place, et qu'ainsi, lors de leur passage dans les capillaires sinusoïdes de la rate, les exosomes soient ingérés par les macrophages du système réticulo-endothélial, de la même façon que le sont les globules rouges en fin de vie. Parmi les signaux « don't eat-me », CD47, une glycoprotéine ubiquitaire, est exprimée à la surface des cellules rouges. CD47 peut lier SIRP α (Signal Regulatory Protein Alpha), un récepteur inhibiteur de la phagocytose, présent sur les macrophages (Oldenborg, Zheleznyak et al. 2000; Vernon-Wilson, Kee et al. 2000). Ainsi, lors de leur passage dans la rate, les globules rouges sont préservés de la phagocytose. Le pool de CD47 à la surface de la cellule rouge est en interaction avec la protéine 4.2, et donc avec le cytosquelette sous jacent (Dahl, Westhoff et al. 2003). Des expériences de micro-aspiration ont en effet permis de montrer que CD47 est retenu en surface de la cellule rouge grâce à cette interaction avec le cytosquelette via la protéine 4.2. On peut penser que CD47 soit alors exclu d'un tri vers les exosomes. CD47 étant un signal « don't eat-me », l'absence de ce signal à la surface des exosomes de réticulocyte pourrait alors favoriser leur élimination.

Après 120 jours passés dans la circulation sanguine, les érythrocytes sont principalement phagocytés au niveau de la rate. Plusieurs auteurs considèrent ces érythrocytes en fin de vie comme des corps apoptotiques (Testa 2004) parlant même d'eryptosis pour décrire leur mort (Lang, Lang et al. 2005). En effet, après avoir montré des caractéristiques

typiques de l'apoptose (*i.e.* : la dégradation des mitochondries, la perte de volume et la formation de vésicules) un des signaux permettant leur élimination est là encore une translocation de PS à la surface des cellules. Cette PS est alors reconnue par les macrophages des capillaires sinusoides de la rate, et les érythrocytes sont phagocytés. L'expression de CD47 diminue également au cours du vieillissement de l'érythrocyte. Ainsi, la diminution de ce signal « don't eat-me » contribue également à la reconnaissance de l'érythrocyte sénescant à éliminer par les phagocytes du système réticulo-endothélial de la rate.

Les érythrocytes âgés, de la même façon que les exosomes ou les corps apoptotiques présentent donc des signaux « eat-me » et une diminution de signaux « don't eat-me » à leur surface, permettant leur reconnaissance par les phagocytes. Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence l'association de deux opsonines (*i.e.* ApoH et les IgMs) en surface des exosomes de réticulocyte. Ces deux opsonines lient deux phospholipides différents (*i.e.* PS dans le cas d'ApoH et LPC dans le cas des IgMs) et ces deux mécanismes différents pourraient contribuer, de manière conjointe, à la reconnaissance efficace des exosomes par les phagocytes du système réticulo-endothélial.

Néanmoins, par manque de temps, nous n'avons pas pu mettre en évidence la fin de cette cascade de signalisation, *i.e.* la phagocytose de ces exosomes. Au niveau des macrophages, différents récepteurs ont été décrits, notamment le récepteur ApoH (Balasubramanian, Chandra et al. 1997), les récepteurs CR3 et CR4 (Complement Receptor 3 et 4) et CD91 (Mevorach, Mascarenhas et al. 1998).

Après liaison des opsonines en surface des exosomes, on peut imaginer que de manière similaire aux corps apoptotiques, ces molécules lient leurs récepteurs respectifs au niveau des phagocytes. Ainsi, nous pouvons suggérer qu'ApoH, une fois liée en surface des exosomes puisse être reconnue par son récepteur au niveau des macrophages de la rate. De la même façon, il est probable que les IgMs naturelles, liées à la surface des exosomes puissent recruter à leur tour la protéine C1q qui active la voie du complément *via* C3b/bi ou interagit avec le récepteur CD91 par l'intermédiaire de la calréticuline.

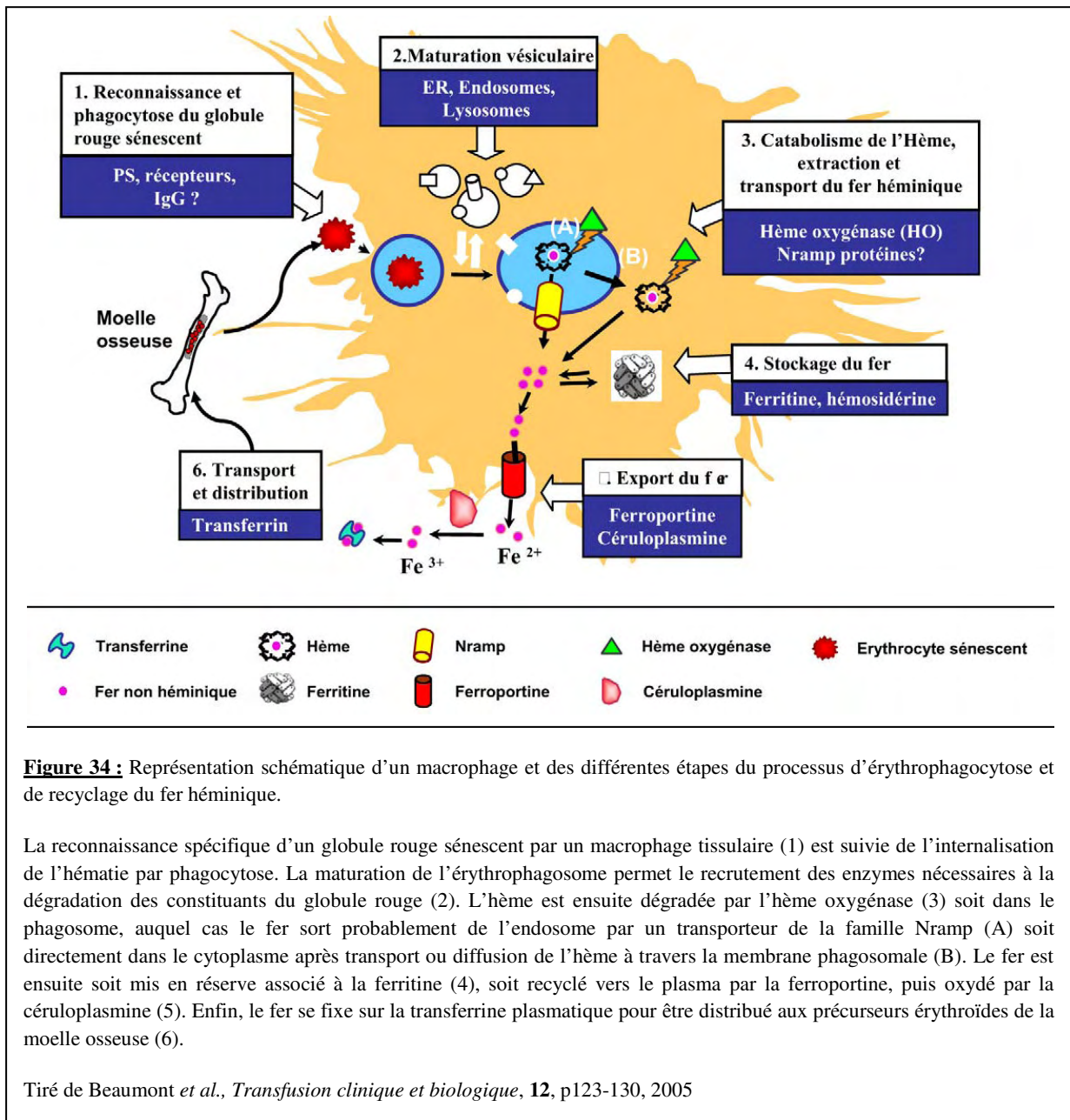
Suite à leur opsonisation et à leur reconnaissance par les phagocytes, les corps apoptotiques sont éliminés par phagocytose. Cette élimination doit impérativement se dérouler dans un contexte de tolérance. Pour cela, lors de la phagocytose, deux mécanismes se mettent en place : (i) l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires et (ii) l'activation de la production de molécules anti-inflammatoires. Dans le cas des cellules apoptotiques, il a été montré que la phagocytose du corps entraînait l'inhibition de la production de l'IL-12 (InterLeukin-12) (Kim, Elkon et al. 2004) par exemple, une cytokine

pro-inflammatoire. En effet, cette cytokine joue un rôle dans l'activation des cellules NK (Natural Killer), et son activation pourrait entraîner une réponse inflammatoire non souhaitée. La production de TGF- β (Transforming Growth Factor- β) (Fadok, Bratton et al. 1998) ou d'IL-10 (InterLeukin-10) (Voll, Herrmann et al. 1997) par les macrophages sert par contre de signal anti-inflammatoire. Le TGF- β peut par exemple inhiber la sécrétion d'IL-1 (une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les macrophages et induisant la phase de réaction inflammatoire) mais également downréguler la quantité de récepteurs pour cette interleukine (Ruscetti, Varesio et al. 1993; Wahl 1994).

Dans le cas des exosomes de réticulocyte, nous pouvons imaginer que de tels mécanismes se mettent en place. Ainsi, l'opsonisation des vésicules par des molécules spécifiques permettrait aux phagocytes en charge de leur élimination, de mettre en place les mécanismes évoqués ci-dessus, afin d'éviter une inflammation gênante, et d'éliminer les exosomes de la circulation dans un contexte de tolérance.

La rate peut être imaginée comme étant le lieu principal de la clairance des exosomes. A ce sujet, il a été montré que des liposomes chargés négativement, recrutent l'ApoH sérique lors d'une injection chez l'animal et étaient captés principalement dans la rate. Un effet direct d'ApoH sur leur élimination rapide *in vivo* a été démontré (Chonn, Semple et al. 1995).

De plus, le fer héminique est recyclé suite à la phagocytose et au catabolisme des globules rouges sénescents par les macrophages tissulaires. Cette voie produit environ 95% des besoins journaliers en fer nécessaire pour l'érythropoïèse. Les acteurs principaux de cette érythrophagocytose sont les macrophages de la rate (dans la pulpe rouge) et de la moelle osseuse (figure 34). On peut imaginer que le contenu interne des exosomes, et en particulier le fer héminique, soit réutilisé de la même manière, par la même filière tissulaire.



Sécrétion d'exosomes et énucléation :

Un tri des protéines intervient au stade érythroblastique et il existe des similitudes entre l'énucléation et la sécrétion d'exosomes. Au sein de l'îlot érythroblastique, les érythroblastes perdent leur noyau et deviennent alors des réticulocytes. Le noyau est libéré, entouré de membrane plasmique. Lors de cette étape de différenciation, des protéines (*e.g.* intégrine $\beta 1$) sont perdues par la cellule en étant spécifiquement enrichies dans la membrane plasmique entourant les noyaux (Lee, Gimm *et al.* 2004). Ces protéines sont également préférentiellement associées aux exosomes libérés lors de la maturation des réticulocytes

(Rieu, Geminard et al. 2000). A l'inverse, certaines protéines retenues à la surface du réticulocyte naissant lors de l'énucléation (*e.g.* glycophorines, bande 3) ne sont pas retrouvées dans les exosomes. Il se pourrait donc que ces deux phénomènes (énucléation et sécrétion d'exosomes) concourent au remodelage de la membrane plasmique de la cellule rouge mature en éliminant spécifiquement les mêmes protéines.

Dans le cas de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, il est à remarquer que sa présence à la surface de l'érythroblaste participe à sa rétention au niveau de l'îlot érythroblastique et donc probablement à la capture du noyau lors de l'énucléation (Sadahira, Yoshino et al. 1995). Par contre, sa présence à la surface des cellules rouges circulantes provoque des problèmes d'occlusion vasculaire en interagissant avec son contre récepteur (VCAM1) en surface des cellules endothéliales (Swerlick, Eckman et al. 1993).

Le noyau est éliminé par les macrophages de l'îlot érythroblastique, dans la moelle osseuse. On retrouve dans ce mode d'élimination certains aspects de la clairance des corps apoptotiques. En effet, il a été montré qu'une fois expulsé, ce noyau présente rapidement une réexposition de la PS à la surface de la membrane qui l'entoure ce qui contribue à sa phagocytose, sans entraîner de réaction inflammatoire (Yoshida, Kawane et al. 2005). Une protéine est également retrouvée à la fois au niveau du noyau extrudé et à la surface des macrophages. Il s'agit de l'EMP (Erythroblast Macrophage Protein). Le rôle de cette protéine serait de permettre l'attachement du noyau au macrophage, afin d'aider à sa phagocytose (Hanspal and Hanspal 1994). L'étude sur le tri des protéines lors de l'énucléation a pu mettre en évidence qu'une faible part du pool total de la protéine restait associée au réticulocyte naissant (Lee, Gimm et al. 2004). Or, l'EMP pourrait s'avérer néfaste au niveau du réticulocyte naissant, car sa liaison avec l'EMP en surface des macrophages pourrait provoquer une reconnaissance et une élimination non souhaitée des jeunes réticulocytes. On peut donc penser que la protéine EMP doit être éliminée rapidement par les réticulocytes. Un moyen mis en place par la cellule pourrait être d'associer cette protéine aux exosomes. Nous disposons d'un anticorps anti-EMP, fourni généreusement par le Dr. Manjit Hanspal. J'ai alors pu tester si effectivement, la protéine EMP était associée aux exosomes issus de réticulocyte. Par cytométrie et western blot, mes premiers résultats confortent cette hypothèse. En effet, que ce soit à partir d'exosomes isolés directement à partir du plasma, ou à partir d'exosomes issus d'une maturation *in vitro* de réticulocytes, je détecte la protéine associée aux exosomes. Ainsi, l'EMP associé aux exosomes aurait un double rôle : (i) protéger le réticulocyte et (ii) favoriser la phagocytose des exosomes de la même façon qu'elle favorise celle des noyaux extrudés.

La sécrétion d'exosomes représente donc un processus à part entière de la différenciation érythropoïétique, dans le remodelage membranaire nécessaire au bon fonctionnement de la cellule rouge mature. A ce propos, on peut également remarquer que dans d'autres types cellulaires (*e.g.* cellules dendritiques) la formation de structures multivésiculaires et/ou la sécrétion d'exosomes est étroitement liée à l'état de différenciation/maturation cellulaire. Ces mécanismes de formation/sécrétion de compartiments membranaires permettent d'ajuster temporairement/définitivement les pools de molécules (*e.g.* CMH-II) associés à la réponse cellulaire.

Dans le mode de clairance des exosomes, on retrouve de grandes similitudes avec l'élimination des corps apoptotiques mais également avec la clairance des noyaux au stade érythroblastique. La figure 35 présentée ci-dessous met en avant le parallèle entre les trois modèles de clairance.

Un dernier parallèle pouvant être fait avec l'apoptose se situe au niveau de la morphogénèse. En effet, comme l'apoptose qui peut contribuer au développement des organes par un remodelage tissulaire, la sécrétion d'exosomes pourrait contribuer au développement des cellules rouges par un remodelage membranaire.

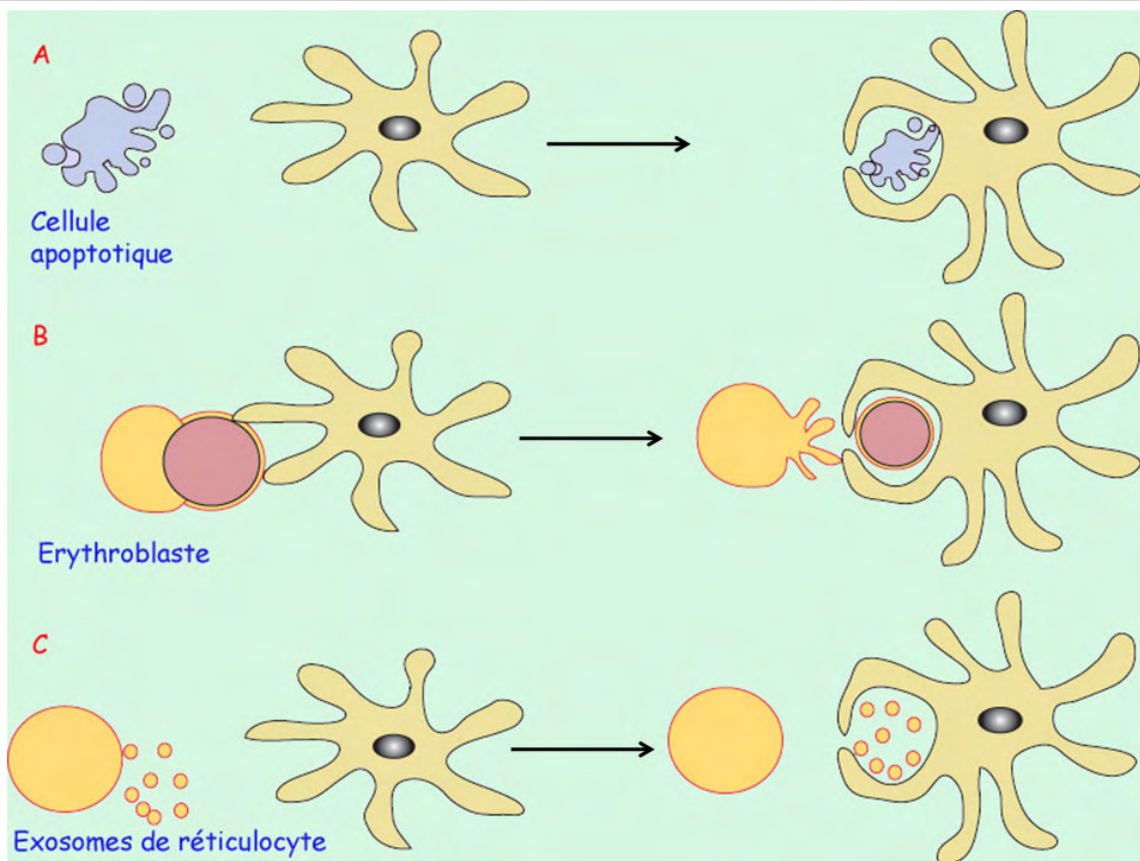


Figure 35 : Représentation schématique du parallèle existant entre l'élimination des cellules apoptotiques, du noyau expulsé par l'érythroblaste et des exosomes sécrétés par les réticulocytes.

Les cellules apoptotiques expriment différents signaux « eat-me » (*e.g.* translocation de PS, liaison d'opsonines) permettant leur reconnaissance par les phagocytes et sont ensuite ingérées pour être éliminées (A). Au sein de l'îlot érythroblastique, l'érythroblaste est en contact avec le macrophage et lors de l'expulsion, l'apparition de signaux « eat-me » (*e.g.* translocation de PS, EMP) au niveau de la membrane entourant le noyau permet leur ingestion. Le réticulocyte naissant est préservé de la phagocytose (B) et lors de sa maturation, le réticulocyte sécrète des exosomes qui, de la même façon que les cellules apoptotiques ou le noyau présentent différents signaux « eat-me » (*e.g.* translocation de PS, liaison d'opsonines) et peut être l'EMP) et seront probablement phagocytés (C).

Références Bibliographiques

- Ablin, J., I. Verbovetski, et al. (2005). "Quinidine and procainamide inhibit murine macrophage uptake of apoptotic and necrotic cells: a novel contributing mechanism of drug-induced-lupus." *Apoptosis* **10**(5): 1009-18.
- Admyre, C., S. M. Johansson, et al. (2007). "Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk." *J Immunol* **179**(3): 1969-78.
- Ahle, S., A. Mann, et al. (1988). "Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane." *Embo J* **7**(4): 919-29.
- Allen, T. D. and T. M. Dexter (1982). "Ultrastructural aspects of erythropoietic differentiation in long-term bone marrow culture." *Differentiation* **21**(2): 86-94.
- Amerik, A. Y., J. Nowak, et al. (2000). "The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways." *Mol Biol Cell* **11**(10): 3365-80.
- Anderson, H. A., C. A. Maylock, et al. (2003). "Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells." *Nat Immunol* **4**(1): 87-91.
- Anstee, D. J. and M. J. Tanner (1986). "Structure and function of the red cell membrane sialoglycoproteins." *Br J Haematol* **64**(2): 211-5.
- Antonin, W., C. Holroyd, et al. (2000). "A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function." *Embo J* **19**(23): 6453-64.
- Arur, S., U. E. Uche, et al. (2003). "Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment." *Dev Cell* **4**(4): 587-98.
- Atsumi, G., M. Murakami, et al. (2000). "Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca2+-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release." *J Biol Chem* **275**(24): 18248-58.
- Atsumi, G., M. Tajima, et al. (1998). "Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca2+-independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation." *J Biol Chem* **273**(22): 13870-7.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." *Dev Cell* **3**(2): 271-82.
- Babst, M., D. J. Katzmann, et al. (2002). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." *Dev Cell* **3**(2): 283-9.
- Babst, M., B. Wendland, et al. (1998). "The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function." *Embo J* **17**(11): 2982-93.
- Baker, H. M., B. F. Anderson, et al. (2003). "Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3579-83.
- Balasubramanian, K., J. Chandra, et al. (1997). "Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition." *J Biol Chem* **272**(49): 31113-7.
- Balasubramanian, K. and A. J. Schroit (2003). "Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death." *Annu Rev Physiol* **65**: 701-34.
- Balsinde, J., M. A. Balboa, et al. (1999). "Regulation and inhibition of phospholipase A2." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 175-89.

- Balsinde, J. and E. A. Dennis (1997). "Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2." J Biol Chem **272**(26): 16069-72.
- Bard, M. P., J. P. Hegmans, et al. (2004). "Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(1): 114-21.
- Bardin, C. and R. M. Johnstone (1978). "Sodium-dependent amino acid transport in reconstituted membrane vesicles from Ehrlich ascites cell plasma membranes." J Biol Chem **253**(5): 1725-32.
- Benaroch, P., M. Yilla, et al. (1995). "How MHC class II molecules reach the endocytic pathway." Embo J **14**(1): 37-49.
- Benderoff, S., R. Blostein, et al. (1978). "Changes in amino acid transport during red cell maturation." Membr Biochem **1**(1-2): 89-106.
- Benmerah, A., M. Bayrou, et al. (1999). "Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant." J Cell Sci **112** (Pt 9): 1303-11.
- Berditchevski, F. (2001). "Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye." J Cell Sci **114**(Pt 23): 4143-51.
- Berditchevski, F. and E. Odintsova (1999). "Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling." J Cell Biol **146**(2): 477-92.
- Bessis, M. (1958). "[Erythroblastic island, functional unity of bone marrow.]." Rev Hematol **13**(1): 8-11.
- Bessis, M., C. Mize, et al. (1978). "Erythropoiesis: comparison of in vivo and in vitro amplification." Blood Cells **4**(1-2): 155-74.
- Bette-Bobillo, P. and M. Vidal (1995). "Characterization of phospholipase A2 activity in reticulocyte endocytic vesicles." Eur J Biochem **228**(1): 199-205.
- Bilodeau, P. S., S. C. Winistorfer, et al. (2003). "Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome." J Cell Biol **163**(2): 237-43.
- Bishop, N. and P. Woodman (2000). "ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking." Mol Biol Cell **11**(1): 227-39.
- Bishop, N. and P. Woodman (2001). "TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes." J Biol Chem **276**(15): 11735-42.
- Blanc, L., C. Barres, et al. (2007). "Reticulocyte-secreted exosomes bind natural IgM antibodies: involvement of a ROS-activatable endosomal phospholipase iPLA2." Blood **110**(9): 3407-16.
- Blanchard, N., D. Lankar, et al. (2002). "TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex." J Immunol **168**(7): 3235-41.
- Blostein, R. and E. Grafova (1987). "Factors affecting transport changes associated with reticulocyte maturation." Biomed Biochim Acta **46**(2-3): S172-6.
- Blott, E. J. and G. M. Griffiths (2002). "Secretory lysosomes." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(2): 122-31.
- Bonangelino, C. J., N. L. Catlett, et al. (1997). "Vac7p, a novel vacuolar protein, is required for normal vacuole inheritance and morphology." Mol Cell Biol **17**(12): 6847-58.
- Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu Rev Biochem **72**: 395-447.
- Booth, A. M., Y. Fang, et al. (2006). "Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane." J Cell Biol **172**(6): 923-35.
- Borisenko, G. G., S. L. Iverson, et al. (2004). "Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells." Cell Death Differ **11**(8): 943-5.

- Bowers, K., J. Lottridge, et al. (2004). "Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Traffic **5**(3): 194-210.
- Brash, A. R. (1999). "Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate." J Biol Chem **274**(34): 23679-82.
- Bratton, D. L. (1993). "Release of platelet activation factor from activated neutrophils. Transglutaminase-dependent enhancement of transbilayer movement across the plasma membrane." J Biol Chem **268**(5): 3364-73.
- Bretscher, M. S. (1973). "Membrane structure: some general principles." Science **181**(100): 622-9.
- Brighton, T. A., P. J. Hogg, et al. (1996). "Beta 2-glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant." Br J Haematol **93**(1): 185-94.
- Brinckmann, R., K. Schnurr, et al. (1998). "Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme." Blood **91**(1): 64-74.
- Broudy, V. C. (1997). "Stem cell factor and hematopoiesis." Blood **90**(4): 1345-64.
- Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." J Biol Chem **275**(23): 17221-4.
- Brown, S., I. Heinisch, et al. (2002). "Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment." Nature **418**(6894): 200-3.
- Bucci, C., R. G. Parton, et al. (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." Cell **70**(5): 715-28.
- Buendia, B., A. Santa-Maria, et al. (1999). "Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis." J Cell Sci **112** (Pt 11): 1743-53.
- Buhring, H. J., B. Asenbauer, et al. (1989). "Sequential expression of CD34 and CD33 antigens on myeloid colony-forming cells." Eur J Haematol **42**(2): 143-9.
- Burger, K. N. and A. J. Verkleij (1990). "Membrane fusion." Experientia **46**(6): 631-44.
- Burkhardt, J. K., S. Hester, et al. (1990). "The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments." J Cell Biol **111**(6 Pt 1): 2327-40.
- Caby, M. P., D. Lankar, et al. (2005). "Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma." Int Immunol **17**(7): 879-87.
- Carlile, G. W., D. H. Smith, et al. (2004). "Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation." Blood **103**(11): 4310-6.
- Ceresa, B. P. and S. L. Schmid (2000). "Regulation of signal transduction by endocytosis." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 204-10.
- Chamley, L. W., E. J. McKay, et al. (1991). "Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies." Thromb Res **61**(3): 291-9.
- Chang, M. K., C. Bergmark, et al. (1999). "Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6353-8.
- Chaput, N., J. Taieb, et al. (2004). "Exosome-based immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **53**(3): 234-9.
- Charrin, S., S. Manie, et al. (2003). "A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins." Eur J Immunol **33**(9): 2479-89.
- Chasis, J. A. (2006). "Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis." Curr Opin Hematol **13**(3): 137-41.
- Chasis, J. A., M. Prenant, et al. (1989). "Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation." Blood **74**(3): 1112-20.

- Chen, C. Y., L. Pajak, et al. (2002). "The effect of proteasome inhibitors on mammalian erythroid terminal differentiation." Exp Hematol **30**(7): 634-9.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-12.
- Chonn, A., S. C. Semple, et al. (1995). "Beta 2 glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles." J Biol Chem **270**(43): 25845-9.
- Cinti, D. L., L. Cook, et al. (1992). "The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum." Prog Lipid Res **31**(1): 1-51.
- Clague, M. J. (2002). "Membrane transport: a coat for ubiquitin." Curr Biol **12**(15): R529-31.
- Clague, M. J. and S. Urbe (2003). "Hrs function: viruses provide the clue." Trends Cell Biol **13**(12): 603-6.
- Clark, H., N. Palaniyar, et al. (2002). "Surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis in vivo." J Immunol **169**(6): 2892-9.
- Clayton, A., J. Court, et al. (2001). "Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry." J Immunol Methods **247**(1-2): 163-74.
- Clayton, A., C. L. Harris, et al. (2003). "Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59." Eur J Immunol **33**(2): 522-31.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis." J Cell Biol **162**(5): 773-9.
- Connor, J., C. C. Pak, et al. (1994). "Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells." J Biol Chem **269**(4): 2399-404.
- Coulombel, L., G. Tchernia, et al. (1979). "Human reticulocyte maturation and its relevance to erythropoietic stress." J Lab Clin Med **94**(3): 467-74.
- Cremona, O. (2001). "Live stripping of clathrin-coated vesicles." Dev Cell **1**(5): 592-4.
- Crowther, R. A. and B. M. Pearse (1981). "Assembly and packing of clathrin into coats." J Cell Biol **91**(3 Pt 1): 790-7.
- Da Costa, L., N. Mohandas, et al. (2001). "Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia." Blood **98**(10): 2894-9.
- Dahl, K. N., C. M. Westhoff, et al. (2003). "Fractional attachment of CD47 (IAP) to the erythrocyte cytoskeleton and visual colocalization with Rh protein complexes." Blood **101**(3): 1194-9.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, et al. (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clin Chim Acta **329**(1-2): 23-38.
- Damke, H., T. Baba, et al. (1995). "Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin." J Cell Biol **131**(1): 69-80.
- Daro, E., P. van der Sluijs, et al. (1996). "Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9559-64.
- Dautry-Varsat, A. (1986). "Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor." Biochimie **68**(3): 375-81.
- Davis, J. Q., D. Dansereau, et al. (1986). "Selective externalization of an ATP-binding protein structurally related to the clathrin-uncoating ATPase/heat shock protein in vesicles containing terminal transferrin receptors during reticulocyte maturation." J Biol Chem **261**(33): 15368-71.

- De Camilli, P., K. Takei, et al. (1995). "The function of dynamin in endocytosis." Curr Opin Neurobiol **5**(5): 559-65.
- de Gassart, A., C. Geminard, et al. (2003). "Lipid raft-associated protein sorting in exosomes." Blood **102**(13): 4336-44.
- Denzer, K., M. van Eijk, et al. (2000). "Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface." J Immunol **165**(3): 1259-65.
- Dove, S. K., R. K. McEwen, et al. (2002). "Vac14 controls PtdIns(3,5)P(2) synthesis and Fab1-dependent protein trafficking to the multivesicular body." Curr Biol **12**(11): 885-93.
- Dubiel, W. and S. M. Rapoport (1989). "ATP-dependent proteolysis of mitochondria of reticulocytes." Revis Biol Celular **21**: 505-21.
- Dupre, S., C. Volland, et al. (2001). "Membrane transport: ubiquitylation in endosomal sorting." Curr Biol **11**(22): R932-4.
- Eastman, S. W., J. Martin-Serrano, et al. (2005). "Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting complex required for transport-I important for viral budding." J Biol Chem **280**(1): 628-36.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.
- Erdošova, B., L. Hlavkova, et al. (2002). "Part of CD68+ macrophages in the clearance of apoptotic bodies in human metanephros." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **146**(2): 41-5.
- Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, et al. (1998). "Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes." J Biol Chem **273**(32): 20121-7.
- Eskelinen, E. L. (2006). "Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy." Mol Aspects Med **27**(5-6): 495-502.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." J Clin Invest **101**(4): 890-8.
- Fadok, V. A., P. P. McDonald, et al. (1998). "Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells." Biochem Soc Trans **26**(4): 653-6.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-16.
- Felder, S., K. Miller, et al. (1990). "Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body." Cell **61**(4): 623-34.
- Fevrier, B., D. Vilette, et al. (2004). "Cells release prions in association with exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9683-8.
- Fra, A. M., E. Williamson, et al. (1994). "Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae." J Biol Chem **269**(49): 30745-8.
- Frasch, S. C., P. M. Henson, et al. (2000). "Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta." J Biol Chem **275**(30): 23065-73.
- Frazier, J. L., J. H. Caskey, et al. (1982). "Studies of the transferrin receptor on both human reticulocytes and nucleated human cells in culture: comparison of factors regulating receptor density." J Clin Invest **69**(4): 853-65.
- Funato, K., W. Beron, et al. (1997). "Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells." J Biol Chem **272**(26): 16147-51.

- Futter, C. E., L. M. Collinson, et al. (2001). "Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes." J Cell Biol **155**(7): 1251-64.
- Futter, C. E., A. Pearce, et al. (1996). "Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes." J Cell Biol **132**(6): 1011-23.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, et al. (2001). "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding." Cell **107**(1): 55-65.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman, et al. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol **119**(3): 493-501.
- Geminard, C., F. Nault, et al. (2001). "Characteristics of the interaction between Hsc70 and the transferrin receptor in exosomes released during reticulocyte maturation." J Biol Chem **276**(13): 9910-6.
- Gijon, M. A., D. M. Spencer, et al. (2000). "Recent advances in the regulation of cytosolic phospholipase A(2)." Adv Enzyme Regul **40**: 255-68.
- Gill, D. J., H. Teo, et al. (2007). "Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking." Embo J **26**(2): 600-12.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, et al. (2000). "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells." Embo J **19**(17): 4577-88.
- Glowacki, E. R. and R. L. Millette (1965). "Polyribosomes and the Loss of Hemoglobin Synthesis in the Maturing Reticulocyte." J Mol Biol **11**: 116-27.
- Gorden, P., J. L. Carpentier, et al. (1978). "Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5025-9.
- Gottlinger, H. G. (2001). "The HIV-1 assembly machine." Aids **15 Suppl 5**: S13-20.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-9.
- Grimsley, C. and K. S. Ravichandran (2003). "Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals." Trends Cell Biol **13**(12): 648-56.
- Gronowicz, G., H. Swift, et al. (1984). "Maturation of the reticulocyte in vitro." J Cell Sci **71**: 177-97.
- Gruenberg, J. and F. R. Maxfield (1995). "Membrane transport in the endocytic pathway." Curr Opin Cell Biol **7**(4): 552-63.
- Grulich, C., R. M. Duvoisin, et al. (2001). "Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte." FEBS Lett **489**(1): 51-4.
- Grune, T., T. Reinheckel, et al. (1996). "Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome." J Biol Chem **271**(26): 15504-9.
- Gumienny, T. L. and M. O. Hengartner (2001). "How the worm removes corpses: the nematode *C. elegans* as a model system to study engulfment." Cell Death Differ **8**(6): 564-8.
- Hammel, M., R. Schwarzenbacher, et al. (2001). "Mechanism of the interaction of beta(2)-glycoprotein I with negatively charged phospholipid membranes." Biochemistry **40**(47): 14173-81.
- Hamon, Y., C. Broccardo, et al. (2000). "ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine." Nat Cell Biol **2**(7): 399-406.
- Hanayama, R., M. Tanaka, et al. (2002). "Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes." Nature **417**(6885): 182-7.
- Hanspal, M. and J. S. Hanspal (1994). "The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact." Blood **84**(10): 3494-504.

- Hanspal, M., Y. Smockova, et al. (1998). "Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages." Blood **92**(8): 2940-50.
- Harding, C., J. Heuser, et al. (1984). "Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding." Eur J Cell Biol **35**(2): 256-63.
- Heijnen, H. F., N. Debili, et al. (1998). "Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules." Blood **91**(7): 2313-25.
- Hemler, M. E. (2003). "Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 397-422.
- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**(1313): 243-6.
- Henley, J. R., E. W. Krueger, et al. (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae." J Cell Biol **141**(1): 85-99.
- Hess, C., S. Sadallah, et al. (1999). "Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units." J Immunol **163**(8): 4564-73.
- Heuser, J. E. and J. Keen (1988). "Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly." J Cell Biol **107**(3): 877-86.
- Heynen, M. J. and R. L. Verwilghen (1982). "A quantitative ultrastructural study of normal rat erythroblasts and reticulocytes." Cell Tissue Res **224**(2): 397-408.
- Hicke, L. and R. Dunn (2003). "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 141-72.
- Hierro, A., J. Sun, et al. (2004). "Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex." Nature **431**(7005): 221-5.
- Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid (1995). "Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding." Nature **374**(6518): 190-2.
- Hirsch, J. G., M. E. Fedorko, et al. (1968). "Vesicle fusion and formation at the surface of pinocytotic vacuoles in macrophages." J Cell Biol **38**(3): 629-32.
- Hohfeld, J. and F. U. Hartl (1994). "Post-translational protein import and folding." Curr Opin Cell Biol **6**(4): 499-509.
- Holstein, S. E., H. Ungewickell, et al. (1996). "Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin." J Cell Biol **135**(4): 925-37.
- Honda, A., M. Nogami, et al. (1999). "Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation." Cell **99**(5): 521-32.
- Hornick, C. A., R. L. Hamilton, et al. (1985). "Isolation and characterization of multivesicular bodies from rat hepatocytes: an organelle distinct from secretory vesicles of the Golgi apparatus." J Cell Biol **100**(5): 1558-69.
- Huet, C., J. F. Ash, et al. (1980). "The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts." Cell **21**(2): 429-38.
- Hurley, J. H., S. Lee, et al. (2006). "Ubiquitin-binding domains." Biochem J **399**(3): 361-72.
- Ikonomov, O. C., D. Sbrissa, et al. (2001). "Mammalian cell morphology and endocytic membrane homeostasis require enzymatically active phosphoinositide 5-kinase PIKfyve." J Biol Chem **276**(28): 26141-7.
- Ishimoto, Y., K. Ohashi, et al. (2000). "Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6." J Biochem (Tokyo) **127**(3): 411-7.

- Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.
- Jandl, J. H. and J. H. Katz (1963). "The plasma-to-cell cycle of transferrin." J Clin Invest **42**: 314-26.
- Jelkmann, W. and T. Hellwig-Burgel (2001). "Biology of erythropoietin." Adv Exp Med Biol **502**: 169-87.
- Jiang, R., B. Gao, et al. (2000). "Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes." J Biol Chem **275**(12): 8439-47.
- Johnson, L. S., K. W. Dunn, et al. (1993). "Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif." Mol Biol Cell **4**(12): 1251-66.
- Johnstone, R. M. (1979). "Is Na⁺-dependent exchange diffusion a true exchange?" J Biol Chem **254**(24): 12479-83.
- Johnstone, R. M. (1992). "The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins." Biochem Cell Biol **70**(3-4): 179-90.
- Johnstone, R. M., M. Adam, et al. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem **262**(19): 9412-20.
- Johnstone, R. M. and J. Ahn (1990). "A common mechanism may be involved in the selective loss of plasma membrane functions during reticulocyte maturation." Biomed Biochim Acta **49**(2-3): S70-5.
- Johnstone, R. M., A. Bianchini, et al. (1989). "Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions." Blood **74**(5): 1844-51.
- Johnstone, R. M., A. Mathew, et al. (1991). "Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins." J Cell Physiol **147**(1): 27-36.
- Johnstone, R. M., A. Mathew, et al. (1998). "Loss of glucose transport in developing avian red cells." Eur J Cell Biol **75**(1): 66-77.
- Kanduc, D., A. Mittelman, et al. (2002). "Cell death: apoptosis versus necrosis (review)." Int J Oncol **21**(1): 165-70.
- Karlsson, M., S. Lundin, et al. (2001). "'Tolerosomes' are produced by intestinal epithelial cells." Eur J Immunol **31**(10): 2892-900.
- Katzmann, D. J., M. Babst, et al. (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." Cell **106**(2): 145-55.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, et al. (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 893-905.
- Kelekar, A. (2005). "Autophagy." Ann N Y Acad Sci **1066**: 259-71.
- Kent, G., O. T. Minick, et al. (1966). "Autophagic vacuoles in human red cells." Am J Pathol **48**(5): 831-57.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kim, S., K. B. Elkon, et al. (2004). "Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells." Immunity **21**(5): 643-53.
- Kim, S. J., D. Gershov, et al. (2002). "I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation." J Exp Med **196**(5): 655-65.

- Kirchhausen, T. (2000). "Clathrin." *Annu Rev Biochem* **69**: 699-727.
- Kirchhausen, T. and S. C. Harrison (1981). "Protein organization in clathrin trimers." *Cell* **23**(3): 755-61.
- Kleijmeer, M., G. Ramm, et al. (2001). "Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells." *J Cell Biol* **155**(1): 53-63.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." *Science* **290**(5497): 1717-21.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* **275**(5303): 1132-6.
- Kobayashi, T., M. H. Beuchat, et al. (2002). "Separation and characterization of late endosomal membrane domains." *J Biol Chem* **277**(35): 32157-64.
- Kobayashi, T., M. H. Beuchat, et al. (1999). "Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport." *Nat Cell Biol* **1**(2): 113-8.
- Kobayashi, T., E. Stang, et al. (1998). "A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function." *Nature* **392**(6672): 193-7.
- Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, et al. (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." *Blood* **84**(5): 1415-20.
- Kothakota, S., T. Azuma, et al. (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science* **278**(5336): 294-8.
- Koury, M. J., S. T. Koury, et al. (2005). "In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes." *Blood* **105**(5): 2168-74.
- Krauss, S. W., A. J. Lo, et al. (2005). "Nuclear substructure reorganization during late-stage erythropoiesis is selective and does not involve caspase cleavage of major nuclear substructural proteins." *Blood* **106**(6): 2200-5.
- Kroemer, G. and J. C. Reed (2000). "Mitochondrial control of cell death." *Nat Med* **6**(5): 513-9.
- Kurzchalia, T. V. and R. G. Parton (1999). "Membrane microdomains and caveolae." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 424-31.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, et al. (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway." *Mol Cell* **7**(3): 661-71.
- Lamaze, C. and S. L. Schmid (1995). "The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways." *Curr Opin Cell Biol* **7**(4): 573-80.
- Lang, K. S., P. A. Lang, et al. (2005). "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." *Cell Physiol Biochem* **15**(5): 195-202.
- Lang, R., M. Lustig, et al. (1994). "Apoptosis during macrophage-dependent ocular tissue remodelling." *Development* **120**(12): 3395-403.
- Langelier, C., U. K. von Schwedler, et al. (2006). "Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release." *J Virol* **80**(19): 9465-80.
- Lauber, K., S. G. Blumenthal, et al. (2004). "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses." *Mol Cell* **14**(3): 277-87.
- Lauber, K., E. Bohn, et al. (2003). "Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal." *Cell* **113**(6): 717-30.
- Laulagnier, K., D. Grand, et al. (2004). "PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes." *FEBS Lett* **572**(1-3): 11-4.
- Laulagnier, K., C. Motta, et al. (2004). "Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization." *Biochem J* **380**(Pt 1): 161-71.

- Lawrence, B. P. and W. J. Brown (1992). "Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes." *J Cell Sci* **102** (Pt 3): 515-26.
- Le, P. U., G. Guay, et al. (2002). "Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **277**(5): 3371-9.
- Lee, G., A. Lo, et al. (2006). "Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation." *Blood* **108**(6): 2064-71.
- Lee, J. C., J. A. Gimm, et al. (2004). "Mechanism of protein sorting during erythroblast enucleation: role of cytoskeletal connectivity." *Blood* **103**(5): 1912-9.
- Leibman, A. and P. Aisen (1977). "Transferrin receptor of the rabbit reticulocyte." *Biochemistry* **16**(7): 1268-72.
- Levkowitz, G., H. Waterman, et al. (1998). "c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor." *Genes Dev* **12**(23): 3663-74.
- Li, Z., A. Menoret, et al. (2002). "Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation." *Curr Opin Immunol* **14**(1): 45-51.
- Liu, Q. A. and M. O. Hengartner (1999). "Human CED-6 encodes a functional homologue of the *Caenorhabditis elegans* engulfment protein CED-6." *Curr Biol* **9**(22): 1347-50.
- Lobie, P. E., R. Sadir, et al. (1999). "Caveolar internalization of growth hormone." *Exp Cell Res* **246**(1): 47-55.
- Lombardi, D., T. Soldati, et al. (1993). "Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network." *Embo J* **12**(2): 677-82.
- London, E. and D. A. Brown (2000). "Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)." *Biochim Biophys Acta* **1508**(1-2): 182-95.
- Lutters, B. C., J. C. Meijers, et al. (2001). "Dimers of beta 2-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta 2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I antibody complexes." *J Biol Chem* **276**(5): 3060-7.
- Luzio, J. P., B. A. Rous, et al. (2000). "Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis." *J Cell Sci* **113** (Pt 9): 1515-24.
- Mallegol, J., G. van Niel, et al. (2005). "Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes." *Blood Cells Mol Dis* **35**(1): 11-6.
- Marbaix, G., A. Burney, et al. (1970). "Evolution of the polyribosome distribution during in vivo reticulocyte maturation." *Eur J Biochem* **13**(2): 322-5.
- Marbaix, G., G. Huez, et al. (1976). "Free cytoplasmic alpha-globin messenger RNA appears during the maturation of rabbit reticulocytes." *FEBS Lett* **66**(2): 269-73.
- Marechal, V., M. C. Prevost, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis." *J Virol* **75**(22): 11166-77.
- Marguet, D., M. F. Luciani, et al. (1999). "Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey." *Nat Cell Biol* **1**(7): 454-6.
- Martin-Serrano, J. (2007). "The Role of Ubiquitin in Retroviral Egress." *Traffic* **8**(10): 1297-1303.
- Martin-Serrano, J., A. Yarovoy, et al. (2003). "Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21): 12414-9.
- Matsumoto, K., T. Morisaki, et al. (2004). "Exosomes secreted from monocyte-derived dendritic cells support in vitro naive CD4+ T cell survival through NF-(kappa)B activation." *Cell Immunol* **231**(1-2): 20-9.
- Matsuo, H., J. Chevallier, et al. (2004). "Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization." *Science* **303**(5657): 531-4.

- Matsuura, E., Y. Igarashi, et al. (1990). "Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease." Lancet **336**(8708): 177-8.
- Maxfield, F. R. and T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 121-32.
- Mayor, S., J. F. Presley, et al. (1993). "Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process." J Cell Biol **121**(6): 1257-69.
- McDonald, P. P., V. A. Fadok, et al. (1999). "Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells." J Immunol **163**(11): 6164-72.
- McEvoy, L., P. Williamson, et al. (1986). "Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(10): 3311-5.
- McNatt, M. W., I. McKittrick, et al. (2007). "Direct binding to Rsp5 mediates ubiquitin-independent sorting of Sna3 via the multivesicular body pathway." Mol Biol Cell **18**(2): 697-706.
- Meers, P., K. Hong, et al. (1988). "Free fatty acid enhancement of cation-induced fusion of liposomes: synergism with synexin and other promoters of vesicle aggregation." Biochemistry **27**(18): 6784-94.
- Mel, H. C., M. Prenant, et al. (1977). "Reticulocyte motility and form: studies on maturation and classification." Blood **49**(6): 1001-9.
- Mellman, I., R. Fuchs, et al. (1986). "Acidification of the endocytic and exocytic pathways." Annu Rev Biochem **55**: 663-700.
- Messias, A. C., C. Harnisch, et al. (2006). "The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation." J Mol Biol **361**(3): 470-81.
- Mevorach, D., J. O. Mascarenhas, et al. (1998). "Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages." J Exp Med **188**(12): 2313-20.
- Mills, I. G., A. T. Jones, et al. (1999). "Regulation of endosome fusion." Mol Membr Biol **16**(1): 73-9.
- Mobius, W., E. van Donselaar, et al. (2003). "Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway." Traffic **4**(4): 222-31.
- Mohandas, N. and M. Prenant (1978). "Three-dimensional model of bone marrow." Blood **51**(4): 633-43.
- Montesano, R., J. Roth, et al. (1982). "Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins." Nature **296**(5858): 651-3.
- Morelli, A. E., A. T. Larregina, et al. (2004). "Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells." Blood **104**(10): 3257-66.
- Moynault, A., M. F. Luciani, et al. (1998). "ABC1, the mammalian homologue of the engulfment gene ced-7, is required during phagocytosis of both necrotic and apoptotic cells." Biochem Soc Trans **26**(4): 629-35.
- Mukherjee, S., T. T. Soe, et al. (1999). "Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails." J Cell Biol **144**(6): 1271-84.
- Muller, M., W. Dubiel, et al. (1980). "Determination and characteristics of energy-dependent proteolysis in rabbit reticulocytes." Eur J Biochem **109**(2): 405-10.
- Mullock, B. M., N. A. Bright, et al. (1998). "Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent." J Cell Biol **140**(3): 591-601.

- Munshi, U. M., J. Kim, et al. (2007). "An Alix fragment potently inhibits HIV-1 budding: characterization of binding to retroviral YPXL late domains." J Biol Chem **282**(6): 3847-55.
- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." Science **267**(5203): 1449-56.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." J Immunol Methods **139**(2): 271-9.
- Odorizzi, G., M. Babst, et al. (1998). "Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body." Cell **95**(6): 847-58.
- Oestreich, A. J., M. Aboian, et al. (2007). "Characterization of multiple multivesicular body sorting determinants within Sna3: a role for the ubiquitin ligase Rsp5." Mol Biol Cell **18**(2): 707-20.
- Oestreich, A. J., B. A. Davies, et al. (2007). "Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway." Mol Biol Cell **18**(2): 646-57.
- Ohno, H., J. Stewart, et al. (1995). "Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins." Science **269**(5232): 1872-5.
- Oka, K., T. Sawamura, et al. (1998). "Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9535-40.
- Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, et al. (2000). "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells." Science **288**(5473): 2051-4.
- Oppenheim, R. W. (1989). "The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death." Trends Neurosci **12**(7): 252-5.
- Orkin, S. H. (1995). "Hematopoiesis: how does it happen?" Curr Opin Cell Biol **7**(6): 870-7.
- Orlandi, P. A. and P. H. Fishman (1998). "Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains." J Cell Biol **141**(4): 905-15.
- Oxhorn, B. C. and I. L. Buxton (2003). "Caveolar compartmentation of caspase-3 in cardiac endothelial cells." Cell Signal **15**(5): 489-96.
- Palade, G. E. (1955). "A small particulate component of the cytoplasm." J Biophys Biochem Cytol **1**(1): 59-68.
- Palleros, D. R., W. J. Welch, et al. (1991). "Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5719-23.
- Pan, B. T. and R. M. Johnstone (1983). "Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor." Cell **33**(3): 967-78.
- Pan, B. T., K. Teng, et al. (1985). "Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes." J Cell Biol **101**(3): 942-8.
- Papini, E., B. Satin, et al. (1997). "The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by Helicobacter pylori cytotoxin." Embo J **16**(1): 15-24.
- Pearse, B. M. (1975). "Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization." J Mol Biol **97**(1): 93-8.
- Pearse, B. M. and M. S. Robinson (1984). "Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin." Embo J **3**(9): 1951-7.
- Pelkmans, L., J. Kartenbeck, et al. (2001). "Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER." Nat Cell Biol **3**(5): 473-83.

- Peters, P. J., H. J. Geuze, et al. (1989). "Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes." Eur J Immunol **19**(8): 1469-75.
- Pierre, J. L. and M. Fontecave (1999). "Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry." Biomaterials **12**(3): 195-9.
- Piper, R. C., A. A. Cooper, et al. (1995). "VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **131**(3): 603-17.
- Piper, R. C. and J. P. Luzio (2001). "Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies." Traffic **2**(9): 612-21.
- Pisitkun, T., R. F. Shen, et al. (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13368-73.
- Platt, N., H. Suzuki, et al. (1996). "Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12456-60.
- Ponka, P. (1997). "Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells." Blood **89**(1): 1-25.
- Ponka, P. (1999). "Cell biology of heme." Am J Med Sci **318**(4): 241-56.
- Poole, J. (2000). "Red cell antigens on band 3 and glycophorin A." Blood Rev **14**(1): 31-43.
- Pornillos, O., S. L. Alam, et al. (2002). "Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein." Nat Struct Biol **9**(11): 812-7.
- Pornillos, O., J. E. Garrus, et al. (2002). "Mechanisms of enveloped RNA virus budding." Trends Cell Biol **12**(12): 569-79.
- Prasad, K., J. Heuser, et al. (1994). "Complex formation between clathrin and uncoating ATPase." J Biol Chem **269**(9): 6931-9.
- Pryor, P. R., B. M. Mullock, et al. (2000). "The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles." J Cell Biol **149**(5): 1053-62.
- Rabesandratana, H., J. P. Toutant, et al. (1998). "Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during In vitro maturation of reticulocytes." Blood **91**(7): 2573-80.
- Rabinovitch, M. (1995). "Professional and non-professional phagocytes: an introduction." Trends Cell Biol **5**(3): 85-7.
- Raff, M. C. (1996). "Size control: the regulation of cell numbers in animal development." Cell **86**(2): 173-5.
- Raiborg, C., B. Bremnes, et al. (2001). "FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes." J Cell Sci **114**(Pt 12): 2255-63.
- Raiborg, C., T. E. Rusten, et al. (2003). "Protein sorting into multivesicular endosomes." Curr Opin Cell Biol **15**(4): 446-55.
- Ramanadham, S., F. F. Hsu, et al. (2004). "Apoptosis of insulin-secreting cells induced by endoplasmic reticulum stress is amplified by overexpression of group VIA calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 beta) and suppressed by inhibition of iPLA2 beta." Biochemistry **43**(4): 918-30.
- Rao, L., D. Perez, et al. (1996). "Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1441-55.
- Rapoport, S. M., T. Schewe, et al. (1979). "The lipoxigenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxigenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte." Eur J Biochem **96**(3): 545-61.
- Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." J Exp Med **183**(3): 1161-72.

- Raposo, G., D. Tenza, et al. (1997). "Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation." Mol Biol Cell **8**(12): 2631-45.
- Reddien, P. W. and H. R. Horvitz (2000). "CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*." Nat Cell Biol **2**(3): 131-6.
- Reggiori, F. and H. R. Pelham (2001). "Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting." Embo J **20**(18): 5176-86.
- Regnault, V., J. Arvieux, et al. (1999). "Both kinetic data and epitope mapping provide clues for understanding the anti-coagulant effect of five murine monoclonal antibodies to human beta2-glycoprotein I." Immunology **97**(3): 400-7.
- Reinheckel, T., O. Ullrich, et al. (2000). "Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress." Arch Biochem Biophys **377**(1): 65-8.
- Ren, Y., R. L. Silverstein, et al. (1995). "CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis." J Exp Med **181**(5): 1857-62.
- Rieu, S., C. Geminard, et al. (2000). "Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1." Eur J Biochem **267**(2): 583-90.
- Riteau, B., F. Faure, et al. (2003). "Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells." Hum Immunol **64**(11): 1064-72.
- Robinson, M. S. (1987). "100-kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies." J Cell Biol **104**(4): 887-95.
- Rodal, S. K., G. Skretting, et al. (1999). "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." Mol Biol Cell **10**(4): 961-74.
- Roth, T. F. and K. R. Porter (1964). "Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti* L." J Cell Biol **20**: 313-32.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**(4): 673-82.
- Rothman, J. E. and J. Lenard (1977). "Membrane asymmetry." Science **195**(4280): 743-53.
- Roubey, R. A. (1994). "Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies." Blood **84**(9): 2854-67.
- Rubartelli, A., A. Poggi, et al. (1997). "The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium." Eur J Immunol **27**(8): 1893-900.
- Ruscetti, F., L. Varesio, et al. (1993). "Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system." Ann N Y Acad Sci **685**: 488-500.
- Sadahira, Y., T. Yoshino, et al. (1995). "Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands." J Exp Med **181**(1): 411-5.
- Sadlon, T. J., T. Dell'Oso, et al. (1999). "Regulation of erythroid 5-aminolevulinic synthase expression during erythropoiesis." Int J Biochem Cell Biol **31**(10): 1153-67.
- Saelens, X., N. Festjens, et al. (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." Oncogene **23**(16): 2861-74.
- Sakahira, H., M. Enari, et al. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." Nature **391**(6662): 96-9.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10964-7.

- Sandvig, K. and B. van Deurs (1991). "Endocytosis without clathrin (a minireview)." Cell Biol Int Rep **15**(1): 3-8.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-8.
- Scaffidi, C., S. Kirchhoff, et al. (1999). "Apoptosis signaling in lymphocytes." Curr Opin Immunol **11**(3): 277-85.
- Schewe, T., S. M. Rapoport, et al. (1986). "Enzymology and physiology of reticulocyte lipoyxygenase: comparison with other lipoyxygenases." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **58**: 191-272.
- Schlossman, D. M., S. L. Schmid, et al. (1984). "An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase." J Cell Biol **99**(2): 723-33.
- Schneider, P., N. Holler, et al. (1998). "Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity." J Exp Med **187**(8): 1205-13.
- Scott, R. S., E. J. McMahon, et al. (2001). "Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER." Nature **411**(6834): 207-11.
- Segura, E., S. Amigorena, et al. (2005). "Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses." Blood Cells Mol Dis **35**(2): 89-93.
- Segura, E., C. Nicco, et al. (2005). "ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming." Blood **106**(1): 216-23.
- Seigneuret, M., A. Zachowski, et al. (1984). "Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence." Biochemistry **23**(19): 4271-5.
- Seki, M. and H. Shirasawa (1965). "Role of the reticular cells during maturation process of the erythroblast. 3. The fate of phagocytized nucleus." Acta Pathol Jpn **15**(4): 387-405.
- Silvie, O., S. Charrin, et al. (2006). "Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites." J Cell Sci **119**(Pt 10): 1992-2002.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-9.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Six, D. A. and E. A. Dennis (2000). "The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization." Biochim Biophys Acta **1488**(1-2): 1-19.
- Skokos, D., S. Le Panse, et al. (2001). "Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes." J Immunol **166**(2): 868-76.
- Skulachev, V. P. (1996). "Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell." FEBS Lett **397**(1): 7-10.
- Skulachev, V. P. (1999). "Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms." Mol Aspects Med **20**(3): 139-84.
- Skulachev, V. P. (2001). "The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology." Exp Gerontol **36**(7): 995-1024.
- Skutelsky, E. and D. Danon (1972). "On the expulsion of the erythroid nucleus and its phagocytosis." Anat Rec **173**(1): 123-6.
- Soldati, T. and M. Schliwa (2006). "Powering membrane traffic in endocytosis and recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 897-908.

- Sotelo, J. R. and K. R. Porter (1959). "An electron microscope study of the rat ovum." J Biophys Biochem Cytol **5**(2): 327-42.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, et al. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.
- Srivastava, P. (2002). "Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 395-425.
- Stern, M., J. Savill, et al. (1996). "Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response." Am J Pathol **149**(3): 911-21.
- Stolle, C. A. and E. J. Benz, Jr. (1988). "Cellular factor affecting the stability of beta-globin mRNA." Gene **62**(1): 65-74.
- Su, H. P., K. Nakada-Tsukui, et al. (2002). "Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)." J Biol Chem **277**(14): 11772-9.
- Subra, C., K. Laulagnier, et al. (2007). "Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies." Biochimie **89**(2): 205-12.
- Sulston, J. E. and H. R. Horvitz (1977). "Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **56**(1): 110-56.
- Sundquist, W. I., H. L. Schubert, et al. (2004). "Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein." Mol Cell **13**(6): 783-9.
- Swerlick, R. A., J. R. Eckman, et al. (1993). "Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium." Blood **82**(6): 1891-9.
- Takano-Ohmuro, H., M. Mukaida, et al. (2000). "Autophagy in embryonic erythroid cells: its role in maturation." Eur J Cell Biol **79**(10): 759-64.
- Takei, K., P. S. McPherson, et al. (1995). "Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals." Nature **374**(6518): 186-90.
- Takizawa, F., S. Tsuji, et al. (1996). "Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells." FEBS Lett **397**(2-3): 269-72.
- Tavassoli, M. (1978). "Red cell delivery and the function of the marrow-blood barrier: a review." Exp Hematol **6**(3): 257-69.
- Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2005). "Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects." Br J Cancer **92**(2): 305-11.
- Taylor, D. D., C. G. Taylor, et al. (1988). "Characterization of plasma membrane shedding from murine melanoma cells." Int J Cancer **41**(4): 629-35.
- Teo, H., D. J. Gill, et al. (2006). "ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes." Cell **125**(1): 99-111.
- Teo, H., O. Perisic, et al. (2004). "ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes." Dev Cell **7**(4): 559-69.
- Teo, H., D. B. Veprintsev, et al. (2004). "Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins." J Biol Chem **279**(27): 28689-96.
- Testa, U. (2004). "Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis." Leukemia **18**(7): 1176-99.

- Thery, C., M. Boussac, et al. (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles." J Immunol **166**(12): 7309-18.
- Thery, C., L. Duban, et al. (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." Nat Immunol **3**(12): 1156-62.
- Thery, C., A. Regnault, et al. (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." J Cell Biol **147**(3): 599-610.
- Thiele, B. J., H. Andree, et al. (1982). "Lipoxygenase mRNA in rabbit reticulocytes. Its isolation, characterization and translational repression." Eur J Biochem **129**(1): 133-41.
- Thomsen, P., K. Roepstorff, et al. (2002). "Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking." Mol Biol Cell **13**(1): 238-50.
- Thorburn, D. R. and E. Beutler (1991). "The loss of enzyme activity from erythroid cells during maturation." Adv Exp Med Biol **307**: 15-27.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.
- Tjoelker, L. W. and D. M. Stafforini (2000). "Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease." Biochim Biophys Acta **1488**(1-2): 102-23.
- Trams, E. G., C. J. Lauter, et al. (1981). "Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles." Biochim Biophys Acta **645**(1): 63-70.
- Tran, D., J. L. Carpentier, et al. (1987). "Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(22): 7957-61.
- Tucker, E. M. and J. D. Young (1980). "Biochemical changes during reticulocyte maturation in culture. A comparison of genetically different sheep erythrocytes." Biochem J **192**(1): 33-9.
- Ullrich, O., S. Reinsch, et al. (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." J Cell Biol **135**(4): 913-24.
- Ungewickell, E. and D. Branton (1981). "Assembly units of clathrin coats." Nature **289**(5796): 420-2.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, et al. (1997). "Functional interaction of the auxilin J domain with the nucleotide- and substrate-binding modules of Hsc70." J Biol Chem **272**(31): 19594-600.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, et al. (1995). "Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles." Nature **378**(6557): 632-5.
- Utleg, A. G., E. C. Yi, et al. (2003). "Proteomic analysis of human prostasomes." Prostate **56**(2): 150-61.
- van der Sluijs, P., M. Hull, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway." Cell **70**(5): 729-40.
- van Deurs, B., P. K. Holm, et al. (1993). "Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes." Eur J Cell Biol **61**(2): 208-24.
- van Leyen, K., R. M. Duvoisin, et al. (1998). "A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation." Nature **395**(6700): 392-5.
- Van Niel, G., J. Mallegol, et al. (2003). "Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice." Gut **52**(12): 1690-7.
- van Niel, G., I. Porto-Carreiro, et al. (2006). "Exosomes: a common pathway for a specialized function." J Biochem (Tokyo) **140**(1): 13-21.

- van Niel, G., G. Raposo, et al. (2001). "Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles." Gastroenterology **121**(2): 337-49.
- Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, et al. (1997). "Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria." Cell **91**(5): 627-37.
- Vandivier, R. W., C. A. Ogden, et al. (2002). "Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex." J Immunol **169**(7): 3978-86.
- Vaux, D. L. and A. Strasser (1996). "The molecular biology of apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2239-44.
- Verhoven, B., R. A. Schlegel, et al. (1995). "Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes." J Exp Med **182**(5): 1597-601.
- Vernon-Wilson, E. F., W. J. Kee, et al. (2000). "CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1." Eur J Immunol **30**(8): 2130-7.
- Vidal, M., P. Mangeat, et al. (1997). "Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation." J Cell Sci **110** (Pt 16): 1867-77.
- Vidal, M., J. Sainte-Marie, et al. (1989). "Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase"." J Cell Physiol **140**(3): 455-62.
- Vidal, M. J. and P. D. Stahl (1993). "The small GTP-binding proteins Rab4 and ARF are associated with released exosomes during reticulocyte maturation." Eur J Cell Biol **60**(2): 261-7.
- Vincent-Schneider, H., P. Stumptner-Cuvelette, et al. (2002). "Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells." Int Immunol **14**(7): 713-22.
- Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-1.
- Wahl, S. M. (1994). "Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly." J Exp Med **180**(5): 1587-90.
- Wang, S. X., G. Cai, et al. (1999). "Intrinsic fluorescence study of the interaction of human apolipoprotein H with phospholipid vesicles." Biochemistry **38**(29): 9477-84.
- Wang, W., L. Yang, et al. (2007). "Evidence of cholesterol accumulated in high curvature regions: implication to the curvature elastic energy for lipid mixtures." Biophys J **92**(8): 2819-30.
- Watarai, M., I. Derre, et al. (2001). "Legionella pneumophila is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus." J Exp Med **194**(8): 1081-96.
- Watson, A. and F. J. Doherty (1994). "Calcium promotes membrane association of reticulocyte 15-lipoxygenase." Biochem J **298** (Pt 2): 377-83.
- Watts, C. (1997). "Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules." Annu Rev Immunol **15**: 821-50.
- Waugh, R. E., J. B. McKenney, et al. (1997). "Surface area and volume changes during maturation of reticulocytes in the circulation of the baboon." J Lab Clin Med **129**(5): 527-35.
- Wefes, I., L. D. Mastrandrea, et al. (1995). "Induction of ubiquitin-conjugating enzymes during terminal erythroid differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4982-6.

- Welsch, S., A. Habermann, et al. (2006). "Ultrastructural analysis of ESCRT proteins suggests a role for endosome-associated tubular-vesicular membranes in ESCRT function." *Traffic* **7**(11): 1551-66.
- White, I. J., L. M. Bailey, et al. (2006). "EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation." *Embo J* **25**(1): 1-12.
- Whitley, P., B. J. Reaves, et al. (2003). "Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization." *J Biol Chem* **278**(40): 38786-95.
- Willem, J., M. ter Beest, et al. (1990). "A non-exchangeable fluorescent phospholipid analog as a membrane traffic marker of the endocytic pathway." *Eur J Cell Biol* **53**(1): 173-84.
- Williams, J. M., R. Colman, et al. (2005). "Anti-endothelial cell antibodies from lupus patients bind to apoptotic endothelial cells promoting macrophage phagocytosis but do not induce apoptosis." *Rheumatology (Oxford)* **44**(7): 879-84.
- Williamson, P., A. Christie, et al. (2001). "Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes." *Biochemistry* **40**(27): 8065-72.
- Winstead, M. V., J. Balsinde, et al. (2000). "Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function." *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2): 28-39.
- Wolf, A. A., Y. Fujinaga, et al. (2002). "Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol." *J Biol Chem* **277**(18): 16249-56.
- Wolfers, J., A. Lozier, et al. (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." *Nat Med* **7**(3): 297-303.
- Wu, Y. C. and H. R. Horvitz (1998). "The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters." *Cell* **93**(6): 951-60.
- Wu, Y. C. and H. R. Horvitz (1998). "*C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180." *Nature* **392**(6675): 501-4.
- Wu, Y. C., M. C. Tsai, et al. (2001). "*C. elegans* CED-12 acts in the conserved *crkII*/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment." *Dev Cell* **1**(4): 491-502.
- Wubbolts, R., M. Fernandez-Borja, et al. (1996). "Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface." *J Cell Biol* **135**(3): 611-22.
- Wubbolts, R., R. S. Leckie, et al. (2003). "Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation." *J Biol Chem* **278**(13): 10963-72.
- Wurm, H. (1984). "beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles." *Int J Biochem* **16**(5): 511-5.
- Wurmser, A. E. and S. D. Emr (1998). "Phosphoinositide signaling and turnover: PtdIns(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires luminal vacuolar hydrolase activities." *Embo J* **17**(17): 4930-42.
- Wyllie, A. H. (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." *Nature* **284**(5756): 555-6.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." *Int Rev Cytol* **68**: 251-306.
- Yang, M., I. Coppens, et al. (2004). "The Plasmodium falciparum Vps4 homolog mediates multivesicular body formation." *J Cell Sci* **117**(Pt 17): 3831-8.
- Yorikawa, C., H. Shibata, et al. (2005). "Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting." *Biochem J* **387**(Pt 1): 17-26.

- Yoshida, H., K. Kawane, et al. (2005). "Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells." Nature **437**(7059): 754-8.
- Zachowski, A. and P. F. Devaux (1990). "Transmembrane movements of lipids." Experientia **46**(6): 644-56.
- Zermati, Y., C. Garrido, et al. (2001). "Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation." J Exp Med **193**(2): 247-54.
- Zhou, Z., E. Hartwig, et al. (2001). "CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*." Cell **104**(1): 43-56.
- Zitvogel, L., A. Regnault, et al. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.
- Zou, H., Y. Li, et al. (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**(17): 11549-56.

Annexe