

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 mars 2011 (31.03.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale

WO 2011/036416 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/62 (2006.01)

(74) Mandataire : ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS; 3, rue Auber, F-75009 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/052006

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
23 septembre 2010 (23.09.2010)

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
09/04576 24 septembre 2009 (24.09.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : MAMOUN, Robert, Zaine El Abiddine [FR/FR]; 18, cours Grégoire, F-34725 St André de Sangonis (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : NOVEL CHIMERIC POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES ENABLING THE SECRETION OF A POLYPEPTIDE OF INTEREST IN COMBINATION WITH EXOSOMES AND USES THEREOF

(54) Titre : NOUVEAUX POLYNUCLEOTIDES ET POLYPEPTIDES CHIMERIQUES PERMETTANT LA SECRETION D'UN POLYPEPTIDE D'INTERET EN ASSOCIATION AVEC DES EXOSOMES ET LEURS UTILISATIONS

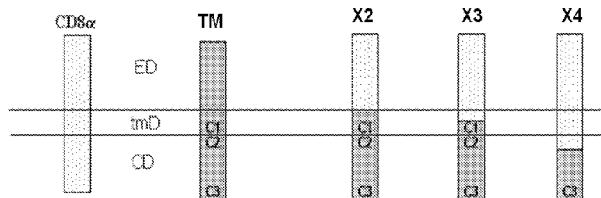


Figure 1

(57) Abstract : The present invention relates to a chimeric polypeptide including a plurality of polypeptide fields, suitable for being secreted in combination with membrane vesicles and, in particular, exosomes. The invention also relates to the use of the polypeptides of the invention and encoding polynucleotides for said polypeptides, for the production of immunogenic exosome or DNA compositions, for screening protein interactions. The present invention also relates to the immunological uses of the properties of exosomes comprising a polypeptide according to the invention and immunogenic compositions of the invention. The present invention relates to the use of exosomes comprising a polypeptide according to the invention as a diagnosis tool. The present invention also relates to the use of the properties of membrane vesicles and protein compositions of the invention for prophylaxis and/or treatment of a disease caused by a functional deficit, in particular for transporting a protein or a nucleic acid, in particular for compensating or making up for an enzymatic deficit or, in particular, for inducing a transcriptional or translational modification in the targeted cells or organs.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

La présente invention a pour objet un polypeptide chimérique comprenant plusieurs domaines polypeptidiques, capables d'être sécrété en association avec des vésicules membranaires et en particulier des exosomes. L'invention concerne également l'utilisation des polypeptides de l'invention et des polynucléotides codant pour ces polypeptides, pour la production de compositions immunogènes à base d'exosomes ou à base d'ADN, pour le criblage d'interactions protéiques. La présente invention concerne également la mise en œuvre des propriétés d'exosomes comportant un polypeptide de l'invention et de compositions immunogènes de l'invention en imunoologie. La présente invention concerne l'utilisation d'exosomes comportant un polypeptide de l'invention comme outil de diagnostic. La présente invention concerne également la mise en œuvre des propriétés des vésicules membranaires et des compositions protéiques de l'invention pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une maladie due à un déficit fonctionnel, en particulier pour transporter une protéine ou un acide nucléique, en particulier pour compenser ou suppléer un déficit enzymatique, ou en particulier pour induire une modification transcriptionnelle ou traductionnelle dans les cellules ou les organes visées.

Nouveaux polynucléotides et polypeptides chimériques permettant la sécrétion d'un polypeptide d'intérêt en association avec des exosomes et leurs utilisations

5 L'invention concerne des polynucléotides et polypeptides chimériques permettant la sécrétion d'un polypeptide d'intérêt en association avec des exosomes, et leur utilisation notamment pour la production de compositions immunogènes à base de polypeptides chimériques, d'ADN ou d'exosomes, pour le criblage d'interactions protéiques, ou pour le transport de protéines ou d'acides nucléiques.

10 La présente invention a pour objet un polypeptide chimérique capable d'être sécrété en association avec des exosomes lorsqu'il est exprimé dans des cellules eucaryotes appropriées, ledit polypeptide chimérique comprenant plusieurs domaines polypeptidiques.

15 L'invention concerne également une vésicule membranaire, en particulier un exosome, qui comporte un polypeptide de l'invention, une composition immunogène à base de tels exosomes et un procédé de production de tels exosomes.

20 L'invention a également pour objet un polynucléotide codant pour un polypeptide de l'invention et une composition immunogène le comprenant, en particulier un vaccin à ADN le comprenant.

25 La présente invention concerne également la mise en œuvre des propriétés des vésicules membranaires et des compositions immunogènes de l'invention pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une infection par un agent pathogène, un organisme pathogène, un antigène tumoral ou un antigène cytoplasmique, en particulier pour éliciter ou favoriser *in vivo*, chez un hôte (humain ou non humain), une réponse humorale et/ou cellulaire contre un virus, une bactérie, un parasite ou une tumeur.

30 La présente invention concerne en outre l'utilisation d'exosomes comportant un polypeptide de l'invention comme outil de diagnostic.

La présente invention concerne également la mise en œuvre des propriétés des vésicules membranaires et des compositions protéiques de l'invention pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une maladie due à un déficit fonctionnel ou

métabolique, en particulier pour transporter une protéine ou un acide nucléique, en particulier pour compenser ou suppléer un déficit enzymatique, ou en particulier pour induire une modification transcriptionnelle ou traductionnelle dans les cellules ou les organes visées, ou pour modifier le métabolisme cellulaire.

5 La présente invention vise également l'utilisation de vésicules membranaires de l'invention pour produire des anticorps dirigés contre le peptide ou le polypeptide d'intérêt.

10 La présente invention vise également l'utilisation de vésicules membranaires de l'invention pour étudier des interactions entre protéines et pour étudier des molécules interagissant avec des protéines d'intérêt.

15 Les exosomes se présentent sous la forme de petites sphères limitées par une bicouche lipidique. Ces vésicules membranaires sont naturellement sécrétées par différents types de cellules, en particulier par les cellules épithéliales, des cellules tumorales et certaines cellules du système immunitaire, (mastocytes, lymphocytes T et B, cellules dendritiques, notamment cellules de Langerhans). Les exosomes se distinguent d'autres vésicules membranaires sécrétées par les cellules notamment par leur petite taille (de 50 à 100 nm de diamètre) et par leur composition en protéines membranaires (des molécules d'adhésion, de transport, de transduction de signal et des molécules du complexe majeur 20 d'histocompatibilité entre autres).

25 Les exosomes pourraient notamment correspondre à des vésicules internes des endosomes multivésiculaires (notamment des endosomes tardifs) sécrétées par la cellule lors de la fusion de ces endosomes avec la membrane plasmique ; les endosomes multivésiculaires sont généralement impliqués dans le transport de molécules dans les compartiments lysosomiques (voie de dégradation des protéines) mais, dans certaines cellules telles que les réticulocytes et certaines cellules présentatrices d'antigènes, ils pourraient être dirigés vers la membrane plasmique, avec laquelle ils fusionneraient pour libérer des exosomes dans le milieu extracellulaire.

30 Des études antérieures ont démontré que les exosomes sont capables d'induire des réponses immunes humorales et/ou cellulaires (Delcayre *et al.*, 2002). Les exosomes sont considérés comme des vecteurs d'antigènes capables de stimuler directement *in vitro* des lymphocytes T de manière antigène

spécifique. En effet, les exosomes sécrétés par les cellules dendritiques expriment des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II. Les complexes peptides/CMH fonctionnels portés par les exosomes seraient transférés d'une cellule dendritique à une autre qui n'a jamais vu l'antigène dont dérivent les peptides associés aux molécules du CMH. En stimulant de proche en proche les cellules dendritiques naïves, les exosomes sécrétés et présentant à leur surface un peptide antigénique contribueraient à l'amplification de la réponse T CD4 et T CD8 spécifique (Delcayre et Le Pecq, 2006). Par exemple, chargés avec des peptides tumoraux et injectés à des souris, ces exosomes sont capables de promouvoir une forte réponse immunitaire et de faire régresser des tumeurs solides pré-établies (Zitvogel et al., 1998).

Les exosomes sont capables de présenter des antigènes exogènes soit sous la forme de protéines entières natives, soit sous la forme de peptides associés aux molécules du CMH I et II (Colino et Snapper 2006). La présentation d'antigène à la surface d'exosomes est similaire à une présentation à la membrane d'une cellule ou d'un virus enveloppé. Toutefois, les exosomes n'étant ni vivants ni infectieux, ils présentent l'avantage de pouvoir être manipulés comme un produit ordinaire et sans précautions de confinement, contrairement à un virus. Les exosomes peuvent donc être utilisés comme présentateurs de peptides ou de polypeptides antigéniques à des fins d'immunisation. Cette technique dite « exosome display » ne requiert pas nécessairement la présentation directe de l'antigène par le CMH (Chaput et al., 2004). Néanmoins le développement de cette technique de vaccination inédite suppose de disposer d'un « outil » moléculaire efficace permettant le ciblage des protéines antigéniques avec les exosomes. Or, à ce jour, un tel « outil » n'a pas été décrit.

L'étude des rétrovirus, et plus particulièrement du virus d'immunodéficience humaine (VIH), a révélé leur capacité à détourner la machinerie cellulaire de biogénèse des endosomes multivésiculaires afin de bourgeonner à la membrane plasmique (Pornillos et al., 2002). Ces virus peuvent également utiliser cette machinerie au niveau de la membrane endosomale, son site normal de fonctionnement (Raposo et al., 2002). Ainsi, selon l'hypothèse des « exosomes chevaux de Troie » (Trojan Exosomes ; Gould et al., 2003), ces virus utiliseraient la voie préexistante de biogénèse des exosomes, pour la formation de particules

virales.

L'enveloppe des rétrovirus est constituée de la glycoprotéine d'enveloppe externe (SU) et de la glycoprotéine trans-membranaire (TM). Ces glycoprotéines d'enveloppe sont issues du clivage de la protéine précurseur nommée ENV. L'expression du gène *env* aboutit à la synthèse des glycoprotéines d'enveloppe des rétrovirus, sous forme d'un précurseur protéique qui transite par le Golgi avant d'atteindre la portion de membrane (endosomale ou plasmique), qui servira d'enveloppe virale lors du bourgeonnement des virions. Lors de ce trajet, ce précurseur oligomérique est glycosylé et clivé en glycoprotéines de surface (SU) et transmembranaire (TM). Les protéines SU et TM demeurent associées et sont ancrées dans la membrane vésiculaire ou cellulaire par l'intermédiaire d'une hélice hydrophobe transmembranaire de la protéine TM.

La glycoprotéine TM des rétrovirus présente de multiples facettes dues à l'association de ses domaines externe, transmembranaire et cytoplasmique (CDTM), qui en font la seule protéine des rétrovirus permettant une communication de part et d'autre des membranes du virus et de la cellule infectée (Cann et al., 1992; Delamarre et al., 1996). Elle est notamment impliquée dans le phénomène de pénétration du virus dans la cellule cible, en provoquant la fusion entre les membranes virales et cellulaires. De plus, lors de son cheminement intracellulaire, la protéine TM est susceptible d'influer sur le tri, le devenir, le ciblage et le bourgeonnement des particules virales, par interactions avec le cytosquelette, ainsi qu'avec les machineries d'ubiquitination et de bourgeonnement (Cann et al., 1992 ; Delamarre et al., 1996 ; Straub et Levy, 1999).

Une étude antérieure suggère que le domaine cytoplasmique de la protéine TM de deux rétrovirus, le virus de la leucémie bovine (BLV, pour « Bovine Leukemia Virus ») et le VIH, permet d'induire l'adressage et la sécrétion d'une protéine recombinante dans les exosomes (De Gassart et al., 2004 ; 2009). Des cellules de la lignée K562 (une lignée cellulaire érythroleucémique d'origine humaine), qui sécrètent des exosomes de façon constitutive, ont été transfectées avec des vecteurs rétroviraux permettant d'exprimer, en système eucaryote, deux types de protéine chimère : (i) une chimère comportant le domaine extracellulaire de la protéine CD8 murine et les domaines transmembranaire et cytoplasmique de la glycoprotéine TM du BLV (chimère TM-BLV/CD8 ; De Gassart et al., 2004 ;

2009), et (ii) une chimère comportant les domaines extracellulaire et transmembranaire de la protéine CD8 murine et le domaine cytoplasmique de la protéine TM du VIH (chimère TM-HIV/CD8 ; De Gassart et al., 2004). Les deux chimères sont exprimées à la fois dans les cellules K562 transfectées et dans les 5 exosomes sécrétés par ces cellules. En particulier, l'expression de la protéine chimère TM-BLV/CD8 dans les cellules de la lignée K562 disparaît rapidement après transit dans le réseau trans-golgien et les compartiments endosomaux tardifs pour se retrouver dans les exosomes sécrétés par ces cellules. Il semble que la chimère comportant le domaine cytoplasmique de la protéine TM du BLV soit plus fortement adressée vers les exosomes que la chimère comportant le 10 domaine cytoplasmique de la protéine TM du VIH.

Cependant, comme le prouvent les résultats présentés dans la partie exemple de la présente demande, des exosomes portant la construction chimère TM-BLV/CD8 décrite par De Gassart et al. ne sont produits efficacement que dans 15 les cellules de la lignée K562, et sont peu ou pas produits efficacement dans d'autres types cellulaires tels que les cellules de la lignée HEK293.

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides chimériques ayant des propriétés d'adressage dans les exosomes. Les polypeptides chimériques de l'invention comportent uniquement des domaines cytosoliques 20 et/ou des domaines nucléaires et s'ancrent dans la membrane des vésicules membranaires, en particulier des exosomes, sans s'insérer dans la bicoche lipidique d'une membrane vésiculaire ou cellulaire, ni traverser cette bicoche lipidique. La présente demande décrit également d'autres polypeptides chimériques capables de s'ancrer dans la membrane des vésicules membranaires, en particulier des exosomes. Ces polypeptides chimériques additionnels comprennent un ou plusieurs domaine(s) membranaire(s), en particulier au moins un domaine transmembranaire. La fonction d'ancrage dans 25 les membranes vésiculaires ou cellulaires de ces polypeptides chimériques additionnels est assurée par leur domaine(s) membranaire(s), qui leur permettent de s'insérer dans la bicoche lipidique d'une membrane vésiculaire ou cellulaire, et le cas échéant de la traverser en partie.

Selon un aspect particulier de l'invention, ces polypeptides chimériques additionnels sont utilisés conjointement avec les polypeptides chimériques de

l'invention.

Les polypeptides chimériques décrits dans cette demande et en particulier les polypeptides chimériques de l'invention se distinguent notamment de ceux décrits dans l'art antérieur et, en particulier de ceux décrits dans De Gassart et al, en ce qu'ils permettent d'adresser de façon beaucoup plus efficace un peptide ou un polypeptide d'intérêt vers des exosomes produits par les cellules de la lignée HEK293 et ainsi, d'amplifier très fortement (de 10 à 100 fois) la production d'exosomes comportant ledit peptide ou polypeptide d'intérêt. Par ailleurs, contrairement aux constructions décrites dans De Gassart et al, qui ne peuvent être utilisées efficacement que dans des cellules de la lignée K562, ces polypeptides peuvent être adressés à la membrane d'exosomes et sécrétés en association avec des vésicules membranaires, en particulier des exosomes produit(e)s par différents types cellulaires, en particulier des cellules HEK293 ou des lymphocytes T ou des lymphocytes B, et pas uniquement par des cellules de la lignée K562. La présente invention permet notamment de produire des quantités importantes de vésicules membranaires, en particulier d'exosomes, utilisables comme outils de recherche mais aussi en diagnostic, dans des applications médicales et en particulier en immunisation et notamment en vaccination.

De telles vésicules membranaires (notamment exosomes) pourraient également être produites *in vivo* par un hôte humain ou non humain (en particulier un mammifère humain ou non humain ou un oiseau), que l'on souhaite par exemple immuniser, et en particulier vacciner, en administrant, à cet hôte, une composition et en particulier une composition immunogène dont le principe actif est un polynucléotide codant pour un polypeptide de l'invention, en particulier une composition immunogène à base d'ADN, et plus particulièrement un vaccin à ADN, ou une composition immunogène dont le principe actif consiste en des vésicules membranaires (en particulier des exosomes) comportant un polypeptide de l'invention.

Un premier objet de la présente invention est un polypeptide chimérique caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en les domaines suivants:

- (i) un peptide ou polypeptide d'intérêt ;
- (ii) un domaine de ciblage sous-membranaire; et

- (iii) un domaine cytoplasmique (CD) d'une protéine membranaire, permettant, dans des cellules eucaryotes, l'adressage dudit polypeptide chimérique vers les vésicules membranaires, en particulier vers les vésicules formant des exosomes, et/ou vers le(s) compartiment(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans la formation des vésicules membranaires, et en particulier des vésicules formant les exosomes, ou un dérivé muté de ce domaine CD, ce dérivé muté étant défini par la substitution, la délétion et/ou l'insertion d'un ou plusieurs résidu(s) dans la séquence du domaine CD de référence et ce dérivé muté conservant la susdite capacité d'adressage du domaine CD, le domaine CD ou son dérivé muté comprenant au moins un motif YxxL, et un motif PxxP, dans x représente un résidu quelconque,

étant entendu que les domaines présents dans le polypeptide chimérique, en particulier les domaines (i), (ii) et (iii), sont des domaines cytosoliques ou nucléaires (par exemple, les domaines (i) et (iii) sont cytosoliques) et que ledit polypeptide chimérique est dépourvu de peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique. Le terme « résidu » tel qu'utilisé dans la présente demande fait référence à un résidu d'acide aminé. Ces résidus sont indiqués en utilisant le code abrégé à une lettre, par exemple, Y pour un résidu tyrosine, L pour un résidu leucine, P pour un résidu proline et x pour un résidu quelconque.

Le motif PXXP dans le domaine CD ou son dérivé muté est de préférence le motif PSAP (SEQ ID NO. 88) ou le motif PTAP (SEQ ID NO. 89).

Le polypeptide chimérique de l'invention est en particulier capable d'être sécrété en association avec des vésicules membranaires, en particulier avec des exosomes, lorsqu'il est exprimé dans des cellules eucaryotes appropriées. Lorsque des exosomes comportant le polypeptide de l'invention sont sécrétés, le peptide ou le polypeptide d'intérêt se trouve inclus (en totalité) dans la fraction cytosolique de ces exosomes. Ceci permet d'attester notamment que le polypeptide chimérique de l'invention est dépourvu de peptide signal qui permettrait l'importation dans le réticulum endoplasmique.

Selon un mode de réalisation particulier, les domaines (i) à (iii) sont positionnés successivement dans l'ordre suivant, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale dans le polypeptide chimérique de l'invention: domaine de ciblage sous-membranaire (ii) - peptide ou polypeptide d'intérêt (i) - domaine CD

ou son dérivé muté (iii).

Alternativement, les domaines (i) à (iii) peuvent être positionnés dans un ordre différent, par exemple dans l'ordre suivant : domaine de ciblage sous-membranaire (ii) - domaine CD ou son dérivé muté (iii) - peptide ou polypeptide d'intérêt (i). L'un ou l'autre des domaines (ii) ou (iii) ou les deux domaines (ii) et (iii) peuvent aussi être positionnés entre deux domaines différents ou identiques de type (i), ils peuvent être aussi insérés à l'intérieur d'un domaine (i), par exemple dans l'ordre N-terminal de (i) - (ii) [ou (iii)] - (iii) [ou (ii)] - fragment C-terminal restant de (i).

Le terme « chimérique » désigne ici un polypeptide qui associe plusieurs domaines, d'au moins deux types différents par leur fonction et/ou par leur localisation cellulaire, au moins deux de ces domaines provenant de molécules distinctes, en particulier provenant soit de différentes protéines d'une même espèce ou d'espèces différentes soit d'une même protéine de différentes espèces.

Un « polypeptide chimérique » tel que défini dans la présente demande peut être le produit d'expression d'un polynucléotide recombinant et peut être exprimé par voie recombinante dans une cellule hôte. Ledit polypeptide chimérique est donc par exemple un polypeptide de fusion.

Par « domaine » d'une protéine ou d'un polypeptide on entend une région ayant une propriété fonctionnelle et/ou une localisation, cellulaire pour ladite protéine ou ledit polypeptide.

Le terme « domaine de ciblage sous-membranaire » ou « domaine d'adressage à la membrane » ou « domaine de recrutement à la membrane » (ou d'association aux membranes cellulaires et vésiculaires) désigne, dans la présente demande, un domaine capable, dans une cellule et en particulier dans une cellule eucaryote (par exemple une cellule productrice d'exosome), de s'ancrer à une membrane cellulaire et/ou une membrane vésiculaire sans être inséré dans ladite ou lesdites membrane(s), l'ancrage à la membrane ou aux membranes pouvant être assuré au moyen d'une ou plusieurs molécule(s) d'ancrage (ledit domaine étant capable de lier ladite ou lesdites molécule(s) d'ancrage) et/ou par des interactions (en particulier des interactions électrostatiques) entre ledit domaine de ciblage sous-membranaire et ladite ou lesdites membrane(s). Selon un mode de réalisation particulier, ledit domaine est

capable, dans une cellule et en particulier dans une cellule eucaryote (par exemple une cellule productrice d'exosome), de se fixer à ou d'interagir avec la face interne (c'est-à-dire cytoplasmique) de la membrane plasmique et/ou de vésicules membranaires, par l'intermédiaire d'une ou plusieurs molécule(s) 5 d'ancre et/ou par des interactions (en particulier des interactions électrostatiques).

Le terme « ciblage sous-membranaire », « adressage à la membrane » ou « recrutement à la membrane », lorsqu'il est appliqué au domaine (ii) présent dans le polypeptide chimérique de l'invention, implique une capacité à interagir (par 10 l'intermédiaire d'une ou plusieurs molécule(s) d'ancre et/ou par des interactions, en particulier des interactions électrostatiques) avec une membrane cellulaire (en particulier la membrane plasmique) et/ou une membrane vésiculaire. Le cas échéant (mais pas nécessairement), ce terme implique également une prise en charge cellulaire active permettant d'amener ledit domaine (ii) et, par conséquent, 15 un polypeptide chimérique comprenant ledit domaine (ii), à proximité d'une membrane cellulaire (en particulier la membrane plasmique) ou vésiculaire, de telle sorte que des interactions avec ladite membrane deviennent possibles.

Le domaine de ciblage sous-membranaire est suffisant pour permettre l'ancre du polypeptide chimérique de l'invention à la bicouche lipidique de 20 membranes cellulaires ou vésiculaires (par l'intermédiaire d'une ou plusieurs molécule(s) d'ancre et/ou par des interactions). Ainsi, de part sa présence dans le polypeptide chimérique de l'invention, le domaine de ciblage sous-membranaire permet au polypeptide chimérique de l'invention exprimé dans une cellule et en particulier une cellule eucaryote, d'être ancré à (parfois indiqué par 25 l'expression « ancré dans ») une membrane cellulaire ou vésiculaire, sans que ledit polypeptide soit inséré dans ladite membrane. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le domaine de ciblage sous-membranaire confère au polypeptide chimérique de l'invention la propriété de se fixer (par l'intermédiaire d'une ou plusieurs molécule(s) d'ancre et/ou par des interactions, en particulier 30 des interactions électrostatiques) à la membrane vésiculaire et cellulaire et en particulier à la face interne de la membrane plasmique et de vésicules membranaires.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le domaine de

ciblage sous-membranaire comporte 5 à 40 résidus, de préférence 8 à 25 ou 12 à 25 résidus et plus préférablement 14 à 25 ou 16 à 23 résidus, par exemple 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25 résidus.

Par « molécule d'ancrage », on entend, dans la présente demande, toute molécule susceptible de s'insérer dans la bicouche lipidique (en particulier dans au moins un feuillett de la bicouche lipidique) d'une membrane cellulaire ou vésiculaire et en particulier un lipide ou une molécule lipidique (c'est-à-dire une molécule comportant un ou plusieurs lipide(s)) ; le domaine de ciblage sous-membranaire et le polypeptide chimérique de l'invention sont alors dits « à ancrage lipidique ».

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la molécule d'ancrage au sens de l'invention comprend ou consiste en un ou plusieurs lipide(s), ledit ou lesdits lipides comportant une chaîne carbonée hydrophobe lui (leur) permettant de s'enchâsser dans la bicouche lipidique d'une membrane cellulaire ou vésiculaire.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le(s) lipide(s) présent(s) dans la molécule d'ancrage est (sont) choisi(s) parmi les acides gras, par exemple parmi les acides myristiques, les acides palmitiques, et les isoprénoides, en particulier les géranyl-géranyl et les farnésyl.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la ou les molécule(s) d'ancrage est (sont) liée(s) au domaine de ciblage sous-membranaire présent dans le polypeptide chimérique de l'invention par une liaison covalente.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention le terme domaine de ciblage sous-membranaire » permet au polypeptide chimérique de l'invention d'être ancré à la bicouche lipidique par l'intermédiaire d'un ou plusieurs acide(s) gras, en particulier un ou plusieurs acide(s) gras choisi(s) parmi les acides myristiques, les acides palmitiques et les géranyl-géranyl, et/ou par l'intermédiaire d'un peptide ou d'une structure peptidique capable d'interagir avec un ou plusieurs lipide(s) ou motif(s) lipidique(s) présent(s) dans une bicouche lipidique, en particulier avec un phospholipide. Ainsi, le polypeptide chimérique de l'invention est ancré aux membranes cellulaires et vésiculaires sans être inséré dans lesdites membranes.

Selon un mode de réalisation préféré, ce domaine est suffisant pour lier un

5 acide gras et en particulier un acide myristique, un acide palmitique ou un géranyl-géranyl. Cette liaison peut se faire notamment sur un résidu G (par exemple dans le cas d'un acide myristique), C ou S du domaine de ciblage sous-membranaire. Il peut notamment s'agir d'une liaison amide ou thioester. L'acide gras, en particulier l'acide myristique peut se lier au domaine de ciblage sous-membranaire par une liaison covalente.

10 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le domaine de ciblage sous-membranaire comprend ou consiste en un peptide ou une structure peptidique (c'est à dire une structure comprenant un ou plusieurs résidu(s) d'acides aminés et de préférence un ou plusieurs enchaînement(s) d'au moins deux résidu(s) d'acides aminés consécutifs) capable d'interagir avec un ou plusieurs lipide(s) (en particulier un ou plusieurs acide(s) gras) ou avec un ou plusieurs motif(s) lipidique(s) (en particulier un ou plusieurs motif(s) lipidique(s) comprenant ou consistant en un ou plusieurs acide(s) gras) présent(s) dans une bicoche lipidique, en particulier avec un phospholipide.

15 Le domaine de ciblage sous-membranaire et le peptide ou le polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique de l'invention peuvent être dérivés ou non d'une même entité, en particulier d'une même protéine.

20 Selon un mode de réalisation préféré, le domaine de ciblage sous-membranaire est celui d'une protéine membranaire extrinsèque ou est un dérivé muté du domaine de ciblage sous-membranaire d'une protéine membranaire extrinsèque.

25 Selon un mode de réalisation préféré, le « domaine de ciblage sous-membranaire » comporte ou consiste une séquence consensus permettant l'attachement, par exemple par acylation ou par prénylation, d'un acide gras et en particulier acide myristique, d'un acide palmitique ou d'un géranyl-géranyl.

30 Ladite séquence consensus peut comprendre ou consister en la séquence suivante : M-G-X₁-X₂-X₃-S/C (dans laquelle X₁, X₂, et X₃ désignent indépendamment un résidu quelconque), en particulier dans le cas où elle permet l'attachement d'un acide myristique. Lorsqu'un acide gras se lie à cette séquence consensus, c'est généralement sur le résidu G, par exemple en position 2.

 Selon un mode de réalisatrion particulier,

 - X₁ est choisi parmi C, S et L ; et/ou

- X_2 est choisi parmi S, I, V, M et L ; et/ou
- X_3 est choisi parmi K, Q, H, F, C et S.

5 Lorsque ladite séquence consensus permet l'attachement d'un acide myristique, elle est de préférence localisée en position N-terminale (par exemple en position 2) dans le domaine de ciblage sous-membranaire, et donc dans le polypeptide de l'invention.

10 Selon un mode de réalisation préféré, le « domaine de ciblage sous-membranaire » comporte plusieurs résidus d'acides aminés basiques, en particulier plusieurs résidus choisis parmi K, R et H. « Plusieurs » signifie ici au moins deux, et de préférence au moins trois, par exemple, deux, trois quatre, cinq, ou plus de cinq.

15 Ces acides aminés peuvent être notamment impliqués dans des interaction avec des lipides des membranes cellulaires ou vésiculaires, notamment avec la choline (par exemple avec la phosphatidyl choline) et permettent ainsi d'augmenter l'affinité du ciblage sous-membranaire pour ces membranes.

Les acides aminés basiques du domaine de ciblage sous-membranaire peuvent être localisés dans la séquence consensus décrite ci-dessus et/ou en dehors de cette séquence consensus.

20 Ainsi, selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le domaine de ciblage sous-membranaire de l'invention:

- comprend ou consiste en une séquence choisie parmi les séquences suivantes :M-G-x-x-K-S/C-K-x-K et M-G-x-x-K-S/C-K-x-K-x-x-x-R-R-R dans lesquelles x désigne un résidu quelconque) ; une telle séquence peut par exemple permettre l'attachement d'un acide myristique (par exemple en position 2), ou

25 - consiste en un dérivé muté de cette séquence, ledit dérivé muté conservant la capacité de ce domaine à s'y ancrer dans la bicouche lipidique d'une membrane cellulaire.

Le domaine de ciblage sous-membranaire peut être notamment issu d'une protéine de la famille des protéines Src, en particulier d'une protéine choisie parmi les protéines Src, Yes, Lyn, Fyn, Lck, Blk, Fgr, Hck et Yrk (Resh, 1994), et plus particulièrement de la partie N-terminale d'une de ces protéines. Par exemple ce domaine peut être issu de la protéines c-Src ou v-Src (de préférence c-Src). Ce domaine peut par exemple comprendre ou consister en les 15, 16, 17, 18, 19, 20,

21, 22, 23, 24 ou 25 acides aminés N-terminaux d'une de ces protéines, et en particulier de la protéine Src.

Alternativement, le domaine de ciblage sous-membranaire peut être issu d'autres protéines acylées, en particulier de protéines de capsides virales, exemple protéine MA du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou de protéines de filovirus.

Ainsi, le domaine de ciblage sous-membranaire peut être issu d'une protéine Src, et en particulier comporter ou consister en la séquence suivante : M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R-R-R (SEQ ID NO.:104) ou M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R-R-R-K-S-R-G-P-G-G (SEQ ID NO.:105) ou consister en un dérivé muté du domaine de séquence M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R-R-R ou M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R-R-R-K-S-R-G-P-G-G.

Le terme « issu d'une protéine particulière » indique, dans la présente demande que le peptide ou polypeptide visé comprend ou consiste en cette protéine particulière, ou en un fragment de ladite protéine particulière, ou un dérivé muté de ladite protéine ou du fragment par substitution ou délétion d'acides aminés.

Parmi d'autres peptides ou structures peptidiques capables d'interagir avec un ou plusieurs lipide(s) ou un motif lipidique particulier, qui permettent de cibler la face interne de membranes cellulaires ou vésiculaires, on peut citer les domaines FYVE (Hurley, JH ; 2006). Ainsi, selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le domaine de ciblage sous-membranaire comprend ou consiste en un ou plusieurs domaine(s) FYVE.

L'expression « vésicule membranaire » désigne au sens de la présente demande toute vésicule composée d'une bicouche lipidique renfermant une fraction cytosolique telle que produite par des cellules eucaryotes. Cette expression inclut notamment les vésicules sécrétées dans l'espace extracellulaire, c'est-à-dire les exosomes.

Par « exosomes », on entend, dans la présente demande, des nanovésicules des membranes cellulaires telles que définies ci-dessus. Ces exosomes peuvent être purifiés à partir des surnageants de culture de cellules par centrifugation différentielle, par ultra-filtration ou par adsorption sur un support ou par tout autre procédé, comme illustré dans les exemples.

L'expression « sécrété en association avec des vésicules membranaires, en particulier avec des exosomes » signifie, dans la présente demande, qu'un polypeptide chimérique de l'invention et/ou au moins un de ses produits de dégradation est sécrété dans l'espace extracellulaire, non pas sous forme soluble dans cet espace extracellulaire, mais sous une forme ancrée à la face interne de la membrane des vésicules membranaires, en particulier des exosomes.

Dans la mesure où le polypeptide chimérique de l'invention ne comporte pas de peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique, c'est un résident permanent du cytosol ou du noyau (il reste localisé dans le cytosol ou dans le noyau) et va donc se trouver non pas intégré dans la membrane ni à la surface d'une vésicule membranaire et en particulier d'un exosome sécrété par une cellule productrice d'exosome, mais à l'intérieur (c'est-à-dire dans la lumière) de cette vésicule membranaire. De plus, ce polypeptide est adressé à la membrane et ancré à la membrane des vésicules membranaires et en particulier des exosomes par l'intermédiaire d'un peptide capable d'interagir avec un ou plusieurs lipide(s) ou un motif lipidique présent(s) dans la couche interne d'une bicouche lipidique, en particulier un phospholipide, ou, de préférence, par l'intermédiaire d'un ou plusieurs acide(s) gras (en particulier un ou plusieurs acide(s) gras choisi(s) parmi les acides myristiques, les acides palmitiques et les géranyl-géranyl), qui interagissent avec le domaine de ciblage sous-membranaire.

Ce(s) acide(s) gras peuvent être attachés de façon co-traductionnelle et permettent au polypeptide chimérique produit dans le cytoplasme d'une cellule de se s'ancrer de façon post-traductionnelle dans des membranes cellulaires ou vésiculaires.

Selon un mode de réalisation particulier, le polypeptide chimérique de l'invention est produit avec et est intégré dans les exosomes avant leur sortie de la cellule.

La sécrétion d'un peptide ou d'un polypeptide en association avec des vésicules membranaires (en particulier des exosomes) requiert notamment (1) l'adressage dudit peptide ou d'un polypeptide au(x) lieu(x) de formation des vésicules membranaires et en particulier des exosomes, et (2) le bourgeonnement vésiculaire à partir de la membrane dans laquelle ledit peptide ou polypeptide est ancré.

Le terme « adressage » encore appelé « tri », « aiguillage » ou « routage intracellulaire » fait référence, dans la présente demande, au processus qui permet à un polypeptide, dont la synthèse débute dans le cytosol, d'être dirigé vers et d'atteindre les compartiments impliqués dans le bourgeonnement de vésicules membranaires, en particulier des vésicules formant les exosomes et/ou d'atteindre les vésicules membranaires, en particulier les vésicules formant les exosomes.

Le terme « sécrétion » désigne, dans le cadre de l'invention, le processus par lequel des vésicules membranaires, alors appelées « exosomes », sont sécrétées, c'est-à-dire relarguées dans l'espace extracellulaire à partir d'une ou plusieurs cellule(s). Ce processus peut notamment se produire lorsque des endosomes multivésiculaires fusionnent avec la membrane plasmique d'une cellule, relarguant ainsi les vésicules membranaires qu'ils contiennent à l'extérieur de la cellule.

Comme illustré dans les exemples ci-après, un test permettant de mettre en évidence les propriétés d'adressage et de sécrétion d'un polypeptide chimérique tel que défini dans la présente demande consiste à vérifier que ledit polypeptide chimérique et/ou ses produits de dégradation se retrouvent bien associés avec des vésicules membranaires (en particulier des exosomes) lorsque ledit polypeptide est exprimé dans des cellules eucaryotes appropriées.

Une cellule eucaryote « appropriée » est avantageusement une cellule eucaryote comportant des vésicules internes de sécrétion, cultivable, capable d'exocytose, modifiable génétiquement et, préférentiellement, dont les vésicules internes peuvent être sécrétées sous l'effet d'une stimulation externe. Il s'agit en particulier d'une cellule de mammifère et plus particulièrement d'une cellule d'origine humaine ou une cellule ayant pour origine un mammifère non humain. Il peut également s'agir de cultures primaires ou de lignées immortalisées. De telles cellules eucaryotes « appropriées » incluent notamment les cellules eucaryotes naturellement capables de produire des exosomes, en particulier les mastocytes, lymphocytes T et B et les cellules dendritiques (par exemple les cellules de Langerhans) ou des cellules dérivées de ces types cellulaires, ainsi que les cellules eucaryotes ou les lignées cellulaires eucaryotes modifiées par génie génétique de façon à les rendre capables de sécréter des exosomes.

Le terme « bicouche lipidique », désigne la structure de base de la membrane plasmique et de toute membrane biologique, c'est-à-dire tout assemblage de lipides amphiphile en un double feuillet (ou double couche) séparant une cellule ou une vésicule de son environnement et délimitant le cytoplasme d'une cellulaire ou d'une vésicule, ou délimitant les organites à l'intérieur du cytoplasme. Ce terme englobe donc toute membrane de la cellule, c'est-à-dire à la fois la membrane plasmique et les membranes des différents compartiments intracellulaires, en particulier celles du réticulum endoplasmique, celles de l'appareil de Golgi, ou encore celle des vésicules membranaires, par exemple celle des exosomes ou des endosomes.

Par « domaine cytoplasmique » (CD), on entend, dans la présente demande, un domaine cytoplasmique particulier capable d'être adressé vers les vésicules membranaires, en particulier vers les vésicules formant des exosomes, ou vers le(s) compartiment(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans la formation des vésicules membranaires, et en particulier des vésicules formant les exosomes dans des cellules eucaryotes; ce domaine peut ainsi être sécrété dans l'espace extracellulaire en association avec des exosomes, lorsqu'il est exprimé dans des cellules eucaryotes appropriées. Ainsi, ce domaine permet, lorsqu'il est intégré à un polypeptide chimérique comprenant un peptide ou un polypeptide d'intérêt, d'adresser ledit polypeptide chimérique vers les vésicules membranaires et/ou vers leurs(s) lieu(x) de formation et en particulier d'adresser ledit polypeptide chimérique à la membrane de vésicules membranaires, de façon à ce que ce ledit polypeptide puisse être sécrété en association avec des vésicules membranaires (en particulier des exosomes) par une cellule, en particulier une cellule eucaryote appropriée.

Un « dérivé muté » d'un domaine au sens de la présente demande fait référence à tout polypeptide ou peptide modifié par rapport au domaine original ou de référence, sous réserve que ce dérivé muté conserve la fonction impliquant normalement ledit domaine : cette fonction est par exemple la capacité d'adressage vers les vésicules membranaire (et en particulier vers les exosomes) normalement attachée au domaine CD de référence, la fonction d'ancrage à une bicouche lipidique normalement attachée au domaine de ciblage sous-membranaire, et, pour les peptides chimériques additionnels la fonction d'insertion

et d'ancrage dans une bicouche lipidique impliquant normalement un domaine membranaire et en particulier la capacité à traverser entièrement et s'ancrer dans une bicouche lipidique impliquant normalement un domaine transmembranaire. Un tel dérivé muté peut donc correspondre par exemple à un fragment composé de résidus contigus dudit domaine original ou de référence (ce dérivé étant obtenu notamment par délétion et éventuellement substitution d'un ou plusieurs résidu(s) dans la séquence originale) ou, au contraire à un polypeptide de taille plus importante que le domaine original ou de référence, en particulier un polypeptide comprenant le domaine original ou de référence (ce dérivé étant obtenu notamment par insertion d'un ou plusieurs résidu(s) dans la séquence originale).

Selon un mode de réalisation particulier, le « dérivé muté » diffère de la séquence originale ou de référence par la substitution d'au moins un résidu, de préférence un, deux, trois, quatre, cinq, voire plus de cinq résidu(s), consécutifs ou non, dans la séquence du domaine original, ces substitutions pouvant être conservatives, semi-conservatives ou non conservatives, et/ou par la délétion d'au moins un résidu, de préférence un, deux, trois, quatre, cinq, voire plus de cinq résidus, consécutifs ou non, et/ou par l'insertion d'au moins un résidu, de préférence un, deux, trois, quatre, cinq, voire plus de cinq résidus, consécutifs ou non, dans la séquence du domaine original.

La séquence de ce « dérivé muté » peut présenter au moins 60 ou 70%, en particulier au moins 80%, 90% ou 95%, de similarité ou d'identité avec le domaine original dont elle dérive, par référence à la séquence complète du domaine original. Par « pourcentage d'identité », on entend, dans la présente demande, le nombre de résidus identiques rapporté au nombre total de résidus du peptide ou polypeptide étudié. Le « pourcentage de similarité », définit le nombre de résidus identiques ou chimiquement similaires rapporté au nombre total de résidus du peptide ou polypeptide étudié. Le pourcentage d'identité ou de similarité est déterminé en alignant les deux séquences à comparer et en utilisant l'algorithme de Needleman et Wunsch, qui permet un alignement global entre deux séquences. Le pourcentage de similarité ou d'identité est alors calculé sur la totalité de la longueur de ces deux séquences.

Selon un mode de réalisation particulier, le domaine CD ou son dérivé muté comprend deux ou trois motifs YxxL, dans lesquels x représente un résidu

quelconque. Le motif ou un des motifs YxxL présent(s) dans le domaine CD peut (peuvent) être, par exemple, le motif YINL (SEQ ID NO. 91) ou YSHL (SEQ ID NO. 97).

Selon un mode de réalisation particulier, le domaine CD ou son dérivé muté comprend un motif DYxxL, dans lequel x représente un résidu quelconque. A titre d'exemple illustré dans la partie expérimentale, on citera le motif DYINL (SEQ ID NO. 93).

Alternativement ou de façon complémentaire, le domaine CD comprend au moins un motif équivalent à un motif YxxL ou à un motif DYxxL, par exemple un motif YxxF ou DYxxF respectivement, dans lequel x représente un résidu quelconque. Par exemple, le récepteur de la transférine, qui est une protéine cellulaire, comporte un domaine YxxF.

La description de la présente demande, faite par référence au domaine YxxL en général ou tel qu'illustré par des séquences particulières, vaut également pour les domaines DYxxL ou DYxxF, définis en termes généraux ou ayant des séquences spécifiques dérivées des exemples donnés de motifs.

Selon un mode de réalisation préféré, le domaine CD ou son dérivé muté comprend en outre deux, trois ou quatre motif(s) PxxP, dans lequel x représente un résidu quelconque, au moins un de ces motifs PxxP étant le motif PSAP (SEQ ID NO. 88) ou PTAP (SEQ ID NO. 89). Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le motif PxxP du domaine CD ou de son dérivé muté est PSAP ou PTAP (plus préférablement PSAP) et le motif YxxL est YINL ou YSHL.

Dans un mode de réalisation particulier, le motif YxxL du domaine CD (par exemple le motif YINL ou YSHL), ou un des motifs est YxxL, est localisé en position C-terminale par rapport au motif PxxP (par exemple le motif PSAP).

Dans un mode de réalisation particulier, le motif YxxL du domaine CD (par exemple le motif YINL ou YSHL) est localisé en position N-terminale par rapport au motif PxxP (par exemple le motif PSAP).

Parmi les protéines ayant un domaine CD comportant au moins un motif YxxL, on trouve notamment des protéines cellulaires et des protéines virales. Ces protéines virales sont notamment des protéines de virus enveloppés, en particulier les glycoprotéines TM de virus enveloppés et notamment de rétrovirus.

Selon un mode de réalisation particulier, le domaine CD est celui d'une

protéine TM du virus de la leucémie bovine (BLV). Ce rétrovirus, qui fait partie des Oncovirinae (c'est un Oncovirus), induit, chez les bovins, une prolifération des cellules B pouvant engendrer une leucémie..

Le domaine CD de la protéine TM du BLV est composé de 58 résidus, et a pour 5 séquence SEQ ID NO.6. Le domaine CD du polypeptide chimérique de l'invention ou son dérivé muté correspond alors soit au domaine de séquence SEQ ID NO.6, soit à un dérivé muté du domaine de séquence SEQ ID NO.6.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le dérivé muté du domaine CD est un fragment de domaine CD natif constitué essentiellement par 10 une séquence d'acides aminés s'étendant du motif PSAP (ou PTAP) jusqu'au motif YxxL (par exemple YINL ou YSHL) qui, dans un mode de réalisation particulier, le suit en partie C-terminale. Le cas échéant, un ou plusieurs résidus d'acide aminé naturellement présent(s) dans le domaine CD, entre ces deux motifs, est (sont substitué(s) ou déleté(s)).

Selon un mode de réalisation particulier, le domaine CD du polypeptide chimérique de l'invention ou son dérivé muté, en particulier le dérivé muté du domaine CD, est dépourvu de la séquence KCLTSRLLKLLRQ. Ainsi, le dérivé muté du domaine CD peut différer du domaine CD original en ce que sa séquence est dépourvue de la séquence : KCLTSRLLKLLRQ.

En outre, ou alternativement, la séquence du dérivé muté du domaine CD peut présenter au moins 60 ou 70%, en particulier au moins 80%, 90% ou 95%, 20 de similarité ou d'identité avec la séquence du domaine CD original dépourvue de l'enchaînement KCLTSRLLKLLRQ.

Il peut également être préférable que le domaine CD ou son dérivé muté, 25 et en particulier son dérivé muté soit dépourvu de la séquence PC et/ou de la séquence CP. Selon un mode de réalisation particulier, ledit domaine CD ou son dérivé muté, en particulier son dérivé muté est notamment dépourvu de la séquence PCP. Ainsi, si le domaine CD original contient une séquence PCP, son dérivé muté peut être obtenu notamment en déletant, dans la séquence du domaine CD original, le résidu cystéine de ladite séquence PCP, ou en le substituant par un autre résidu, de préférence par un résidu non palmitoylable, par exemple un résidu alanine.

Selon un mode de réalisation particulier, le domaine CD ou son dérivé est

dépourvu à la fois de la séquence PCP et de l'enchaînement KCLTSRLLKLLRQ.

A titre d'exemple, le dérivé muté du domaine CD de la protéine TM du BLV peut comprendre ou consister en la séquence SEQ ID NO.8, qui correspond à la séquence SEQ ID NO.6 dans laquelle les 13 résidus N-terminaux ont été déletés.

A titre d'exemple également, la séquence du dérivé muté de la protéine TM du BLV peut différer de la séquence du domaine CD de la protéine TM du BLV par la substitution d'au moins un résidu, de préférence un, deux, trois, quatre, cinq, voire plus de cinq résidu(s), consécutifs ou non, et/ou par la délétion et/ou l'insertion d'au moins un résidu, de préférence un, deux, trois, quatre, cinq, voire plus de cinq résidu(s), consécutifs ou non dans la séquence dudit domaine correspondant à la séquence SEQ ID NO.8.

Encore à titre d'exemple, la séquence du dérivé muté du domaine CD de la protéine TM du BLV (domaine CD de séquence SEQ ID NO.6) peut présenter au moins 60 ou 70%, en particulier au moins 80%, 90% ou 95%, de similarité ou d'identité avec la séquence SEQ ID NO.8. De préférence, la séquence dudit dérivé muté conserve notamment le motif YINL, YSHL (ou, le cas échéant, DYINL) et le motif PSAP de la séquence SEQ ID NO.8.

La séquence du dérivé muté du domaine CD de séquence SEQ ID NO.6 est, de préférence, dépourvue de motif PC (proline – cystéine) et CP (cystéine - proline) et, plus préférablement dépourvue de motif PCP (proline - cystéine - proline). Par exemple, il peut comprendre ou consister en la séquence SEQ ID NO. 10 ou SEQ ID NO.12.

Selon un mode de réalisation particulier, le domaine CD ou son dérivé muté, en particulier le dérivé muté du domaine CD de séquence SEQ ID NO.6, comprend ou consiste en une séquence choisie parmi les séquences suivantes:

PxxPxxxxPxxPxSxYxxLxPxxPExYxxLxPxxPDYxxL ;

PxxPx_nPxxPx_nSxYxxLx_nPxxPEx_nYxxLx_nPxxPDYxxL ;

PxxPxxxxPxxPxSxYxxLxPxxPExYxxLxPxxPDYxxLxxxx ; et

PxxPx_nPxxPx_nSxYxxLx_nPxxPEx_nYxxLx_nPxxPDYxxLxxxx ;

dans lesquelles x et x_n représentent respectivement un résidu quelconque et un ou plusieurs résidu(s) quelconque(s), et dans lesquelles au moins un des motifs PxxP est le motif PSAP ou PTAP .

Selon un mode de réalisation particulier, le domaine CD ou son dérivé

muté, en particulier le dérivé muté du domaine CD de séquence SEQ ID NO.6, comprend ou consiste en une séquence choisie parmi les séquences suivantes:

PxxPxxxxxxxxxxxxYxxL ;
PxxPxxxxxxxxxxxxDYxxL ;
5 PxxPxxYxxxxxxxxYxxL ;
PxxPxxYxxxxxxxxDYxxL ;
PxxPExYxxLxPxxPDYxxL ;
PxxPx_nYxxL ;
PxxPx_nDYxxL ;
10 PxxPx_nYx_nYxxL ;
PxxPx_nYx_nDYxxL ;
PxxPEx_nYxxLx_nPxxPDYxxL ;
PxxPxxxxPxxPxxxYxxLxPxxPExYxxLxPxxPDYxxL ;
PxxPx_nPxxPx_nYxxLx_nPxxPEX_nYxxLx_nPxxPDYxxL ;
15 PxxPxxxxPxxPxxxYxxLxPxxPExYxxLxPxxPDYxxLxxxx ; et
PxxPx_nPxxPx_nYxxLx_nPxxPEX_nYxxLx_nPxxPDYxxLxxxx.

dans lesquelles x et x_n représentent respectivement un résidu quelconque et un ou plusieurs résidu(s) quelconque(s), au moins un des motifs PxxP étant le motif PSAP ou PTAP.

20 En particulier n est supérieur ou égal à 1 et inférieur à 50. n peut avoir en particulier toute valeur entre 1 et 20.

A titre d'exemple, le motif PxxP qui, dans un mode de réalisation particulier, se trouve en position N-terminale dans les séquences indiquées ci-dessus, peut être le motif PSAP ou PTAP.

25 Alternativement ou de façon complémentaire, le motif YxxL qui, dans un mode de réalisation particulier, se trouve en position C-terminale dans les séquences indiquées ci-dessus, peut être par exemple le motif YINL ou YSHL.

30 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, lorsque le domaine CD ou son dérivé muté comprend l'une des séquences ci-dessus, les résidus d'acides aminés consécutifs ajoutés en amont ou en aval de cette séquence ne forment pas un motif PxxP ni un motif YxxL, YxxF, DYxxL ou DYxxF.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit dérivé muté du domaine CD de séquence SEQ ID NO.6 comporte 6 à 100 résidus, en particulier 20 à 80, 30 à

70 ou 40 à 60, par exemple 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ou 50 résidus.

A titre d'exemple, la séquence du dérivé muté du domaine CD peut comprendre ou consister en la séquence SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 44 ou SEQ ID NO. 95 ou présenter au moins 60 ou 70%, en particulier au moins 80%, 90% ou 95%, de similarité ou d'identité avec la séquence SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 44 ou SEQ ID NO. 95 par référence respectivement à la séquence SEQ ID NO. 30, SEQ ID NO. 42, SEQ ID NO. 44 ou SEQ ID NO. 95 complète.

Par « peptide ou polypeptide d'intérêt » on entend, dans la présente demande, tout un enchaînement de plusieurs (au moins deux) résidus successifs, formant la structure d'un peptide ou d'un polypeptide. Un peptide désigne une chaîne de 2 à 20 résidus successifs (en particulier 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 résidus), en particulier une chaîne de 5 à 10, de 10 à 15 ou de 15 à 20 résidus successifs. Un polypeptide, qui désigne également une protéine ou un fragment d'une protéine, est un enchaînement de plus de 20 (au moins 21) résidus successifs, en particulier une chaîne de 21 à 1000 résidus successifs, de préférence de 21 à 500, 21 à 250 ou 21 à 150 résidus successifs, par exemple 21 à 50, 50 à 100, 100 à 150 résidus successifs. Ledit peptide ou polypeptide d'intérêt peut être en particulier comprendre ou consister en un ou plusieurs domaines d'une protéine soluble, membranaire, transmembranaire et/ou multimérique.

Selon un mode de réalisation particulier, le « peptide ou polypeptide d'intérêt », en particulier le peptide ou polypeptide d'intérêt présent dans le polypeptide chimérique de l'invention comprend ou consiste en un ou plusieurs domaine(s) d'une protéine cytosolique ou d'une protéine nucléaire, ou un ou des fragment(s) de ce(s) domaine(s).

Par « fragment » d'un domaine on entend, dans la présente demande, une portion composée d'au moins 6 résidus contigus dudit domaine, et en particulier une portion présentant au moins 50%, de préférence au moins 60%, 70%, 80%, ou au moins 90%, voire 100% d'identité avec la séquence complète dudit domaine. Quoi qu'il en soit, un fragment est de taille inférieure à la taille de la protéine dont il dérive.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit peptide ou polypeptide

d'intérêt est antigénique, c'est-à-dire qu'il est capable d'éliciter une réponse immunitaire dirigée contre ledit peptide ou polypeptide d'intérêt. Ledit peptide ou polypeptide d'intérêt peut en particulier comprendre ou consister en un ou plusieurs épitope(s) d'une protéine.

5 Selon un mode de réalisation particulier, ledit peptide ou polypeptide d'intérêt provient d'un organisme pathogène, par exemple un virus, une bactérie ou un parasite, ou d'un agent pathogène, par exemple une cellule tumorale, une toxine.... Tout composant peptidique cytoplasmique ou nucléaire d'un tel organisme ou agent pathogène peut être utilisé, qu'il s'agisse ou non d'une protéine de structure. Ce peut être notamment un antigène de pathogène, et en particulier un antigène viral, bactérien ou un antigène provenant d'un parasite.

10 15 Selon un mode de réalisation particulier, ledit peptide ou polypeptide d'intérêt peut également provenir d'un antigène cytoplasmique, et en particulier d'un antigène tumoral cytoplasmique, ou de la partie cytosolique d'une protéine transmembranaire. Ce peut être alternativement une enzyme ou une partie d'enzyme ou un dérivé muté d'une enzyme, ou une toxine protéique, ou une partie de toxine protéique, ou un composé choisi pour sa capacité d'agir spécifiquement sur une cellule (ledit composé pouvant avoir un effet délétère ou au contraire bénéfique pour une cellule cible). Ce peut être également une protéine (par exemple une protéine G) ou un fragment de protéine, capable de fixer spécifiquement un acide nucléique, par exemple la protéine de capsid du phage MS2. Ce peut être également un peptide ou polypeptide capable de fixer un acide nucléique particulier.

20 25 En fonction du type de peptide ou de polypeptide d'intérêt choisi, l'invention pourra être utilisée *in vivo*, notamment pour une application médicale, notamment en immunisation, en particulier en vaccination.

A titre d'exemple, dans deux polypeptides chimériques de l'invention décrits dans les exemples, le polypeptide d'intérêt est un dérivé muté de la protéine hAGT. Ce dérivé muté est la protéine SNAP, qui est disponible dans le commerce (Covalys, NEB). Selon un mode de réalisation particulier, un polypeptide chimérique tel que défini dans la présente demande comprend en outre au moins une molécule de liaison (ou linker). Le terme « linker » désigne tout élément permettant de lier deux domaines successifs. Celui-ci peut-être de longueur et de nature variable.

Selon un mode de réalisation particulier, au moins deux domaines successifs du polypeptide de l'invention sont liés de façon covalente, par exemple par l'intermédiaire de liaisons peptidiques. Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, ledit linker est un polypeptide ou un peptide. Ce linker polypeptidique peut consister en une séquence de 2 à 50 résidus, de préférence de 2 à 30 résidus, par exemple 2 à 5, 5 à 10, 10 à 20 ou 20 à 30 résidus successifs.

Selon un mode de réalisation particulier, la séquence nucléotidique codant pour ledit linker comprend ou consiste en un site de restriction. Par « site de restriction », on entend une séquence nucléotidique particulière reconnue par une enzyme de restriction de type II comme un site de coupure dans la molécule d'ADN. Ainsi, ce linker peut être, par exemple, le linker de séquence SR, ou AS, ou PAGSGAP (SEQ ID NO.:106), codés respectivement par les séquences nucléotidiques TCTAGA, ou GCTAGC, ou CCTGCAGGAAGCGGCCGCC (SEQ ID NO.:107) qui comprennent respectivement les sites des enzymes de restriction XbaI, Nhe I, et Sbf I-Asc I.

Selon un mode de réalisation préféré, le peptide ou polypeptide d'intérêt se trouve dans sa conformation native dans les polypeptides chimériques décrits dans la présente demande et en particulier dans le polypeptide chimérique de l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier, un polypeptide chimérique tel que défini dans la demande est multimérique et en particulier est sous la forme d'un dimère ou d'un trimère. Ceci peut être le cas, en particulier, lorsque le peptide ou le polypeptide d'intérêt provient d'une protéine qui, sous sa forme native, se dimérisé ou se trimérisé.

Selon un mode de réalisation particulier, un polypeptide chimérique tel que défini dans la demande comprend en outre une séquence tag qui permet de le purifier. Par exemple, ladite séquence tag peut comprendre ou consister en une pluralité de résidus histidine liés consécutivement, en particulier une séquence de 6 résidus histidine consécutifs.

Selon un mode de réalisation particulier, un polypeptide chimérique tel que défini dans la demande comprend une protéine tag ou rapporteur, qui peut être par exemple une enzyme, et qui est destinée à marquer le polypeptide, par exemple en lui associant un fluorophore, ou tout autre marqueur ou substrat

permettant de fixer des marqueurs (par exemple la biotine). Une telle protéine peut être par exemple la protéine SNAP ou un dérivé muté de la protéine SNAP, qui conserve les propriétés de marquage normalement attachées à la protéine SNAP.

5 Selon un mode de réalisation particulier, un polypeptide chimérique tel que défini dans la demande comporte la protéine hAGT, dont le numéro d'accession dans la base de données GenBank est M29971.1, ou un dérivé issu ou muté de la protéine hAGT (Keppler et al., 2002) contenu dans le plasmide pSNAPm (NEB, USA).

10 Selon un mode de réalisation particulier, le polypeptide chimérique comprend en outre un marqueur permettant de détecter le polypeptide chimérique par ELISA ou en Western Blot. De préférence, ledit marqueur est un épitope reconnu par un anticorps monoclonal spécifique, par exemple un épitope myc.

15 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, dans les polypeptides chimériques décrits dans la présente demande et en particulier dans le polypeptide chimérique de l'invention, le peptide ou polypeptide d'intérêt a avantageusement sa conformation native (en particulier est sous forme de multimère, par exemple sous forme de dimère ou de trimère) lorsqu'il est associé aux exosomes.

20 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide chimérique de l'invention tel que défini dans la présente demande, pour adresser (*in vivo* ou *in vitro*) un peptide ou polypeptide d'intérêt qu'il comprend, vers les vésicules membranaires, en particulier vers les vésicules formant des exosomes, et/ou vers le(s) compartiment(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans la formation des vésicules membranaires, et en particulier des vésicules formant les exosomes, et pour permettre ainsi la sécrétion, par des cellules eucaryotes appropriées, dudit peptide ou polypeptide d'intérêt en association avec lesdites vésicules membranaires.

25 Suivant un aspect particulier de l'invention, le polypeptide chimérique de l'invention peut être utilisé en association avec un polypeptide chimérique, dénommé ci-après « polypeptide chimérique additionnel ».

30 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le polypeptide chimérique additionnel comprend ou consiste en les domaines suivants:

- un peptide ou un polypeptide d'intérêt ;
- un domaine transmembranaire; et
- un domaine cytoplasmique (CD) ou un dérivé muté de ce domaine

CD, ledit domaine CD et son dérivé muté étant tels que définis dans la présente
5 demande,

ces domaines étant positionnés successivement dans l'ordre suivant, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale : peptide ou polypeptide d'intérêt - domaine transmembranaire - domaine CD ou son dérivé muté ; ou domaine CD ou son dérivé muté - domaine transmembranaire - peptide ou polypeptide d'intérêt.

10 Le polypeptide chimérique additionnel comprend nécessairement au moins un domaine membranaire (le domaine transmembranaire) mais il peut en comprendre plusieurs ; le peptide ou polypeptide d'intérêt pouvant comporter zéro, un ou plusieurs domaine(s) membranaire(s), en particulier transmembranaire(s) (voir ci-dessous), le polypeptide chimérique additionnel comporte un ou plusieurs domaines membranaires (en particulier transmembranaire(s)). Lorsque ledit polypeptide chimérique ne comporte qu'un seul domaine membranaire (le domaine transmembranaire), celui-ci peut être ou non dérivé de la même entité, en particulier de la même protéine que le peptide ou polypeptide d'intérêt dudit polypeptide.

15 Le domaine CD ou le dérivé muté du polypeptide chimérique additionnel peut être identique à ou différent du domaine CD ou du dérivé muté du domaine CD du polypeptide chimérique de l'invention.

20 Un « domaine membranaire », désigne, dans la présente demande, tout domaine capable d'interagir avec une bicouche lipidique et en particulier capable de s'ancrer - et ainsi ancrer un polypeptide le comprenant - dans une bicouche lipidique et en particulier dans une membrane vésiculaire ou cellulaire et dans la membrane d'un exosome. Selon un mode de réalisation particulier, ce domaine membranaire est capable de se lier d'une part à un premier domaine (par exemple un peptide ou un polypeptide d'intérêt) et d'autre part à un deuxième domaine (par exemple un domaine cytoplasmique). Il peut par exemple comporter 10 à 50 résidus, de préférence 15 à 40 résidus et plus préférablement 20 à 30 résidus. Selon un mode de réalisation particulier, ledit domaine membranaire est un

domaine transmembranaire, c'est-à-dire un domaine membranaire traversant entièrement la bicouche lipidique d'une membrane vésiculaire ou cellulaire. Un domaine transmembranaire est généralement agencé en hélice α hydrophobes, les protéines transmembranaires à traversées multiples pouvant contenir 5 plusieurs, en particulier 2, 3, 4, 5, 6, 7 8, 9 ou 10, voire 20 ou plus de 20 hélices α hydrophobes. Il peut également être agencé en feuillet β . Un ou plusieurs domaines transmembranaires peuvent également adopter une structure en tonneau β transmembranaire, généralement composée de 8 à 22 brins β .

Par « protéine membranaire » on entend toute chaîne polypeptidique 10 comportant un ou plusieurs domaine(s) membranaire(s) tel(s) que défini(s) ci-dessus.

15 Comme le polypeptide chimérique de l'invention, le polypeptide chimérique additionnel est capable d'être sécrété en association avec des vésicules membranaires, en particulier avec des exosomes, lorsqu'il est exprimé dans des cellules eucaryotes appropriées.

De par son ou ses domaine(s) membranaire(s), en particulier de par son ou 20 ses domaine(s) transmembranaire(s), le polypeptide chimérique additionnel ou un produit de dégradation dudit polypeptide peut s'ancrer dans la membrane d'une vésicule membranaire (en particulier d'un exosome) en s'insérant dans la bicouche lipidique de cette membrane. Un produit de dégradation dudit polypeptide chimérique peut également être ancré dans la membrane d'une vésicule membranaire par l'intermédiaire du domaine membranaire (en particulier 25 transmembranaire) d'une molécule du CMH (de classe I ou II) à laquelle ledit produit de dégradation dudit polypeptide chimérique est associé.

Dans un polypeptide chimérique additionnel ainsi ancré dans la membrane 30 d'une vésicule membranaire (en particulier d'un exosome), le peptide ou un polypeptide d'intérêt peut se trouver exposé (en totalité ou en partie) à l'extérieur de ladite vésicule membranaire et/ou inclus (en totalité ou en partie) dans la membrane de ladite vésicule membranaire (c'est le cas lorsque ledit polypeptide ou peptide d'intérêt comporte un ou plusieurs domaines membranaires) et/ou inclus (en totalité ou en partie) dans la fraction cytosolique de ladite vésicule membranaire.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, lorsque le domaine

CD et un domaine transmembranaire dudit polypeptide chimérique additionnel sont dérivés d'une même protéine, alors au moins le domaine CD, son dérivé muté ou le domaine transmembranaire dérivé de la même protéine que le domaine CD est un dérivé muté par substitution et/ou délétion d'un ou plusieurs résidu(s) dans la séquence du domaine original.

Le domaine transmembranaire peut être dérivé d'une ou plusieurs protéine(s) transmembranaire(s), qui traverse(nt) une fois ou plusieurs fois, en particulier 2, 3, 4, 5, 6, 7 8, 9 ou 10 fois, voire 20 fois, ou plus, une membrane vésiculaire ou cellulaire. Lesdites protéines membranaires ou transmembranaires peuvent être notamment choisies parmi : des protéines humaines, des protéines d'un animal non humain, des protéines d'un organisme pathogène ou d'un agent pathogène, en particulier des protéines virales, bactériennes, ou des protéines exprimées par un parasite ou une cellule tumorale.

Le ou au moins un des domaine(s) transmembranaire(s) du polypeptide chimérique additionnel peut être en particulier celui d'une seule et même protéine transmembranaire ou être un dérivé muté du domaine transmembranaire d'une protéine membranaire. Ledit dérivé muté peut par exemple être obtenu en remplaçant une partie de la séquence du domaine de référence par une séquence dérivée du domaine transmembranaire d'une autre protéine transmembranaire.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, lorsque le domaine CD du polypeptide chimérique additionnel ou son dérivé muté comprend ou consiste en le domaine CD la protéine TM du BLV, de séquence SEQ ID NO.6, le(s) domaine(s) membranaire(s) dudit polypeptide chimérique additionnel est(sont) dépourvu(s) du domaine transmembranaire de la protéine TM du BLV, qui a pour séquence SEQ ID NO.4. Un domaine transmembranaire du polypeptide chimérique additionnel peut en revanche correspondre à un dérivé muté du domaine de séquence SEQ ID NO.4, ledit dérivé muté ne comprenant pas la séquence SEQ ID NO.4. Un tel dérivé muté peut être obtenu, par délétion et éventuellement substitution d'un ou plusieurs résidu(s) dans la séquence SEQ ID NO.4, comme illustré dans les exemples.

Selon un mode de réalisation particulier, lorsque un des domaine(s) transmembranaire(s) et le domaine CD dérivent d'une même protéine, notamment lorsqu'ils dérivent de la protéine TM du BLV, on utilise, en tant que domaine (iii),

un dérivé muté du domaine CD dépourvu de la séquence PCP (le résidu C de la séquence PCP étant par exemple remplacé par un résidu A) et/ou dépourvu de la séquence KCLTSRLLKLLRQ.

5 Selon un mode de réalisation particulier, lorsque un des domaines membranaires du polypeptide chimérique additionnel comprend ou consiste en le domaine transmembranaire de la protéine TM du BLV, de séquence SEQ ID NO.4, le domaine CD ou son dérivé muté est dépourvu du domaine CD de la protéine TM du BLV, de séquence SEQ ID NO.6. Le domaine CD ou son dérivé muté peut en revanche correspondre à, ou comprendre un dérivé muté du 10 domaine de séquence SEQ ID NO.6. Comme illustré dans les exemples, un tel dérivé muté peut être obtenu, par exemple, en déletant des résidus situés dans la partie N-terminale de la séquence SEQ ID NO.6, en particulier en déletant la séquence KCLTSRLLKLLRQ et/ou en déletant la séquence PCP dans la séquence SEQ ID NO.6, ou en substituant par exemple le résidu cystéine de la 15 séquence PCP un autre résidu, de préférence par un résidu non palmitoylable, par exemple un résidu alanine.

Le peptide ou le polypeptide d'intérêt présent dans ce polypeptide chimérique additionnel peut être tel que défini dans la demande pour le polypeptide chimérique de l'invention. Alternativement ou cumulativement, ledit peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique additionnel peut également comprendre ou consister en un ou plusieurs domaine(s) d'une protéine extracellulaire ou d'une protéine de surface ou un ou des fragment(s) d'un ou plusieurs de ce(s) domaine(s).

25 Selon un mode de réalisation particulier, le peptide ou le polypeptide d'intérêt présent dans ce polypeptide chimérique additionnel comprend ou consiste en un ou plusieurs domaine(s) d'une protéine extracellulaire ou de surface ou un ou des fragment(s) d'un ou plusieurs de ce(s) domaine(s) et, le cas échéant en :

30 - un ou plusieurs domaine(s) membranaire d'une protéine membranaire, en particulier d'une protéine transmembranaire ou un ou plusieurs fragment(s) de ce(s) domaine(s), et/ou

- un ou plusieurs domaine(s) cytoplasmique(s) d'une protéine membranaire, en particulier d'une protéine transmembranaire, ou un ou plusieurs fragment(s) de ce(s) domaine(s).

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique additionnel est un récepteur, par exemple un récepteur à multiples domaines membranaires et en particulier un récepteur CXCR4 ou GPR, ou tout autre peptide ou polypeptide qui permet de cibler une cellule cible ou un type particulier de cellules cibles (par exemple des cellules tumorales ou des cellules présentant un trouble métabolique ou fonctionnel).

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, le peptide ou polypeptide d'intérêt de ce polypeptide chimérique additionnel comprend ou consiste en un ou plusieurs ectodomaine(s) et/ou un ou plusieurs domaine(s) membranaire(s) et/ou un ou plusieurs domaines(s) cytoplasmique(s) d'une protéine membranaire, en particulier d'une protéine transmembranaire, ou un ou plusieurs fragment(s) d'un ou plusieurs de ce(s) domaine(s).

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ledit peptide ou polypeptide d'intérêt de ce polypeptide chimérique additionnel provient d'un organisme pathogène, par exemple un virus, une bactérie ou un parasite, ou d'un agent pathogène, par exemple une cellule tumorale, une toxine..., ou d'un antigène tumoral, d'un antigène cytoplasmique, d'un récepteur de ligand, notamment d'un récepteur à multiples domaines membranaires, par exemple un récepteur à sept domaines transmembranaires, d'un récepteur de cytokines ou d'un ligand de récepteur, notamment d'une cytokine ou d'un fragment de ceux-ci. Tout composant peptidique d'un organisme ou d'agent pathogène peut être utilisé, qu'il s'agisse ou non d'une protéine de structure. Ce peut être notamment un antigène de pathogène, et en particulier un antigène viral, bactérien ou un antigène provenant d'un parasite.

Ledit peptide ou polypeptide d'intérêt de ce polypeptide chimérique additionnel peut également provenir d'un antigène tumoral, d'un antigène cytoplasmique, d'une protéine transmembranaire, notamment d'une intégrine ou d'un co-récepteur ou d'une protéine intervenant dans des interactions (en particulier les protéines ICAM, CD4, CD8), d'un récepteur de ligand, notamment

d'un récepteur à un seul domaine membranaire, par exemple un récepteur de cytokine (en particulier les récepteurs de la famille HER répondant à l'EGF, par exemple le récepteur EGF-R1), notamment d'un récepteur à multiples domaines membranaires, par exemple un récepteur à sept domaines transmembranaires (en particulier le récepteur CXCR4 du VIH ou un récepteur de l'acide gamma amino butyrique (GABA)), ou d'un ligand de récepteur, notamment d'une cytokine ou d'un fragment de ceux-ci.

En fonction du type de peptide ou de polypeptide d'intérêt présent dans ce polypeptide chimérique additionnel, l'invention pourra être utilisée *in vitro*, par exemple pour cibler des molécules interagissant avec ledit peptide ou polypeptide d'intérêt.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit peptide ou polypeptide d'intérêt provient d'une protéine présente à la surface d'un virus, par exemple une protéine responsable de la fixation d'une particule virale à un récepteur situé sur une cellule cible et/ou responsable de la fusion de l'enveloppe virale ou de la membrane plasmique d'une cellule infectée avec la membrane plasmique d'une cellule cible, ou un fragment d'une telle protéine.

A titre d'exemple, on peut utiliser, en tant que domaine (i), une protéine de l'enveloppe d'un virus enveloppé ou un fragment de cette protéine. Ce virus enveloppé peut être notamment choisi parmi les familles suivantes :

- les Poxviridae, en particulier ceux du genre Orthopoxvirus, qui comprend notamment le virus de la variole et le virus de la vaccine ;

- les Herpesviridae, en particulier ceux du genre Herpesvirus, qui comprend notamment les Herpesvirus de types 1 et 2, le virus de la Varicelle, le virus d'Epstein Barr, le Cytomégalovirus, et les Herpesvirus de types 6, 7, 8 ;

- les Hepadnaviridae, qui comprennent notamment le virus de l'hépatite B ;

- les Orthomyxoviridae, en particulier ceux du genre virus influenza A, B ou C, qui comprend notamment le virus de la grippe aviaire H5N1 ;

- les Paramyxoviridae, en particulier ceux du genre Paramyxovirus, qui comprend notamment les virus parainfluenzae et le virus des oreillons, ceux du genre Morbillivirus, qui comprend notamment les virus de la rougeole, et ceux du genre Pneumovirus, qui comprend notamment le virus respiratoire syncytial ;

- les Rhabdoviridae, en particulier ceux du genre Lyssavirus, qui comprend

notamment le virus de la rage ;

- les Filoviridae, qui comprennent notamment le virus de Marburg et le virus Ebola ;

5 - les Togaviridae, en particulier ceux du genre Flavivirus, qui comprend notamment le virus de la fièvre jaune et le virus de l'hépatite C (HCV), ceux du genre Alphavirus et ceux du genre Rubivirus, qui comprend notamment le virus de la rubéole ;

10 - les Coronaviridae, en particulier ceux du genre Coronavirus, qui comprend notamment des virus responsables d'infections respiratoires et digestives telles que le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS);

- les Arenaviridae, en particulier ceux du genre Arenavirus, qui comprend notamment le virus de Lassa ;

- les Bunyaviridae, en particulier ceux du genre Bunyavirus, Hantavirus, Phlebovirus ; et

15 - les Retroviridae, en particulier ceux du genre Lentivirus et notamment les virus d'immunodéficience humaine (VIH).

Encore à titre d'exemple, le peptide ou polypeptide d'intérêt peut être issu d'une protéine de l'enveloppe d'un virus de la grippe, en particulier de l'hémagglutinine (HA) d'un virus de la grippe, et plus particulièrement de la protéine HA du virus de la grippe aviaire H5N1. Ce peut être l'ectodomaine de cette protéine ou un fragment de cet ectodomaine ou un fragment comprenant ou consistant en un ou plusieurs épitope(s) de cet ectodomaine.

D'autres polypeptides antigéniques de ces virus peuvent naturellement être utilisés, tels que la protéine ou un fragment de la polyprotéine GAG du VIH, la protéine ou un fragment de capsid du poliovirus ou d'un papillomavirus.

25 A titre d'exemple également, le peptide ou polypeptide d'intérêt peut être issu d'une protéine de l'enveloppe externe de l'un de ces virus. Il peut être issu d'une protéine l'enveloppe d'un coronavirus, en particulier de la protéine Spike (S) d'un coronavirus, et plus particulièrement la protéine Spike d'un coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (coronavirus du SRAS ou SARS-CoV en anglais). Ce peptide ou polypeptide d'intérêt peut en particulier comprendre ou consister en l'ectodomaine de cette protéine ou un fragment comprenant ou consistant en un ou plusieurs épitope(s) de cet ectodomaine.

Dans un mode de réalisation particulier, le peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique additionnel a la capacité de reconnaître une protéine présente à la surface de cellules cibles, par exmeples de cellules dendritiques, de lymphocytes, de cellules tumorales...

5 L'adressage du polypeptide chimérique additionnel au(x) lieu(x) de formation des vésicules membranaires et en particulier au(x) lieu(x) de formation des exosomes peut nécessiter notamment que ledit polypeptide chimérique additionnel comprenne un peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique, afin que ledit polypeptide chimérique additionnel puisse être inséré dans une membrane vésiculaire ou cellulaire (la fonction d'ancrage dans la membrane étant assurée par le domaine transmembranaire). Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, contrairement au polypeptide chimérique de l'invention, 10 le polypeptide chimérique additionnel peut comporter un (ou plusieurs) peptide(s) signal d'importation dans le réticulum endoplasmique.

15 Par « peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique», on entend une petite séquence polypeptidique continue d'environ 5 à environ 60 résidus, en particulier de 15 à 60 résidus et plus particulièrement de 15 à 30 résidus, qui permet le passage d'une protéine le comportant à travers la membrane du réticulum endoplasmique, le passage de la protéine pouvant être 20 complet ou être partiel, l'arrêt du passage de la protéine dépendant de la présence d'un autre signal (ou d'autres signaux) additionnel(s). Les peptides signaux pour une même destination étant interchangeables d'une protéine à une autre, tout peptide signal permettant l'adressage d'une protéine au réticulum endoplasmique peut-être utilisé dans le cadre de la présente invention.

25 A titre d'exemple, on peut utiliser en tant que peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique un peptide de 27 résidus de séquence SEQ ID NO.:2. A titre d'exemple également, on pourrait également utiliser le peptide signal d'une protéine membranaire telle que les protéines CD4, CD8 et hémagglutinine (HA), le peptide signal d'un récepteur de cytokine tel que IL1R1, EGFR1 (HER1), 30 HER2, HER3 ou HER4, ou encore, le peptide signal d'une protéine sécrétée, par exemple, celui d'une cytokine. Ainsi, on peut utiliser un peptide signal choisi parmi : celui de la protéine CD4 humaine (peptide de séquence SEQ ID NO.:49) ou CD4 de souris (peptide de séquence SEQ ID NO.:50), celui de la protéine CD8

alpha de souris (peptide de séquence SEQ ID NO.:51), CD8 alpha bovine (peptide de séquence SEQ ID NO.:52), CD8 alpha humaine (peptide de séquence SEQ ID NO.:53), ou CD8 alpha de rat (peptide de séquence SEQ ID NO.:54), celui des récepteurs IL1R1 humain (peptide de séquence SEQ ID NO.:55), EGFR1 (HER1) humain (peptide de séquence SEQ ID NO.:56), HER2 humain (peptide de séquence SEQ ID NO.:57), HER3 humain (peptide de séquence SEQ ID NO.:58) ou HER4 humain (peptide de séquence SEQ ID NO.:59), ou celui des cytokines IL-2 de souris (peptide de séquence SEQ ID NO.:60), IL-6 de souris (peptide de séquence SEQ ID NO.:61), IL-7 humaine (peptide de séquence SEQ ID NO.:62), IL-10 de souris (peptide de séquence SEQ ID NO.:63), ou MIP-1-alpha chimiochine humaine (peptide de séquence SEQ ID NO.:64), celui de l' hémagglutinine du virus Influenza B (peptide de séquence SEQ ID NO.:65), celui de l' hémagglutinine des virus Influenza A H1N1 (peptide de séquence SEQ ID NO.:66), Influenza A H2N2 (peptide de séquence SEQ ID NO.:67), Influenza A H3N2 (peptide de séquence SEQ ID NO.:68), Influenza A H4N6 (peptide de séquence SEQ ID NO.:69), Influenza A H5N1 (peptide de séquence SEQ ID NO.:70), Influenza A H6N5 (peptide de séquence SEQ ID NO.:71), Influenza A H7N7 (peptide de séquence SEQ ID NO.:72), Influenza A H8N4 (peptide de séquence SEQ ID NO.:73), Influenza A H9N2 (peptide de séquence SEQ ID NO.:74), Influenza A H10N7 (peptide de séquence SEQ ID NO.:75), Influenza A H11N6 (peptide de séquence SEQ ID NO.:76), Influenza A H12N5 (peptide de séquence SEQ ID NO.:77), ou Influenza A H13N6 (peptide de séquence SEQ ID NO.:78).

Selon un autre mode de réalisation particulier, ledit peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique peut faire partie du peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique additionnel. C'est par exemple le cas lorsque ledit peptide ou polypeptide d'intérêt est une protéine membranaire ou une cytokine.

Indépendamment ou en combinaison avec le mode de réalisation ci-dessus, ledit peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique peut faire partie d'un des domaines membranaires (en particulier un domaine transmembranaire) du polypeptide chimérique additionnel. Cela peut être par exemple le cas lorsque le domaine transmembranaire ou un des domaines

membranaires dudit polypeptide est dérivé d'un récepteur à sept domaines transmembranaires.

Alternativement, selon un autre mode de réalisation, ledit peptide signal d'importation ne fait partie d'aucun des trois domaines principaux (à savoir les 5 domaines : peptide ou polypeptide d'intérêt ; domaine transmembranaire ; domaine CD ou son dérivé muté), et est, par conséquent, ajouté en plus de ces trois domaines dans polypeptide chimérique additionnel. Il peut alors être placé à différentes localisations dans la séquence linéaire dudit polypeptide, mais se trouve généralement à une extrémité dudit polypeptide et est de préférence en 10 position N-terminale dans ledit polypeptide.

Si un deuxième peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique est ajouté dans le polypeptide chimérique additionnel, il permet le cas échéant d'augmenter le ciblage membranaire.

Sous une forme mature, en particulier lorsqu'il est ancré dans la membrane 15 d'une vésicule membranaire, par exemple d'un exosome, le polypeptide chimérique additionnel ne comporte généralement pas ou plus de peptide signal N- ou C- terminal d'importation dans le réticulum endoplasmique; après qu'il a rempli sa fonction, le peptide signal N- ou C- terminal peut être séparé du polypeptide par un clivage protéolytique, par exemple dans le réticulum 20 endoplasmique ou dans le Golgi.

La présente invention a également pour objet une vésicule membranaire, et plus précisément un exosome, qui comporte un polypeptide chimérique de l'invention de l'invention, et/ou un ou plusieurs produit(s) de dégradation dudit polypeptide chimérique de l'invention, ce(s) produit(s) de dégradation étant le cas 25 échéant associé(s) à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et/ou de type II.

Le polypeptide chimérique de l'invention et/ou se(s) produit(s) de dégradation est(sont) ancré(s) dans la membrane de ladite vésicule membranaire par l'intermédiaire de leur domaine de ciblage sous-membranaire ou par 30 l'intermédiaire du domaine membranaire de la molécule du CMH (de classe I ou II) à laquelle il est(sont) associé(s). Selon un mode de réalisation particulier, un produit de dégradation comprend ou consiste en un fragment du peptide ou polypeptide d'intérêt, en particulier en un fragment comprenant ou consistant en

un ou plusieurs épitope(s) dudit peptide ou polypeptide d'intérêt. Dans un mode de réalisation particulier, la vésicule membranaire de l'invention, et plus précisément l'exosome de l'invention, comporte, outre le polypeptide chimérique de l'invention, et/ou ses éventuels produit(s) de dégradation, un ou plusieurs polypeptide(s) chimérique(s) additionnel(s) décrits dans le demande, et/ou un ou plusieurs produit(s) de dégradation de ce(s) polypeptide(s) chimérique(s) additionnel(s), le(s) produit(s) de dégradation du (des) polypeptide(s) chimérique(s) additionnel(s) étant le cas échéant associé(s) à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et/ou de type II.

Alternativement, la vésicule de l'invention qui comporte un polypeptide chimérique de l'invention peut être utilisée en combinaison avec une vésicule membranaire (en particulier un exosome), dénommée ci-après « vésicule membranaire additionnelle » (et en particulier « exosome additionnel »), qui comporte un ou plusieurs polypeptide(s) chimérique(s) additionnel(s), et/ou un ou plusieurs produit(s) de dégradation de ce(s) polypeptide(s) chimérique(s) additionnel(s) décrits dans le demande, ce(s) produit(s) de dégradation étant le cas échéant associé(s) à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et/ou de type II.

A titre d'exemple, la vésicule membranaire de l'invention, et plus précisément l'exosome de l'invention, peut comporter :

- d'une part, un polypeptide chimérique de l'invention (et/ou ses éventuels produit(s) de dégradation) dans lequel le peptide ou polypeptide d'intérêt est une protéine cytosolique, par exemple un antigène, une protéine G, une enzyme (par exemple une enzyme cytosolique qui est défective dans de(s) cellules cibles), une toxine ou tout autre peptide ou polypeptide cytosolique pouvant avoir un effet délétère ou au contraire bénéfique pour une cellule cible, ou encore un peptide ou polypeptide capable de fixer un acide nucléique particulier, ledit polypeptide chimérique de l'invention étant éventuellement marqué, par exemple par un premier fluorophore ;

- d'autre part, un polypeptide chimérique additionnel, (et/ou ses éventuels produit(s) de dégradation) dans lequel le peptide ou polypeptide d'intérêt est par exemple un récepteur (par exemple un récepteur à multiples domaines membranaires et en particulier un récepteur CXCR4 ou GPR) ou tout autre

5 peptide ou polypeptide qui permet de cibler une cellule cible ou un type particulier de cellules cibles (par exemple des cellules tumorales ou des cellules présentant un trouble métabolique ou fonctionnel), ledit polypeptide chimérique additionnel étant de préférence marqué, par exemple par un deuxième fluorophore (distinct du premier fluorophore).

10 Une telle vésicule de l'invention peut avoir de nombreuses applications et peut être notamment utilisée pour modifier le contenu de cellules cibles. Lorsqu'elle est administrée à une cellule, à une population de cellules ou un hôte humain ou non humain, cette vésicule peut être internalisée par certaines cellules (par exemple des cellules dendritiques ou des cellules tumorales) ciblées via le peptide ou polypeptide d'intérêt présent dans le polypeptide chimérique additionnel (ou via ses éventuels produit(s) de dégradation) de cette vésicule. En internalisant ladite vésicule, les cellules cibles internalisent le peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique de l'invention présent dans cette vésicule, ce qui, en fonction de la nature dudit peptide ou polypeptide d'intérêt, 15 peut avoir diverses applications et notamment permettre de:

- traiter les cellules cibles (par l'apport d'une enzyme par exemple);
- au contraire détruire les cellules cibles (par exemple des cellules tumorales) ; ou
- 20 - faire du diagnostic, par exemple en détectant un acide nucléique lié au peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique de l'invention ;
- d'induire une réponse immunitaire dirigée par exemple contre un antigène cytosolique présent dans le polypeptide chimérique de l'invention ;
- faire du criblage de protéines et/ou analyser d'éventuelles interactions entre protéines (par exemple en détectant d'éventuels transferts d'énergie entre 25 les deux fluorophores utilisés).

30 La vésicule membranaire de l'invention, qu'elle comprenne ou non aussi un polypeptide chimérique additionnel, peut être utilisée notamment pour produire *in vivo* ou *in vitro* des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, vaccinants ou non vaccinants, dirigés contre ledit peptide ou polypeptide d'intérêt ou leur fragment. De tels anticorps peuvent être utilisés notamment en diagnostic ou pour étudier des interactions protéiques, en particulier pour réaliser des criblages à haut débit de molécules telles que des drogues ou des cytokines capables d'interagir avec le

peptide ou le polypeptide d'intérêt ou leur fragment.

En outre, la vésicule membranaire de l'invention, qu'elle comprenne ou non aussi un polypeptide chimérique additionnel, peut être utilisée *in vivo*, en immunisation, pour éliciter ou favoriser, chez un hôte (humain ou non humain), une réponse humorale et/ou cellulaire contre une tumeur, ou contre le virus, la bactérie ou le parasite dont le peptide ou le polypeptide d'intérêt dérive. La réponse immune élicitée ou favorisée pour la vésicule membranaire de l'invention, en particulier par un exosome de l'invention, peut être, selon la nature des polypeptides associés aux exosomes, une réponse tolérogène ou de défense. Une réponse tolérogène peut permettre, par exemple, à l'hôte de lutter contre l'asthme ou de supporter une greffe.

Dans une vésicule membranaire comprenant un polypeptide chimérique additionnel, (et/ou ses éventuels produit(s) de dégradation), le peptide ou le polypeptide d'intérêt se trouvant dans ledit polypeptide(s) chimérique(s) additionnel(s), ou un fragment dudit peptide ou le polypeptide d'intérêt, est exposé, en partie ou en totalité, à la surface, à l'extérieur de la vésicule membranaire. Par conséquent, une vésicule de l'invention comprenant aussi un polypeptide chimérique additionnel peut être utilisée notamment pour produire ou sélectionner ou cibler *in vivo* ou *in vitro* des cellules procaryotes ou eucaryotes ou des virus (par exemple des phages) ou des ribosomes interagissant directement ou indirectement avec ledit peptide ou polypeptide d'intérêt ou leur fragment. Selon un mode de réalisation préféré, ledit peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique additionnel, ou le fragment dudit peptide ou polypeptide d'intérêt, est exposé (en partie ou en totalité) dans sa conformation native à la surface de la vésicule membranaire.

Selon un mode de réalisation particulier, le peptide ou le polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique additionnel ou le fragment dudit peptide ou polypeptide d'intérêt, est inclus en partie ou en totalité dans la membrane de la vésicule membranaire de l'invention, et/ou inclus en partie ou en totalité dans la fraction cytosolique de ladite vésicule membranaire.

Une composition, en particulier une composition thérapeutique (par exemple pharmaceutique) ou une composition immunogène, dont le principe actif comprend un ou plusieurs polypeptide(s) chimérique(s) de l'invention ou une ou

plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention, en particulier un ou plusieurs exosome(s) de l'invention fait également partie de l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier, ladite composition comprend en outre :

- 5 - un ou plusieurs polypeptide(s) chimérique(s) additionnel(s) ; ou
- une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) additionnelle(s) (en particulier un ou plusieurs exosome(s) additionnel(s)).

Alternativement, ladite composition peut être utilisée (en particulier administrée à un hôte humain ou non humain) en conjonction avec une autre 10 composition, en particulier une autre composition thérapeutique ou immunogène, qui comprend un ou plusieurs polypeptide(s) chimérique(s) additionnel(s) et une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) additionnelle(s).

Selon un mode de réalisation particulier, ladite ou lesdites composition(s) comprend (comprennent) en outre un ou plusieurs véhicule(s), diluant(s), et/ou 15 adjuvant(s) ou une de leurs combinaisons. Dans le cas d'une administration injectable, on peut notamment choisir une formulation dans une solution aqueuse, non aqueuse ou isotonique.

Le terme « véhicule » désigne, dans la présente demande, tout support 20 (c'est-à-dire tout ce qui peut transporter au moins un principe actif) qui n'altère pas l'efficacité de l'activité biologique des substances actives de l'invention. De nombreux véhicules sont connus dans l'état de la technique. Les véhicules utilisés peuvent être, par exemple, de l'eau, une solution saline, de l'albumine sérique, une solution Ringer, le polyéthylène glycol, des solvants miscibles dans l'eau, des sucres, des lieux, des excipients, des pigments, des huiles végétales ou 25 minérales, des polymères solubles dans l'eau, des agents tensioactifs, des agents épaississants ou gélifiants, des agents cosmétiques, des agents de solubilisation, des agents de stabilisation, des agents conservateurs, des agents alcalinisants ou acidifiants ou une de leurs combinaisons.

Le terme « diluant » signifie, dans la présente demande, un agent de 30 dilution, et inclut les diluants solubles et les diluants insolubles. On utilise généralement un diluant insoluble quand le principe actif est soluble et un diluant soluble quand le principe actif est insoluble. Un principe actif « insoluble » peut être totalement insoluble en milieu aqueux ou avoir une solubilité limitée (c'est à

dire une solubilité inférieure à 10mg/ml dans 250 ml d'eau à un pH de 1.0 à 7.5) en milieu aqueux. Des exemples de diluants insolubles incluent la cellulose microcristalline, la cellulose microcristalline silicifiée, l'hydroxyméthylcellulose, le phosphate de dicalcium, le carbonate de calcium, le sulfate de calcium, le carbonate de magnésium, le phosphate de tricalcium, etc. Des exemples de diluants solubles incluent le mannitol, le glucose, le sorbitol, le maltose, les dextrates, les dextrines, le dextrose, etc.

Le terme « adjuvant » désigne, dans la présente demande, un produit qui, ajouté au contenu à une composition immunogène, en particulier à un vaccin, accroît l'intensité de la réaction immunitaire induite chez l'hôte (humain ou non humain) auquel ladite composition est administrée. Un adjuvant peut notamment accroître la quantité d'anticorps spécifiques que ledit mammifère est capable de produire après l'administration de ladite composition et accroît donc l'efficacité de la l'immunisation. Les adjuvants sont notamment utiles quand l'antigène utilisé seul ne provoque qu'une réaction immunitaire trop faible pour procurer une bonne protection, pour réduire la quantité d'antigène à administrer à un hôte, ou encore pour faciliter certains modes d'administration de ladite composition, par exemple dans le cas d'une administration au niveau des muqueuses. Les adjuvants susceptibles d'être utilisés dans le cadre de l'invention sont en particulier des saponines, du phosphate d'aluminium (alum), des peptidoglycans, des carbohydrates, des peptides, par exemple le muramyl dipeptide (N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, MDP), des émulsions huile/eau, des polysaccharides, des cytokines, des hormones, l'hémocyanine de patelle, des adjuvants de la famille des dinucléotides CpG non méthylés, des adjuvants de la famille des poly IC, des adjuvants de la famille du monophosphoryl lipide A et des acides nucléiques, en particulier des ADN bactériens ou des ADN codant pour une protéine ayant un effet adjuvant, par exemple un facteur de croissance ou une cytokine, plus particulièrement le GM-CSF ou l'IL4.

Selon un mode de réalisation préféré, ledit ou lesdits véhicule(s), diluant(s), et/ou adjuvant(s) ou leur combinaison sont des substances ou une combinaison de substances pharmaceutiquement acceptables, c'est à dire appropriée(s) pour une administration à un hôte (par exemple un humain, un mammifère non humain ou un oiseau) à des fins thérapeutiques ou prophylactiques. Une telle substance

ou combinaison de substance est donc préférentiellement non toxique pour l'hôte auquel elle est administrée.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide chimérique, selon le code génétique universel, et en tenant compte de la dégénérescence de ce code. Le terme « polynucléotide » couvre toute molécule d'ADN ou d'ARN (mono ou bicaténaire). Ce polynucléotide peut être nu ou, alternativement, il peut être inséré dans un vecteur de clonage ou d'expression, de préférence un vecteur approprié pour l'expression dans des cellules eucaryotes. Ce vecteur est, de préférence un plasmide. Ledit polynucléotide peut être notamment assemblé par PCR. Il comporte de préférence 2000 à 50000 nucléotides.

Le terme « code » ne signifie pas nécessairement que ludit polynucléotide ne comprend que la partie codante. Ludit polynucléotide peut en effet comprendre en outre des séquences de régulation de l'expression et notamment comprendre un promoteur, par exemple un promoteur eucaryote

A titre d'exemple, ludit polynucléotide comprend, en tant que séquence codant pour le domaine CD du polypeptide chimérique de l'invention ou pour le dérivé muté de ce domaine CD, une séquence comprenant ou consistant en une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 SEQ ID NO. 47 et SEQ ID NO. 94.

Selon un mode de réalisation particulier, le polynucléotide de l'invention code en outre pour un polypeptide chimérique additionnel tel que défini dans la présente demande. Alternativement, le polynucléotide de l'invention peut être utilisé en conjonction avec un polynucléotide distinct, dénommé ci-après « polynucléotide additionnel », qui code pour un polypeptide chimérique additionnel tel que défini dans la présente demande.

Selon un mode de réalisation particulier, un polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique additionnel comprend une séquence codant pour un signal d'importation dans le réticulum endoplasmique. Par exemple, cette séquence peut être la séquence SEQ ID NO.:1 ou une séquence codant pour un peptide de séquence SEQ ID NO.:49 à SEQ ID NO.:78. Comme indiqué précédemment, le peptide signal codé par cette séquence, lorsqu'il se trouve en position N- ou C-terminale dans le polypeptide codé par ludit polypeptide, peut être clivé lors d'une

étape de maturation du polypeptide chimérique, qui a généralement lieu dans le réticulum endoplasmique ou dans le Golgi.

Le polynucléotide de l'invention, de même que le polynucléotide additionnel, peut être placé sous le contrôle d'éléments de régulation, de clonage ou d'expression.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, ledit (lesdits) polynucléotide(s) est (sont) inséré dans un vecteur de clonage ou d'expression, de préférence un vecteur d'expression et plus préférablement un vecteur approprié pour l'expression dans des cellules eucaryotes. Ledit vecteur est de préférence un 10 plasmide. Le polynucléotide chimérique de l'invention et le polynucléotide chimérique additionnel peuvent être insérés dans le même vecteur ou dans deux vecteur distincts.

Lesdits polynucléotides sont en général placés sous le contrôle d'un promoteur eucaryote, de préférence un promoteur eucaryote fort tel qu'un promoteur viral, par exemple le promoteur d'un virus choisi parmi : le virus SV40, le virus du sarcome de Rous, le virus des leucémies murines (MuLV), le virus des leucémies à cellules T de l'homme adulte (HTLV-I), le virus de la leucémie bovine (BLV), le cytomégalovirus, un promoteur hybride dérivé de ces promoteurs viraux ou un promoteur viral contenant des séquences modifiées.

Lesdits polynucléotides peuvent en outre comporter une séquence kozak, en particulier la séquence nucléotidique ACCATGG ou une séquence dérivée ACCATG, dans laquelle la séquence ATG correspond au codon d'initiation de la séquence codante.

Par ailleurs, lesdits polynucléotides peuvent en outre comporter un intron.

Selon un mode de réalisation particulier, lesdits polynucléotides comprennent au moins un linker nucléotidique codant pour un linker polypeptidique tel que défini ci-dessus. Ce linker nucléotidique peut en particulier comprendre ou consister en un site de restriction. Par « site de restriction », on entend une séquence nucléotidique particulière reconnue par une enzyme de restriction de type II comme un site de coupure dans le polynucléotide. A titre d'exemple, ces linkers nucléotidiques peuvent consister en les séquences nucléotidiques TCTAGA, ou GCTAGC, ou CCTGCAGGAAGCGGGCGCGCCC qui

comprènent respectivement les sites des enzymes de restriction XbaI, Nhe I, et Sbf I-Asc I.

Selon un mode de réalisation particulier, la séquence dudit polynucléotide de l'invention et/ou la séquence du polynucléotide additionnel sont optimisées pour une utilisation chez un hôte (par exemple un hôte eucaryote), en particulier un être humain, un mammifère non humain et/ou un oiseau.

La présente invention a également pour objet un vecteur de clonage ou d'expression, qui est, de préférence un plasmide, caractérisé en ce qu'il comprend un insert polynucléotidique constitué par un polynucléotide de l'invention, sous le contrôle d'éléments de régulation, de clonage ou d'expression.

Ce vecteur de clonage ou d'expression peut en outre comprendre un insert polynucléotidique constitué par polynucléotide additionnel, sous le contrôle d'éléments de régulation, de clonage ou d'expression. Alternativement, ce vecteur de clonage ou d'expression peut être utilisé en conjonction avec un autre vecteur de clonage dénommé ci-après vecteur de clonage ou d'expression additionnel, qui comprend un insert polynucléotidique constitué par polynucléotide additionnel, sous le contrôle d'éléments de régulation, de clonage ou d'expression.

L'invention a également pour objet une culture cellulaire sélectionnée parmi le groupe comprenant les cultures cellulaires de bactéries, les cultures cellulaires primaires de cellules eucaryotes animales et les lignées cellulaires, ladite culture cellulaire contenant un polynucléotide de l'invention, un vecteur de clonage ou d'expression de l'invention, ou un polypeptide chimérique de l'invention. Le cas échéant, ladite culture cellulaire peut en outre comprendre un polynucléotide additionnel, un vecteur de clonage ou d'expression additionnel, ou un polypeptide chimérique additionnel. La présente invention a également pour objet une composition, en particulier une composition thérapeutique ou immunogène, comprenant un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en un polynucléotide de l'invention, et un support, un diluant ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Ladite composition de l'invention peut en outre comprendre un acide nucléique comprenant ou consistant en un polynucléotide chimérique additionnel. Alternativement, ladite composition de l'invention peut être utilisée (en particulier administrée à un hôte humain ou non humain) en association avec une

composition (dite additionnelle) comprenant un acide nucléique qui comprend ou consiste en un polynucléotide additionnel, et un support, un diluant ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation particulier, ladite ou lesdites composition(s) comprend (comprennent) en outre un adjuvant tel que défini dans la présente demande.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit (lesdits) acide(s) nucléique(s) est(sont) un ADN. Les compositions immunogènes à base d'ADN ciblent *in vivo* des cellules de l'hôte à immuniser, en particulier les cellules dendritiques (notamment les cellules de Langerhans), qui sont d'excellents producteurs d'exosomes vaccinants. Ainsi, cette composition immunogène peut permettre d'induire la production, par les propres cellules d'un hôte immunisé avec ladite composition immunogène, d'exosomes porteurs du peptide ou du polypeptide d'intérêt ou d'un fragment de celui-ci.

Selon un mode de réalisation particulier, ladite ou lesdites composition(s) immunogène(s) est (sont) un vaccin, en particulier un vaccin à ADN.

La présente invention a également pour objet une cellule recombinante productrice d'exosomes, en particulier une cellule du système immunitaire et plus particulièrement une cellule du système immunitaire choisie parmi les mastocytes, les lymphocytes, en particulier les lymphocytes B et T, et les cellules dendritiques, en particulier les cellules de Langerhans, caractérisée en ce qu'elle est recombinée avec un ou plusieurs polynucléotide(s) de l'invention ou un vecteur de clonage ou d'expression de l'invention et, le cas échéant, un ou plusieurs polynucléotide(s) additionnels, ou un vecteur de clonage ou d'expression additionnel, ou qu'elle a absorbé une vésicule membranaire de l'invention, et/ou une vésicule membranaire additionnelle. En outre, la présente invention concerne également un élément choisi parmi un polypeptide chimérique de l'invention, une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention (en particulier un ou plusieurs exosome(s) de l'invention), un polynucléotide de l'invention et une composition de l'invention, pour une utilisation comme médicament.

Lesdits éléments peuvent être utilisés en particulier pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une infection bactérienne, virale, parasitaire, ou d'une tumeur, ou d'un déficit fonctionnel ou métabolique, en particulier un déficit

enzymatique. Ils sont notamment destinés à une utilisation en immunisation, en particulier pour éliciter ou favoriser (c'est-à-dire notamment amplifier) *in vivo*, chez un hôte (humain ou non humain) une réponse humorale et/ou cellulaire contre la tumeur, le virus, la bactérie ou le parasite dont le peptide ou polypeptide d'intérêt dérive. Ils peuvent être notamment utilisés *in vivo* pour éliciter ou amplifier une réponse T CD4 et/ou T CD8 spécifique dirigée contre le peptide ou le polypeptide d'intérêt et/ou pour produire des anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux dirigés contre le peptide ou le polypeptide d'intérêt, en particulier des anticorps dirigés contre un peptide ou un polypeptide comprenant ou consistant en un ou plusieurs épitopes conformationnels.

Dans un mode de réalisation particulier, ces éléments sont utilisés pour cibler des cellules déterminées *in vivo*.

Lesdits éléments peuvent être utilisés en particulier pour traiter des cellules cibles chez un hôte humain ou non humain (par l'apport d'une enzyme par exemple), et/ou pour détruire des cellules cibles chez un hôte humain ou non humain et/ou pour induire une réponse immunitaire dirigée par exemple contre un antigène cytosolique présent dans le polypeptide chimérique de l'invention chez un hôte humain ou non humain (par exemple des cellules tumorales) et/ou pour faire du diagnostic (par exemple en détectant un acide nucléique lié au peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique de l'invention).

En outre, lesdits éléments peuvent être utilisés *in vitro*, pour faire du criblage de protéines et/ou analyser d'éventuelles interactions entre protéines (par exemple en détectant d'éventuels transferts d'énergie entre deux fluorophores utilisés).

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un de ces éléments pour la fabrication d'un médicament destiné à la prophylaxie et/ou au traitement d'un déficit fonctionnel ou métabolique, en particulier un déficit enzymatique ou d'une tumeur ou d'une infection par un organisme pathogène ou par un agent pathogène, notamment une infection bactérienne, virale ou parasitaire, et/ou pour éliciter ou amplifier une réponse immunitaire par exemple telle que décrite ci-dessus. Suite à l'administration d'une composition de l'invention, dont le principe actif est un polynucléotide de l'invention (et, le cas échéant, un polynucléotide additionnel) ou une ou plusieurs vésicule(s)

membranaire(s) de l'invention (et, le cas échéant, une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) additionnelle(s)), à un hôte (humain ou non humain), les cellules productrices d'exosomes de cet hôte, en particulier les cellules dendritiques, vont produire des exosomes, comportant un polypeptide chimérique et/ou un produit de dégradation de ce dernier, ce produit de dégradation pouvant s'associer naturellement à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité. Ces vésicules membranaires vont permettre d'éliciter ou favoriser une réponse immune dirigée contre le peptide ou le polypeptide d'intérêt.

Un « hôte » au sens de la présente demande désigne un humain ou un animal non humain.

Le terme « animal non humain » tel qu'utilisé dans la présente demande inclut tout mammifère non humain, notamment un rongeur (en particulier une souris, un rat, un hamster ou un lapin), un singe, un camélidé, un chat, un chien, un cheval, un mulet, un bovin, un ovin, un porcin, et inclut également un oiseau, en particulier un poulet.

L'expression « infection » telle qu'utilisée dans la présente demande signifie que ledit hôte (humain ou non humain) a été exposé à un organisme pathogène ou un agent pathogène en particulier à un virus enveloppé tel que défini dans la présente demande. En particulier une telle infection est capable d'évoluer vers des signes cliniques de pathologies induites ou accompagnant ladite infection. Le terme « infection » englobe donc également tout signe clinique, symptôme ou maladie apparaissant chez un hôte (humain ou non humain) suite à son exposition à un organisme pathogène ou un agent pathogène. Par exemple, une « infection virale » ou une « infection bactérienne » au sens de la présente demande inclut à la fois les phases les plus précoces de la contamination virale, bactérienne ou parasitaire, les phases intermédiaires, et les phases les plus tardives de la contamination, ainsi que les pathologies diverses qui sont la conséquence de la contamination d'un hôte par un virus, par des bactéries ou par un parasite, il inclut aussi la présence de tout ou partie de génome d'un organisme pathogène.

Le terme « prophylaxie » désigne tout degré de retardement dans le moment d'apparition de signes cliniques ou de symptômes de l'infection ou de l'apparition d'une tumeur ou de toutes autres pathologies, en particulier d'un déficit fonctionnel ou métabolique (par exemple un déficit enzymatique), ainsi que tout

5 degré d'inhibition de la sévérité des signes cliniques ou symptômes de l'infection ou de la tumeur, y compris, mais sans limitation à, la prévention totale de l'infection ou d'un cancer. Ceci nécessite que les polypeptides chimériques décrits dans la demande (en particulier le polypeptide chimérique de l'invention), les vésicules membranaires décrites dans la demande (en particulier vésicules membranaires de l'invention) ou les compositions décrites dans la demande (en particulier les compositions de l'invention) de l'invention soit administrés à l'hôte susceptible d'être exposé à un organisme pathogène ou un agent pathogène et/ou susceptible de développer une tumeur ou de toutes autres pathologies, en 10 particulier d'un déficit fonctionnel ou métabolique, avant l'apparition de tout signe clinique ou symptôme de la maladie. L'administration prophylactique peut avoir lieu avant que ledit hôte ne soit exposé à l'organisme ou à l'agent pathogène responsable de l'infection, ou au moment de l'exposition. Une telle administration prophylactique sert à empêcher, et/ou réduire la sévérité de n'importe quelle 15 infection subséquente. La prophylaxie au sens de la présente demande couvre également la prévention totale d'une infection ou d'un cancer ou de toutes autres pathologies.

20 Par « traitement », on entend l'effet thérapeutique que produisent sur un hôte les polypeptides chimériques décrits dans la demande (en particulier le polypeptide chimérique de l'invention), les polynucléotides décrits dans la demande (en particulier le polynucléotide de l'invention), les vésicules membranaires décrits dans la demande (en particulier les vésicules membranaires de l'invention), ou une des compositions décrites dans la demande (en particulier les compositions de l'invention), lorsqu'ils sont administrés audit hôte au moment 25 de l'exposition à un organisme ou un agent pathogène, après l'exposition ou après l'apparition de signes cliniques ou de symptômes de l'infection ou après l'apparition d'une tumeur. Lorsque les substances actives de l'invention sont administrées à un hôte après la contamination par un virus, ils peuvent être administrés pendant la phase de primo-infection, pendant la phase 30 asymptomatique ou encore après l'apparition de signes cliniques ou de symptômes de la maladie.

Le terme « traitement » inclut tout effet curatif obtenu grâce à une substance active de l'invention, ainsi que l'amélioration des signes cliniques ou

des symptômes observés chez l'hôte (humain ou non humain), de même que l'amélioration de la condition de l'hôte. Ainsi, le terme « traitement » couvre notamment le ralentissement, la diminution, l'interruption, ainsi que l'arrêt d'une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou de la croissance de tumeurs ou de toutes autres pathologies et/ou des conséquences néfastes de l'infection ou de l'apparition de la tumeur ou de toutes autres pathologies; un traitement n'exige pas nécessairement l'élimination complète de tous les signes cliniques de l'infection ou de la tumeur et/ou de tous les symptômes de la maladie, ni même l'élimination complète du virus, des bactéries, des parasites ou des cellules tumorales, ou des cellules fonctionnellement déficientes.

Les substances actives de l'invention peuvent donc être administrées à un hôte qui présente des risques d'être exposé à un organisme ou un agent pathogène et de développer une infection ou une tumeur (prophylaxie) ou après l'exposition de l'hôte à un organisme ou un agent pathogène, en particulier après la manifestation des premiers signes cliniques ou symptômes de la maladie, par exemple après que des protéines ou anticorps spécifiques d'un virus, de bactéries, de parasites ou d'une tumeur ont été détectés dans le sang de l'hôte (traitement).

L'invention a également pour objet une méthode pour prévenir et/ou traiter une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou une tumeur ou de toutes autres pathologies, ladite méthode comprenant au moins une étape d'administration *in vivo*, à un hôte le nécessitant, du polypeptide chimérique, d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention (en particulier un ou plusieurs exosome(s) de l'invention), d'un polynucléotide de l'invention ou d'une composition immunogène de l'invention. Ladite méthode de traitement est, en particulier, appropriée pour et destinée à éliciter ou favoriser, *in vivo*, chez ledit hôte, une réponse humorale et/ou cellulaire contre la tumeur, le virus, la bactérie ou le parasite dont le peptide ou polypeptide d'intérêt dérive.

Les termes « administration » et « administrer » tels qu'utilisés dans la présente demande incluent toute administration, quelle que soit la voie d'administration choisie.

Les voies d'administration et les posologies varient en fonction d'une variété de paramètres, par exemple en fonction de l'état de l'hôte, du type

d'infection et de la sévérité de l'infection à traiter ou de l'importance de la tumeur.

Le polypeptide chimérique, de même qu'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention (en particulier un ou plusieurs exosome(s) de l'invention), le polynucléotide de l'invention ou une composition de l'invention sont susceptibles d'être administrés à un hôte humain ou non humain sous forme sèche, solide (en particulier cachet, poudre, gélule, pilule, granule, suppositoire, capsule polymère ou comprimé, et plus précisément comprimé à libération accélérée, comprimé gastrorésistant ou comprimé à libération prolongée), sous forme gélatineuse ou sous la forme d'une solution ou d'une suspension liquide (en particulier sirop, solution injectable, infusible ou buvable, nébulisats, microvésicules, liposomes) ou sous la forme de patch. Ces composés peuvent également se présenter sous la forme de doses sous forme sèche (poudre, lyophilisat, etc.) à reconstituer au moment de l'utilisation en utilisant un diluant approprié. Par ailleurs, ils peuvent être conditionnés pour une administration sous la forme d'une dose unique (monodose) ou multiple (multidose).

Les substances actives de l'invention peuvent être formulées pour une administration par voie entérale, parentérale (intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée), transcutanée (ou transdermique ou percutanée), cutanée, orale, mucosale, en particulier transmuqueuse-buccale, nasale, ophtalmique, otologique (dans l'oreille), vaginale, rectale, ou encore les voies intragastrique, intracardiaque, intrapéritonéale, intrapulmonaire ou intratrachéale.

Afin d'augmenter les effets bénéfiques des compositions de l'invention (en particulier des compositions immunogènes de l'invention), il est en effet envisageable de procéder à une administration sous la forme de plusieurs administrations successives, répétées à une ou plusieurs occasions, après un intervalle de temps particulier. Ils peuvent en outre être administrés avec un second agent thérapeutique, en particulier un agent antiviral, antibactérien, antiparasitaire ou antitumoral.

Dans le cadre d'une utilisation en vaccination, il peut également être préférable d'immuniser un hôte, dans un premier temps avec une composition immunogène à base d'un polynucléotide de l'invention, en particulier avec un vaccin à ADN de l'invention, puis, dans un deuxième temps, avec les vésicules membranaires de l'invention, une composition immunogène à base desdites

vésicules ou une composition immunogène dont le principe actif est un polypeptide chimérique de l'invention ou un ou plusieurs fragment(s) de celui-ci (ledit polypeptide chimérique ou ses(s) fragment(s) pouvant être obtenus notamment par purification ou par synthèse chimique).

5 Alternativement, il peut également être préférable d'immuniser un hôte, dans un premier temps avec les vésicules membranaires de l'invention ou une composition immunogène à base desdites vésicules, puis, dans un deuxième temps, avec une composition immunogène à base d'un polynucléotide de l'invention, en particulier avec un vaccin à ADN de l'invention.

10 Les compositions immunogènes à base d'un polynucléotide de l'invention et en particulier les vaccins à ADN de l'invention sont de préférence administré(e)s à un hôte par voie intramusculaire ou sous-cutanée, en utilisant soit une aiguille et une seringue, soit un injecteur dépourvu d'aiguille, en particulier un pistolet à air comprimé capable de propulser, à l'intérieur de cellules d'un hôte, des microbilles 15 d'or, de tungstène ou de platine chargées d'ADN (pistolet « biolistique » ou pistolet à gène), par exemple le pistolet « Helios® Gene Gun System» de la société BioRad.

20 La quantité de principe actif administrée à un hôte humain ou non humain est une quantité thérapeutiquement efficace, c'est-à-dire une quantité active, suffisante, à des posologies et pendant des périodes de temps nécessaires, pour 25 obtenir un effet significatif et en particulier apporter un bénéfice significatif à l'hôte dans le cadre d'une administration pour la prophylaxie ou le traitement tel que défini dans la présente demande. Une quantité thérapeutiquement efficace est également une quantité pour laquelle les effets bénéfiques l'emportent sur un quelconque effet toxique ou néfaste du ou des principe(s) actif(s). Une telle quantité peut correspondre à une quantité suffisante pour inhiber la réPLICATION 30 virale, la prolifération bactérienne ou la croissance d'une tumeur de façon significative ou pour faire disparaître, réduire, ou améliorer toute infection existante provoquée l'agent ou l'organisme pathogène. La quantité thérapeutiquement efficace varie en fonction de facteurs tels que l'état d'infection, l'âge, le sexe ou le poids de l'hôte. Les régimes posologiques peuvent être ajustés de façon à obtenir un effet thérapeutique optimum. La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention *in vivo* de vésicules membranaires,

en particulier d'exosomes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'administration d'un polypeptide chimérique de l'invention (et le cas échéant d'un polypeptide chimérique additionnel), d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention, en particulier un ou plusieurs exosome(s) de l'invention (et le cas échéant d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) additionnelle(s)), d'un polynucléotide de l'invention (et le cas échéant d'un polynucléotide additionnel), ou d'une composition de l'invention (et le cas échéant d'une composition additionnelle), à un hôte (humain ou non humain). Ce procédé peut être notamment mis en œuvre dans le cadre d'une méthode pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une tumeur ou d'une infection par un organisme pathogène ou par un agent pathogène, notamment une infection bactérienne, virale ou parasitaire.

La présente invention concerne en outre un procédé de production *in vitro* de vésicules membranaires et en particulier d'exosomes comportant un peptide ou un polypeptide d'intérêt et/ou un produit de dégradation de ce peptide ou un polypeptide d'intérêt, ce produit de dégradation pouvant le cas échéant s'associer à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité. Ledit procédé comprend les étapes suivantes :

- a) l'introduction, dans une cellule productrice d'exosomes, d'un ou plusieurs polynucléotide(s) de l'invention, qui code(nt) pour un polypeptide comprenant ledit peptide ou polypeptide d'intérêt, ou la mise en contact d'une cellule productrice d'exosomes avec une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention, qui comporte(nt) un polypeptide comprenant ledit peptide ou polypeptide d'intérêt et/ou un produit de dégradation de ce polypeptide, ou avec une composition à base de telles vésicules;
- b) la culture de ladite cellule productrice d'exosomes;
- c) la récupération des vésicules membranaires et en particulier des exosomes produit(e)s par ladite cellule productrice d'exosomes.

Selon un mode de réalisation particulier, la cellule productrice d'exosomes est une cellule de la lignée HEK293, ou une lignée dérivée, ou une cellule du système immunitaire. En particulier, la cellule du système immunitaire peut être choisie parmi les mastocytes, les lymphocytes, en particulier les lymphocytes T et B, et les cellules dendritiques. La cellule du système immunitaire est de

préférence une cellule dendritique, par exemple une cellule de Langerhans.

Selon un mode de réalisation particulier, l'étape a) consiste en la mise en contact d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention, en particulier d'un ou plusieurs exosome(s) de l'invention, avec une cellule dendritique.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit procédé comprend en outre une étape intermédiaire entre les étapes a) et b), au cours de laquelle la cellule est sélectionnée et/ou stimulée pour induire et/ou augmenter la sécrétion des exosomes ou pour obtenir des exosomes présentant des qualités définies, en particulier pour induire une spécificité dans la composition des exosomes en certaines protéines cellulaires, par exemple la protéine ICAM.

Selon un mode de réalisation particulier, l'introduction, d'un ou plusieurs polynucléotide(s) de l'invention dans une cellule productrice d'exosomes à l'étape a) est réalisée par transfection ou par transduction.

Selon un mode de réalisation particulier, l'étape c) est réalisée en purifiant les vésicules membranaires et en particulier les exosomes à partir du surnageant de culture de la cellule productrice d'exosomes par centrifugation différentielle, par ultrafiltration, par adsorption sur un support, ou par tout autre procédé.

Les vésicules membranaires et en particulier les exosomes obtenus par ce procédé font également partie de l'invention.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention (et, le cas échéant, d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) additionnelle(s)), ou d'une composition à base de vésicule(s) membranaire(s) de l'invention (et, le cas échéant, d'une composition additionnelle), pour produire des d'anticorps dirigés contre le peptide ou polypeptide d'intérêt, ces anticorps étant destinés à une utilisation en diagnostic ou en recherche. La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un sérum polyclonal dirigé contre un ou plusieurs peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) d'intérêt exprimé(s) à la surface de vésicules membranaires, en particulier d'exosomes, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) l'administration, le cas échéant répétée, à un animal non humain, de vésicules membranaires de l'invention, d'une composition immunogène de l'invention ou d'un polynucléotide de l'invention, associés ou non à un adjuvant; et

b) la récupération des anticorps formés, capables de reconnaître le ou les peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) d'intérêt.

Selon un mode de réalisation particulier, l'étape a) est suivie d'une étape de sacrifice de l'animal non humain.

5 La présente invention a également pour objet deux procédés de préparation d'anticorps monoclonaux dirigés contre un ou plusieurs peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) exprimé(s) à la surface de ou dans des vésicules membranaires, en particulier d'exosomes. Le premier procédé comprend les étapes suivantes:

10 a) la fusion, avec des cellules de myélome, de cellules spléniques préalablement obtenues chez un hôte (humain ou non humain), par exemple une souris Balb/c, auquel on a administré des vésicules membranaires de l'invention, une composition immunogène de l'invention ou un polynucléotide de l'invention, le cas échéant en association avec un adjuvant et le cas échéant par administration 15 répétée;

b) la culture et la sélection des hybridomes dans des conditions permettant la production d'anticorps;

c) la récupération des anticorps monoclonaux dirigés contre les peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) d'intérêt.

20 Le deuxième procédé de préparation d'anticorps monoclonaux comprend les étapes suivantes:

a) l'immortalisation de cellules productrices d'anticorps par exemple des lymphocytes ou des lymphoblastes, à partir de cellules hématopoïétiques, plus particulièrement de cellules du sang, préalablement obtenues chez un hôte 25 (humain ou non humain), par exemple une souris Balb/c, auquel on a administré des vésicules membranaires de l'invention une composition immunogène de l'invention ou un polynucléotide de l'invention, le cas échéant en association avec un adjuvant et le cas échéant par administration répétée;

b) la culture et la sélection des cellules immortalisées dans des conditions 30 permettant la production d'anticorps;

c) la récupération des anticorps monoclonaux dirigés contre les peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) d'intérêt.

L'invention permet notamment de produire des anticorps cytosoliques.

L'immortalisation des cellules productrices d'anticorps à l'étape a) peut être réalisée notamment par infection de ces cellules avec un virus immortalisant. Ce virus immortalisant peut être un virus herpétique, par exemple le virus d'Epstein-Barr. Cette immortalisation peut également être effectuée par modification du génome des cellules productrices d'anticorps avec un composant immortalisant. Ce composant immortalisant peut être un composant viral, par exemple d'un virus herpétique, ou un gène cellulaire, par exemple le gène de la télomérase.

L'animal non humain auquel on a administré des vésicules membranaires, une composition immunogène ou un polynucléotide de l'invention dans le cadre du procédé de préparation d'un sérum polyclonal ou des procédés de préparation d'anticorps monoclonaux peut être notamment un rongeur (en particulier une souris, par exemple une souris Balb/c, un rat, un hamster ou un lapin), un oiseau, en particulier un poulet, ou un mulet.

Selon un mode de réalisation particulier des deux procédés de préparation d'anticorps monoclonaux de l'invention, les cellules spléniques ou les cellules productrices d'anticorps de l'étape a) ont été préalablement obtenues chez un hôte non humain après une étape de sacrifice dudit animal non humain.

Si nécessaire, les anticorps monoclonaux ou polyclonaux produits par les procédés de préparation d'anticorps de l'invention peuvent être "humanisés", c'est-à-dire modifiés par génie génétique de façon remplacer au maximum les fragments constants Fc de l'espèce d'origine par des fragments humains.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide chimérique de l'invention (et, le cas échéant, d'un polypeptide chimérique additionnel), d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) de l'invention (et, le cas échéant, d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) additionnelle(s)), ou d'une composition de l'invention (et le cas échéant d'une composition additionnelle), pour la détection (en particulier *in vitro*) de partenaires spécifiques capables d'interagir avec ledit peptide ou un polypeptide d'intérêt ou avec un fragment dudit peptide ou un polypeptide d'intérêt. La présente demande a également pour objet un procédé de criblage *in vitro* de molécules ou un procédé de sélection de cellules productrices de molécules interagissant avec un peptide ou un polypeptide d'intérêt ou avec un fragment dudit peptide ou un polypeptide d'intérêt, ledit procédé comprenant :

a) la mise en contact de vésicules membranaires de l'invention avec une ou plusieurs molécules susceptibles d'interagir avec ledit peptide ou polypeptide d'intérêt présent dans le polypeptide chimérique additionnel;

5 b) la détection d'une éventuelle interaction entre ledit peptide ou polypeptide d'intérêt ou un fragment dudit peptide ou polypeptide d'intérêt et ladite ou lesdites molécules.

Les interactions entre ledit peptide ou polypeptide d'intérêt et un éventuel partenaire peuvent être mises en évidence *in vitro* par toute technique permettant de démontrer des interactions protéiques et en particulier entre une protéine et son ligand, par exemple, par des expériences de coimmunoprecipitation, par exemple par ELISA, par exemple par cytofluorimétrie en flux, par exemple par électrophorèse PAGE-SDS ou par transfert de type «Western» (Western Blot), ainsi que par toute technique de criblage à haut débit permettant de démontrer des interactions protéiques et en particulier entre une protéine et son ligand, par exemple des techniques mesurant des modifications en inositol phosphates, ou en cAMP, ou en calcium, ou des transferts d'énergie (par exemple technique FRET ou BRET) entre molécules ou entre deux domaines de molécules.

Selon un mode de réalisation particulier, les vésicules membranaires utilisées à l'étape a) du procédé de criblage de l'invention sont telles que au moins un peptide ou polypeptide d'intérêt ou au moins un de leurs fragments est exposé, en partie ou en totalité, à l'extérieur de ladite vésicule membranaire. Ledit peptide ou polypeptide d'intérêt peut être en particulier un récepteur à multiples domaines transmembranaires, par exemple le récepteur CXCR4 ou un récepteur comportant un seul domaine transmembranaire, par exemple le récepteur CD4 ou EGF-R1.

Enfin, la présente invention a également pour objet un kit comprenant un polynucléotidé de l'invention et une notice d'utilisation, et, le cas échéant, un polynucléotide additionnel.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente l'invention apparaissent dans les exemples et les figures qui suivent.

DESCRIPTION DES DESSINS

Figure 1 : Représentation des différents types de constructions CD8-CD™ étudiées. **Construction X2** (séquence SEQ ID NO.79 et SEQ ID NO.80):

l'ectodomaine (ED) de CD8 est fusionné avec les domaines transmembranaires (tmD) et cytoplasmique (CD) de la protéine TM du BLV. Cette construction conserve les deux sites de palmitoylation Cys 1 et Cys 2 ainsi que le résidu cystéine régulateur non palmitoylable (Cys 3) de la protéine TM du BLV.

Construction X3 (séquence SEQ ID NO.81 et SEQ ID NO.82): ED et une portion de tmD de CD8 sont fusionnés avec une portion tmD du BLV et la totalité de CD™ BLV. TmD du BLV est alors amputée de ses 15 premiers résidus. Cette construction conserve les deux sites de palmitoylation (les résidus cystéine en positions 153 et 158) ainsi que le résidu cystéine régulateur non palmitoylable (le résidu cystéine en position C-terminale ; Cys 3) de la protéine TM du BLV.

Construction X4 (séquence SEQ ID NO.83 à SEQ ID NO.86): La majeure partie de CD™ BLV est conservée. Dans cette construction, le domaine transmembranaire du CD8 alpha de souris est lié par un linker de séquence "RSR" au domaine CD de la protéine TM du BLV. Cette construction ne comporte que le résidu cystéine régulateur non palmitoylable (Cys 3) de la protéine TM du BLV.

Figure 2 : Récapitulatif des séquences des protéines chimères obtenues à partir de la protéine CD8 alpha de souris et de la protéine TM du BLV. Les résidus soulignés correspondent aux résidus des hélices transmembranaires des protéines CD8 alpha et TM. Les trois résidus cystéine de la protéine TM du BLV qui ont fait l'objet d'une mutation (substitution par un résidu alanine) sont indiqués par C1, C2 et C3. Les protéines chimères créées correspondent aux constructions X2 (séquence SEQ ID NO.79 et SEQ ID NO.80), X3 (séquence SEQ ID NO.81 et SEQ ID NO.82) et X4 (séquence SEQ ID NO.83 à SEQ ID NO.86).

Figure 3 : Préparations des ADN par la méthode STET. Les chiffres 1 à 7 correspondent aux numéros des échantillons des produits STET. « M » représente le marqueur de taille. Les bandes correspondant à l'ADN plasmidique super enroulé sont encadrées.

Figure 4 : Contrôle de la présence des ADN dans les produits de purification sur colonne. Les bandes correspondant à l'ADN plasmidique super enroulé sont encadrées. **A** : ADN obtenu par la méthode STET et déposé sur colonne. **E** et **E'** : Fractions retenues sur la colonne puis éluées. **FT** : Fraction non retenue. **M** : Marqueur de taille.

Figure 5 : Dosages spectrométriques des aliquotes et ajustement des concentrations des ADN après digestion enzymatique. La double flèche indique que les concentrations ont été réajustées.

Figure 6 : Contrôle de l'identité des ADN après digestion enzymatique.-
Discriminations des mutants de CD8-CDTM. A : discrimination des mutants pX2 AAC et pX2 CCA. B : discrimination des mutants X2 entre eux.

Figure 7 : Analyse par Western Blot de l'expression des différentes chimères CD8-CDTM. La chimère CD8-CDTM est indiquée par une flèche.

Figure 8 : Analyse par Western Blot de l'expression des différentes chimères CD8-CDTM après immunoprécipitation. La chimère CD8-CDTM est indiquée par une flèche.

Figure 9 : Analyse par Western Blot de l'expression de CD8-CDTM dans les exosomes isolés par ultracentrifugation. Le signal à 55 kDa correspond à la présence de CD8-CDTM.

Figure 10 : Analyse par Western Blot du contenu en CD8-CDTM des vésicules isolées après sédimentation sur gradient de densité de sucre, pour les mutants pX4 --C et pX4 --A.

Figure 11 : Analyse par Western Blot de l'expression de CD8-CDTM après lyse cellulaire, selon la présence ou non d'inhibiteurs de transport vésiculaire. La chimère CD8-CDTM est indiquée par une flèche.

Figure 12 : Analyse par Western Blot de l'expression de CD8-CDTM au sein des exosomes, selon la présence ou non d'inhibiteurs de transport vésiculaire. La chimère CD8-CDTM est indiquée par une flèche.

5 **Figure 13** : Analyse par imagerie d'immunofluorescence confocale des phénotypes généraux – **Phénotype A** - Cellules HEK293 transfectées avec pX2 CAC. Ce phénotype est retrouvé chez les mutants pX2 conservant la Cys 3 : pX2 CCC, pX2 ACC, pX2 CAC et pX2 AAC. (Voir partie résultats, « localisation par immunofluorescence)

10 **Figure 14** : Analyse par imagerie d'immunofluorescence confocale des phénotypes généraux - **Phénotype B** - Cellules transfectées avec pX2 CAA. Ce phénotype est retrouvé chez les mutants pX2 ne conservant pas la Cys 3 : pX2

15 CCA, pX2 ACA, pX2 CAA et pX2 AAA. (Voir partie résultats, « localisation par immunofluorescence)

Figure 15 : Analyse par imagerie d'immunofluorescence confocale des phénotypes généraux - **Phénotype C** - Cellules transfectées avec pX3 CCC. Ce phénotype est retrouvé chez les deux mutants pX3 étudiés : pX3 CCC et pX3 ACC. (Voir partie résultats, « localisation par immunofluorescence)

15 **Figure 16** : Analyse par imagerie d'immunofluorescence confocale des phénotypes généraux - **Phénotype D** - Cellules transfectées avec pX4 --C. Ce phénotype est retrouvé chez les deux mutants pX4 étudiés : pX4 --C et pX4 --A. (Voir partie résultats, « localisation par immunofluorescence)

20 **Figure 17** : Analyse par imagerie d'immunofluorescence confocale des phénotypes généraux - **Phénotype E** - Cellules transfectées avec pX4 stp. Ce phénotype est retrouvé uniquement chez pX4 stp. (Voir partie résultats, « localisation par immunofluorescence)

25 **Figure 18** : Analyse par imagerie d'immunofluorescence confocale des zones périnucléaires présentant un fort signal FITC. Cellules transfectées avec pX3 CCC.

Figure 19 : Représentation du panel de mutants CDTM.

Figure 20 : Schéma du plasmide Topo[®] (pCR-Blunt II-TOPO) utilisé pour cloner les différents produits PCR. Le vecteur Topo fournit dans le kit Topo-blunt cloning (Invitrogen) est linéarisé et possède, à chacune de ses extrémités 3'-phosphate, la

Topoisomérase I du virus de la vaccine, qui permet de liguer les produits de PCR avec le vecteur Topo linéarisé.

Figure 21 : Vecteur d'expression pBluescript II KS (+).

Figure 22: Schéma du plasmide pKSII-CD8α.

5 **Figure 23** : Schéma du plasmide rétroviral pLPCX utilisé pour l'expression des gènes chimères. Ces gènes sont introduits au niveau du site multiple de clonage.

Figure 24 : Schéma des constructions chimériques finales clonées dans le vecteur d'expression rétroviral pLPCX.

10 **Figure 25** : Visualisation de l'expression et ciblage exosomal des protéines chimères. Western blot anti-CDTM et anti-CD8α pour les lysats cellulaires et exosomaux de l'ensemble des protéines mutantes et sauvage CD8α-CDTM (taille variant de 31kDa à 27kDa) ainsi que du témoin négatif (vecteur d'expression pLPCX contenant le CD8α seul). Les sérum de lapin anti-CDTM et anti-CD8α sont dilués au 1/200^{ème}. L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la 15 peroxydase est dilué au 1/5000^{ème}.

20 **Figure 26** : Résultats comparés des expériences de détection de CD8α associé aux exosomes par cytofluorimétrie de flux et Western Blot. Tableau donnant les résultats de l'expression et le ciblage vers les exosomes des différentes protéines chimères analysées. Les mutants signalés par une étoile sont significatifs pour le ciblage exosomal. La présence de CD8α sur les exosomes est repérée par cytofluorimétrie de flux au moyen d'un anticorps monoclonal de souris fluorescent spécifique d'un épitope conformationnel de la protéine CD8α (anticorps 53-6.7 de chez Pharmingen).

25 **Figure 27 : Expression du CD8 à la surface des exosomes.** Histogramme représentant la moyenne des mesures de l'exposition de chaque protéine chimère à la surface des exosomes. Ces mesures ont été effectuées par cytofluorimétrie de flux. L'exposition de chaque protéine chimère est exprimée en pourcentage par

rapport à l'exposition de la protéine chimère CD8a-CDTM sauvage (construction n°9 sur l'histogramme = 100 %). L'écart type est indiqué. Les protéines chimères analysées sont : **1** : témoin négatif (vecteur d'expression pLPCX contenant le CD8 α seul) ; **2** : KS5 ; **3** : KS6 ; **4** : KS8 ; **5** : KS9 ; **6** : KS10 ; **7** : KS12 ; **8** : KS14 ; **9** : séquence sauvage ; **10** : aucune construction ; **11** : KM4 ; **12** : KM5 ; **13** : S ; **14** : KTMY ; **15** : KM8 ; **16** : E ; **17** : KM9 ; **18** : KM11/1 ; **19** : KM11/3 ; **20** : D et **21** : KM13. Les résultats observés confirment les résultats présentés en figures 25 et 26.

Figure 28 : Représentation de différents plasmides d'expression pLPCX obtenus après clonage de gènes chimères codant pour des protéines à simple ou multiples domaines transmembranaires.

Figure 29: A. Analyse par Western Blot anti-CDTM-BLV réalisée sur les **extraits de protéines cellulaires** de cellules HEK293T non transfectées (N-T) ou transfectées avec les vecteurs d'expression pLPCX contenant les trois constructions codant pour les trois protéines chimères. L'anticorps primaire de lapin anti-CDTM-BLV est utilisé dilué au 1/200. L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase est utilisé au 1/2000. B. Les tailles des bandes observées correspondent aux tailles attendues et sont notées à droite.

Figure 30 : A. Analyse Western Blot anti-CDTM-BLV réalisée sur les **extraits de protéines exosomales** produites par des cellules HEK293T non transfectées (N-T) ou transfectées avec les vecteurs d'expression pLPCX contenant les trois constructions codant pour les trois protéines chimères. L'anticorps primaire de lapin anti-CDTM-BLV est utilisé dilué au 1/200. L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase est utilisé au 1/2000. B. Les tailles des bandes observées correspondent aux tailles attendues et sont notées à droite.

Figure 31 : Révélation au Bleu de Coomassie des empreintes protéiques des différents extraits cellulaires (A) et exosomaux (B).

Figure 32 : Séquence du gène Src-SNAP-DCTM annotée des sites de restriction bordant les 3 fragments d'ADN fusionnés et séquence de la protéine SSC codée par ce gène (SEQ ID NOs.:121 et 122).

Figure 33 : Séquence du gène D-SNAP-CDTM annotée des sites de restriction bordant les 3 fragments d'ADN fusionnés et séquence de la protéine DSC codée par ce gène (SEQ ID NOs.:123 et 124).

5

Figure 34 : Démonstration du ciblage dans les exosomes des protéines SSC et DSC. Des cellules HEK 293 (5×10^5 cellules) sont transfectées en présence de 2 μ l de JetPrime (PolyPlus transfection) avec 1 μ g d'ADN vecteur d'expression eucaryote (pCDNA 3.1) contenant les gènes chimères Src-SNAP-CDTM (pistes 3 et 6), ou D-SNAP-CDTM (pistes 2 et 5) ou dépourvu de ces gènes (piste 1 et 4). Les protéines des exosomes (A) sécrétés dans le milieu et des cellules sont séparés par électrophorèse sur gel (PAGE-SDS) et transférées sur membrane Immobilon (Millipore). Les Western blots sont révélés au moyen d'un sérum de lapin anti-CDTM et d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin marqués à la peroxidase: A) analyse de 2 μ g d'exosomes, B) analyse de 20 μ g d'extrait cellulaire.

EXEMPLES

EXEMPLE 1

MATERIEL ET METHODES

I. *Préparations des ADN plasmidiques :*

A. *Transformation de bactéries :*

Des bactéries compétentes DH5 α (200 μ l) sont transformées par choc thermique avec 12,5 ng de chacun des 13 ADN étudiés codant pour les CD™ sauvages ou mutants du virus BLV, ainsi que par un plasmide dépourvu d'insert (pLPCX) faisant office de témoin négatif.

Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu LB/Agar contenant 50 μ g/ml d'ampicilline, à 37°C pendant 16h. Elles sont ensuite conservées à 4°C.

B. *Pré-culture et culture de bactéries :*

Une colonie de chaque type de bactéries est ensuite mise en pré-culture dans 3 ml de milieu LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline, à 37 °C sous agitation, pendant environ 8 h.

Chaque pré-culture servira à inoculer, au 1/200, deux flacons contenant chacun 250 ml de LB/Amp (100 µg/ml). L'incubation se fait à 37 °C, sous agitation, pendant 12 à 16 h.

C. Maxipréparation STET :

Les cultures obtenues sont centrifugées (GR 412, Jouan) 20 min à une vitesse de 3600 rpm et à une température de 4 °C. Les culots sont repris dans 25 ml de tampon STET (*Sucrose 8 %, Triton X100 5%, Tris HCl pH 8 50 mM, EDTA 50 mM*) auquel on ajoute 500µl de lysozyme (10 mg/ml ; Sigma) et 250 µl de RNase (2 mg/ml ; Sigma). Les tubes sont alors incubés 10 min à 100 °C puis centrifugés à 16000 rpm pendant 30 min. Les surnageants obtenus sont incubés 45 min à 65 °C en présence de 1mg/ml de protéinase K (Amresco). Les surnageants sont prélevés et l'ADN est précipité avec 0,15 volume d'acétate de sodium (AcNa) 3 M pH 6 et 0,6 volume d'isopropanol. Les solutions sont centrifugées (Aventi 30, Beckman) à 4 °C pendant 15 min à 15000 rpm. Les culots obtenus sont lavés avec 10 ml d'Ethanol avant d'être de nouveau centrifugés selon les paramètres précédents. Les acides nucléiques obtenus sont ensuite séchés et repris dans 2 ml de TE 1X et conservés à 4 °C.

La présence d'ADN super-enroulé est vérifiée, pour chaque produit de Maxipréparation, par électrophorèse de 0,2 µl et 1 µl des produits par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %.

D. Purification sur colonne :

Les maxipréparations STET permettent l'obtention de quantités importantes de plasmides, mais dont le degré de pureté peut être amélioré. Pour cela nous avons purifié chacun des 14 plasmides en réalisant un double passage sur colonnes AX100 (Kit Nucleobond PC 100, Macherey Nagel). Après précipitation à l'isopropanol, les plasmides purifiés obtenus sont repris dans 500 µl de TE1X et conservé à 4 °C.

La présence d'ADN super-enroulé est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %) pour chaque éluat obtenu ainsi que pour la fraction non-retenue sur les colonnes (FT=flow-trough).

La concentration en ADN des solutions obtenues est évaluée par spectrophotométrie, à une longueur d'onde de 260 nm.

E. Aliquotage et précipitation à l'EtOH :

On aliquote chaque type d'ADN par tubes de 50 ou 100 µg, puis on réalise une précipitation avec de l'éthanol (EtOH) et NaCl, sous hotte à flux laminaire, afin de stériliser les plasmides. Les culots obtenus sont repris à raison de 200 µl de TE1X pour 100 µg de plasmides, soit une concentration de 500 ng/µl. La présence d'ADN dans les aliquotes est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %.

F. Dosages spectrophotométriques des aliquotes obtenus :

Les aliquotes sont dosés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm. Les échantillons sont dilués au 1/50 et sont dosés dans un volume final de 500 µl.

G. Digestions enzymatiques :

L'identité de chaque plasmide est contrôlée par digestion de 20 ng de chacun d'eux par des enzymes de restriction (New England Biolabs): le couple Hind III/Not I, Xba I, Aat II, Pac I, Sfo I. Les plasmides sont discriminés selon le nombre de bandes obtenus et leur poids moléculaire, après électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %) de chaque produit de digestions.

II. Analyse de l'expression des chimères***A. Culture cellulaire :***

Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney cells, cellules embryonnaires de rein humain) sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), complémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 20 µg/ml de gentamicine, à 37 °C sous 5 % de CO₂.

B. Transfection :

En vue des transfctions, on ensemence 5.10^5 cellules dans 2 ml de milieu par puits de 9,6 cm² (plaques 6 puits). Après incubation une nuit à 37 °C sous 5% de CO₂, le milieu est remplacé par du DMEM complet sans antibiotiques.

Les cellules sont alors transfctées par un polyplex formé par la complexation, dans un tampon NaCl (0,15 M), de 6 µl de Jet PEI (Qbiogen) et 3 µg de chaque acide nucléique à tester; Un plasmide exprimant LacZ fait office de témoin positif pour la transfection. Après 24 h d'incubation à 37 °C sous 5 % de CO₂, le milieu est éliminé et remplacé par du DMEM complet avec 20 µg/ml de

gentamicine. L'expression optimum des plasmides est obtenue 48 h après le début de la transfection.

Dans certains cas, afin d'analyser l'importance du transport vésiculaire dans la dégradation et le ciblage de CDTM, nous avons utilisé des inhibiteurs de transport vésiculaire qui sont la bafilomycine et Ly 294002. 32 h après transfection, chaque inhibiteur est ajouté au milieu de culture à une concentration de 0,5 µM pour la bafilomycine et 10 µM pour Ly 294002.

C. Extraction protéique :

48 h après transfection les cellules sont lysées par un tampon TNE-NP40 0,5% auquel on ajoute 0,1 mM de PMSF. Après clarification par centrifugation (14000 rpm, 15 min, 4 °C ; Eppendorf 5417R), les lysats sont dosés par spectrophotométrie (à 595 nm) selon la technique de Bradford.

Pour chaque échantillon, on prélève 200 µg de protéines que l'on complète par du tampon de lyse pour un volume finale de 30 µl auquel on rajoute 10 µl de tampon d'échantillon 4X (CB 4X : NaOH 200 mM, EDTA 20 mM, SDS 2%, *Vert de bromocrésol 0,05%, Glycérol 10%*).

D. Préparation des exosomes :

Avant lyse des cellules, les milieux de cultures sont récupérés et précentrifugés à 10000 rpm pendant 20 min à une température de 4 °C (Aventi 30, Beckman). Les surnageants obtenus sont ensuite ultracentrifugés (Optima LE-80K, rotor Ti 50, Beckman) à 100000 g pendant 2 h à une température de 4 °C. Les culots obtenus sont repris dans 100 µl de CB 1X.

Nous avons aussi analysé les exosomes par sédimentation sur gradient de densité de sucre. Les culots obtenus après ultracentrifugation des milieux de culture sont alors repris dans 100 µl d'une solution de sucre à 0,25 M.

Les vésicules sont ensuite déposées sur un gradient de sucre préparé avec 8 couches (de 1,2 ml) de densités différentes (en molarité) : 0,5 / 0,75 / 1 / 1,25 / 1,5 / 1,75 / 2 / 2,5. Les tubes sont alors centrifugés (Optima LE-80K, rotor SW 41, Beckman) à 39 000 rpm pendant 16 h, à une température de 4 °C.

Après centrifugation, on prélève le gradient par fraction de 700 µl. Les protéines sont ensuite précipitées par addition d'un même volume de TCA 30 %. Les tubes sont conservés 2h à 4°C puis centrifugés (Eppendorf, 5417R) à une

température de 4 °C pendant 20 min à 13000 rpm. Les culots sont repris dans 500 µl d'acétone puis de nouveaux centrifugés comme précédemment.

Les culots alors obtenus sont repris dans 80 µl de CB1X puis analysés par migration sur gel d'acrylamide-SDS et Western Blot.

5 **E. Western Blot et Immunoprécipitation :**

Les échantillons protéiques obtenus sont analysées par western blot : après migration et séparation sur gel d'acrylamide (12,5 %), les protéines sont transférées sur membrane hydrophobe PVDF (Immobilon-P, Millipore).

10 La présence des mutants de la protéine TM est révélée par immunomarquage à l'aide des anti-corps suivant :

- *Anticorps primaire* : antisérum de lapin Anti-CD™ BLV (Dilution 1/200).
- *Anticorps secondaire* : Anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase (Dilution 1/5000 ; Jackson Immuno Research, JIR)

15 La présence de récepteurs à la transferrine est révélée par immunomarquage à l'aide des anti-corps suivant :

- *Anticorps primaire* : IgG de souris anti-TFr humain (Dilution 1/200 ; Zymed)
- *Anticorps secondaire* : Anti-IgG de souris (Dilution 1/5000 ; JIR)

20 Afin d'accroître sélectivement la concentration de la protéine étudiée, nous avons aussi réalisé des immunoprécipitations sur les lysats protéiques, préalablement à la migration sur gel. Après normalisation des quantités de protéines, l'adsorption du lysat se fait sur de la sepharose 6B, afin d'éliminer les réactions non spécifiques et l'immunoprécipitation est réalisée avec de la protéine sepharose 6A, en présence de 2,5 µg des anticorps suivant :

- *Anticorps primaires* :
 - IgG de souris Anti-CD8 de souris (19/178) (JIR)
 - IgG de rat Anti-CD8 de souris (53/672) (JIR)
- *Anticorps secondaires* :
 - Anti-IgG de souris (JIR)
 - Anti-IgG de rat (JIR)

25 Les culots obtenus sont alors repris dans 70 µl de CB 1,5X.

III. Localisation par immunofluorescence

A. Préparation des lamelles.

Les lamelles type coverslips sont stérilisées à l'EtOH absolu, sous hotte à flux laminaire, puis placées dans des puits de 1,9/cm² (plaques 24 puits) avant 5 d'être « coatées » à la poly-L-Lysine (25 µg/ml, Sigma) pendant 1 h à 37 °C. Après lavage au PBS, les lamelles sont conservées à 4 °C, dans 1 ml de PBS.

B. Culture cellulaire et transfection.

Les cellules HEK293 sont cultivées et transfectées selon la méthode décrite dans la partie « Analyses de l'expression des chimères ». 24 h après transfection, 10 les cellules sont reprises dans 35 ml de DMEM complet, puis distribuées dans des puits de 1,9 cm² (plaques 24 puits), contenant les lamelles préalablement stérilisées et « coatées », à raison de 1 ml de dilution cellulaire par puits. Les cellules ainsi mises en culture sont incubées 24 h à 37 °C, sous 5 % de CO₂.

C. Fixation et perméabilisation.

15 Les cellules sont ensuite fixées pendant 30 min avec une solution de formaldéhyde (4 %) puis perméabilisées au Triton X-100 (0,2 % final). Après 3 rinçages de 10 min au PBS, les lamelles sont conservées avec 1 ml de PBS, à 4 °C.

D. Marquages pour l'immunofluorescence.

20 Les différents anticorps à disposition nous ont permis de tester plusieurs marquages pour la localisation par immunofluorescence:

Marquages CD8 :

N°1 : IgG de souris / anti-CD8 de souris (19/178) (JIR) + Anti-IgG de souris FITC (JIR)

25 N°2 : Ascites de souris / anti-CD8 de souris (19/178) (JIR) + Anti-IgG de souris FITC (JIR)

N°3 : IgG de rat / anti-CD8 de souris (53/672) (JIR) + Anti-IgG de rat FITC (JIR)

N°4 : IgG de rat (53/6.7) / anti-CD8 de souris FITC (Pharmingen)

Marquages des compartiments intra-cellulaires :

30 N°5 : IgG de souris / anti-CD63 (Lamp3) humain (Zymed) + Anti-IgG de souris Cy3 (Sigma)

N°6 : IgG de souris / anti-Lamp1 humain + Anti-IgG de souris Cy3 (Sigma)

N°7 : IgG de souris / anti-Tf2 humain (Zymed) + Anti-IgG de souris Cy3 (Sigma)

N°8 : IgG de lapin / anti-caveolin (BD) + Anti-IgG de lapin TRITC (JIR)

5

RESULTATS

Les connaissances sur le processus de formation des exosomes sont partielles. De même, les fonctions associées au domaine cytoplasmique de Env sont mal caractérisées. La présente étude repose sur l'hypothèse que le modèle du virus de la leucémie bovine (BLV) est un bon outil pour étudier les phénomènes de formations des exosomes et des particules virales et que le domaine cytoplasmique de la protéine TM (CDTM) du BLV est un outil potentiellement intéressant pour le développement de la vaccination par « exosome display ».

Pour évaluer ces potentialités et afin de caractériser les fonctions responsables du ciblage de la protéine TM du BLV, et plus particulièrement le rôle des résidus cystéine palmitoylés ou non, nous avons développé plusieurs vecteurs permettant l'expression, au sein de cellules eucaryotes, de protéines transmembranaires chimères comprenant l'ectodomaine de la protéine CD8 de souris et le domaine CDTM (protéines chimères CD8-CDTM). Des chimères CD8-CDTM sauvages ainsi que des chimères CD8-CDTM mutées ont été exprimées.

L'ectodomaine CD8 de souris est, dans une cellule humaine, un élément neutre n'interférant pas avec les récepteurs cellulaires. Les chimères utilisées nous assurent donc de l'absence d'interactions entre l'ectodomaine des protéines et les structures cellulaires.

En conséquences, ces chimères permettent d'étudier spécifiquement les domaines cytoplasmique et transmembranaire de la protéine TM, en évitant les phénomènes engendrés par l'ectodomaine de la protéine TM et par la protéine SU qui lui est associée.

Trois types de constructions ont été utilisés (voir figures 1 et 2). A partir de ces constructions, nous avons développé différents vecteurs d'expression pLPCX permettant l'expression de CD8-CDTM sauvages ou mutées au niveau des résidus cystéine 1, 2 et 3 (schématisé par le sigle : CCC). Les résidus cystéine sont alors remplacés, ou non, par des résidus alanine, qui ne peuvent pas être palmitoylés.

Les protéines CD8-CDTM sauvages ou mutés étudiées sont :

- 1 : pX2 CCC (phénotype sauvage)
- 2 : pX2 ACC
- 3 : pX2 CAC
- 5 • 4 : pX2 AAC
- 5 : pX2 CCA
- 6 : pX2 ACA
- 7 : pX2 CAA
- 8 : pX2 AAA
- 10 • 9 : pX3 CCC (phénotype sauvage)
- 10 : pX3 CAC
- 11 : pX4 - - C (phénotype sauvage)
- 12 : pX4 - - A
- 13 : pX4 stp (*pX4 stp est composé uniquement par ED, tmD et une petite partie du CDTM de CD8*).

15 Ces constructions nous ont permis d'étudier, au niveau du ciblage de la protéine TM : les conséquences de la mutation des résidus cystéine, l'importance de l'intégrité du domaine trans-membranaire de la protéine TM, et l'importance du domaine cytoplasmique de la protéine TM (CDTM).

I. Préparation des ADN plasmidiques :

20 Dans un premier temps, nous avons produit, en grande quantité, chacun de nos 13 ADN ainsi qu'un vecteur sans insert (pLPCX) faisant office de témoin négatif. Après culture de bactéries transformées par nos différents plasmides, les ADN obtenus ont été purifiés successivement par la méthode STET puis sur colonne. L'identité des plasmides obtenus a ensuite été contrôlée par digestion enzymatique.

A. Préparations des ADN par la méthode STET :

30 Afin de vérifier l'intégrité des ADN plasmidiques et le rendement des préparations STET, nous avons réalisé une migration de 1µl et 0,20µl de chacun d'eux, sur gel d'agarose (0,8% ; voir figure 3). La non-dégradation des ADN est mise en évidence par la présence de bandes distinctes d'ADN super enroulés de

tailles homogènes.

B. Contrôle de la présence des ADN dans les produits de purification sur colonne :

Les ADN obtenus par la méthode STET sont purifiés sur colonnes, les fractions retenues puis éluées ainsi que les fractions non retenues sont ensuite analysées par électrophorèse sur gel afin de vérifier l'intégrité des ADN purifiés obtenus. Le gel présenté en figure 4 nous indique que l'ADN super-enroulé est bien présent dans les fractions pures éluées des colonnes (E et E') mais indétectable dans les fractions non retenues (FT).

C. Dosages spectrométriques des aliquotes et ajustement des concentrations des ADN après digestion enzymatique :

Les ADN purifiés sont ensuite dosés au spectrophotomètre. Les concentrations alors obtenues varient, en fonction des aliquotes, entre 149 µg/ml et 584 µg/ml. Après précipitation à l'EtOH, les ADN des aliquotes sont repris dans du TE1X et ajustés à une même concentration .

Afin de vérifier les concentrations d'ADN, nous avons linéarisé les plasmides par digestion enzymatique, à l'aide du couple Hind III/Not I, puis nous les avons analysé sur gel d'électrophorèse (voir figure 5, profil supérieur). Il est apparu que l'intensité des bandes obtenues était encore variable. Nous avons donc réajusté les concentrations en fonction des dosages spectrométriques et de l'intensité des bandes obtenues après la digestion (voir figure 5 - profil inférieur). L'obtention de bandes d'intensités égales, en plus d'assurer l'exactitude des concentrations de nos ADN avant leurs transfctions dans des cellules, permettra une meilleure lisibilité des électrophorèses après digestions enzymatiques, lors du contrôle de l'identité des plasmides.

D. Contrôle de l'identité des ADN après digestion enzymatique.

1) Principe général :

Afin de s'assurer de l'identité des 14 ADN préparés, tous sont contrôlés par digestion à l'aide des enzymes de restriction Hind III et Not I, Xba I, Aat II, Pac I ainsi que Sfo I qui doivent résulter en des combinaisons différentes de profils sur gels pour chacun des ADN . La migration sur gel d'agarose (0,8%) des produits de digestions permet la discrimination des ADN en fonction du nombre et de la taille

des bandes obtenues, comme indiqué dans le tableau 1 (remarque : les bandes d'une taille inférieure à une centaine de paires de bases ne sont pas visibles sur nos gels d'électrophorèse).

La digestion des constructions étudiées permet de s'assurer de l'identité de chaque plasmide. La discrimination des grands types de construction CD8-CD™ se fait par l'analyse du nombre et de la taille des bandes obtenus après digestion avec les enzymes Hind III/Not I et Xba I. La discrimination entre les différents mutants des résidus cystéine se fait après digestion par les enzymes Aat II, Pac I et Sfo I. Le nombre de bandes alors obtenus est plus important qu'avec les digestions par Hind III/Not I et Xba I, et la discrimination est réalisée en se basant principalement sur la présence ou non de bandes spécifiques (**en gras**).

		Nombres de bandes théoriques obtenus après digestions				
N°	Plasmide	Hind III/Not I	Xba I	Aat II	Sfo I	Pac I
15	1 pX2 wt TM	2	3	8	4	0
	2 pX2 MCA	2	3	8	4	1
	3 pX2 M2	2	3	9	4	1
	4 pX2 M14	2	3	9	4	0
	5 pX2 M15	2	3	8	5	0
	6 pX2 M16	2	3	8	5	1
	7 pX2 M17	2	3	9	5	1
	8 pX2 M18	2	3	9	5	0
20	9 pX3 wt TM	2	2	8	4	0
	10 pX3 M15	2	2	9	4	1
25	11 pX4 wt TM	1	2	8	4	0
	12 pX4 M15	1	2	8	5	0
	13 pX4 Stp	1	(d)	(h)	8	4

Tableau 1

Tailles des bandes attendues (en bp) :

a) : 7206 / 49

(g) : 6552 / 610

(b) : 6868 / 311

(h) : 6552 / 385

(c) : 7162

(i) : **4285** / 1055 / 801 / 498 / 294 / 186 / 83 / 53

30 **(d)** : 6937

(j) : **3423** / 1055 / **862** / 801 / 294 / 186 / 83 / 53

(e) : 6822 / 367 / 66

(k) : 4276 / **2538** / 310 / 131

(f) : 6812 / 367

(l) : 4276 / **1839** / **699** / 310 / 131

2) Exemple :

Pour la discrimination des mutants pX2 AAC et pX2 CCA, les gels obtenus sont représentés en figure 6A.

Interprétation :

- 5 Digestion par Hind III/ Not I : l'obtention d'une bande unique, à environ 7206 pb, correspond à la présence de constructions X2 ou X4 dans chacun des deux échantillons.
- 10 Digestion par XbaI : l'obtention de deux bandes à environ 6822 (ou 6812) et 367 bp correspondent à la présence de constructions X2 ou X3 dans chacun des deux échantillons.

En recoupant ces deux résultats nous pouvons affirmer que nous sommes donc bien en présence de **deux constructions de type X2**.

On cherche ensuite à discriminer les mutants X2 entre eux (voir figure 6B):

Interprétation :

- 15 Digestion par AatII :
 - **Echantillon 4** : l'obtention d'une 1 bande spécifique avoisinant 3423 pb (rouge) correspond à la présence d'un des plasmides X2 suivant : **pX2 CAC, pX2 AAC, pX2 CAA ou pX2 AAA**.
 - **Echantillon 5** : l'obtention d'une 1 bande spécifique avoisinant 4285 pb (bleu) correspond à la présence d'un des plasmides X2 suivant : **pX2 CCC, pX2 ACC, pX2 CCA ou pX2 ACA**.
- 20 Digestion par Sfo I :
 - **Echantillon 4** : l'obtention d'une bande spécifique avoisinant 2538 pb (rouge) correspond à la présence d'un des plasmides X2 suivant : **pX2 CCC, pX2 ACC, pX2 CAC, pX2 AAC**. En recoupant ce résultat avec celui de la digestion par Aat II, nous pouvons alors en déduire que nous sommes en présence d'un des plasmides suivant : **pX2 AAC ou pX2 CAC**.
 - **Echantillon 5** : l'obtention de 2 bandes spécifiques avoisinant 1839 pb (noir) et 699 (vert) pb correspond à la présence d'un des plasmides X2 suivant : **pX2 CCA, pX2 ACA, pX2 CAA, pX2 AAA**. En recoupant ce résultat avec celui de la digestion par Aat II, nous pouvons alors en déduire que nous sommes en présence d'un des plasmides suivant : **pX2 CCA ou pX2 ACA**.

- Digestion par Pac I :

Nous obtenons pour chaque échantillon, 1 bande de faible intensité correspondant à de l'ADNp non super enroulé ainsi qu'une bande de forte intensité correspondant à nos ADNp super enroulé (bleu) mettant en évidence l'absence de digestion par Pac I, pour ces échantillons.

Les échantillons 4 et 5 correspondent respectivement aux mutants ***pX2 AAC*** et ***pX2 CCA***.

Ce processus a été appliqué à l'identification de tous les plasmides.

3) Conclusion :

Lors de cette étape de préparation des ADN, nous avons obtenus plusieurs milligrammes de chacun des 14 plasmides purifiés et leurs identités ont toutes été confirmées après contrôle par digestions enzymatiques et analyses sur gels. De plus, tous les ADN ont été ajustés à une même concentration.

15 ***II. Analyse de l'expression des chimères :***

Afin d'évaluer l'expression des ADN, une même quantité de chacun des plasmides a été transfété au sein de cellules HEK293. Les protéines ainsi exprimées sont analysées par migration sur gel suivie d'un transfert sur membrane PVDF. Les membranes sont ensuite révélées à l'aide d'un sérum de lapin Anti-CDTM et d'un anticorps secondaire Anti-Lapin marqué à la peroxydase.

20 ***A. Analyse de la présence de CD8-CDTM au sein des lysats cellulaires :***

1) Analyses des lysats bruts :

Après 48h de transfection, les cellules sont lysées et les extraits obtenus sont dosés selon la technique de Bradford. Nous avons analysé 200µg de protéines brutes, issues de ces lysats, par migration sur gel et western blot révélé avec un anticorps anti-CDTM (voir figure 7).

Différents signaux spécifiques sont alors observables selon les échantillons :

- Une double bande à 50 kDa (bleu) correspondant à la présence de CD8-CDTM. Les deux bandes correspondent à deux niveaux de glycosylation de CD8.
- Un signal à environ 20 kDa (rouge) d'origine indéterminée.

Les échantillons pX2 CCC, pX2 ACC, pX2 CAC, pX2 AAC, pX4 stp et pLPCX ne présentent pas ces bandes.

2) Analyse des lysats après immunoprécipitation par des anticorps anti-CD8 :

5 Afin d'abaisser le seuil de détection de CD8-CDTM au sein des lysats cellulaires, nous avons utilisé une grande quantité d'extrait et concentré les chimères par immunoprécipitation avec des anticorps monoclonaux spécifique d'un épitope conformationnel de l'ectodomaine du CD8.

10 Après 48h de transfection, les cellules sont lysées et les extraits obtenus sont dosés selon la technique de Bradford. Après normalisation des concentrations en protéines, les extraits sont immunoprécipités en présence des anticorps Anti-CD8 et de protéine A sepharose. Les produits obtenus sont analysés par migration sur gel et Western Blot révélés avec un anticorps anti-CDTM (voir figure 8). Différents signaux sont alors observables selon les échantillons :

- 15
- Une double bande à 55 kDa (bleu) correspondant à la présence de CD8-CDTM.
 - Un signal non identifié, retrouvé pour chaque échantillon, à environ 66 kDa.
 - Un ou plusieurs signaux d'un poids moléculaire supérieur à 66 KDa correspondant probablement à la présence de protéines CD8-CDTM multimérisées.

20 Ici, l'échantillon pX2 AAC présente un signal détectable à 50KDa contrairement à l'analyse effectuée sans immunoprécipitation. En revanche aucun signal n'est détectable pour les échantillons pX2 CCC, pX2 ACC, pX2 CAC, pX4 stp et pLPCX.

25

3) Récapitulatifs de l'analyse de l'expression de CD8-CDTM au sein de lysats cellulaires :

30 En corrélant les données obtenues par western blot sur les lysats cellulaires avec les caractéristiques de chaque chimère (intégrité de tmD BLV, présence du troisième résidu de cystéine et nombre de résidus cystéine), nous pouvons établir le tableau 2 ci-dessous.

Il apparaît que, en plus du CDTM du BLV, deux facteurs puissent jouer sur la présence des chimères CD8-CDTM. Ces facteurs sont : la présence ou non de tmD

BLV, et la présence ou non du troisième résidu de cystéine (Cys 213).

B. Analyse de l'association de CD8-CD™ avec les exosomes :

Les différents ADN utilisés ne varient que de quelques nucléotides. Il est donc probable que les quantités de CD8-CD™ synthétisées soient équivalentes. Cependant il est apparu, lors de l'analyse de l'expression de CD™ au sein de lysats cellulaires, que certaines chimères ne sont pas détectables 48h après transfection. Cette absence de signal serait le reflet de la disparition de certaines de nos protéines chimériques. Cette disparition pourrait être due soit à une dégradation rapide de ces chimères, soit à leur sécrétion sous forme d'exosomes. Nous avons donc cherché à détecter la présence de CD8-CD™ au sein d'exosomes.

Construction	tmD BLV	Nbre de Cystéines	Signal CD™ BLV
pX2 CCC	Complet	3	Nul
pX2 ACC	Complet	2	Nul
pX2 CAC	Complet	2	Nul
pX2 AAC	Complet	1	+
pX2 CCA	Complet	2	+++ +
pX2 ACA	Complet	1	+++ +
pX2 CAA	Complet	1	+++ +
pX2 AAA	Complet	0	++
pX3 CCC	~ 15 aa	3	+++
pX3 CAC	~ 15 aa	2	++ +
pX4 -- C	Absent	1	+++ +
pX4 -- A	Absent	0	+++ + +
pX4 stp	Absent	0	Nul
pLpcX	Absent	0	Nul

Tableau 2

5 1) Contenu en CD8-CD™ des vésicules isolées par centrifugation :

Après 48h de transfection, les milieux de cultures sont récupérés et centrifugés en vue d'isoler les exosomes. Les culots obtenus sont alors analysés par migration sur gel et Western Blot révélé avec un anticorps anti-CD™ (voir figure 9).

On peut visualiser, selon les échantillons, un signal à 55 kDa correspondant à la présence de CD8-CD™. Ce signal est non détectable pour les échantillons pX2 CCC, pX2 ACC, pX2 CAC, pX2 AAC, pX4 stp et pLPCX.

10 2) Contenu en CD8-CD™ après sédimentation des vésicules sur gradient de densité de sucre :

Afin de nous assurer que le signal obtenu après ultracentrifugation des milieux de culture est bien du à la présence des chimères au sein d'exosomes et non pas à la présence de débris cellulaires contenant CD8-CD™, nous avons analysé les culots d'exosomes obtenus selon la méthode décrite précédemment 15 par sédimentation sur un gradient de densité de sucre. Les exosomes flottent alors à une densité allant de 1,13 à 1,20 g/ml en fonction des cellules utilisées et de la composition des vésicules. Après la sédimentation par ultracentrifugation, le gradient est prélevé par fractions de 700µl. Les protéines sont précipitées à l'aide de TCA et analysées par migration sur gel puis Western Blots révélés avec un anticorps anti-CD™ et un anticorps anti-récepteur de la transferrine (RTf) permettant de détecter la présence de vésicules cellulaires (endosomes ou 20 exosomes). Cette analyse a été réalisée pour les mutants pX4 -C et pX4 --A.(voir figure 10).

Chez pX4 --C et pX4 --A, on détecte un signal correspondant à CD8-CD™ dans les fractions de densité allant de 1,13 à 1,25 g/ml. Pour ces mêmes densités, nous avons également pu détecter un signal correspondant à RTf. Ces résultats 25 révèlent la présence de CD8-CD™ dans les fractions contenant les exosomes.

30 3) Récapitulatif de l'analyse de l'association des exosomes avec CD8-CD™ :

L'association de CD8-CD™ avec les exosomes a été détectée pour tous les mutants contenant CD™ exceptés pour les pX2 possédant Cys 213. Les mutants pX4 --C et pX4 --A apparaissent comme très efficacement ciblés dans les

exosomes. Les mutants pX3 et pX2 ne possédant pas Cys 213 sont eux aussi retrouvés dans les exosomes mais dans des proportions moindre que pour les mutants pX4 --C et pX4--A.

Il apparaît donc que, en plus de la présence du CDTM viral, deux facteurs puissent jouer sur le ciblage des chimères CD8-CDTM dans les exosomes.

Ces facteurs sont :

- La présence ou non du domaine transmembranaire du BLV.
- La présence ou non de la Cys 3.

C. Influence de l'inhibition du transport vésiculaire sur l'expression des chimères CD8-CDTM:

L'absence de détection des chimères pX2 CCC, pX2 ACC, pX2 CAC et pX2 AAC n'étant pas due à une sécrétion exosomale accrue, nous avons cherché à savoir si elle pouvait être due à une dégradation par la voie de tri des protéines des MVBs vers les lysosomes.

Pour cela, nous avons utilisé les inhibiteurs de transport vésiculaire que sont la bafilomycine et Ly294002. Ces inhibiteurs permettent de bloquer la voie de dégradation lysosomale, favorisant ainsi la sécrétion de protéines par les exosomes. Les inhibiteurs sont ajoutés aux milieux de cultures 32h après la transfection ; 16h plus tard, les cellules sont lysées et les milieux de cultures sont récupérés puis centrifugés en vue d'isoler les exosomes. Les échantillons obtenus sont alors analysés par migration sur gel et Western Blot révélé avec un anticorps anti-CDTM. Nous avons ainsi analysé l'expression des chimères pX2 CCC, pX2 CCA, pX3 CCC, pX4 -- C, pX4 -- A et pX4 stp .(voir figures 11 et 12).

Il apparaît que, pour ces mutants, le profil des Western Blots des protéines obtenues en présence d'inhibiteurs est le même que lors de l'analyse sans inhibiteur, que cela soit pour les lysats cellulaires ou pour les exosomes.

L'absence des chimères pX2 CCC, pX2 ACC, pX2 CAC et pX2 AAC n'est donc apparemment due ni à une sortie exosomale accélérée, ni à une dégradation dans les lysosomes. Il est probable qu'elle soit la conséquence d'une dégradation très précoce au niveau du système de contrôle du repliement au sein du réticulum endoplasmique (RE) et du TGN.

III. Localisation par immunofluorescence :

Afin d'apprécier le ciblage membranaire de CD8-CD™ ainsi que sa localisation dans les compartiments cellulaires, nous avons réalisé des observations en microscopie d'immunofluorescence confocale. 48h après 5 transfection, les cellules ont été fixées puis marquées à l'aide de différents anticorps.

A. Choix des anticorps :

Dans un premier temps, chaque type de marquage (voir Matériels et Méthodes) est testé, avec des dilutions d'anticorps variables, sur des cellules 10 fixées exprimant pX4 -- C ou pLPCX. Après observation sur un microscope à immunofluorescence classique (ZEISS Axiovert 200 M), nous avons testé les différents anticorps à disposition (voir partie « Matériels et Méthodes ») et déterminé leur efficacité ainsi que leurs dilutions optimales. Il est apparu que plusieurs anticorps anti-compartiments intra-cellulaires présentaient un signal nul 15 ou aspécifique.

Pour l'observation en imagerie confocale, nous n'avons donc pu utiliser que deux types de marquages :

- Marquage CD8-CD™ :

IgG de rat (53/6.7) Anti-CD8 de souris FITC (Pharmingen, dilution 1/50)

- Marquage Lamp3 :

IgG de souris Anti-CD63 (Lamp3) humain (Zymed, dilution 1/50) + Anti-IgG de souris Cy3 (Sigma, dilution 1/500)

B. Observations de la répartition de CD8-CD™ :

Après fixation et marquage des cellules à l'aide de nos différents anticorps, nous avons observé la répartition du marquage issu de CD8-CD™ ainsi que sa 25 colocalisation avec Lamp3 à l'aide d'un microscope confocal (ZEISS LSM 510).

Les cellules exprimant pLPCX (témoin négatif) ne présentent pas de signal FITC. Ce témoin nous permet donc de s'assurer que la fluorescence FITC visualisée pour les autres mutants est bien issue de la présence de CD8-CD™.

De façon surprenante, malgré une absence de détection par Western Blot, les constructions pX2 comprenant la Cys 3 sont visibles, bien que faiblement, en immunofluorescence.

Analyse des phénotypes généraux :

Les cellules HEK293 sont transfectées pendant 48h puis fixées. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM 510 (objectif X63 à immersion).

5 **CD8** : Marquage FITC (vert) révélant la présence des chimères contenant le CD8.

Lamp3 : Marquage Cy3 (rouge) révélant de la présence de la protéine Lamp3 caractéristique des endosomes tardifs.

CD8-CDTM / Lamp3 : Superposition des images FITC et Cy3. La nuance jaune obtenu met en évidence la colocalisation de CD8-CDTM avec Lamp3.

10 Après observations, nous avons pu distinguer 5 phénotypes généraux (voir figures 13 à 17) en se basant sur l'aspect (vésiculaire, membranaire ou périnucléaire) et l'intensité du marquage FITC. La colocalisation du marquage FITC d'aspect vésiculaire avec Lamp3 ne rentre pas en ligne de compte pour la détermination de ces phénotypes car elle est avérée chez tous les mutants. De 15 plus cette co-localisation est toujours partielle.

Analyse des zones périnucléaires présentant un fort signal FITC :

Pour tous les échantillons, excepté pX4 stp, on retrouve de manière plus ou moins constante un signal périnucléaire CD8 homogène important à la périphérie du noyau. Les paramètres d'intensité requis pour la visualisation de la majeure partie de la fluorescence FITC présente dans les cellules entraînent la saturation de cette zone. Un signal ainsi saturé étant peu exploitable, nous avons réalisé des acquisitions de paramètres d'intensité plus faible, en nous concentrant sur l'analyse de ces zones, notamment pour déterminer la pertinence des colocalisations qu'elles présentent avec Lamp3.

25 **CD8-CDTM / Lamp3 [a]** : Colocalisation de CD8-CDTM (vert) avec Lamp3 (rouge). Les paramètres d'intensité pour l'acquisition, même faibles, entraînent une saturation du signal périnucléaire et l'apparition de nuances jaunes à ce niveau, mettant en évidence une colocalisation partielle entre ces deux marquages. En raison de la saturation du signal, il est impossible de dire si la colocalisation mise 30 en évidence est réelle ou artéfactuelle.

CD8-CDTM [d] : Signal FITC issu de CD8-CDTM. Les paramètres d'intensité ont été abaissés sensiblement afin d'éliminer tout phénomène de saturation du signal. Le signal FITC apparaît diffus, homogène et non ponctué.

CD8-CDTM / Lamp3 [d] : Colocalisation de CD8-CDTM (vert) avec Lamp3 (rouge). Les paramètres d'intensité ont été abaissés sensiblement afin d'éliminer tout phénomène de saturation du signal. Il en résulte une absence de nuances jaunes mettant en évidence l'absence de colocalisation entre FITC et Lamp3.

5 D'après ces acquisitions, le marquage issu de Lamp3 apparaît en fait comme étant situé à l'intérieur de cette zone périnucléaire mais n'est en tout cas jamais colocalisé avec le marquage FITC (voir figure 18).

10 De plus le marquage issu de CD8-CDTM de ces zones périnucléaires apparaît diffus, homogène et non ponctué, et semble mettre en évidence la présence de CD8-CDTM au sein d'une structure cellulaire. La localisation et l'aspect de ce marquage, ainsi que l'absence de colocalisation réelle avec Lamp3 15 suggèrent la présence de CD8-CDTM dans l'appareil de Golgi.

15 Ce phénotype est retrouvé, de façon plus ou moins intense, chez tous les mutants, hormis pX4 stp. Chez les mutants pX4 --C et pX4 --A, ce phénotype n'est visible que dans une minorité de cellules, contrairement aux mutants pX2 et pX3 chez qui il est présent de manière constante.

Localisation du marquage FITC					
Phénotype	Mutants	Intensité FITC	Vésiculaire	Membranaire	TGN
A	pX2 CCC	+	+++	-	++
	pX2 ACC	+	+++	-	++
	pX2 CAC	+	+++	-	++
	pX2 AAC	+	+++	-	++
B	pX2 CCA	+++	++++	-	++
	pX2 ACA	+++	++++	-	++
	pX2 CAA	+++	++++	-	++
	pX2 AAA	+++	++++	-	++
C	pX3 CCC	++++++	+	+++	+++++
	pX3 CAC	++++++	+	+++	+++++
D	pX4 -- C	++++++	++	++++	+
	pX4 -- A	++++++	++	++++	+
E	pX4 stp	++++	+	+++	-

Tableau 3

Ainsi, l'observation spécifique des zones périnucléaires fortement marquées par FITC nous a permis de mettre en évidence la présence probable de

CD8-CDTM au sein du TGN.

D'après les données obtenues, nous pouvons établir le tableau récapitulatif ci-dessous (voir tableau 3).

Ces observations confirment que, outre le CDTM viral, deux facteurs jouent un rôle sur la stabilité et le ciblage de nos chimères.

Ces facteurs sont :

- La présence ou non de tmD BLV.
- La présence ou non des résidus N-terminaux du CDTM du BLV
- La présence ou non de la Cys 3.

10

CONCLUSION :

Au cours de nos analyses, il est apparu que la chimère pX4 stp, composée uniquement de l'ectodomaine et du tmD de CD8, s'accumule dans les cellules HEK293 en étant efficacement ciblée vers la membrane plasmique.

15 De la même façon, les chimères pX4 --C et pX4 --A s'accumulent et se retrouvent dans la membrane plasmique mais dans des proportions plus importantes que pX4 stp. Ces chimères sont très efficacement sécrétées au sein d'exosomes.

20 Les chimères pX3 quant à elles sont très présentes au sein de l'appareil de Golgi, contrairement aux chimères pX4. Leur ciblage au sein de la membrane plasmique et dans les exosomes paraît moins efficace que chez les chimères pX4 mais demeure important.

25 Les chimères pX2 apparaissent peu stables et sont retrouvées au sein du TGN mais pas dans la membrane plasmique. Les constructions pX2 comportant Cys 3 sont très peu stables dans les cellules et ne sont pas détectées dans les exosomes. La substitution de la Cys terminale dans ce type de constructions semble contribuer à un gain de stabilité des protéines chimériques. En effet, les constructions pX2 sans Cys 3 sont détectables dans les cellules et dans les exosomes.

30 Toutes les chimères étudiées présentent, en immunofluorescence, un marquage vésiculaire qui est partiellement colocalisé avec un marqueur des endosomes tardifs.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de la présence, ou

non, de Cys 3 dans la stabilité et dans le ciblage des chimères CD8-CDTM. Il semble que l'absence de ce résidu cystéine favorise la stabilité et le ciblage membranaire des chimères étudiées ainsi que leur présence dans les exosomes. Ces phénomènes pourraient être indépendants de l'hyperpalmitoylation associée à l'absence de Cys 3. En effet, la construction pX2 AAC, qui est non palmitoylée, est plus stable que les trois mutants pX2 possédant Cys 3 ainsi que Cys 1 et/ou Cys 2, qui sont palmitoylables. Cependant, une implication différentielle de la palmitoylation dans la stabilité et le ciblage de nos chimères ne doit pas être exclue.

Cette étude a permis de découvrir l'importance fondamentale de tmD du BLV. En effet, la délétion de tout ou partie de tmD BLV semble accroître sensiblement la stabilité des chimères ainsi que leur ciblage au niveau de la membrane plasmique. Ainsi de façon étonnante, la présence de tmD BLV favoriserait la dégradation précoce des chimères. Cette dégradation pourrait intervenir au niveau du système du contrôle du repliement au sein des compartiments cellulaires que sont le RE et le TGN puisque la voie de dégradation lysosomale ne semble pas en cause. L'absence d'effets d'inhibiteurs de transport vésiculaire sur la stabilité et le ciblage exosomal des chimères CD8-CDTM ainsi que leur colocalisation très partielle avec les endosomes tardifs, même pour les chimères les moins stables, vient soutenir cette hypothèse.

L'attrait principal de nos travaux réside dans la découverte d'outils potentiellement efficaces pour le développement d'un mode de vaccination basé sur le concept « exosome display ». En effet, les chimères pX4 --C et surtout pX4 --A semblent disposer d'un « moteur » moléculaire permettant un ciblage très efficace d'antigène peptidique (ici le CD8) vers les exosomes. Ce « moteur » serait donc situé dans le domaine cytoplasmique de la protéine TM du BLV.

Exemple 2 : Identification d'acides aminés impliqués dans le ciblage exosomal du peptide CDTM

Afin de préciser la nature exacte du « moteur » situé dans le domaine cytoplasmique de la protéine TM du BLV avant de procéder à de premiers essais d'immunisation, nous avons étudié l'effet de 18 types de mutations dans le domaine cytoplasmique de la protéine TM du BLV (voir figure 19):

- délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution des 2 résidus proline du premier motif PxxP (SEQ ID NO.:13 et SEQ ID NO. :14 ; mutation KM4) ;

- délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution des 2 résidus proline du deuxième motif PxxP (SEQ ID NO.:15 et SEQ ID NO.:16; mutation KM5) ;

5 - délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution des 2 résidus proline du troisième motif PxxP (SEQ ID NO.:17 et SEQ ID NO. :18; mutation KM8) ;

- délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution du premier résidu proline du quatrième motif PxxP (SEQ ID NO.:19 et SEQ ID NO.:20; mutation KM11/1) ;

10 - substitution des 2 résidus proline du quatrième motif PxxP (SEQ ID NO.:21 et SEQ ID NO.:22; mutation KM11/3) ;

- délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution du résidu tyrosine du premier motif YxxL (SEQ ID NO.:23 et SEQ ID NO. :24; mutation KTMY) ;

- délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution du résidu tyrosine du deuxième motif YxxL (SEQ ID NO.:25 et SEQ ID NO. :26; mutation KM9) ;

15 - délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution du résidu tyrosine du troisième motif YxxL (SEQ ID NO.:27 et SEQ ID NO.:28; mutation KM13) ;

- délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution du résidu sérine se trouvant avant le premier motif YxxL (SEQ ID NO.:29 et SEQ ID NO. :30; mutation S) ;

20 - délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution du résidu acide glutamique se trouvant avant le deuxième motif YxxL (SEQ ID NO.:31 et SEQ ID NO. :32 ; mutation E) ;

- délétion des 13 résidus N-terminaux et substitution du résidu acide aspartique se trouvant avant le troisième motif YxxL (SEQ ID NO.:33 et ; SEQ ID NO. :34; mutation D) ;

25 - séquence tronquée à 6 résidus - délétion des 13 résidus N-terminaux et des 39 résidus C-terminaux (SEQ ID NO. : 35 et SEQ ID NO. :36 ; mutation KS5) ;

- séquence tronquée à 15 résidus - délétion des 13 résidus N-terminaux et des 30 résidus C-terminaux (SEQ ID NO. :37 et SEQ ID NO. :38; mutation KS6) ;

30 - séquence tronquée à 21 résidus - délétion des 13 résidus N-terminaux et des 24 résidus C-terminaux (SEQ ID NO. : 39 et SEQ ID NO.:40; mutation KS8) ;

- séquence tronquée à 26 résidus - délétion des 13 résidus N-terminaux et

des 19 résidus C-terminaux (SEQ ID NO.:41 et SEQ ID NO. :42; mutation KS9) ;
- séquence tronquée à 31 résidus - délétion des 13 résidus N-terminaux et
des 14 résidus C-terminaux (SEQ ID NO.:43 et SEQ ID NO. :44; mutation KS10) ;
- séquence tronquée à 37 résidus - délétion des 13 résidus N-terminaux et
5 des 8 résidus C-terminaux (SEQ ID NO. :45 et SEQ ID NO. :46; mutation KS12) ;
- séquence tronquée à 41 résidus - délétion des 13 résidus N-terminaux et
des 4 résidus C-terminaux (SEQ ID NO. :47 et SEQ ID NO.48; mutation KS14).

10 Les mutants de substitution et de délétion ont été obtenus par mutagénèse dirigée ; les résidus substitués ont été remplacés par un résidu alanine. L'arrêt de traduction des mutants de délétion a été obtenu par addition d'un codon stop (codon TGA, TAG ou TAA).

15 Les séquences ADN codant pour les 18 mutants, ainsi que la séquence ADN CD™ sauvage dans laquelle seuls les 13 résidus N-terminaux ont été déletés (SEQ D NO. : 7 ; séquence appelée « séquence sauvage » ci-après) ont été sous-clonées en aval d'une séquence codant pour l'ectodomaine du CD8α murin. Les 19 gènes chimères obtenus ont ensuite été clonés dans un vecteur d'expression viral. Les vecteurs recombinants ainsi obtenus ont été transfectés dans des cellules eucaryotes (cellules HEK) afin d'analyser le ciblage vers les exosomes des protéines chimères résultantes. 48 heures après, l'expression protéique dans les cellules a été examinée par Western Blot. Parallèlement, les exosomes ont été purifiés par ultracentrifugation permettant d'évaluer ainsi le tri 20 de la protéine chimère dans les exosomes par FACS et western blot.

25 Les résultats présentés ci-après mettent en évidence la nécessité de deux motifs peptidiques individuellement reconnus dans la littérature pour leurs interactions avec des protéines associées à la machinerie ESCRT et à la machinerie de transfert intermembranaire (en particulier les adaptines dont AP3). C'est la première fois que l'on apporte des évidences expérimentales que ces deux motifs peptidiques jouent, en synergie, un rôle déterminant dans le ciblage exosomal.

30 Ces résultats apportent des informations inédites et intéressantes en termes de signalisation inter-cellulaires utilisant les exosomes. Ils permettent ainsi d'avoir en main un outil bien défini pour cibler des protéines avec les exosomes. D'un point de vue industriel, ils faciliteront l'élaboration d'une nouvelle génération

de vaccin et d'un outil unique de criblage de molécules thérapeutiques ou d'anticorps par exemple.

1- Obtention des constructions moléculaires

A- Préparation des inserts par PCR:

5 Les trois mutants de substitutions S (Ser→Ala), D (Ac. Asp→Ala) et E (Ac.Glut→Ala) ont été obtenus par mutagenèse dirigée par une double PCR utilisant les amorces de mutations suivantes :

- Amorce S vers A, sens:

10 5' CCCTAAACCCGATGCTGATTATCAGGCCTGCTACCATCC 3'

- Amorce S vers A, anti-sens:

5' CGCGGATGGTAGCAACGCCTGATAATCAGCATCGGGTTA 3'

- Amorce D vers A, sens:

15 5' CCACCAAGCCGGCATACATCAACCT 3'

- Amorce D vers A, anti-sens:

5' TCGAAGGTTGATGTATGCCGGCTTGGT 3'

- Amorce E vers A, sens:

20 5' GCTACCATCCGCCAGCGATCTAC 3'

- Amorce E vers A, anti-sens:

5' GTAGATCGCTGGCGCGGATGGTA 3'.

25 Les PCR ont été réalisées à l'aide du kit Expand High Fidelity PCR system (Roche®) qui possède un mélange enzymatique contenant de l'ADN polymérase *Taq* thermostable et d'une ADN polymérase *Tgo* thermostable pourvue d'une activité correctrice (activité exonucléasique 3'-5') qui permet de limiter les erreurs lors de la polymérisation et d'obtenir des fragments à bouts francs. Deux 30 mélanges de réactifs ont été préparés à 4°C :

A (25µL) :10ng d'ADN à amplifier, 1µL de dNTP 10mM (200µM final chacun), 1,5µL de chacune des deux amorces sens et anti-sens à 10µM (300nM final), eau stérile (qsp 25µL) ; et

B (25µL) :5µL de tampon « Expand High Fidelity » 10X à 15mM en MgCl₂ (1,5mM final), 0,75µL de mélange enzymatique « High Fidelity » (2,6U final), eau stérile (qsp 25µL).

A et B ont été mélangés à 4°C puis les cycles d'amplication suivants ont été

réalisés :

- dénaturation de l'ADN double brin 2 minutes à 94°C ;
- 4 cycles de dénaturation (94°C, 10 secondes), hybridation (50°C, 15 secondes) et élongation (72°C, 20 secondes) ;
- 25 cycles : 10 secondes à 94°C, 15 secondes à 64°C puis 20 secondes à 72°C;
- élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Le produit PCR obtenu a été maintenu à 4°C.

Les séquences ADN codant pour les 18 mutants, ainsi que la séquence ADN sauvage ont été modifiées par PCR (mutagénèse dirigée) afin qu'elles soient encadrées par des sites de restriction particuliers ; le protocole indiqué ci-dessus a été mis en œuvre, en utilisant deux amorces possédant les sites de restrictions XbaI et NotI.

B- Clonage des produits PCRs dans TOPO-bluntII et contrôles

Chacun des 19 ADNs a été ligué dans un vecteur de clonage TOPO (voir figure 20) du kit Topo-blunt cloning (Invitrogen) pour être introduit dans des bactéries chimiocompétentes. Les clones transformés ont été sélectionnés et toutes les séquences d'ADNs vérifiées par séquençage.

a) Ligation dans le plasmide et Transformation dans Top10

Chacun des différents produits de PCR a été intégré dans un plasmide TOPO-BluntII déjà ouvert et à bouts francs portant le gène de résistance à la kanamycine. Les bactéries chimiocompétentes Top10 ont été transformées par ces plasmides et mises en culture sur boîte de LB/agar (100µg/mL de kanamycine). Le plasmide TOPO-BluntII sans insert a servi de témoin négatif et un autre témoin (1ng du plasmide PUC19) a été utilisé comme témoin positif de transformation. Après culture, seules les bactéries transformées par un plasmide contenant l'insert ou PUC19 (témoin positif) se sont développées en présence de l'agent de sélection (antibiotique).

b) Criblage des bons clones et séquençage:

Suivant les résultats des clonages, 2 à 10 colonies ont été amplifiées pour réaliser l'extraction de l'ADN plasmidique. Pour chaque construction et chaque clone, nous avons obtenu un volume d'ADN plasmidique de 100µL à environ

150ng/µL. Le rapport absorption à 260nm / absorption à 280nm donne pour chaque purification une valeur comprise entre 1,8 et 2 ce qui témoigne de la pureté de la préparation (une valeur inférieure à 1,8 témoignerait d'une contamination protéique).

5 Pour s'assurer de la présence de l'insert dans le plasmide, les ADNs plasmidiques ont été digérés par l'enzyme de restriction EcoRI qui encadre les séquences d'intérêt. La visualisation des ces produits de digestion a été faite sur gel d'agarose 2% où la présence d'un fragment (d'environ 300pb) constitue la preuve d'un ADN recombinant.

10 Une fois les bons clones identifiés, 2 à 4 µg d'ADN plasmidique de chaque mutant ont été séquencés afin de vérifier l'intégrité de chaque séquence d'intérêt et donc du cadre ouvert de lecture. Les mutations et les sites de restrictions rajoutés ont été contrôlés par la même occasion.

C- Obtention des gènes chimères dans un vecteur de clonage pKSII

15 Chacune des 19 séquences (1 sauvage et 18 mutées) a été placée en aval d'une séquence codant pour l'ectodomaine CD8α de souris, pour donner 19 constructions.

a) Préparation d'un vecteur de clonage pKSII-CD8

20 Le vecteur pKSII-CD8α (voir figure 22) a été digéré successivement avec les enzymes de restrictions XbaI et NotI pour pouvoir accueillir les inserts. Les digestions effectuées, le plasmide a été déphosphorylé, précipité à l'éthanol et purifié sur gel d'agarose 0,8%.

b) Préparation des inserts

25 Les différents inserts encadrés par les sites de restrictions XbaI-NotI ont été digérés par les mêmes enzymes de restrictions que le plasmide afin que celui-ci puisse les intégrer.

c) Obtention des plasmides chimères par clonage

Les ADNs ont été insérés dans le plasmide pKSII-CD8α linéarisé :

30 Les inserts digérés ont été purifiés sur gel d'agarose 2,5%. Leur réinsertion dans le vecteur pKSII-CD8α a été réalisée par la technique de ligation dans le gel. Un fragment de gel vierge a servi de témoin négatif de ligation.

Ayant utilisé les mêmes enzymes de restrictions pour le vecteur et les inserts, ils possèdent donc des sites cohésifs XbaI et NotI complémentaires :

plasmide et inserts devraient pouvoir établir des liaisons entre eux. C'est une enzyme, la ligase, qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre une extrémité 3'-OH et une extrémité 5'-Phosphate de deux acides nucléiques.

Une fois l'étape de ligation achevée, des bactéries DH5 α sont transformées par ces plasmides portant le gène de résistance à l'ampicilline. Après culture des différentes bactéries transformées à 37°C sur LB/agar (50 μ g/mL d'ampicilline) et comparaison avec les témoins négatifs, on constate le développement de colonies uniquement chez les cellules transformées par les produits de ligation en présence d'insert CDTM. Cela suggère que les colonies obtenues ont bien été transformées par un vecteur contenant un insert entre les sites XbaI et NotI.

10 d) Criblage :

Pour confirmer l'obtention des plasmides chimères, différents clones de chaque mutant ont été criblés en digérant l'ADN plasmidique par les deux enzymes XbaI/ NotI et après migration des produits de digestion sur gel d'agarose 15 0,8%. Cette double digestion excise l'ensemble du gène chimère créé, c'est-à-dire avec le CD8 α en phase avec le CDTM.

Pour chaque clone et chaque construction (pKSII-CD8 α -CDTM muté ou sauvage), il a été observé une première bande à 2,9 kpb correspondant à la taille du plasmide pKSII linéarisé. Une deuxième bande a été repérée à environ 950pb ; 20 elle correspond au gène codant pour les chimères CD8 α - CDTM mutés ou non.

D- Obtention des gènes chimères dans le vecteur d'expression rétroviral pLPCX :

Le vecteur d'expression pKSII, s'il est facile à manipuler de par sa taille et ses sites de restrictions, ne permet pas l'expression protéique dans les cellules 25 eucaryotes. Nous avons donc choisi pLPCX (Clontech Laboratories Inc., voir figure 23), qui permet d'introduire un gène autant par transfection que par transduction au moyen d'un vecteur rétroviral.

Chaque gène chimère a été excisé du plasmide pKSII entre les sites XbaI-NotI pour être purifié par extraction sur gel d'agarose 2% en utilisant le kit 30 Nucleospin Extract II® (Macherey-Nagel).

Le vecteur d'expression pLPCX a lui aussi été préalablement digéré par le couple d'enzymes XbaI-NotI, déphosphorylé puis précipité à l'isopropanol (cette étape permet d'éliminer le court fragment d'ADN (inférieur à 100pb) situé entre

Xhol et NotI libéré lors de la digestion).

La ligation des gènes chimères avec pLPCX a été réalisée en utilisant la T4 DNA ligase (Biolabs) (rapport insert/vecteur d'environ 3/1 molécule à molécule). Des bactéries chimio-compétentes Stbl2 (MAX Efficiency® Stbl2™ Competent Cells, Invitrogen) ont été transformées par ces produits de ligation. Un témoin positif (1ng du plasmide pUC19) et un témoin négatif (pLPCX « ligué » sans insert) ont été préparés en parallèle. Après culture bactérienne à 30°C sur milieu gélosé contenant 50µg/mL d'ampicilline, seules les bactéries transformées par le témoin positif ou par les produits de ligation avec inserts se sont développées.

Pour pouvoir procéder au criblage et avoir une quantité conséquente d'ADN plasmidique nécessaire pour les transfctions dans cellules eucaryotes, des Midipreparations ont été effectuées. La présence des inserts dans le plasmide a été vérifiée sur gel d'agarose 2% après digestion par Xhol puis NotI. Pour chaque construction (pLPCX-CD8α-CD™ mutées et sauvage ; voir figure 24) on observe une bande à 6,3kpb correspondant au pLPCX linéarisé et une bande à 950pb correspondant aux gènes chimères excisés.

2- Expression et analyse du ciblage vers les exosomes :

A- Transfctions dans les cellules HEK 293T :

Pour s'assurer de la transfection des cellules eucaryotes HEK 293T et estimer le pourcentage de cellules transduites, les cellules sont transfctées par le plasmide contenant le gène *LacZ* et incubées dans une solution de X-Gal.

D'abord à l'œil et après observation au microscope optique (grossissement X40) nous avons constaté que plus de 50% des cellules étaient colorées en bleu ce qui prouve que la grande majorité ont été transduites par le plasmide *LacZ*. Les mêmes conditions ayant été respectées pour la transfection de nos gènes chimères, il est probable que plus de 50% des cellules aient été transduites par les gènes chimères.

En parallèle, vingt transfctions simultanées dans des cellules HEK 293T ont été effectuées. Elles correspondent à chacun des plasmides ainsi qu'à un témoin négatif (pLPCX-CD8 sans CD™).

B- Expression des protéines chimères dans la cellule et ciblage vers les exosomes

a) Analyse par western blot :

Les lysats cellulaires et exosomaux issus des transfections ont été analysés par migration sur gel SDS-PAGE à 10%, suivie d'un transfert sur membrane PVDF (polyvinylidène difluoride, Immobilon-P, Millipore). Ces membranes ont ensuite été révélées à l'aide d'un sérum primaire de lapin anti-CDTM suivi d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase. Après révélation, ces anticorps sont éliminés et les membranes de transfert révélées de la même façon mais en utilisant un sérum de lapin anti-CD8α.

Les résultats sont présentés sur les figures 25 et 26.

- Comparaison des niveaux d'expression des chimères dans les cellules et les exosomes :

On constate que les lysats cellulaires ne révèlent qu'une faible expression des protéines chimères. Par contre, la présence de certaines protéines chimères dans les exosomes est parfois très forte.

Outre les niveaux d'expression, la différence majeure que l'on remarque entre protéines cellulaires et protéines exosomales est la présence de 2 à 3 bandes pour les cellules et d'une seule pour les exosomes. Ceci vient du fait que la cellule contient des formes non-glycosylées et plus ou moins glycosylées. Seule la forme correctement glycosylée se retrouve dans les exosomes.

- Analyse par western blot du ciblage exosomal des témoins positifs (CD8α-CDTM) et négatif (CD8α seul) :

Avec le sérum anti-CDTM, une bande migrant à 31kDa est présente dans le lysat exosomal du témoin CD8α-CDTM sauvage alors qu'elle est absente dans le lysat des cellules transfectées par le témoin négatif. Cette bande est caractéristique de la protéine chimère attendue.

Avec le sérum anti-CD8α, le témoin négatif CD8α seul présente une bande vers 27kDa qui correspond à l'expression et au ciblage exosomal de CD8α dépourvu de CDTM. Comme précédemment, une bande migrant à 31kDa est présente dans le lysat exosomal du témoin CD8α-CDTM sauvage. La différence d'intensité entre les bandes 31kDa et 27kDa indique que le CD8α est bien plus ciblé sur les exosomes quand il est fusionné au CDTM.

- Analyse par western blot des variations de ciblage des CD8 α -CDTM mutés :

Seuls les résultats obtenus avec le sérum anti-CD8 α sont comparables entre eux. Les résultats obtenus avec le sérum anti-CDTM sont uniquement utilisés pour confirmer les précédents. Suivant la mutation de la séquence codant pour le CDTM, ces résultats montrent une variation dans l'expression et le ciblage des protéines chimères vers les exosomes. Ceci est particulièrement clair pour les mutations qui inhibent fortement le ciblage des protéines sur les exosomes. Les mutants concernés sont les mutants KM8, KM13, D et KS8.

De ces observations on peut conclure que le motif PSAP (mutant KM8) et le motif DY (au niveau du dernier motif YxxL (mutants KM13 et D)) sont importants pour le ciblage exosomal.

b) Quantification des protéines chimères sur les exosomes par FACs :

La présence des protéines chimères a été aussi recherchée par une analyse en cytofluorométrie (FACscan) utilisant un anticorps monoclonal anti-CD8 fluorescent.

Après fixation des exosomes sur billes de latex (billes IDC (Interfacial Dynamics Corporation) ultraclean aldehyde/sulfate Latex), les protéines chimères présentes à la surface des exosomes ont été marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-CD8 α couplé à la fluorescéine (anticorps 53-6.7 de chez Pharmingen) et analysées au cytofluorimètre (FACScan).

Les résultats obtenus sont particulièrement clairs pour les mutants KM8, KM13 et D, qui révèlent l'importance des acides aminés mutés pour le ciblage des protéines chimères sur les exosomes (voir Figures 26 et 27). Ces résultats confirment l'impact des motifs PSAP, D et Y (du motif DYxxL)dans le ciblage des protéines vers les exosomes déjà révélés par les résultats des westerns blots.

Conclusion :

Au cours de cette étude, nous avons construit des gènes chimères permettant d'exprimer le peptide pilote CDTM muté ou sauvage fusionné avec le CD8 α de souris. Ces mutations sur des acides aminés ou des motifs remarquables du CDTM avaient pour but d'identifier les aminoacides et motifs consensus importants dans le ciblage exosomal.

Les différents gènes chimères ont été intégrés dans un vecteur

d'expression rétroviral pour transfecter des cellules eucaryotes HEK 293T afin d'obtenir l'expression de ces protéines chimères. Les bandes observées en western blot suggèrent que, comme la protéine CD8α native, ces protéines sont différemment glycosylées lors de leur passage dans l'appareil de Golgi. Seules les 5 protéines correctement glycosylées se retrouveraient dans les exosomes. Ces protéines ont subi les modifications post-traductionnelles adéquates, condition indispensable à l'expression d'épitopes conformationnels essentiels à la future élaboration d'une immunité vaccinale ou au criblage de molécules thérapeutiques. Cependant, ces glycosylations, qui sont plus ou moins présentes, conduisent à de 10 multiples bandes diffuses qui nous ont gênés lors de la quantification comparée des protéines. Pour palier ce problème, il faudra traiter les lysats avec une endoglycosylase afin d'observer une seule bande sur gel.

D'après ces résultats, les motifs PSAP et DY (du dernier YxxL) sont indispensables à l'expression et au ciblage des protéines chimères vers les 15 exosomes. Ces résultats sont inédits et sont intéressants aussi bien du point de vue fondamental que du point de vue application industrielle.

Il est probable que le motif PSAP soit responsable d'une interaction avec la protéine Tsg101 du complexe ESCRT. Quant au motif DYxxL, il pourrait être impliqué dans l'interaction avec la protéine ALIX du complexe ESCRT. Ainsi, pour 20 la première fois, des données expérimentales suggèrent que le complexe ESCRT serait impliqué dans la formation des exosomes.

EXEMPLE 3 : ciblage de récepteurs à domaines transmembranaires vers les exosomes.

Les récepteurs membranaires sont des cibles majeures pour le développement de molécules thérapeutiques. En général, le criblage à haut débit de drogues s'effectue en particulier avec des récepteurs à multiples domaines membranaires exprimés sur des cellules en culture. Outre les difficultés pour obtenir une forte expression de récepteurs à la surface des cellules, cette 30 technique entraîne des difficultés de robotisation. C'est pourtant actuellement la seule solution, puisque l'utilisation de récepteurs recombinants purifiés est pour l'instant techniquement inenvisageable.

Dans ce contexte, des exosomes porteurs de récepteurs en particulier de

récepteurs à multiples domaines seraient un matériel simple d'emploi et bien adapté au criblage en raison de leur stabilité et de leur facilité de manipulation.

La présente étude visait à produire des exosomes porteurs de récepteurs à simple ou multi- domaines transmembranaires, en particulier le récepteur CxCR4 (récepteur de la chimiokine SDS-1 (CXCL-12) et du HIV) et le récepteur CD4 (récepteur du HIV).

Trois gènes chimères ont été synthétisés. Ils comportent, à l'extrémité 3', le peptide CDTM-BLV de séquence SEQ ID. NO. : 8, et à l'extrémité 5', un ADN codant pour le récepteur humain CxCR4, pour une version du récepteur CxCR4 tronquée en partie C-terminale comportant 307 acides aminés (CxCR4 (307)) ou pour une version du récepteur CD4 tronquée en partie C-terminale comportant 403 acides aminés (CD4 (403)).

Les récepteurs CD4 et CxCR4 comportent respectivement un et sept domaines transmembranaires.

Les trois gènes chimères ont été clonés dans un vecteur d'expression rétroviral pLPCX. Ces différents plasmides ont été transfectés dans des cellules eucaryotes humaines HEK293T afin d'observer l'expression des différentes protéines chimères dans ces cellules ainsi que leur tri vers les exosomes.

La stratégie de clonage et sous-clonage utilisée est similaire à celle décrite pour l'exemple 2 :

Les ADNs codant pour les récepteurs CxCR4, CxCR4 (307) et CD4 (403) ainsi que celui codant pour le peptide pilote CDTM sont amplifiés par PCR en utilisant des amores comportant les séquences de sites de restrictions que l'on souhaite intégrer à chaque extrémité des fragments amplifiés (les fragments CxCR4, CxCR4 (307) et CD4 (403) seront flanqués en 5' par le site EcoRI et en 3' par le site XbaI et CDTM/BLV sera flanqué en 5' par le site XbaI et en 3' par le site NotI).

Les inserts ainsi produits sont clonés dans des vecteurs d'amplification Topo (voir figure 20). Les plasmides obtenus sont ensuite digérés par des enzymes de restriction et analysés sur gel d'agarose 1,5%, puis séquencés afin de vérifier l'intégrité de leur séquence.

L'insert CDTM/BLV est ensuite excisé du vecteur Topo par digestion enzymatique en utilisant le couple XbaI/NotI puis sous-cloné dans le vecteur

d'amplification pKS2 (voir figure 21). Le vecteur pKS2 recombinant ainsi que les vecteurs Topo recombinants contenant les inserts CxCR4, CxCR4 (307) et CD4 (403) sont alors digérés avec les enzymes de restriction EcoRI et XbaI, afin de pouvoir sous-cloner les fragments CxCR4, CxCR4 (307) et CD4 (403) dans le vecteur d'amplification pKS2, lesdits fragments étant placés en 5' de la séquence codant pour le peptide CDTM.

Les différentes constructions ainsi obtenues sont excisées des plasmides pKS2 recombinants par digestion avec le couple d'enzyme EcoRI/NotI puis sous-clonées dans le vecteur d'expression rétroviral pLPCX (voir figure 22). Les vecteurs obtenus (voir figure 28) sont vérifiés par digestion enzymatique en utilisant le couple d'enzymes EcoR1/Xba1.

Les différents plasmides pLPCX sont transfectés dans des cellules eucaryotes humaines HEK293T afin d'exprimer les protéines chimères CxCR4/CDTM, CxCR4(307)/CDTM et CD4 (403)/CDTM.

Un extrait des protéines cellulaires totales (100 µg) et les protéines d'une suspension d'exosomes produits par chacun des lots de cellules transfectées sont alors soumis à une migration en SDS-PAGE (10%) en présence ou en absence de β-mercaptopéthanol. Les protéines d'intérêt sont révélées par Western Blot grâce à l'utilisation d'un sérum primaire de lapin anti-CDTM et d'anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase. La révélation des anticorps est réalisée en chambre noire et par utilisation d'une solution ECL. Enfin l'empreinte protéique de chaque échantillon est révélée par coloration au bleu de Coomassie.

Les résultats sont présentés en figures 29-31.

On observe que les chimères CxCR4/CDTM, CxCR4 (307)/CDTM et CD4 (403)/CDTM sont exprimées dans les extraits de protéines cellulaires (voir figure 29).

Plusieurs bandes caractérisent la chimère CxCR4/CDTM : 36, 42, 62 et 87 kDa. L'expression du récepteur CxCR4 sauvage se caractérise en effet par plusieurs isoformes notamment dans les cellules HEK293T ; des bandes 34, 40, 47, 62, 73 et 80 kDa peuvent être identifiées (Sloane JA, et al.). Les tailles supérieures des bandes de la chimère CxCR4/CDTM dans les HEK293T sont dues à la présence du peptide pilote (domaine CDTM) dans la chimère CxCR4/CDTM. De même, les bandes 30, 42, 60 et 83 kDa révèlent la présence de la chimère CxCR4

(307)/CDTM. La variation de taille des bandes représentant les différentes isoformes de cette chimère s'explique par le fait que le récepteur CxCR4 est tronqué. La chimère CD4 (403)/CDTM, elle, est caractérisée par une bande nettement visible de 53 kDa.

5 En outre ces chimères sont toutes triées vers les exosomes comme le montre la présence les bandes 36, 42, 62 et 87 kDa (pour CxCR4/CDTM) ; 30, 38, 48, et 83 kDa (pour CxCR4 (307)/CDTM) et la bande 53 kDa (pour CD4 (403)/CDTM) (voir figure 30).

10 La révélation au bleu de Coomassie des différentes empreintes protéiques montre que les quantités de protéines totales d'origine exosomale (figure 31B) utilisées au cours de ces expériences sont nettement inférieures aux quantités de protéines totales d'origine cellulaire (figure 31A) alors que le signal en Western blot est équivalent. On constate que toutes les protéines présentes dans le lysat 15 cellulaire témoin ne sont pas triées vers les exosomes. Les chimères CxCR4/CDTM et CD4(403)/CDTM sont adressées très fortement vers les exosomes. En revanche, la chimère CD4 (403)/CDTM est triée presque totalement vers les exosomes.

Conclusion

20 La transfection de cellules HEK293T avec différents plasmides pLPCX a permis l'expression des chimères CxCR4/CDTM-BLV, CxCR4(403) /CDTM-BLV et CD4 (403)/CDTM-BLV. L'analyse par Western blot a mis en évidence leur présence dans les lysats cellulaires.

25 Comme attendu, plusieurs isoformes des chimères CxCR4/CDTM-BLV et CxCR4 (307)/CDTM-BLV sont exprimées dans les cellules HEK293T transfectées avec les plasmides pLPCX CxCR4/CDTM-BLV et pLPCX CxCR4 (307)/CDTM-BLV. Les chimères CxCR4/CDTM-BLV et CxCR4 (307)/CDTM-BLV sont efficacement triées vers les exosomes et il semble que ces protéines de fusion soient partagées à parts égales dans les cellules et les exosomes.

30 En outre on observe la présence de la chimère CD4 (403)/CDTM-BLV dans les cellules HEK293T transfectées avec le plasmide pLPCX CD4 (403)/CDTM-BLV. Il semble que le peptide pilote CDTM-BLV favorise un tri très important de la chimère CD4 (403)/CDTM-BLV vers les exosomes.

Les résultats décrits ci-dessus montrent que le peptide pilote CDTM-BLV est

capable de trier indifféremment des protéines à simple ou multiples domaines transmembranaires vers les exosomes.

On sait qu'il est très difficile de travailler sur ces récepteurs en solution car s'ils ne sont pas intégrés dans une membrane plasmique, ils ne gardent pas leur structure native. Actuellement les études réalisées sur ces protéines sont souvent faites à partir de lignées cellulaires stables et exprimant les récepteurs d'intérêt. Il est toutefois contraignant en termes de temps et d'économie d'acquérir, de cultiver et d'entretenir ces lignées qui peuvent mourir à tout moment si elles sont mal traitées. C'est pourquoi le fait d'utiliser des exosomes porteurs de récepteurs à multiples domaines transmembranaires pour leurs études représente une solution intéressante car les exosomes possèdent tous les avantages d'une cellule pour ces études sans les inconvénients puisqu'ils ne sont pas vivants.

Des exosomes dans la membrane desquels sont intégrées des protéines recombinantes et en particulier des protéines comportant de multiples domaines transmembranaires pourraient être utilisés en vaccinologie et comme outil de criblage.

EXEMPLE 4

Nous avons découvert qu'un fragment de l'extrémité C-terminale de la protéine TM du BLV muté par une délétion d'un peptide et par une substitution d'une cystéine pour une alanine présentait des propriétés exacerbées de ciblage vers les exosomes d'un peptide ou polypeptide d'intérêt qui lui est fusionné. L'analyse des acides aminés impliqués dans cette propriété de ciblage exosomal révèle que ce peptide interagirait avec des protéines de la machinerie de bourgeonnement ESCRT. Il est connu que cette machinerie interagit avec des protéines transmembranaires (par exemple, des récepteurs) et aussi avec des protéines cytoplasmiques (Hrs, capsid de virus par exemple) qui interagissent avec la membrane à laquelle elles se lient tout en restant cytosoliques. Nous avons voulu savoir si une protéine chimère cytosolique ou nucléaire à laquelle on adjoindrait deux propriétés, l'une de liaison à la face interne des membranes et l'autre de ciblage exosomal, serait effectivement triée vers les exosomes. Pour cela, nous avons utilisé une protéine interne à la cellule et impliquée dans le métabolisme de nucléotides pour démontrer cette hypothèse, la protéine SNAP

(Covalys, NEB).

La protéine SNAP est une appellation commerciale de l'entreprise NEB (New England Biochemical, Ipswich, MA, USA) pour un mutant de l'enzyme O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (hAGT). Elle est impliquée dans la voie de synthèse des nucléotides (dans la réparation de l'AND). Nous avons utilisé l'ADN du plasmide pSNAPm de l'entreprise NEB comme ADN matrice des amplifications PCR du fragment d'ADN fusionné entre les fragments src et CDTM. La protéine SNAP peut fixer plusieurs substrats (Keppler et al., 2002; Keppler et al., 2004).

Les propriétés d'interaction aux membranes cellulaires sont le fait de nombreuses protéines cellulaires, en particulier des protéines impliquées dans la signalisation. Ces protéines interagissent avec la membrane par l'intermédiaire d'acides gras qu'elles acquièrent post-traductionnellement et aussi par la présence d'acides aminés basiques qui interagissent avec les têtes polaires de certains acides gras de la membrane (par exemple la choline). Ces acides gras sont en général des acides myristiques, des acides palmitiques ou des géranyl-géranyl.

Le prototype de ces protéines est l'oncogène c-Src qui possède une glycine myristoylable en position 2 et de nombreuses lysines et arginines en N-terminal. Il est connu que, lorsqu'il est fusionné à une protéine cytoplasmique, ce fragment N-terminal lui confère la propriété de se fixer à la face interne de membranes cellulaires. De nombreux autres fragments de protéines (en particulier de protéines cellulaires ou virales) se fixant sous les membranes pourraient jouer le même rôle que celui du fragment N-terminal de c-Src si ces fragments étaient fusionnés avec une protéine cytoplasmique. La localisation du fragment fusionné doit conserver les propriétés de fixation à la membrane. Aussi, il peut être préférable (mais pas forcément obligatoire) que le peptide de ciblage sous-membranaire soit localisé à l'extrémité N-terminal de la protéine de fusion. Par exemple, la myristylation de c-Src ne se fait que sur la glycine en position 2. Pour d'autres acylations, exemple la palmitoylation, la position des acides aminés substitués est généralement plus interne à la séquence protéique.

La séquence CDTM de ciblage exosomal utilisée dans le polypeptide chimérique de l'invention peut varier (voir par exemple les nombreux mutants de la séquence CDTM dans les exemples précédents), mais elle doit contenir au moins la séquence PSAP (ou PTAP) et YxxL pour être pleinement efficace. La

localisation de ce domaine CD dans le polypeptide chimérique de l'invention ne semble pas être cruciale pour la propriété de ciblage vers les exosomes. Toutefois, la localisation optimale de ce domaine CD dans le polypeptide chimérique de l'invention est la position C-terminale.

5 Dans le polypeptide chimérique de l'invention, le peptide ou polypeptide d'intérêt auquel on adjoint ces deux peptides (le domaine CD ou son dérivé muté et le domaine de ciblage sous-membranaire) afin qu'elle acquiert un ciblage exosomal peut être de différentes natures :

10 Par exemple, cela peut être la protéine SNAP, comme dans les polypeptides SNC et DSC décrits ci-après. Dans ce cas, il est possible d'utiliser les propriétés de cette protéine SNAP (comme décrit par exemple par Keppler et al., 2002 et Keppler et al., 2004), pour introduire un fluorophore ou une biotine ou toute autres molécules à un site particulier dans l'exosome, par exemple, au niveau d'une protéine dite protéine G.

15 Alternativement, le peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique de l'invention peut être aussi une enzyme particulière. L'exosome peut ainsi être utilisé comme véhicule pouvant livrer cette enzyme (en particulier d'enzyme cytosolique) à une cellule (en particulier une cellule d'un hôte humain ou non humain) ou à un organe dépourvu de cette activité enzymatique. Cela peut permettre notamment de traiter des patients atteints d'une maladie due à un déficit métabolique ou fonctionnel.

20 Alternativement, le peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique de l'invention peut être un antigène (de pathogène, de tumeurs ou autres). L'exosome le contenant peut ainsi susciter une réaction immune contre cet antigène, ce qui serait particulièrement efficace car les exosomes sont connus comme étant capturés par les cellules de la réponses immunes (par les cellules dendritiques en particulier).

25 Alternativement, le peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique de l'invention peut être une protéine fixant spécifiquement une séquence nucléique (par exemple un ADN). L'exosome de l'invention peut alors fixer un acide nucléique aisément détectable par PCR, par exemple, ce qui permet de faire du diagnostic. Un exemple de technique de fixation spécifique d'une protéine à un ARN est donné dans l'article de Bertrand et al. (1998). La technique

décrise par Bertrand et al. repose sur l'utilisation de la protéine de capsid du phage à ARN simple brin MS2 (Fouts et al., 1997) et d'un ARN contenant plusieurs copies d'une séquence de 19 nucléotides reconnues par cette protéine.

5

I. SYNTHESE D'UN GENE CHIMERE.

Nous voulons associer les propriétés de ciblage sous-membranaire du fragment N-terminal de la protéine c-Src avec des propriétés, que nous avons découvert d'interaction du peptide CDTM15 issu de la protéine TM du BLV (virus de la leucémie bovine) avec la machinerie de ciblage vers les exosomes. Nous 10 pensons ainsi faciliter l'interaction de CDTM avec les protéines de cette machinerie. Notre prototype intègre une protéine rapporteur, la protéine SNAP (Covalys et NEB). Cette protéine pourraît être remplacée par tout autre protéine d'intérêt. Pour cela nous avons créé le gène chimère Src-SNAP-CDTM (SEQ ID NOs.:121 ; 122) qui code pour la protéine chimère SSC (pour Src-SNAP-CDTM ; 15 SEQ ID NOs.:123 ; 124).

La synthèse du gène chimère codant pour la protéine SSC est effectuée en plusieurs étapes. Tout d'abord, obtention d'un ADN synthétique de 75 nt codant pour l'extrémité N-terminale de la protéine c-Src. Ensuite amplification séparément de 3 fragments d'ADN: a) l'ADN synthétique bordé par les sites enzymatiques EcoR1 en amont et Nhe I en aval ; b) l'ADN codant pour la protéine SNAP (NEB) bordé par les sites Nhe I en amont et Sbfl et Ascl en aval; c) l'ADN codant pour un fragment CDTM avec les sites Sbfl et Ascl en amont et Not1 en aval. Enfin, une amplification est effectuée en utilisant simultanément comme ADN matrices les trois fragments d'ADN précédent dont les séquences sont chevauchantes; 20 cette dernière amplification permet d'obtenir un ADN reliant ensemble les trois fragments dans l'ordre Src-SNAP-CDTM.

25

1) Préparation d'un ADN synthétique

Les 5 oligonucléotides suivants sont synthétisés par l'entreprise MWG:

30 **S1** (5'GCCACCATGGGCAGCAGCAAGAGCAAGGCCAAGGAC 3') (SEQ ID NO.:108),

S2 (5'P-CCCAGCCAGCGCCGCCGCAAGTCTAGAGGCCGGGAGGC 3') (SEQ ID NO.:109),

AS1(5'GCCTCCCGGGCCTAGACTTG 3') (SEQ ID NO.:110),
AS2 (5'P-CGGCGGCCGCTGGCTGGGCTTGGCTCTT3') (SEQ ID NO.:111)
AS3 (5'P-GCTGCTGCCATGGTGGC 3') (SEQ ID NO.:112).

5

Synthèse de l'ADN : 20 µl de chaque oligo sont mélangés en quantités équimolaires (100µM de S1,S2, AS1, AS2 et AS3). Addition de 11 µl de tampon ligation (NEB) 10X. Dans l'appareil PCR faire un seul Cycle : 95°C, 2min., suivi d'une descente de température sur la paillasse jusqu'à 25°C. A 10 µl de mix oligos hybridés sont ajoutés 9 µl de tampon ligation 10X, 81 µl de H₂O et 1 µl de T4 DNA ligase (NEB). La ligation est effectuée à 22°C, 10 min.

10 15 L'ADN synthétique est ensuite amplifié par PCR dans un mix contenant 10 ng d'ADN matrice, les amores S1 et AS1, les 4 dNTP, le tampon 1X et 2,5U. de Pfu Turbo DNA-polymerase (Stratagene) dans les conditions du fournisseur de l'enzyme. Après 2 min de dénaturation à 95 °C, 25 cycles d'amplification (95°C 30 sec, 67°C 30 sec, 72°C 5 sec) sont effectués.

20 25 **2) Amplifications par PCR** individuelles de chacun des 3 fragments d'ADN constitutifs du gène Src-SNAP-CDTM afin de greffer à chacunes de leurs extrémités des séquences communes et portant des sites d'endonucléase de restriction. La séquence nucléotidique du fragment Src (codant pour le domaine de ciblage sous-membranaire ou domaine (ii)) est SEQ ID NO.:120. La séquence nucléotidique du fragment CDTM (codant pour le domaine CD ou domaine (iii)) est SEQ ID NO.:120.

Les 3 amplifications sont effectuées dans les conditions et selon les recommandations de l'entreprise Finnzyme, fournisseur de la DNA polymérase Phusion utilisée.

a) L'amplification du fragment Src et l'addition de sites de restrictions sont obtenues en utilisant l'ADN synthétique obtenu ci-dessus et les amores suivantes :

30 R1Src (GAATTCGCCACCATGGCAGCAGCAAGAGCAAG) (SEQ ID NO.:113) et SrcNhe1 (CATGCTAGCGCTGCCTCCCAGGCTCTAGACTTC) (SEQ ID NO.:114).

b) L'amplification du fragment SNAP et l'addition de sites de restrictions est obtenu

en utilisant l'ADN du plasmide pSNAP (NEB) et les amorces suivantes :

NheSNAP (GGAGGCAGCGCTAGCATGGACAAAGACTGCGAAATGA) (SEQ ID NO.:115) et

SNAPSbfAsc (GCGCGCCGCTTCCTGCAGGACCCAGCCCAGGGCTTG) (SEQ ID NO.:116).

c) L'amplification du fragment DCTM et l'addition de sites de restrictions est obtenu en utilisant un ADN codant pour l'extrémité C-terminale de la TM du BLV dont la cystéine C-terminale est mutée en alanine, elle s'effectue en présence des amorces suivantes :

SbfAscDCTM15 (CCTGCAGGAAGCGGCGCGCCCCACTTCCCTGAAATC) (SEQ ID NO.:117) et

DCTM15Not (GCGGCCGCTTCGAACTCGGTGCTGGCAGCAAGA) (SEQ ID NO.:118).

3) Amplification pour obtenir l'ADN Src-SNAP-DCTM.

Les 3 fragments d'ADN précédents sont purifiés sur gel. Une amplification du mélange de ces 3 ADN comme matrice est effectuée en présence des amorces R1Src et DCTM15Not (voir ci-dessus) dans les conditions et selon les recommandations de l'entreprise Finnzyme, fournisseur de la DNA polymérase Phusion utilisée. L'ADN obtenu fusionne en phase les 3 ADN précédent.

II. CLONAGE DANS LE VECTEUR DE CLONAGE PCR® BLUNTII-TOPO®

1) Ligation des produits PCR dans le vecteur de clonage pCR® BluntII-TOPO®

La ligation est réalisée à l'aide d'un vecteur plasmidique linéarisé possédant des enzymes topoisomérase I à ses extrémités (cf. *Figure 6*) permettant ainsi d'intégrer l'insert sans l'intervention d'une ligase. De plus, ce vecteur à une coupe franche de part et d'autre de ses extrémités, l'insert doit donc être aussi à bout franc pour pouvoir se liguer. Afin de sélectionner les transformants, le plasmide possède un gène de résistance à un antibiotique : la kanamycine.

Dans la glace, on mélange : 0,3µL de produit PCR, 0,25µL de « salt solution », 0,7µL d'eau stérile et 0,25µL de vecteur TOPO du kit Topo Blunt cloning (Invitrogen), soit 1,5µL au final. Incubation de 5 à 30min à température ambiante.

2) Transformation des bactéries TOP10 chimio-compétentes

Les bactéries TOP 10 chimio-compétentes (10µL) sont transformées par la totalité du mélange de ligation TOPO/insert. Il y a un témoin positif de transformation (1ng de PUC19 : plasmide portant le gène de résistance à l'ampicilline) et un témoin négatif (plasmide Topo sans insert). Après incubation 30min dans la glace, le mélange subit un choc thermique pendant 30sec à 42°C. Les tubes sont ensuite immédiatement remis dans la glace. Il est ensuite ajouté et homogénéisé délicatement 250µL de milieu SOC (Bacto-tryptone 2%, Bacto-yeast extract 0,5%, NaCl 0,05% et glucose 0,2%) qui sont incubés 1h à 37°C au bain-marie le temps de l'expression phénotypique. Enfin, 150µL des suspensions sont ensemencées sur boîte LB (Luria Broth)/agar à 50µg/mL de kanamycine et incubées 24h à 37°C. Sur les boîtes, les colonies ayant acquis le gène de résistance à la kanamycine et donc, qui possèdent le vecteur de clonage avec ou sans le gène d'intérêt, se sont développées. Des clones sont repiqués et numérotés sur une deuxième boîte de gélose, incubés 24h à 37°C et des cultures liquides de 10mL (LB+kanamycine 100µM) de clones repiqués sont produites durant 16h à 37°C sous agitation.

3) Minipréparation d'ADN plasmidique

La culture bactérienne est centrifugée 15min à 3500rpm et à 4°C. Le culot est repris dans 250µL de tampon de re-suspension A1 (kit plasmid DNA Purification Nucleospin (Macherey-Nagel)). Les bactéries sont lysées pendant 5min à température ambiante avec 250µL de tampon de lyse A2. On ajoute ensuite 300µL de tampon de neutralisation A3 et il est important de bien mélanger par retournement pour ne pas obtenir un culot diffus. Les tubes sont centrifugés 10min à 11000rpm à 4°C. Le surnageant est passé sur colonne placée sur un tube de collecte, le tout centrifugé 1min à 11000rpm. Après lavage avec 500µL de tampon de lavage A4, la colonne est séchée 2min à 11000rpm. On passe 50µL de tampon d'élution et on récolte l'éluat dans un tube Eppendorf. L'ADN obtenu est dosé par spectrophotométrie à 260nm.

4) Digestion enzymatique (EcoRI) et séquençage

Afin de vérifier si l'ADN plasmidique obtenu est bien recombiné, les plasmides sont digérés par une enzyme de restriction spécifique (Biolabs®) EcoRI qui encadre le site d'insertion. Il est digéré environ 200ng de chaque plasmide

avec 4 unités d'enzyme. A cela, il est ajouté 1µL de tampon NEB1 10X et de l'eau stérile afin d'obtenir 10µL au final. La digestion se fait à 37°C pendant 1h. Après identification des bons clones sur gel d'agarose 2%, 1,5µg d'ADN plasmidique est envoyée à séquencer chez la société Eurofins MWG Operon. Ceci permet de vérifier l'intégrité de chaque séquence en vérifiant si les sites de restrictions rajoutés sont bien présents ainsi que la mutation. Plusieurs clones sont obtenus, leurs ADN plasmidiques ont été analysés et séquencés. Deux plasmides sont retenus: le premier Src-SNAP-CDTM représente le gène chimère attendu, le second D-SNAP-CDTM correspond à une séquence présentant une déletion d'une partie du fragment Src qui a dû se produire lors de la dernière PCR. La protéine codée par l'ADN D-SNAP-CDTM contient aussi une glycine dans une position myristoylable mais a perdu une partie de ses acides aminés basiques qui renforcent les propriétés d'ancrage sous-membranaire.

15 III. CLONAGE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION PCDNA 3.1

1) Préparation du vecteur d'expression

Le vecteur pCDNA3.1 est digéré par les enzymes de restriction EcoR1 et NotI, puis déphosphorylé et extrait au phénol/chloroforme.

Une précipitation à l'isopropanol permet d'éliminer le court fragment d'ADN (<100pb situé entre EcoR1 et NotI) libéré lors de la digestion et qui pourrait se religuer avec le plasmide. Ajout de 0,15 fois le volume d'acétate de sodium 3M et 0,6 fois le volume en isopropanol froid. Incuber 30min à 4°C puis centrifuger à 4°C pendant 15min à 15000rpm. Laver le culot avec 500µL d'éthanol 70% et centrifuger de nouveau 10min à 15000rpm. Sécher le culot sous vide pendant 15min et le reprendre dans 50µL de TE.

2) Préparation des inserts

Digestions successives EcoR1-NotI: 2µg d'ADN plasmidique pTopo contenant les inserts Src-SNAP-CDTM et D-SNAP-CDTM sont digérés de façon successive par les 2 enzymes de restrictions encadrant l'insert, à savoir EcoR1 et NotI. Après inactivation des enzymes 20min à 65°C, l'ADN est précipité à l'éthanol et re-suspendu dans 20µL de TE. Il est ensuite stocké à -20°C.

Purification des inserts dans un gel d'agarose low melting (EUROBIO®) : Les fragments d'insert sont extraits sur gel d'agarose low melting 2% et purifiés

sur colonne à l'aide du kit Nucleospin (Kit Nucleospin Extract II®, MACHEREY-NAGEL). Le volume final est de 50µL.

3) Ligation

Dans un tube, 35ng de vecteur déphosphorylé est mélangé à l'insert avec un rapport insert/vecteur d'environ 3/1 (molécule à molécule). Il est additionné : 1µL de tampon ligase 10X, eau stérile (qsp 10µL) et 1U de T4 DNA ligase (Biolabs®). Un témoin négatif est réalisé en remplaçant le volume d'insert par le même volume de TE1X. Les mélanges sont incubés toute la nuit à température ambiante.

4) Transformation de bactéries DH5α

Cette transformation repose sur un choc thermique. Ajout de 200µL de bactéries DH5 α dans le produit de ligation ; 30min dans la glace ; 2min à 42°C ; 5min dans la glace ; ajout de 800µL de milieu LB ; incubation 1h à 37°C sous agitation ;ensemencement de 100µL sur boîte LB/agar/ ampicilline (50µg/mL) et incubation 16h à l'étuve à 37°C.

5) Vérification de la présence de l'insert et visualisation sur gel d'agarose

Des Midipréparations et une vérification par digestion EcoR1-NotI ont été réalisées afin de sélectionner les bons clones et un stock des ADN palsmidiques est préparé pour l'étape de transfection et d'expression protéique.

IV. EXPRESSION DES PROTEINES CHIMERES ET ET CIBLAGE VERS LES EXOSOMES

1) Culture cellulaire

Des cellules eucaryotes HEK 293T (Human Embryonic Kidney) sont cultivées dans des flasques en milieu DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium), contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de la gentamycine à 20 µg/mL, à 37°C sous 5% de CO₂.

2) Transfection

Dans des plaques 6 trous, il est ensemencé 0,5.10⁶cellules HEK 293T/ trous dans 4mL de DMEM 10%SVF sans antibiotique. Après 24h de culture à 37°C sous 5% de CO₂ les cellules sont à 90% de confluence et sont transfectées par un complexe formé entre 1µg de plasmide d'intérêt et 2µL de JetPEI (PolyPlus®) dans 500µL de milieu, l'ADN est internalisé par endocytose. Après 6h

d'incubation, le milieu est remplacé par du DMEM à 10% en SVF exempt d'exosomes contenus dans le sérum (éliminés par une ultracentrifugation à 42000rpm durant 18h (rotor Ti 45, Beckman). A 48h post-transfection, le surnageant est repris afin de récupérer les exosomes produits et les cellules sont lysées pour obtenir les protéines cellulaires.

3) Préparation des exosomes

Une fois le milieu cellulaire récupéré, il est centrifugé 10min à 1400rpm pour éliminer les cellules du milieu de culture. Le surnageant est centrifugé 10min à 10000rpm à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et un coussin de TNE à 20% de sucre est coulé au fond du tube pour être ultracentrifugé à 42000rpm dans un rotor Ti50 (Beckman) durant 2h à 4°C. Le culot d'exosomes purs est ensuite repris dans 100µL de PBS.

4) Extraction des protéines

Les cellules sont lavées au PBS à 4°C, puis lysées avec du tampon RIPA (TNE 1X, NP40 0,5%, Aprotinine 20µg/mL, Leupeptine 20µM, H₂O stérile, PMSF 0,2mM). Le lysat est centrifugé 20 min à 14 000 rpm à 4°C et le surnageant est récupéré.

Les protéines des extraits cellulaires et des exosomes sont dosées par la méthode de Bradford grâce à un spectrophotomètre NanoDrop et une gamme étalon de BSA (0-200 µg/mL).

5) Electrophorèse SDS-PAGE et Western Blot :

Les échantillons (20µg pour les extraits protéiques cellulaires et 2µg pour les lysats exosomaux) sont séparés sur gel de polyacrylamide 10% durant 1h30 à 60mA puis transférés sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, Immobilon-P, Millipore), préalablement activée dans un bain de méthanol, rincée à l'eau puis au TBST (Tris Base 20mM pH 7,4 ; NaCl 0,15M ; Tween 0,5%), durant toute la nuit à 50mA en chambre froide. La membrane est ensuite saturée avec 5% de lait en poudre dans du TBST pendant 1h. Ensuite, elle est incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire : sérum de lapin anti-CDTM préparé au laboratoire. La membrane est lavée 3 fois 5min au TBST puis incubée 1h avec l'anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch). Elle est à nouveau lavée dans du TBST puis déposée sur du papier Whatman imbibé d'une solution d'ECL (Enhanced chemiluminescence,

Amersham)). La révélation s'effectue à l'aide d'une caméra Lumi-imager F1 (Roche[®]).

5 Comme le montre la figure 34, les protéines DSC (pistes 2 et 5) et SSC CDTM (pistes 3 et 6) sont environ 30 kDa exprimées dans les cellules (voir figure 34B). Les deux protéines DSC et SSC se retrouvent ciblées dans les exosomes (voir figure 34A). L'examen de ratios entre protéines sécrétées dans les exosomes / protéines produites dans les cellules montre que le ciblage de la protéine SSC dans les exosomes est plus efficace que celui de la protéine DSC.

10

BIBLIOGRAPHIE

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995). "Molecular Biology of the Cell (3rd Ed.)" Garland, NY.

15 **Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. (1998).** "Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast." Mol Cell. Vol. 2 (4), 437–445.

Cann AJ, Churcher MJ, Boyd M, O'Brien W, Zhao JQ, Zack J, Chen IS (1992). "The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism." J Virol. 1992 ; 66(1):305-9.

20 **Chaput N, Taïeb J, Schartz N, André F, Angevin E, Zitvogel L. (2004).** "Exosomes-based immunotherapy." Cancer Immunol Immunother; 53:234-239.

Colino, J. et Snapper C.M. (2006). Journal of Immunology, 177 :37576

25 **De Gassart A, Geminard C, Hoekstra D, Vidal M. (2004).** "Exosome secretion : the art of reutilizing nonrecycled proteins." Traffic. ; 5:896-903.

De Gassart A, Trentin B, Martin M, Hocquellet A, Bette-Bobillo P, Mamoun R, Vidal M. (2009) "Exosomal sorting of the cytoplasmic domain of bovine leukemia virus TM Env protein." Cell Biol Int. 2009 (1):36-48. Epub 2008 Oct 22.
Delamarre L, Rosenberg AR, Pique C, Pham D, Callebaut I, Dokhelar MC. (1996). "The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol; 13 Suppl 1:S85-91.

30 **Delcayre, A., et al. 2005, Blood Cells Mol Dis 35 :158 ; Thery C. et al., (2002); Nature Immunology 3 :1156.**

- Delcayre A, Le Pecq JB. (2006)** "Exosomes as a novel therapeutic nanodevices." Curr Op in Mol Ther.; 8:1464-1471.
- Gould SJ, Booth A, Hildret JE. (2003)** "The Trojan exosome hypothesis." Proc Natl Acad Sci USA.; 100:10592-10597.
- 5 **Herbein G, Coaqueute A, Perez-Bercoff D, Pancino G. (2002)** "Macrophage activation and HIV infection: can the trojan horse turn into a fortress?" Curr Mol Med.; 2:723-738.
- Hurley JH. (2006)**. "Membrane binding domains". Biochim Biophys Acta. 2006 Aug;1761(8):805-11. Epub 2006 Mar 24. Review.
- 10 **Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K. (2002)**. "A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo". Nat Biotechnol. 2003 Jan;21(1):86-89. Epub 2002 Dec 9.
- 15 **Keppler A, Pick H, Arrivoli C, Vogel H, Johnsson K. (2004)**. "Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells". Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 6;101(27):9955-9. Epub 2004 Jun 28.
- Levine AJ. (1992)**. "Viruses" (Scientific American Library, No. 37). W. H. Freeman/Scientific American Library
- Pornillos O, Garrus J, Sundquist WI. (2002)**. "Mechanism of enveloped RNA virus budding." Trends Cell Biol. 2; 12:569-579.
- 20 **Raposo G, Moore M, Innes D, Leijenderk R, Leigh-Brown A, Benaroch P, Geuze H. (2002)**. "Human macrophage accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments." Traffic. ; 3:718-729.
- 25 **Resh MD. (1994)**. "Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter." Cell. 1994 Feb 11;76(3):411-3 .**Sloane JA, and al. (2005)**. Marked structural and functional heterogeneity in CxCR4: Separation of HIV-1 and SDF-1alpha responses. Immunology and Cell Biology; **83**: 129-143.
- Straub OC, Levy D. (1999)**. "Bovine immunodeficiency virus and analogies with human immunodeficiency virus." Leukemia.;13 Suppl 1:S106-9.
- 30 **Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Tenza D, Raposo G, Amigorena S. (1998)**. "Dendritic cell-derived exosomes elicit potent antitumour immune responses in vivo." Nat. Med. ; 4:594-600.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide chimérique capable d'être sécrété en association avec des vésicules membranaires, en particulier avec des exosomes, lorsqu'il est exprimé dans des cellules eucaryotes appropriées, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en les domaines suivants:

(i) un peptide ou polypeptide d'intérêt ;

(ii) un domaine de ciblage sous-membranaire, permettant au polypeptide chimérique de l'invention d'être ancré à une membrane cellulaire ou vésiculaire par l'intermédiaire d'une ou plusieurs molécule(s) d'ancrage et/ou d'interactions entre ledit domaine de ciblage sous-membranaire et ladite membrane; et

(iii) un domaine cytoplasmique (CD) d'une protéine membranaire, permettant, dans des cellules eucaryotes, l'adressage dudit polypeptide chimérique vers les vésicules membranaires, en particulier vers les vésicules formant des exosomes, et/ou vers le(s) compartiment(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans la formation des vésicules membranaires, ou un dérivé muté de ce domaine CD, ce dérivé muté étant défini par la substitution, la délétion et/ou l'insertion d'un ou plusieurs résidu(s) dans la séquence du domaine CD de référence et ce dérivé muté conservant la susdite capacité d'adressage du domaine CD, le domaine CD ou son dérivé muté comprenant au moins un motif YxxL ou DxxL, et un motif PxxP, dans lequel x représente un résidu quelconque et Y, L, D et P représentent respectivement un résidu tyrosine, leucine, acide aspartique et proline ; étant entendu que les domaines présents dans le polypeptide chimérique, en particulier les domaines (i) et (ii) et (iii) sont des domaines cytosoliques ou nucléaires et que ledit polypeptide chimérique est dépourvu de peptide signal d'importation dans le réticulum endoplasmique.

2. Polypeptide chimérique selon la revendication 1, dans lequel le domaine de ciblage sous-membranaire est celui d'une protéine membranaire extrinsèque ou un dérivé muté de ce domaine de ciblage sous-membranaire, ce dérivé muté étant défini par la substitution, la délétion et/ou l'insertion d'un ou plusieurs résidu(s) dans la séquence du domaine de ciblage sous-membranaire

de référence et conservant la capacité de ce domaine à s'ancrer dans la bicouche lipidique d'une membrane vésiculaire ou cellulaire.

3. Polypeptide chimérique selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les domaines (i) à (iii) sont positionnés successivement dans l'ordre suivant, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale dans le polypeptide : (ii) – (i) – (iii), ou (ii) – (iii) – (i), ou région N-terminale de (i) - (ii) ou (iii) - (iii) ou (ii) – région C-terminale de (i).

4. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le motif PXXP est le motif PSAP (SEQ ID NO. 88) ou PTAP (SEQ ID NO. 89).

5. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le domaine CD comprend deux ou trois motifs YxxL dans lequel x représente un résidu quelconque.

6. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel le domaine CD ou le dérivé muté du domaine CD comprend :

- au moins un motif YxxL ou DYxxL choisi parmi YINL, YSHL et DYINL ; et/ou

- au moins un motif PxxP choisi parmi PSAP ou PTAP.

7. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le domaine de ciblage sous-membranaire comprend ou consiste en une séquence, notamment consensus, permettant l'ancrage à la membrane lipidique par des interactions avec celle-ci, par exemple une séquence FYVE et/ou par l'intermédiaire d'un lipide et en particulier d'un acide gras et plus particulièrement d'un acide myristique, d'un acide palmitique ou d'un géranyl-géranyl ou d'un farnésyl.

8. Polypeptide chimérique selon la revendication 7, dans lequel la séquence consensus permettant l'attachement d'un acide myristique, d'un acide palmitique ou d'un géranyl-géranyl, et en particulier l'attachement d'un acide myristique, comprend ou consiste en la séquence suivante : M-G-X₁-X₂-X₃-S/C, dans laquelle X₁, X₂, et X₃ désignent indépendamment un résidu quelconque, et M, S et C désignent respectivement un résidu méthionine, sérine et cystéine.

9. Polypeptide chimérique selon la revendication 8, dans lequel :

- X₁ est choisi parmi C, S et L ; et/ou

- X_2 est choisi parmi S, I, V, M et L ; et/ou
- X_3 est choisi parmi K, Q, H, F, C et S.

10. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel le domaine de ciblage sous-membranaire comprend plusieurs résidus d'acides aminés basiques, en particulier plusieurs résidus choisis parmi les résidus K, R et H, plus préférablement choisis parmi les résidus K et R et encore plus préférablement des résidus K.

11. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans lequel le domaine de ciblage sous-membranaire est :

10 - issu d'une protéine de la famille des Src, en particulier d'une protéine choisie parmi les protéines Src, Yes, Lyn, Fyn, Lck, Blk, Fgr, Hck et Yrk ; ou
15 - un dérivé muté du domaine de ciblage sous-membranaire d'une protéine de la famille des Src, en particulier d'une protéine choisie parmi les protéines Src, Yes, Lyn, Fyn, Lck, Blk, Fgr, Hck et Yrk, ledit dérivé muté étant défini par la substitution, la délétion et/ou l'insertion d'un ou plusieurs résidu(s) dans la séquence dudit domaine de ciblage sous-membranaire et conservant la capacité de ce domaine à s'ancrer dans la bicoche lipidique d'une membrane vésiculaire ou cellulaire.

12. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel le domaine de ciblage sous-membranaire :

20 - comprend ou consiste en une séquence choisie parmi les séquences suivantes :M-G-x-x-K-S/C-K-x-K et M-G-x-x-K-S/C-K-x-K-x-x-x-R-R-R, dans lesquelles x désigne un résidu quelconque ; ou
25 - consiste en un dérivé muté de cette séquence, ledit dérivé muté étant défini par la substitution, la délétion et/ou l'insertion d'un ou plusieurs résidu(s) dans cette séquence, et conservant la capacité de ce domaine à s'ancrer dans la bicoche lipidique d'une membrane vésiculaire ou cellulaire ; ou
30 - comprend ou consiste en la séquence suivante : M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R-R-R ou M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R-R-R-K-S-R-G-P-G-G; ou
- consiste en un dérivé muté de la séquence M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R-R-R ou M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R-R-R-K-S-R-G-P-G-G, ledit dérivé muté étant défini par la substitution, la délétion et/ou l'insertion d'un ou plusieurs

résidu(s) dans cette séquence, et conservant la capacité de ce domaine à s'ancrer dans la bicouche lipidique d'une membrane vésiculaire ou cellulaire.

13. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, comprenant en outre au moins une molécule de liaison (ou linker), liant deux domaines successifs, ledit linker étant par exemple un peptide ou un polypeptide.

14. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans lequel le domaine CD ou son dérivé muté est dépourvu de la séquence KCLTSRLLKLLRQ et/ou dépourvu de la séquence PCP.

15. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans lequel la séquence du dérivé muté du domaine CD présente au moins 60 ou 70%, en particulier au moins 80%, 90% ou 95%, de similarité ou d'identité avec la séquence du domaine CD original dépourvue de l'enchaînement KCLTSRLLKLLRQ.

16. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, dans lequel la séquence du domaine CD ou de son dérivé muté comprend ou consiste en une séquence choisie parmi les séquences suivantes:

PxxPxxxxxxxxxxxxYxxL

PxxPxxxxxxxxxxxxDYxxL

PxxPxxYxxxxxxxxYxxL ;

20 PxxPxxYxxxxxxxxDYxxL ;

PxxPExYxxLxPxxPDYxxL ;

PxxPx_nYxxL

PxxPx_nDYxxL

PxxPx_nYx_nYxxL ;

25 PxxPx_nYx_nDYxxL ;

PxxPEx_nYxxL_nPxxPDYxxL ;

PxxPxxxxPxxPxxxYxxLxPxxPExYxxLxPxxPDYxxL ;

PxxPx_nPxxPx_nYxxLx_nPxxPEX_nYxxLx_nPxxPDYxxL ;

PxxPxxxxPxxPxxxYxxLxPxxPExYxxLxPxxPDYxxLxxxx ; et

30 PxxPx_nPxxPx_nYxxLx_nPxxPEX_nYxxLx_nPxxPDYxxLxxxx,

dans lesquelles x et x_n représentent respectivement un résidu quelconque et un ou plusieurs résidu(s) quelconque(s) et dans lesquelles au moins un des motifs PxxP est le motif PSAP ou PTAP.

17. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel le domaine (iii) est le domaine CD de la protéine transmembranaire (TM) d'un rétrovirus, en particulier le virus de la leucémie bovine (BLV), ou un dérivé muté de ce domaine.

5 18. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, dans lequel ledit domaine CD est celui de la protéine TM du BLV, de séquence SEQ ID NO. 6.

10 19. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, dans lequel le peptide ou le polypeptide d'intérêt comprend ou consiste en :

- un ou plusieurs domaine(s) d'une protéine cytosolique ou un ou des fragment(s) de ce(s) domaine(s) ; et/ou

un ou plusieurs domaine(s) d'une protéine nucléaire ou un ou des fragment(s) de ce(s) domaine(s)

15 20. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, dans lequel le peptide ou le polypeptide d'intérêt provient d'un organisme pathogène, d'un agent pathogène, d'un antigène tumoral, d'un antigène cytoplasmique, d'un récepteur de ligand, notamment d'un récepteur à multiples domaines membranaires, par exemple un récepteur à sept domaines transmembranaires, d'un récepteur de cytokines ou d'un fragment de ceux-ci, ou d'une toxine ou partie de toxine, ou d'un composé à activité spécifique, par exemple une enzyme ou par exemple un polypeptide liant un acide nucléique, ledit organisme pathogène étant par exemple un virus, une bactérie ou un parasite.

25 21. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, pour une utilisation comme médicament, en particulier pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une infection bactérienne, virale, parasitaire, ou d'une tumeur ou de toutes autres pathologies, par exemple un déficit fonctionnel ou métabolique.

30 22. Polypeptide chimérique pour une utilisation selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il est utilisé en combinaison avec un polypeptide chimérique additionnel, ledit polypeptide chimérique additionnel, étant capable d'être sécrété en association avec des vésicules membranaires, en particulier avec des exosomes, lorsqu'il est exprimé dans des cellules eucaryotes appropriées, et ledit

polypeptide chimérique additionnel étant caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en les domaines suivants:

- un peptide ou polypeptide d'intérêt;
- un domaine transmembranaire; et
- un domaine cytoplasmique (CD) d'une protéine membranaire ou un dérivé muté de ce domaine CD, ledit domaine CD ou son dérivé muté étant tels que définis aux revendications 1, 4-6 et 14-18 ;

le domaine CD ou le dérivé muté du polypeptide chimérique additionnel étant identique à ou différent du domaine CD ou du dérivé muté du domaine CD du polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 22.

23. Polypeptide chimérique pour une utilisation selon la revendication 21 ou 22, dans lequel dans le polypeptide chimérique additionnel, les domaines suivants sont positionnés successivement dans l'ordre suivant, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale dans le polypeptide : peptide ou polypeptide d'intérêt - domaine membranaire - domaine cytoplasmique (CD) ou dérivé muté.

24. Polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, pour une utilisation en immunisation, en particulier pour éliciter ou favoriser *in vivo*, chez un hôte, en particulier chez un mammifère humain, un mammifère non humain ou un oiseau, une réponse humorale et/ou cellulaire contre la tumeur, le virus, la bactérie ou le parasite dont le peptide ou le polypeptide d'intérêt dérive, ledit polypeptide chimérique étant le cas échéant utilisé en combinaison avec un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 23.

25. Vésicule membranaire comportant un polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 24 et/ou un ou plusieurs produit(s) de dégradation de ce polypeptide, et, le cas échéant, un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 23 et/ou un ou plusieurs produit(s) de dégradation de ce polypeptide chimérique additionnel, ce(s) produit(s) de dégradation étant le cas échéant associé(s) à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de type I ou de type II.

26. Vésicule membranaire selon la revendication 25, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un exosome.

27. Vésicule membranaire selon la revendication 25 ou 26, dans laquelle le peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique additionnel ou au moins un fragment de ce peptide ou polypeptide d'intérêt est exposé, en partie ou en totalité, à l'extérieur de ladite vésicule membranaire.

5 28. Une composition thérapeutique dont le principe actif comprend une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, et, le cas échéant, des vésicule(s) membranaire(s), en particulier un ou plusieurs exosomes comportant un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 23 et/ou un ou plusieurs 10 produit(s) de dégradation de ce polypeptide chimérique additionnel.

15 29. Composition thérapeutique selon la revendication 28, pour une utilisation pour traiter des cellules cibles chez un hôte (par l'apport d'une enzyme par exemple), et/ou pour détruire des cellules cibles chez un hôte (par exemple des cellules tumorales), et/ou pour faire du diagnostic chez un hôte (par exemple en détectant un acide nucléique lié au peptide ou polypeptide d'intérêt du polypeptide chimérique de l'invention), et/ou pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une infection bactérienne, virale, parasitaire, ou d'une tumeur, en particulier pour éliciter ou favoriser *in vivo*, chez un hôte, une réponse humorale et/ou cellulaire contre une tumeur, ou contre le virus, la bactérie ou le parasite dont le(s) peptide(s) ou polypeptide(s) d'intérêt dérive.

20 30. Un polynucléotide caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, et le cas échéant, pour un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 23.

25 31. Une composition thérapeutique comprenant :
- un acide nucléique, en particulier un ADN, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en un polynucléotide selon la revendication 30 ; et
- un support, un diluant ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et
- le cas échéant, un acide nucléique, en particulier un ADN, caractérisé en ce qu'il comprend ou consiste en un polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 30 23.

32. Composition thérapeutique selon la revendication 31, pour une utilisation comme médicament, en particulier pour une utilisation pour la prophylaxie et/ou le traitement d'une infection bactérienne, virale, parasitaire, ou d'une tumeur, notamment pour éliciter ou favoriser *in vivo*, chez un hôte, en particulier chez un mammifère humain ou non humain ou un oiseau, une réponse humorale et/ou cellulaire contre une tumeur, ou contre le virus, la bactérie ou le parasite dont le domaine (i) dérive, ladite composition étant le cas échéant utilisée en combinaison avec une composition immunogène comprenant un support, un diluant ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable et un acide nucléique, en particulier un ADN qui comprend ou consiste en un polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 23.

33. Cellule recombinante productrice d'exosomes, en particulier cellule du système immunitaire et plus particulièrement cellule du système immunitaire choisie parmi les mastocytes, les lymphocytes, en particulier les lymphocytes T et B, et les cellules dendritiques, en particulier les cellules de Langerhans, caractérisée en ce que :

- elle est recombinée avec un ou plusieurs polynucléotide(s) selon la revendication 30 et, le cas échéant, un ou plusieurs polynucléotide(s) codant pour un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 23; ou

- elle a absorbé une vésicule membranaire selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, et, le cas échéant, une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s), en particulier un ou plusieurs exosomes, qui comportent un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 23 et/ou un ou plusieurs produit(s) de dégradation de ce polypeptide chimérique additionnel.

34. Utilisation d'une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) selon la revendication 27, pour la détection *in vitro* de partenaires spécifiques capables d'interagir avec ledit peptide ou polypeptide d'intérêt ou avec un fragment dudit peptide ou polypeptide, ou avec un polypeptide chimérique additionnel tel que défini à la revendication 22 ou 23 et/ou un ou plusieurs produit(s) de dégradation de ce polypeptide chimérique additionnel.

35. Procédé de production *in vitro* de vésicules membranaires et en particulier d'exosomes comportant un peptide ou un polypeptide d'intérêt et/ou un produit de dégradation de ce peptide ou un polypeptide d'intérêt, ce produit de dégradation étant le cas échéant associé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) l'introduction, d'un ou plusieurs polynucléotide(s) selon la revendication 30, qui code(nt) pour un polypeptide comprenant ledit peptide ou polypeptide d'intérêt, dans une cellule productrice d'exosomes, en particulier une cellule 293T, ou une cellule du système immunitaire et plus particulièrement une cellule du système immunitaire choisie parmi les mastocytes, les lymphocytes, en particulier les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, en particulier les cellules de Langerhans, ou la mise en contact d'une cellule productrice d'exosomes avec une ou plusieurs vésicule(s) membranaire(s) selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, qui comporte(nt) un polypeptide comprenant ledit peptide ou polypeptide d'intérêt et/ou un produit de dégradation de ce polypeptide,
- 10 b) la culture de ladite cellule productrice d'exosomes;
- 15 c) la récupération des vésicules membranaires et en particulier des exosomes produit(e)s par ladite cellule productrice d'exosomes.

36. Procédé selon la revendication 34, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape intermédiaire entre les étapes a) et b), au cours de laquelle la cellule est sélectionnée et/ou stimulée pour induire et/ou augmenter la sécrétion des exosomes ou pour induire une spécificité dans la composition des exosomes en certaines protéines cellulaires, par exemple la protéine ICAM.

37. Procédé de préparation d'un sérum polyclonal dirigé contre un ou plusieurs peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) d'intérêt exprimé(s) à la surface de vésicules membranaires, en particulier d'exosomes, comprenant les étapes suivantes :

- 25 a) l'administration, le cas échéant répétée, à un animal non humain, de vésicules membranaires selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, d'une composition selon l'une quelconque des revendications 28, 29 et 31, ou d'un polynucléotide selon la revendication 30, associés ou non à un adjuvant; et
- 30 b) la récupération des anticorps formés, capables de reconnaître le ou les

peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) d'intérêt.

38. Procédé de préparation d'anticorps monoclonaux dirigés contre un ou plusieurs peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) exprimé(s) à la surface de ou dans des vésicules membranaires, en particulier des exosomes, ledit procédé 5 comprenant les étapes suivantes :

a) la fusion, avec des cellules de myélome, de cellules spléniques préalablement obtenues chez un hôte (humain ou non humain), par exemple une souris Balb/c, auquel on a administré des vésicules membranaires selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, une composition selon l'une quelconque 10 des revendications 28, 29 ou 31 ou un polynucléotide selon la revendication 30, le cas échéant en association avec un adjuvant et le cas échéant par administration répétée;

b) la culture et la sélection des hybridomes dans des conditions permettant la production d'anticorps;

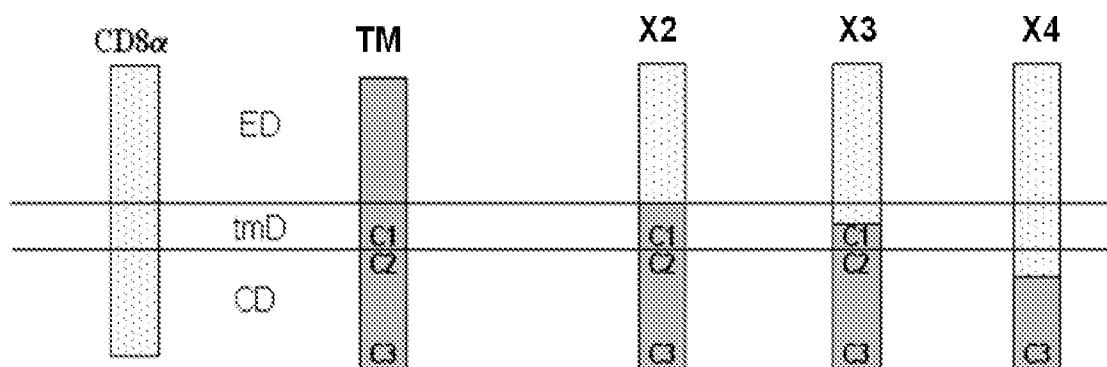
15 c) la récupération des anticorps monoclonaux dirigés contre les peptide(s) ou polypeptide(s) antigénique(s) d'intérêt.

39. Procédé de criblage *in vitro* de molécules interagissant avec un peptide ou un polypeptide d'intérêt ou avec un fragment dudit peptide ou un polypeptide d'intérêt, ledit procédé comprenant :

20 a) la mise en contact de vésicules membranaires selon la revendication 27 avec une ou plusieurs molécules susceptibles d'interagir avec ledit peptide ou polypeptide d'intérêt ;

25 b) la détection d'une éventuelle interaction entre ledit peptide ou polypeptide d'intérêt ou un fragment dudit peptide ou polypeptide d'intérêt et ladite ou lesdites molécules.

1/28

**Figure 1**

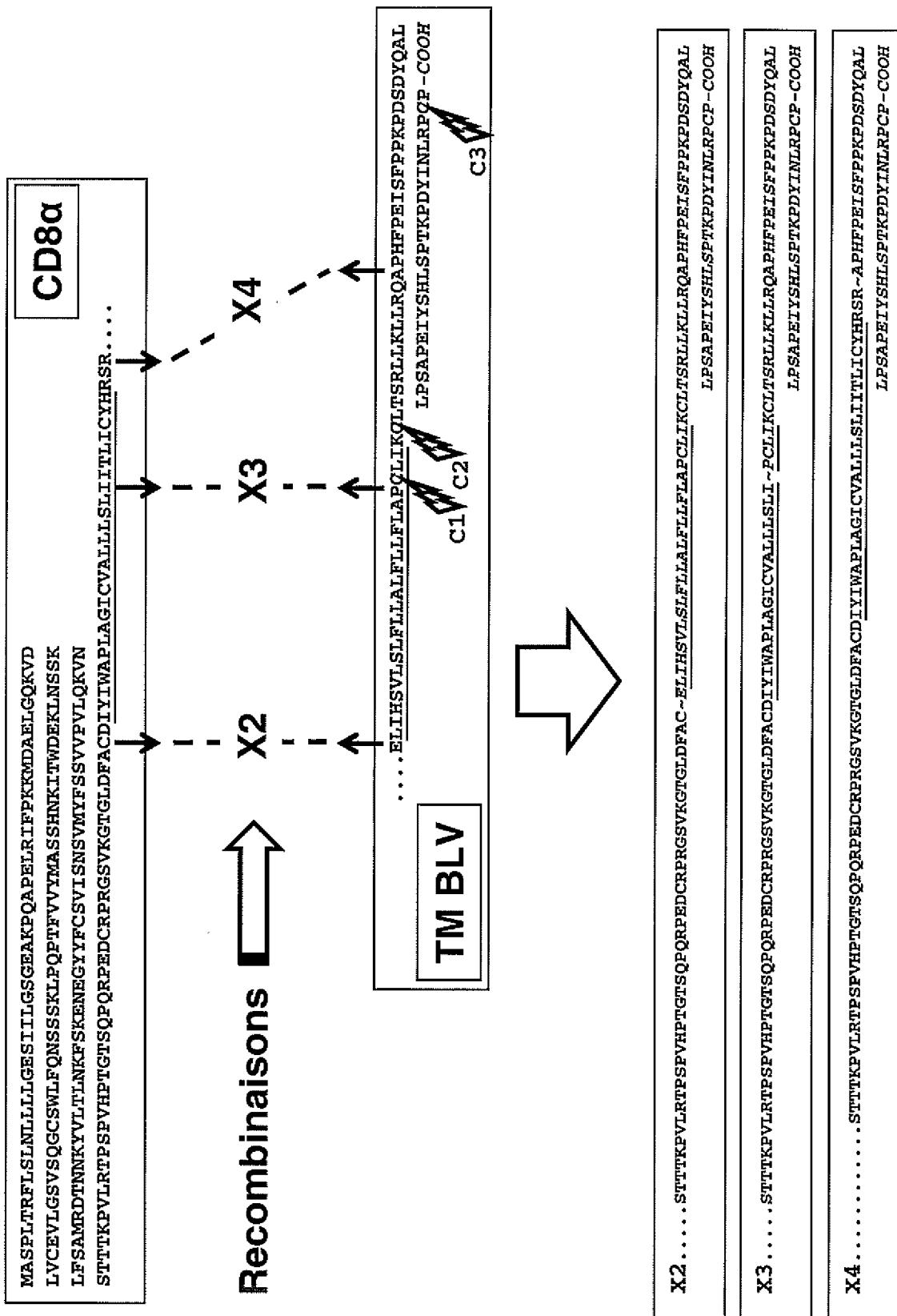
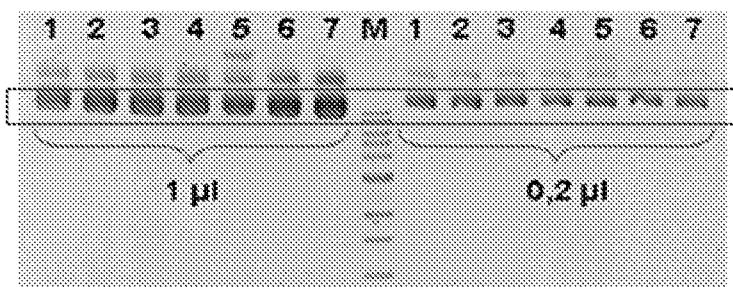
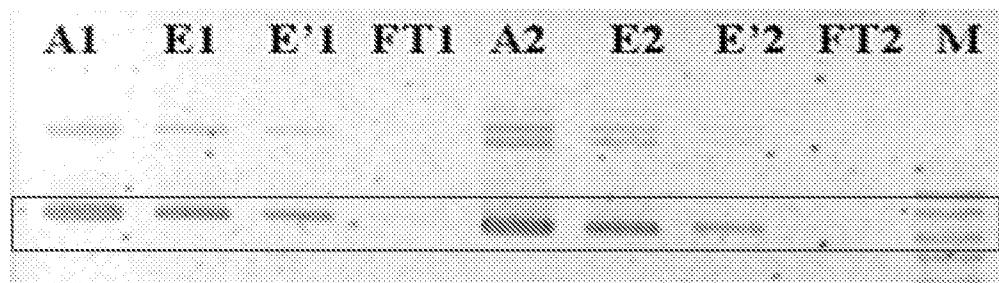


Figure 2

3/28

**Figure 3****Figure 4**

4/28

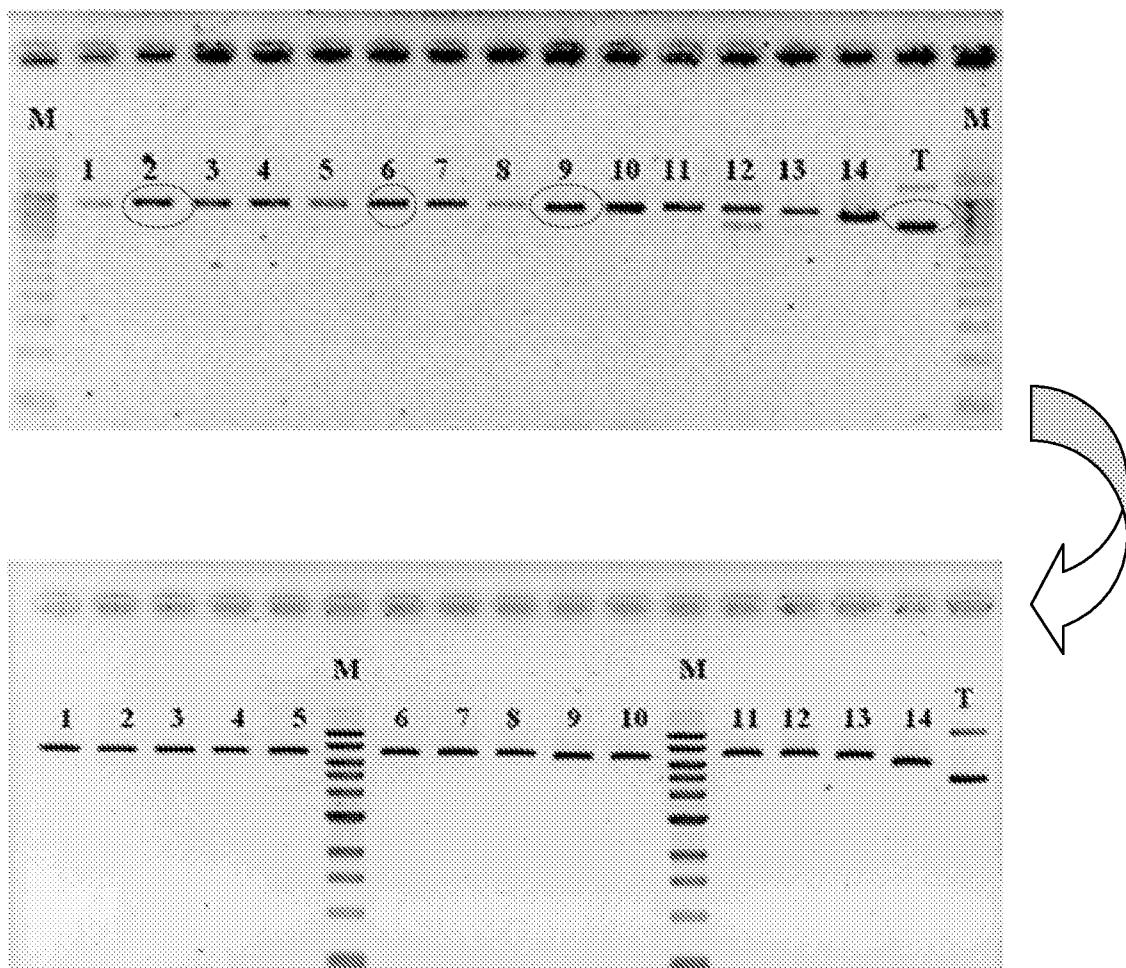
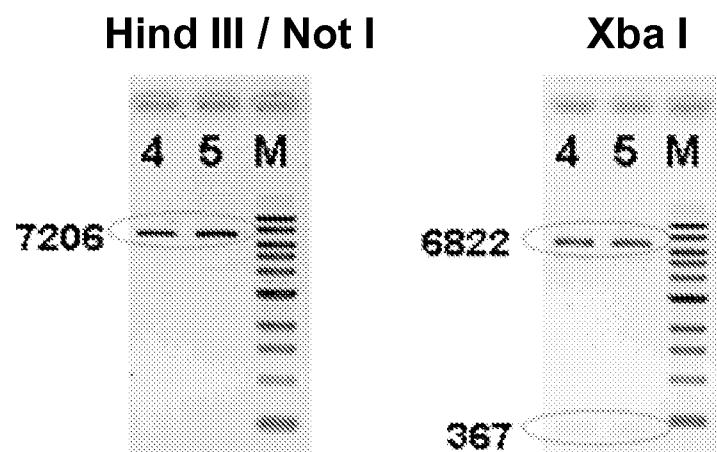
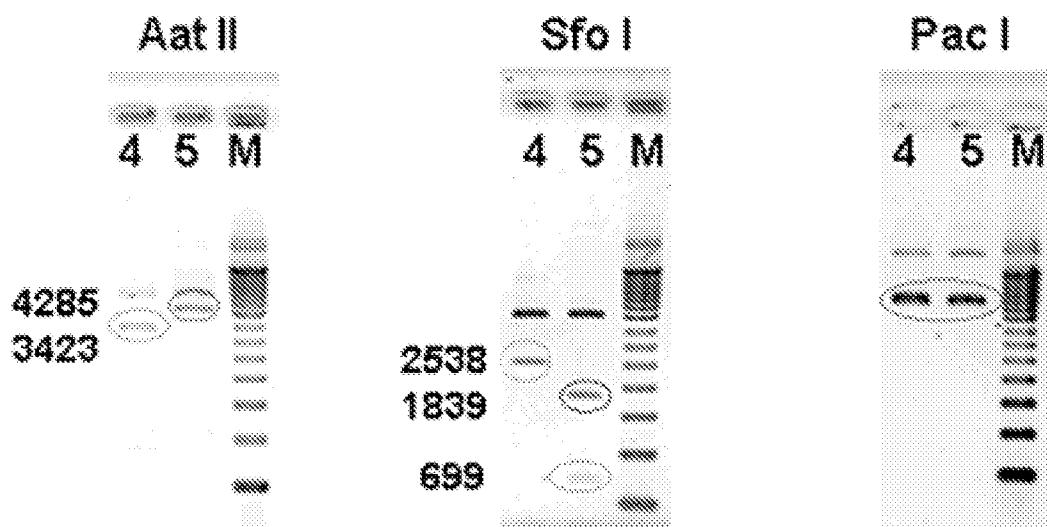


Figure 5

5/28

A**B****Figure 6**

6/28

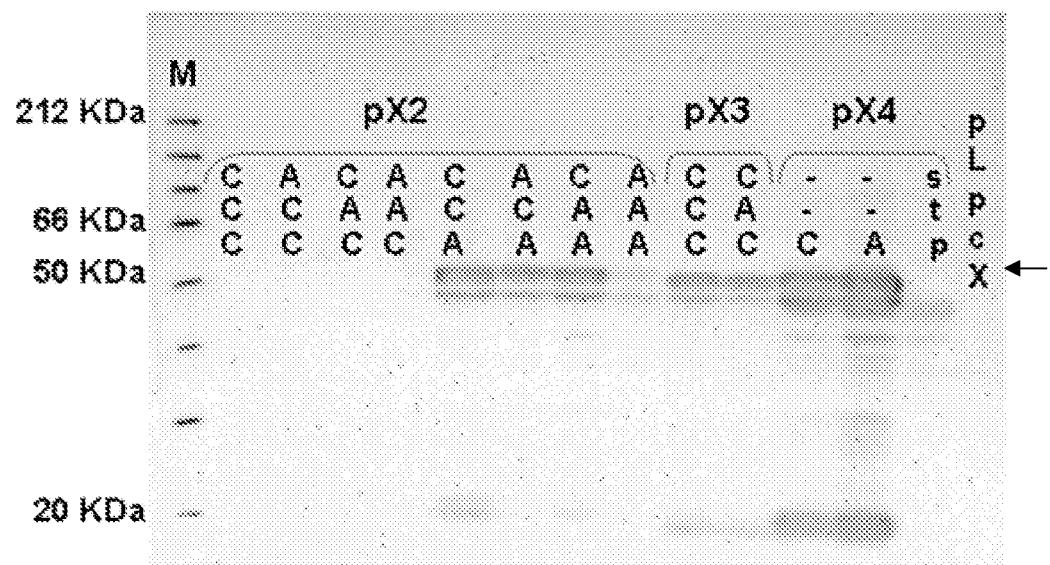


Figure 7

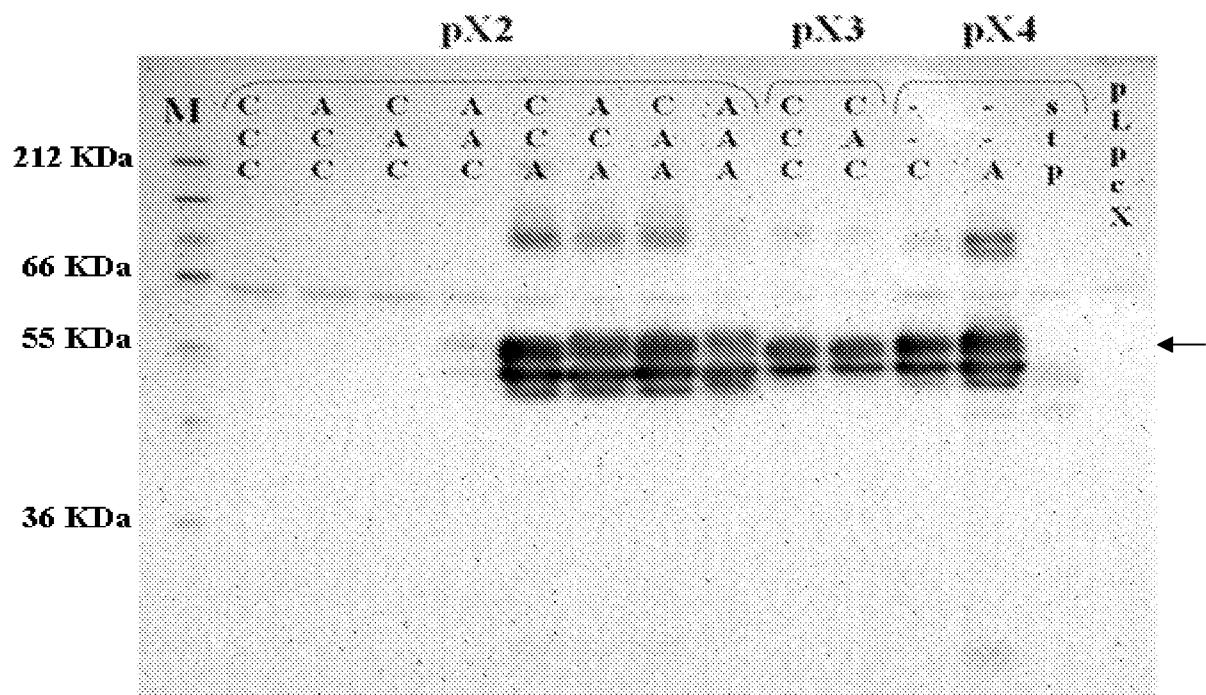


Figure 8

7/28

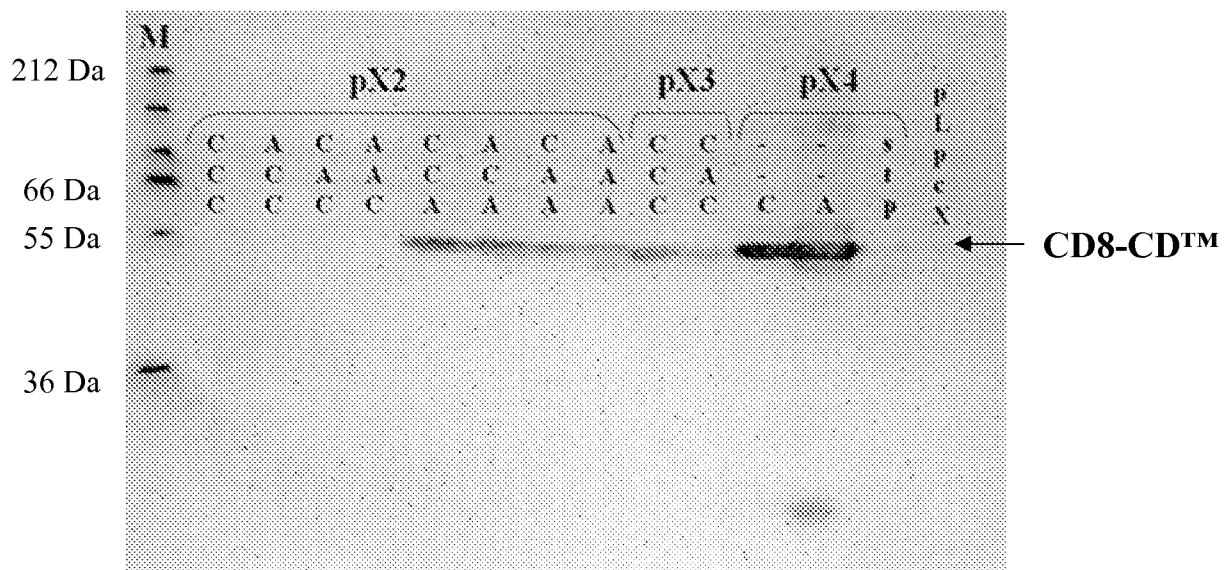


Figure 9

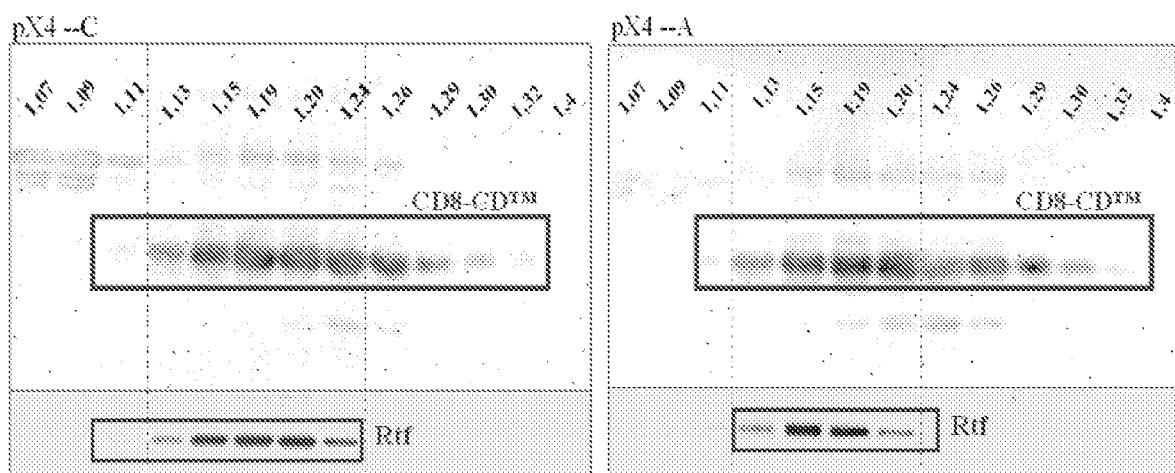


Figure 10

8/28

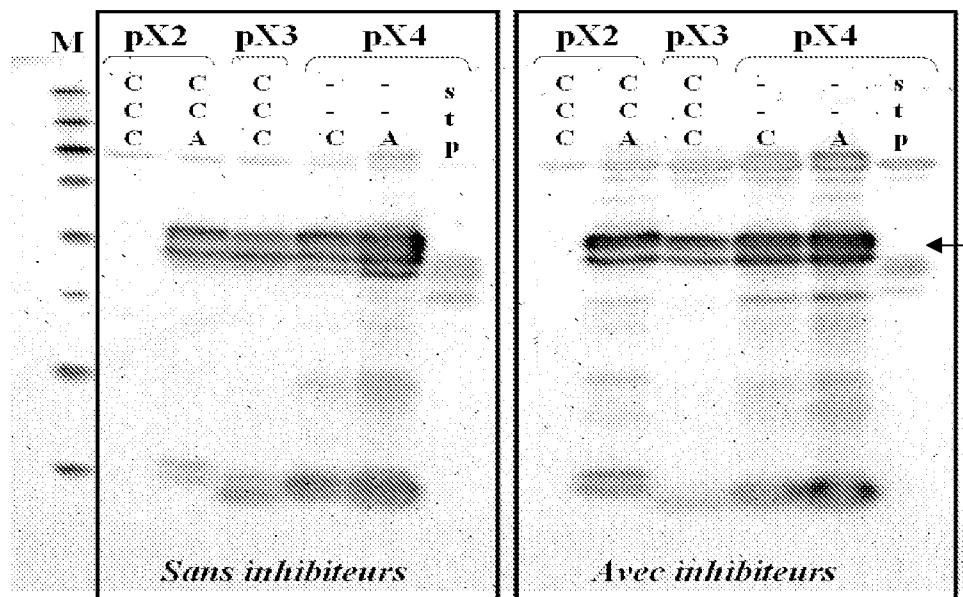


Figure 11

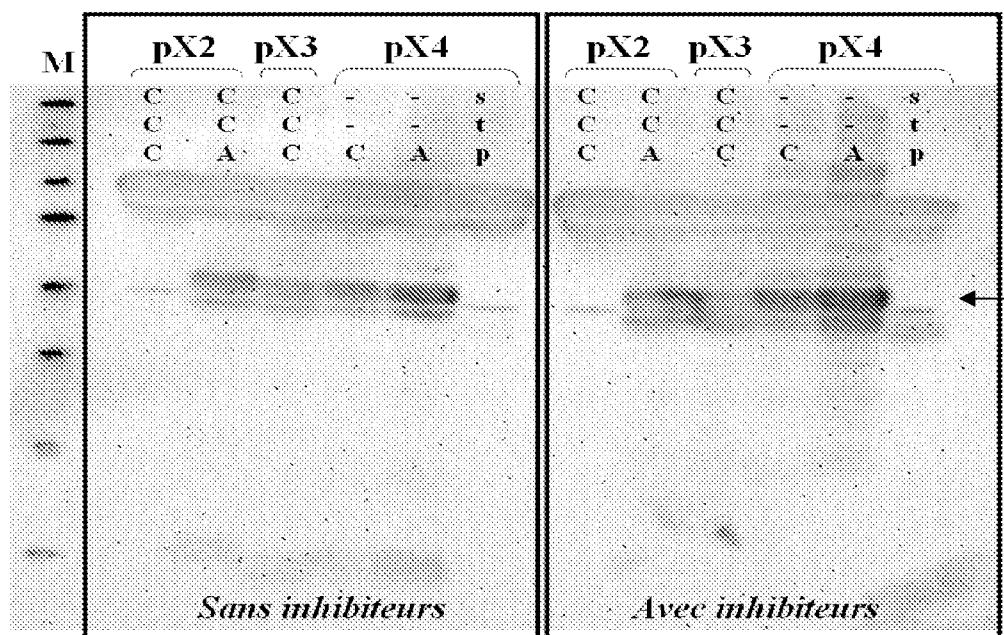


Figure 12

9/28

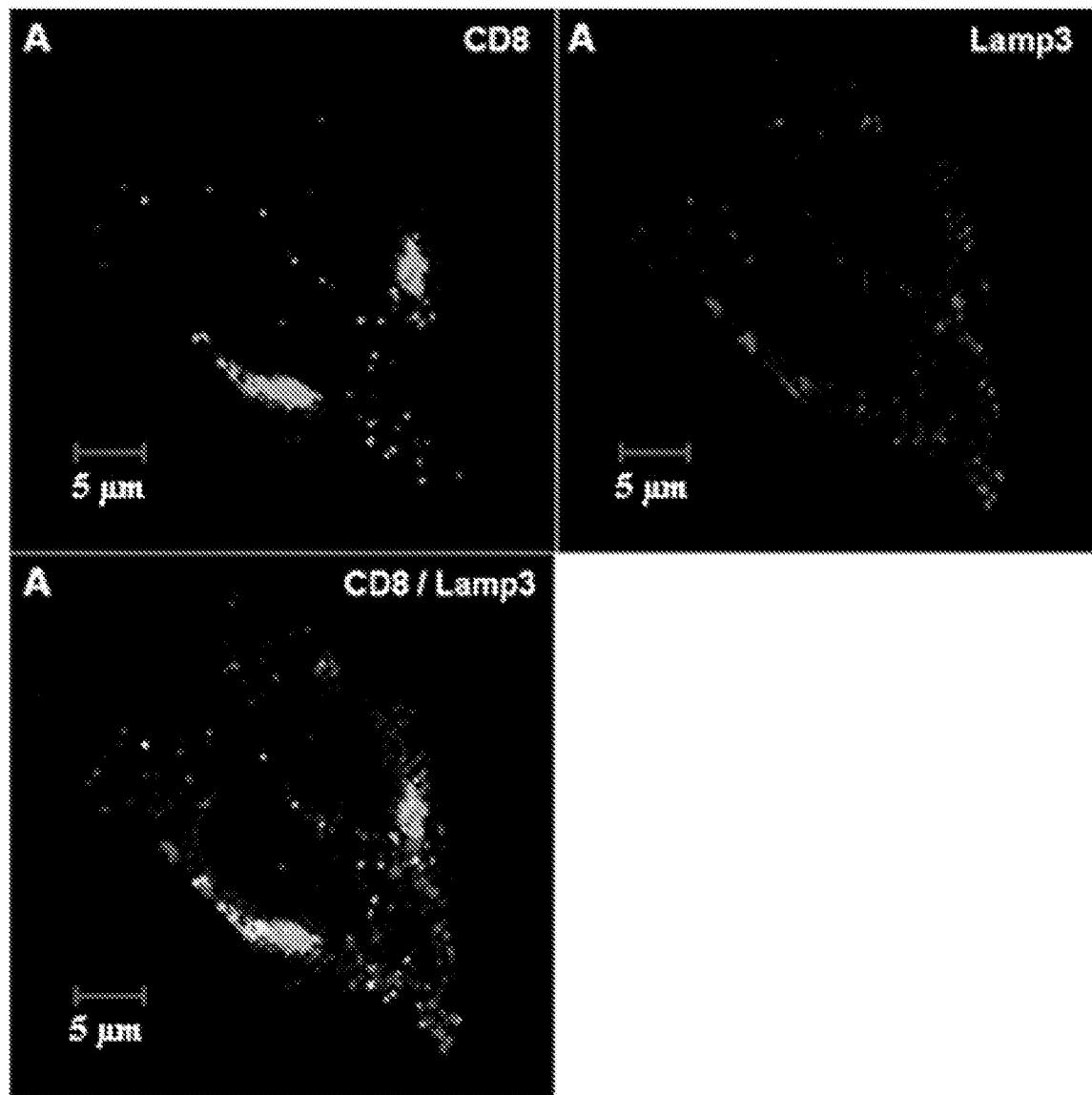


Figure 13

10/28

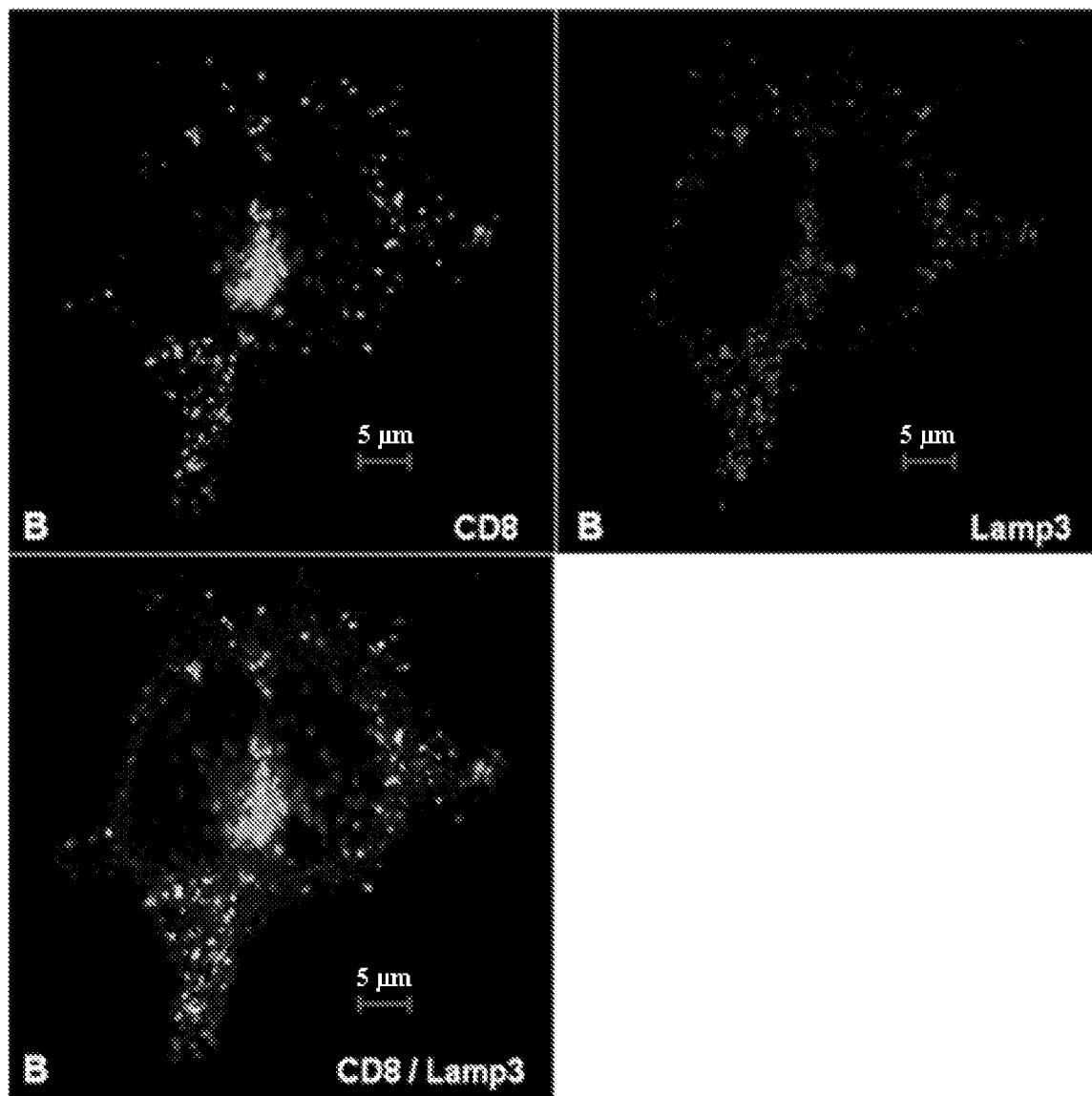
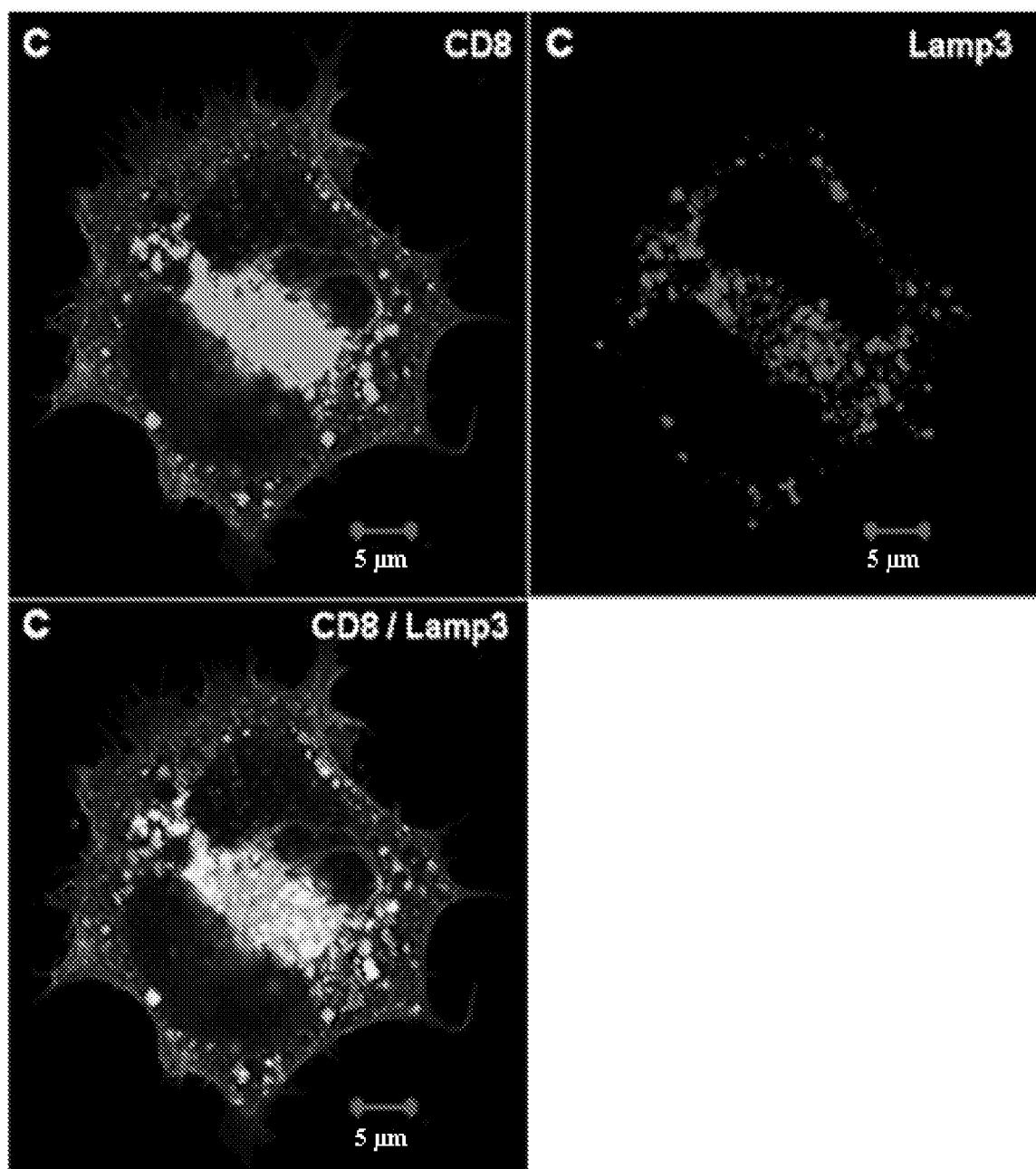


Figure 14

11/28

**Figure 15**

12/28

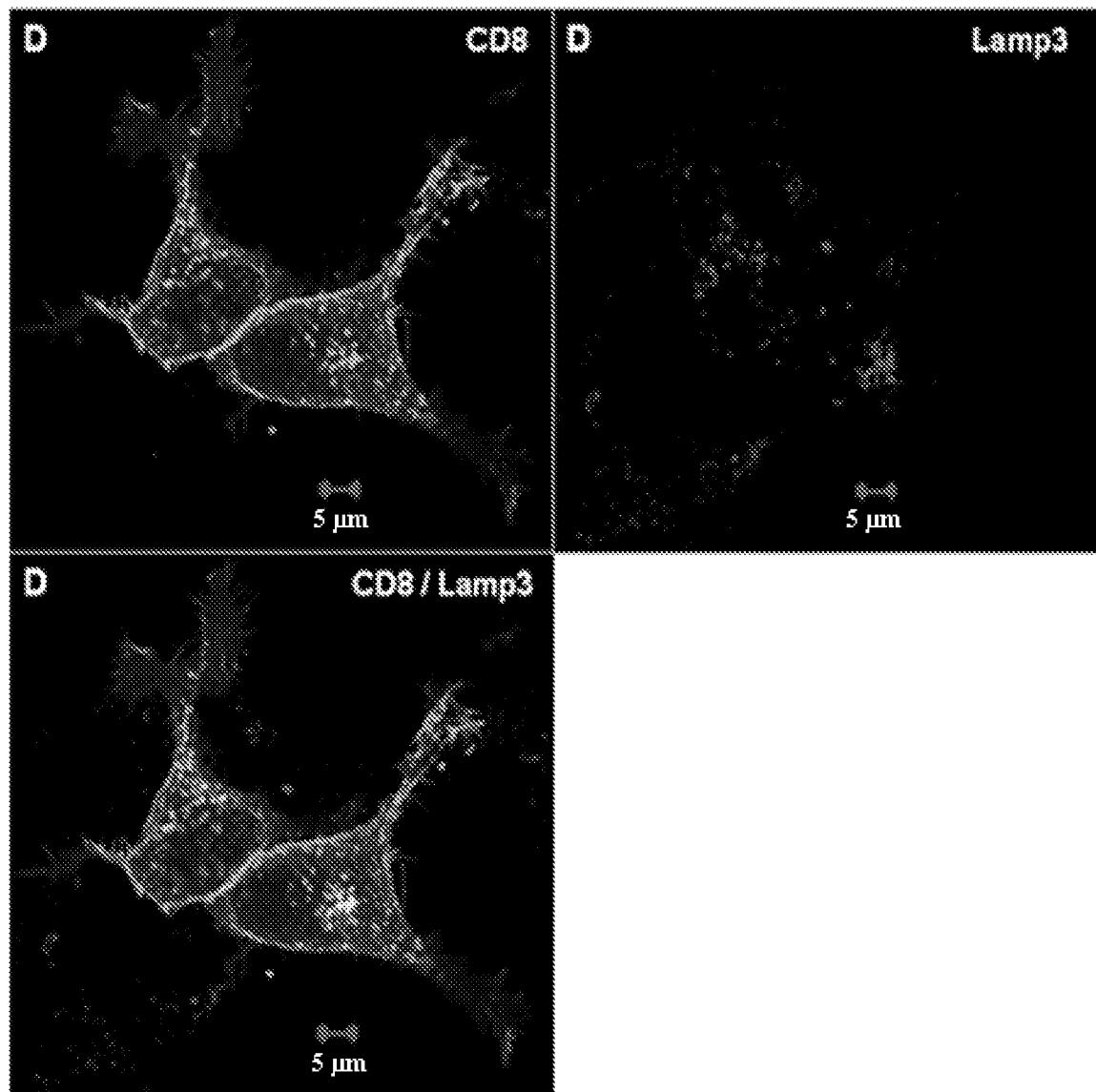


Figure 16

13/28

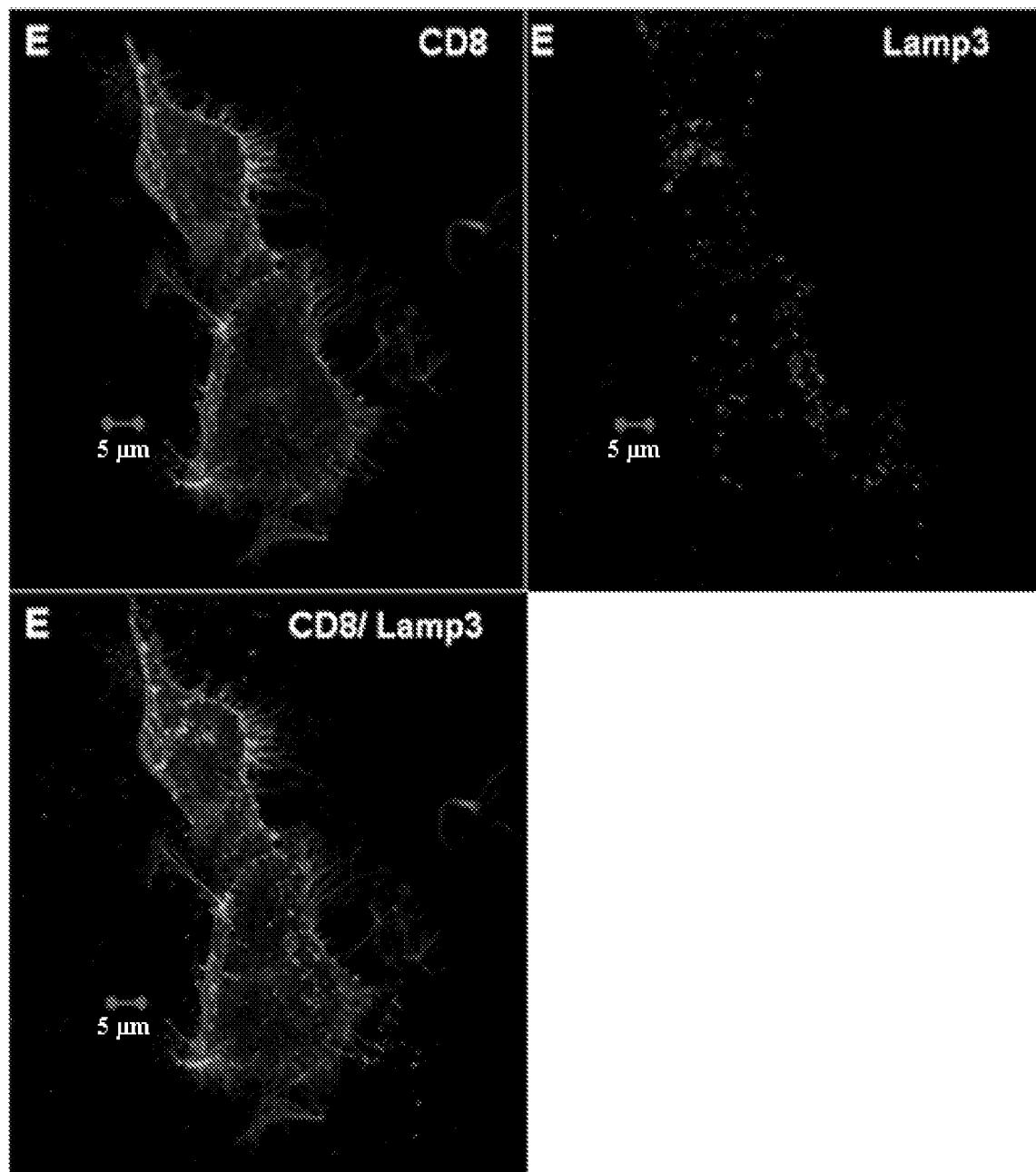
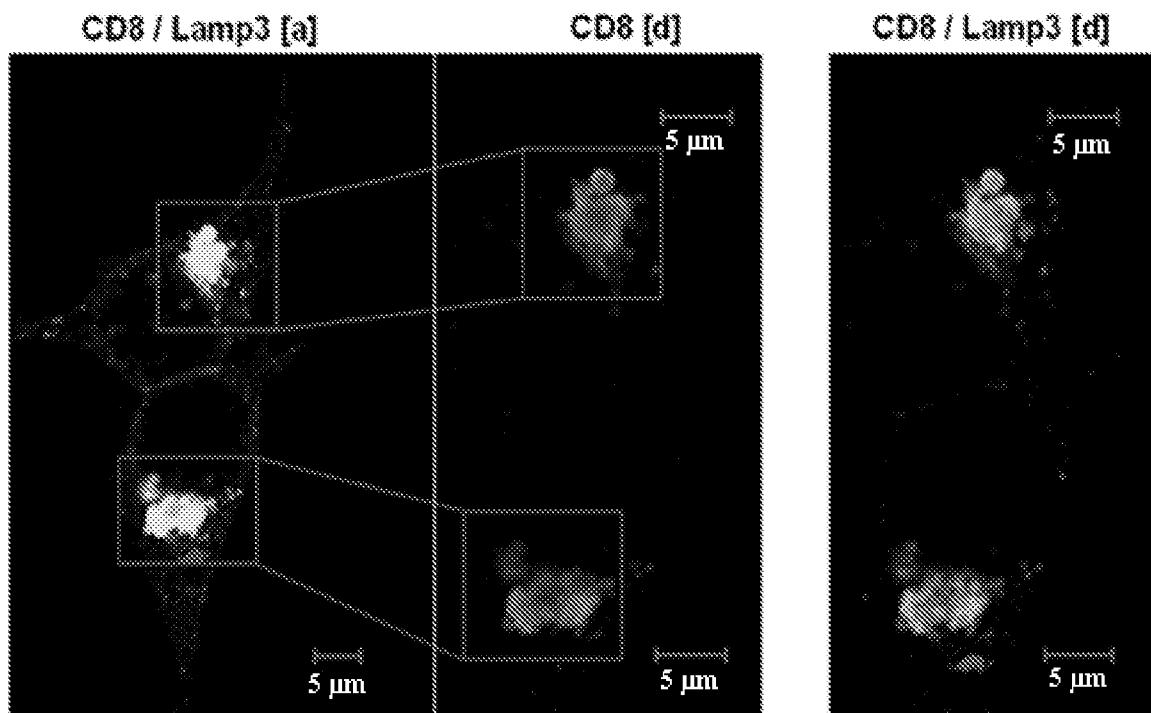
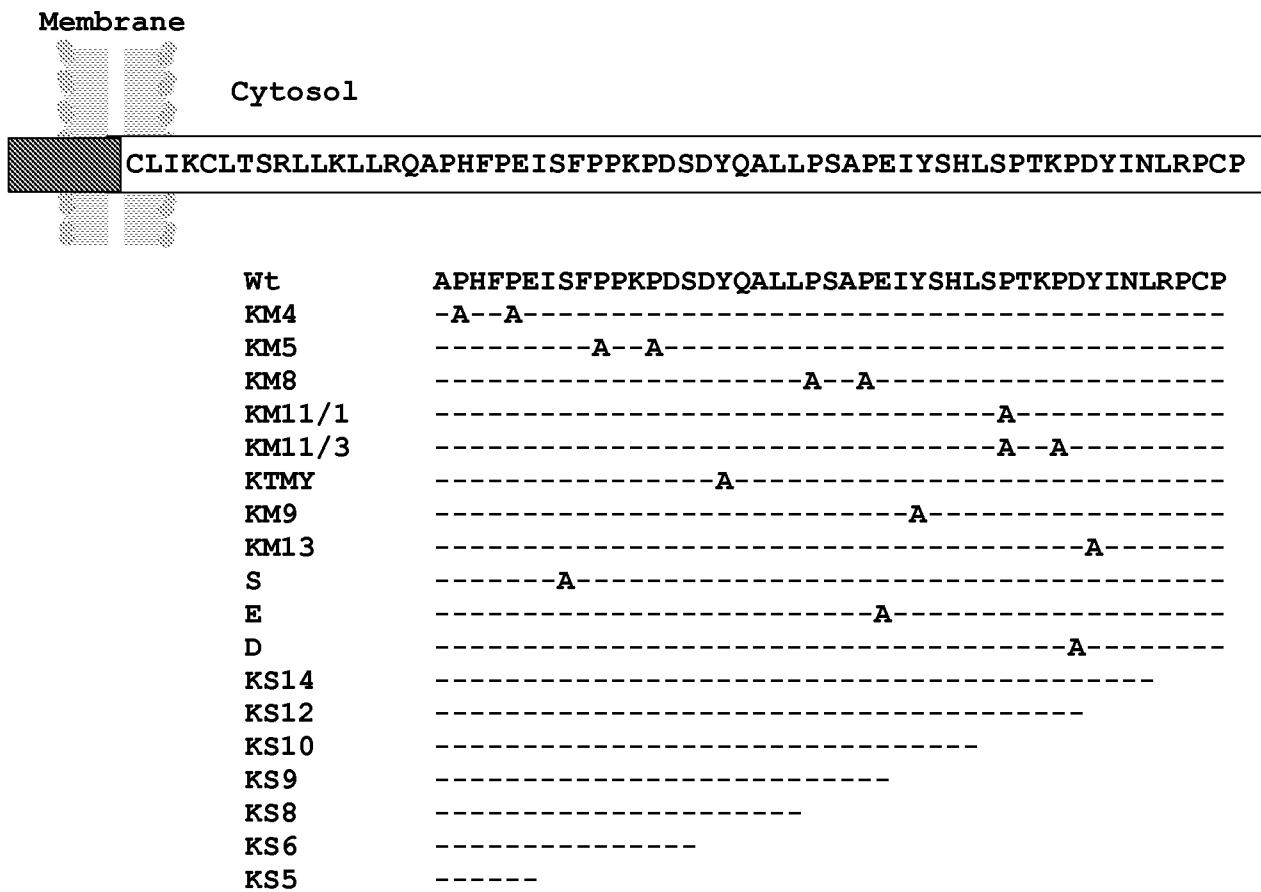


Figure 17

14/28

**Figure 18**

15/28



KM4 : CDTM muté sur les 2 prolines du 1^{er} PxxP
KM5 : CDTM muté sur les 2 prolines du 3^{ème} PxxP
KM11/1 : CDTM muté sur la 1^{ère} proline du 4^{ème} PxxP
KM11/3 : CDTM muté sur les 2 prolines du 4^{ème} PxxP
KTMY : CDTM muté sur la Tyrosine du 1^{er} YxxL
KM9 : CDTM muté sur la Tyrosine du 2^{ème} YxxL
KM13 : CDTM muté sur la Tyrosine du 3^{ème} YxxL
S : CDTM muté sur la Serine avant le 1^{er} YxxL
E : CDTM muté sur l'ac. glutamique avant le 2^{ème} YxxL
D : CDTM muté sur l'ac. aspartique avant le 3^{ème} YxxL

KS5 : CDTM tronqué à 6 acides aminés
KS6 : CDTM tronqué à 15 acides aminés
KS8 : CDTM tronqué à 21 acides aminés
KS9 : CDTM tronqué à 26 acides aminés
KS10 : CDTM tronqué à 31 acides aminés
KS12 : CDTM tronqué à 37 acides aminés
Ks14 : CDTM tronqué à 41 acides aminés

Figure 19

16/28

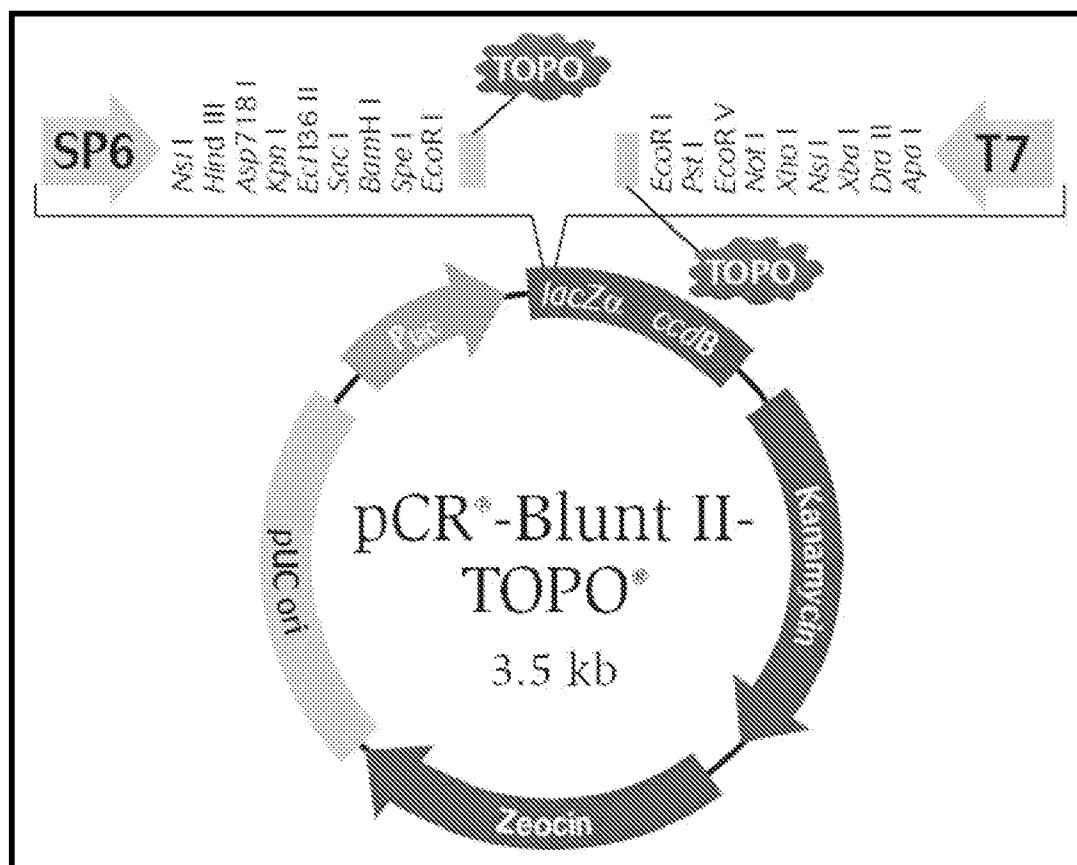


Figure 20

17/28

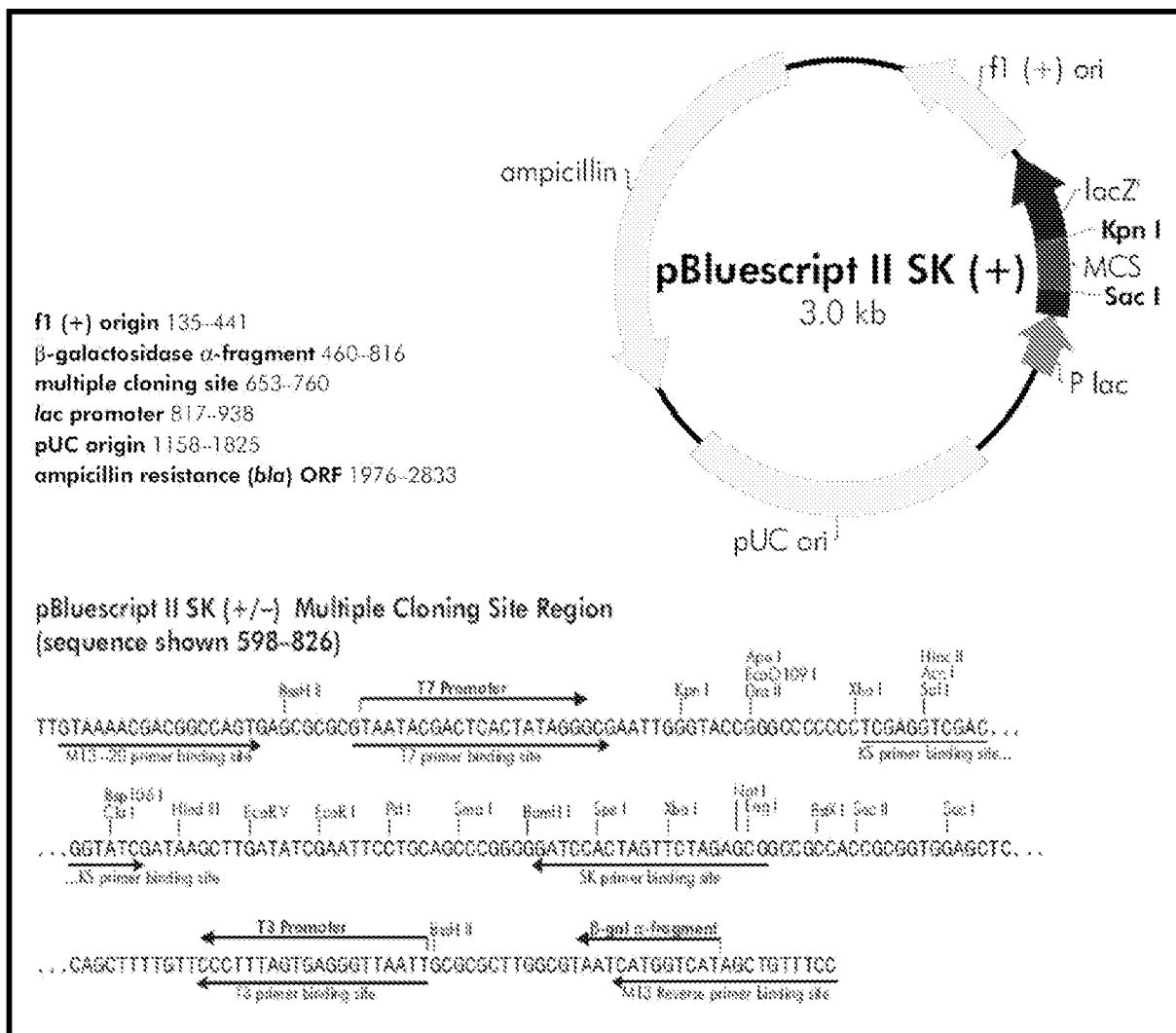


Figure 21

18/28

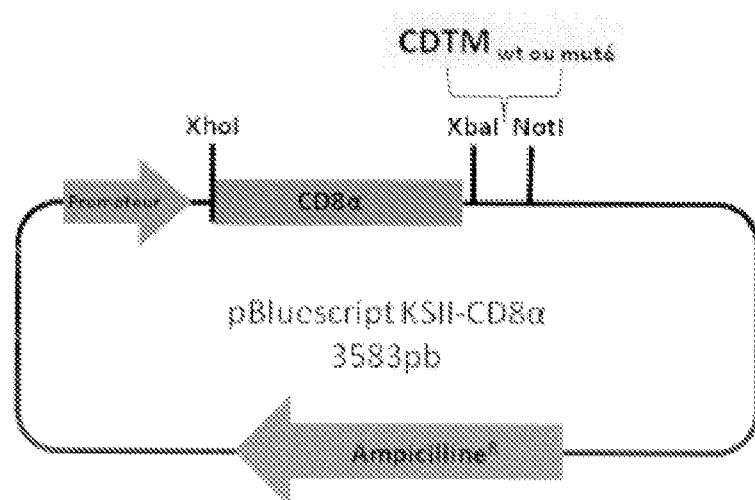


Figure 22

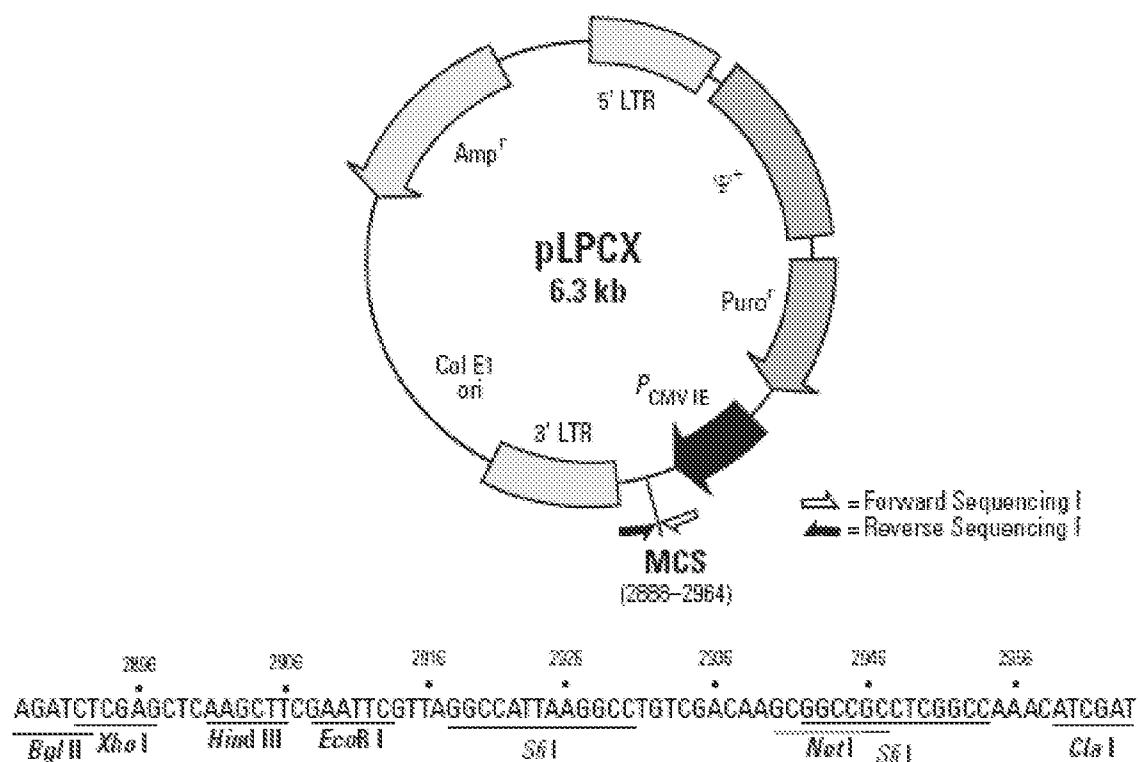
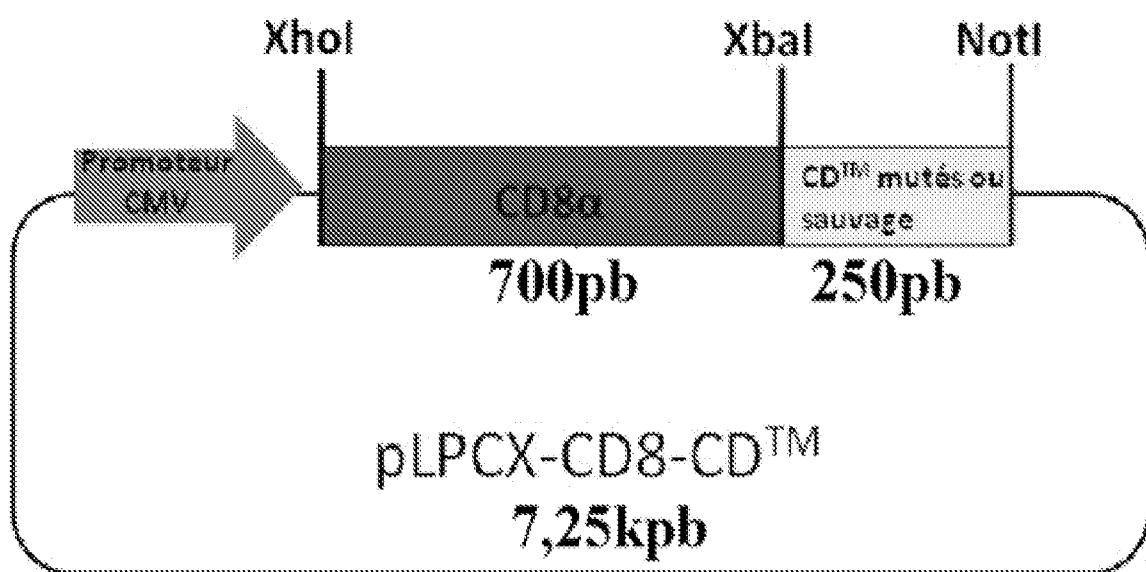


Figure 23

19/28

**Figure 24**

20/28

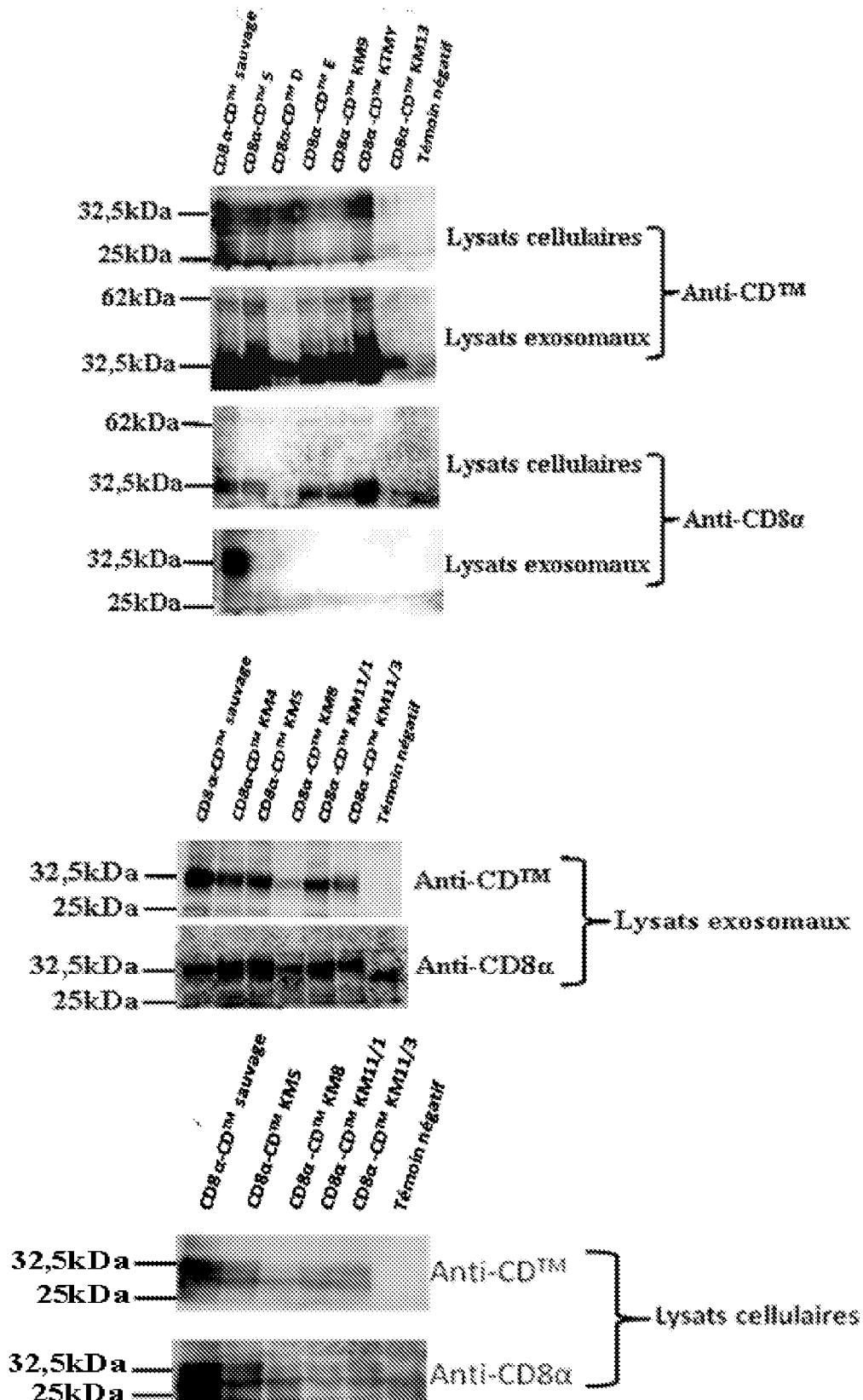
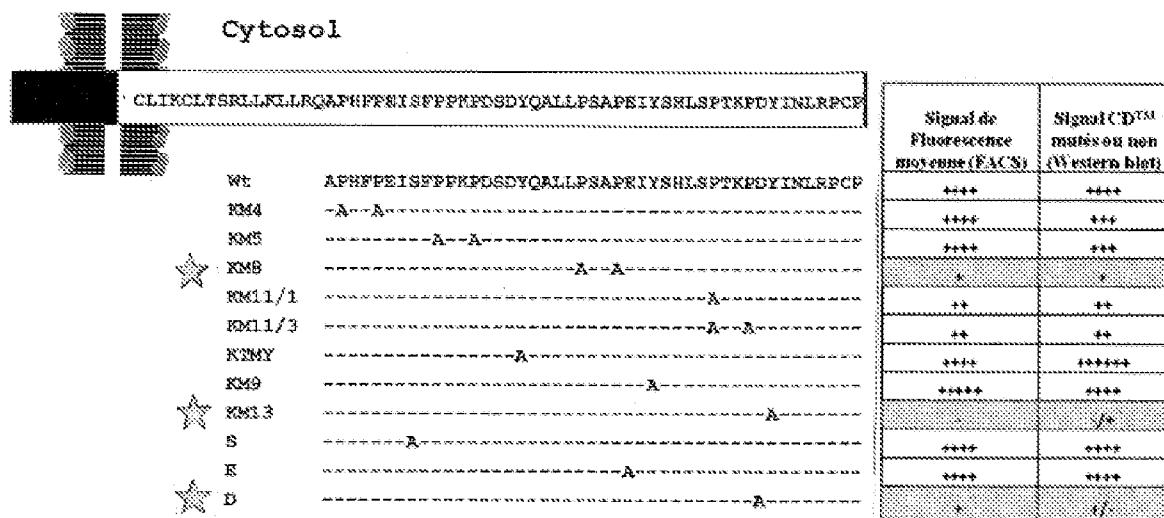
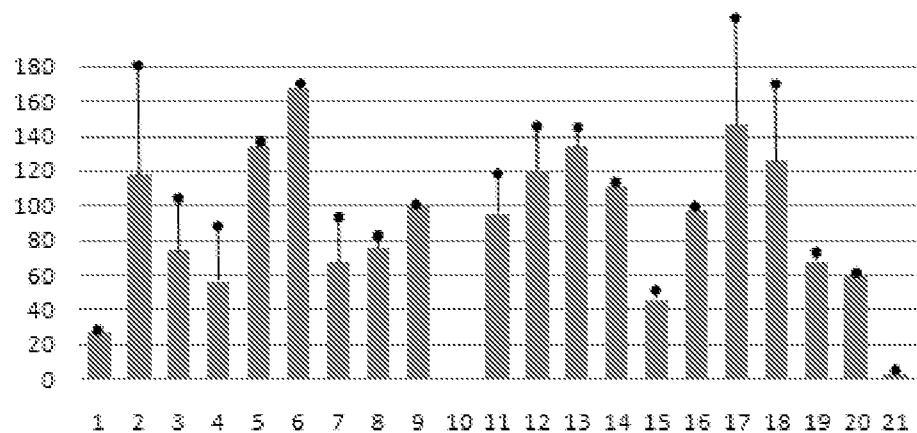


Figure 25

21/28

**Figure 26****Figure 27**

22/28

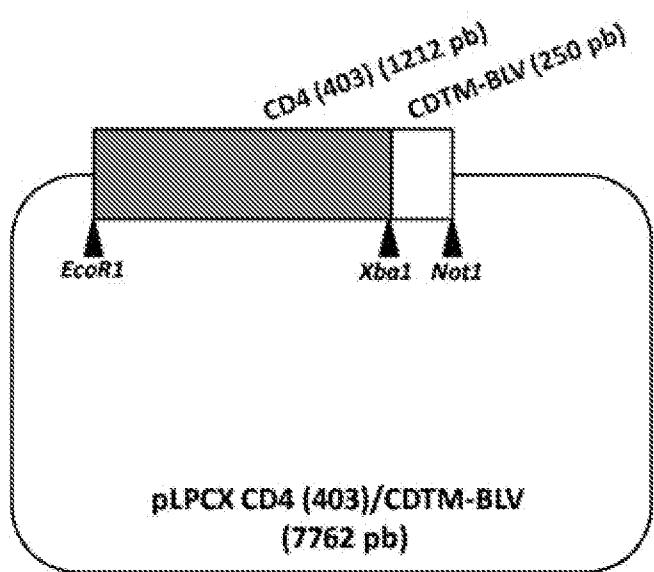
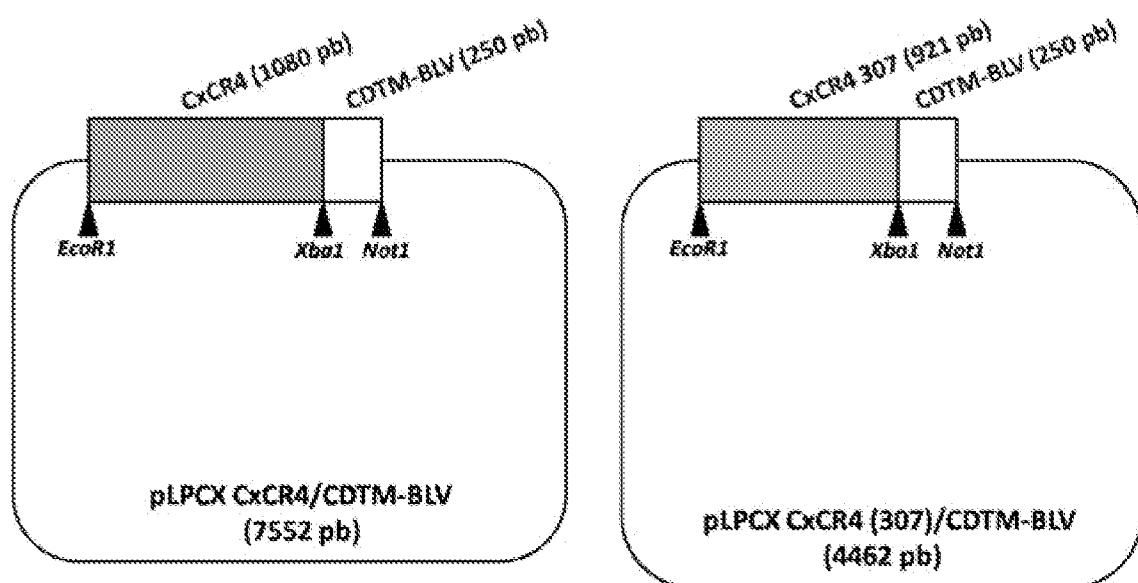


Figure 28

23/28

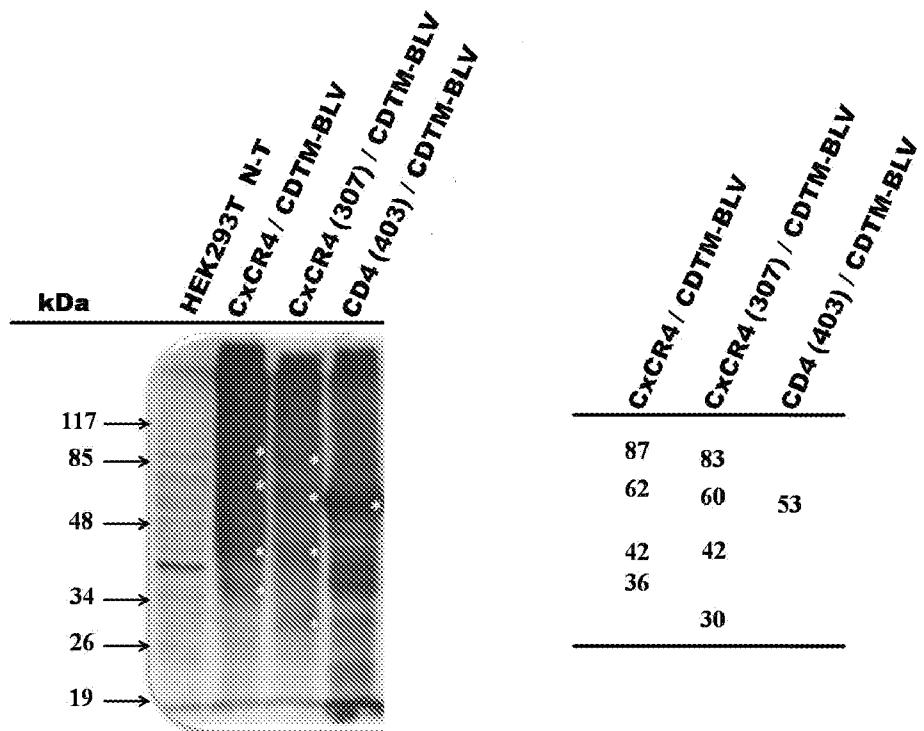


Figure 29

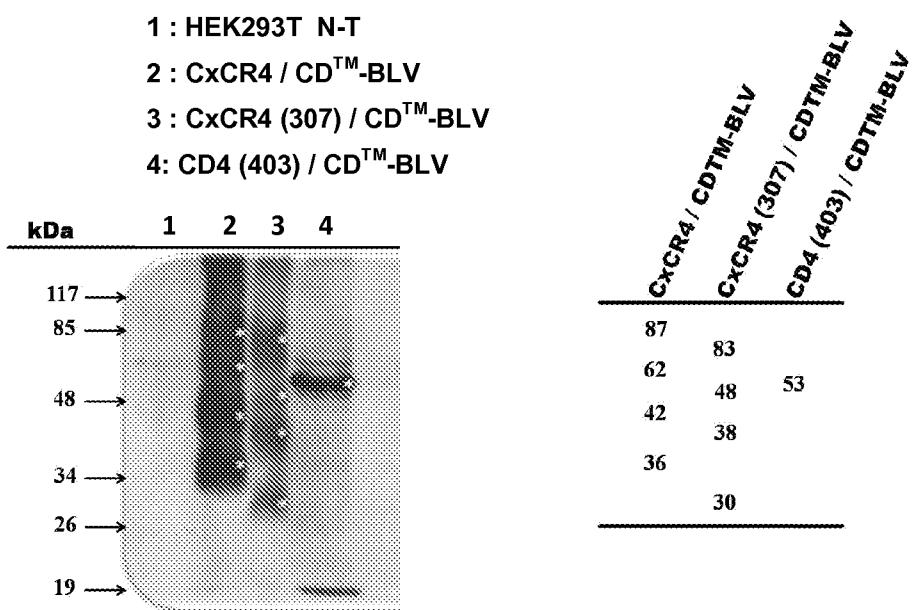
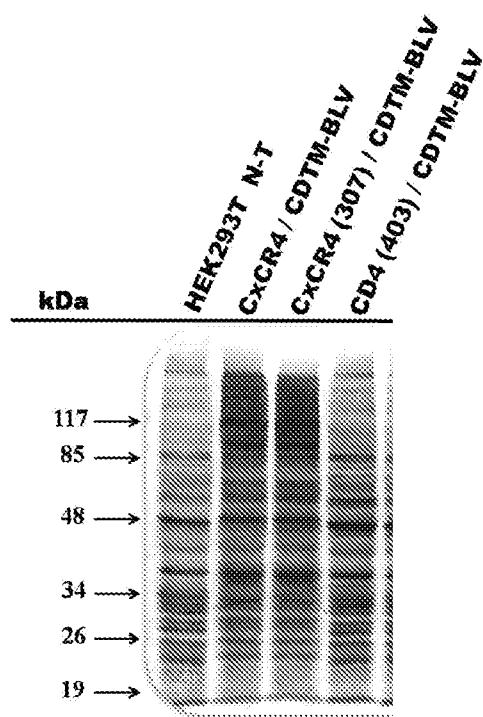
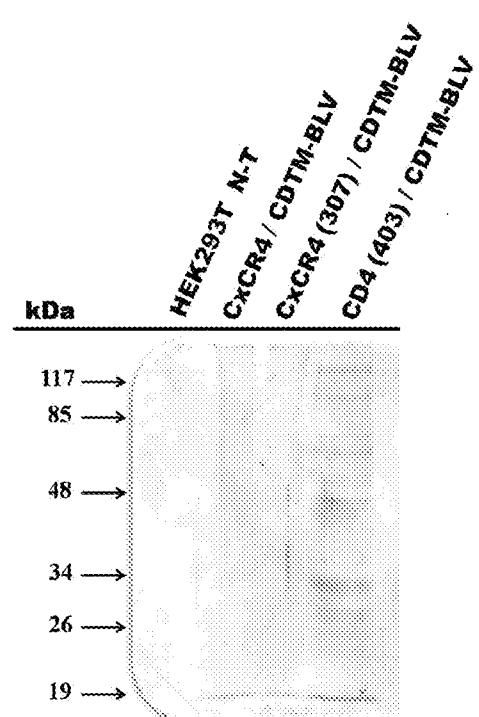


Figure 30

24/28

A**B****Figure 31**

25/28

Src-SNAP-DCTM (SSC)

EcoRI

1 GAATTCGCCA CCATGGCAG CAGCAAGAGC AAGCCCAAGG ACCCCAGCCA
 CTTAACGCGGT GGTACCCGTC GTCTGTTCTCG TTCTGGTTCC TGGGGTCGGT
 M G S S K S K P K D P S Q Frame 1

NheI

51 GCGCCGCCGC AAGTCTAGAG GCCCGGGAGG CAGCGCTAGC ATGGACAAAG
 CGCGCGCCGC TTCAGATCTC CGGGCCCTCC GTCGCGATCG TACCTGTTTC
 R R R K S R G P G G S A S M D K D Frame 1

101 ACTGCGAAAT GAAGCGCACC ACCCTGGATA GCCCTCTGGG CAAGCTGGAA
 TGACGCTTTA CTTCGCGTGG TGGGACCTAT CGGGAGACCC GTTCGACCTT
 C E M K R T T L D S P L G K L E Frame 1

151 CTGTCTGGGT GCGAACAGGG CCTGCACAGAG ATCAAGCTGC TGGGCAAAGG
 GACAGACCCA CGCTTGTCCC GGACGTGCTC TAGTCGACG ACCCGTTTC
 L S G C E Q G L H E I K L L G K G Frame 1

201 AACATCTGCC GCCGACGCCG TGGAAAGTGC TGCCCCAGCC GCCGTGCTGG
 TTGTAGACGG CGGCTGCGC ACCTTCACGG ACGGGGTCGG CGGCACGACC
 T S A A D A V E V P A P A A V L G Frame 1

251 GCGGACCAGA GCCACTGATG CAGGCCACCG CCTGGCTCAA CGCCTACTTT
 CGCCTGGTCT CGGTGACTAC GTCCGGTGGC GGACCGAGTT GCGGATGAAA
 G P E P L M Q A T A W L N A Y F Frame 1

301 CACCAGCCTG AGGCCATCGA GGAGTTCCCT GTGCCAGCCC TGCACCACCC
 GTGGTCGGAC TCCGGTAGCT CCTCAAGGGG CACGGTCGGG ACGTGGTGGG
 H Q P E A I E E F P V P A L H H P Frame 1

351 AGTGTTCAG CAGGAGAGCT TTACCCGCCA GGTGCTGTGG AAAACTGCTGA
 TCACAAGGTC GTCCCTCTGA AATGGGCGGT CCACGACACC TTTGACGACT
 V F Q Q E S F T R Q V L W K L L K Frame 1

401 AAGTGGTGAA GTTCGGAGAG GTCATCAGCT ACCAGCAGCT GGCGCCCTG
 TTCACCACTT CAAGCCTCTC CAGTAGTCGA TGGTCGTCGA CGGGCGGGAC
 V V K F G E V I S Y Q Q L A A L Frame 1

451 GCCGGCAATC CCGCCGCCAC CGCCGCCGTG AAAACCGCCC TGAGCGGAAA
 CGGCCGTTAG GGCGGCGGTG GCGGCCGAC TTTTGGCGGG ACTCGCCTTT
 A G N P A A T A A V K T A L S G N Frame 1

501 TCCCGTGCCCT ATTCTGATCC CCTGCCACCG GGTGGTGTCT AGCTCTGGCG
 AGGGCACGGG TAAGACTAGG GGACGGTGGC CCACACAGA TCGAGACCGC
 P V P I L I P C H R V V S S S G A Frame 1

551 CCGTGGGGGG CTACGAGGGC GGGCTCGCCG TGAAAGAGTG GCTGCTGGCC
 GGCACCCCCC GATGCTCCCG CCCGAGCGGC ACTTTCTCAC CGACGACCGG
 V G G Y E G G L A V K E W L L A Frame 1

Figure 32

26/28

												SbfI	AscI	
601	CACGAGGGCC	ACAGACTGGG	CAAGCCTGGG	CTGGGTCTG	CAGGAAGCGG									
	GTGCTCCCGG	TGTCTGACCC	GTTCGGACCC	GACCCAGGAC	GTCCCTCGCC									
	H E G H	R L G	K P G	L G P A	G S G									Frame 1
651	CGCGCCCCAC	TTCCCTGAAA	TCTCCTTCCC	CCCTAAACCC	GATTCTGATT									
	GCGCGGGGTG	AAGGGACTTT	AGAGGAAGGG	GGGATTGAGG	CTAAGACTAA									
	A P H	F P E	I S F	P P K P	D S D Y									Frame 1
701	ATCAGGCCTT	GCTACCATCC	GCGCCAGAGA	TCTACTCTCA	CCTCTCCCCC									
	TAGTCCGGAA	CGATGGTAGG	CGCGGTCTCT	AGATGAGAGT	GGAGAGGGGG									
	Q A L	L P S	A P E	I Y S H	L S P									Frame 1
751	ACCAAACCCG	ATTACATCAA	CCTTCGACCG	GCGCCCTAGG	ACCCCCATGT									
	TGGTTTGGGC	TAATGTAGTT	GGAAGCTGGC	CGCGGGATCC	TGGGGGTACA									
	T K P D	Y I N	L R P	A P *	Frame 1									
801	TTCACGCACC	CTCAGGCTGT	GGTGGGGCAC	TGGCTTAGTG	GAATAGTCAG									
	AAGTGCCTGG	GAGTCGACCA	CCACCCCGTG	ACCGAATCAC	CTTATCAGTC									
													NotI	
851	TGTACCATCA	CAAGCCTCTT	CTTGCTGCCA	GCACCGAGTT	CGAAGCGGCC									
	ACATGGTAGT	GTTGGAGAA	GAACGACGGT	CGTGGCTCAA	GCTTCGCCGG									
901	GC													
	CG													

Figure 32 (suite)

27/28

D-SNAP-DCTM (DSC)

EcoRI

1 GAATTGCCA CCATGGCAG CAGCAAGAGC AAGTCTAGAG GCCCGGGAGG
M G S S K S K S R G P G G Frame 1

NheI

51 CAGCGCTAGC ATGGACAAAG ACTGCGAAAT GAAGCGCACC ACCCTGGATA
S A S M D K D C E M K R T T L D S Frame 1

101 GCCCTCTGGG CAAGCTGGAA CTGTCTGGGT GCGAACAGGG CCTGCACGAG
P L G K L E L S G C E Q G L H E Frame 1

151 ATCAAGCTGC TGGGCAAAGG AACATCTGCC GCCGACGCCG TGGAAGTGCC
I K L L G K G T S A A D A V E V P Frame 1

201 TGCCCCAGCC GCCGTGCTGG GCGGACCAGA GCCACTGATG CAGGCCACCG
A P A A V L G G P E P L M Q A T A Frame 1

251 CCTGGCTCAA CGCCTACTTT CACCAGCCTG AGGCCATCGA GGAGTTCCCT
W L N A Y F H Q P E A I E E F P Frame 1

301 GTGCCAGCCC TGCACCACCC AGTGTCCAG CAGGAGAGCT TTACCCGCCA
V P A L H H P V F Q Q E S F T R Q Frame 1

351 GGTGCTGTGG AAACTGCTGA AAGTGGTGAA GTTCGGAGAG GTCATCAGCT
V L W K L L K V V K F G E V I S Y Frame 1

401 ACCAGCAGCT GGCGCCCTG GCCGGCAATC CCGCCGCCAC CGCCGCCGTG
Q Q L A A L A G N P A A T A A V Frame 1

451 AAAACCGCCC TGAGCGGAAA TCCCGTGCC ATTCTGATCC CCTGCCACCG
K T A L S G N P V P I L I P C H R Frame 1

501 GGTGGTGTCT AGCTCTGGCG CCGTGGGGGG CTACGAGGGC GGGCTCGCCG
V V S S S G A V G G Y E G G L A V Frame 1

551 TGAAAGAGTG GCTGCTGGCC CACGAGGGCC ACAGACTGGG CAAGCCTGGG
K E W L L A H E G H R L G K P G Frame 1

SbfI **Ascl**

601 CTGGGTCTG CAGGAAGCGG CGCGCCCCAC TTCCCTGAAA TCTCCTTCCC
L G P A G S G A P H F P E I S F P Frame 1

651 CCCTAAACCC GATTCTGATT ATCAGGCCCT GCTACCATCC GCGCCAGAGA
P K P D S D Y Q A L L P S A P E I Frame 1

701 TCTACTCTCA CCTCTCCCCC ACCAAACCCG ATTACATCAA CCTTCGACCG
Y S H L S P T K P D Y I N L R P Frame 1

751 GCGCCCTAGG ACCCCCCATGT TTCACGCACC CTCAGGCTGT GGTGGGGCAC
A P * Frame 1

801 TGGCTTAGTG GAATAGTCAG TGTACCATCA CAAGCCTCTT CTTGCTGCCA

NotI

851 GCACCGAGTT CGAACGGGCC GC

Figure 33

28/28

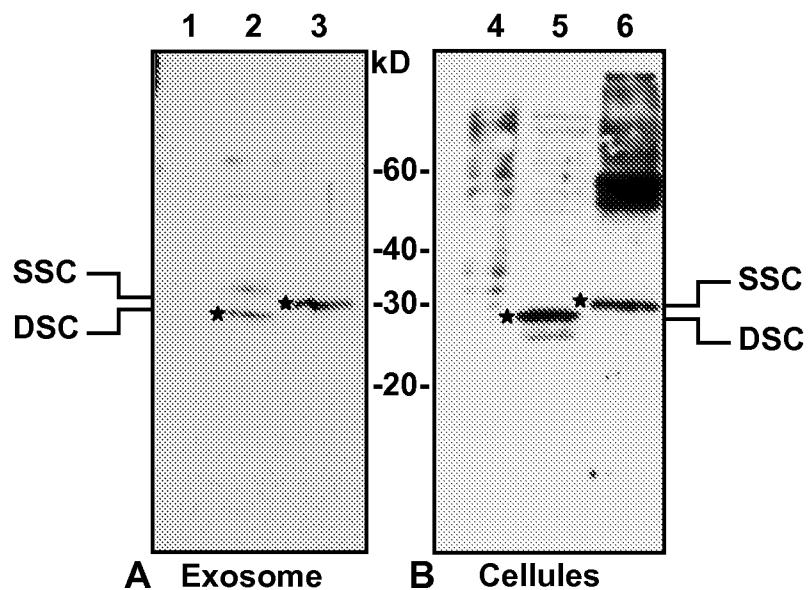


Figure 34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2010/052006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/62
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	<p>WO 2009/115561 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; MAMOUN ROBERT ZAINE EL ABIDDIN [FR]; TREN) 24 September 2009 (2009-09-24) the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-39



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 January 2011	04/02/2011

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lüdemann, Susanna
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2010/052006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NOVAKOVIC S ET AL: "Dileucine and YXXL motifs in the cytoplasmic tail of the bovine leukemia virus transmembrane envelope protein affect protein expression on the cell surface", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD- DOI:10.1128/JVI.78.15.8301-8311.2004, vol. 78, no. 15, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 8301-8311, XP002508133, ISSN: 0022-538X	1-7,10, 13-39
Y	le document en entier, particulièrement fig. 1 -----	8,9,11, 12
X	DE GASSART A ET AL: "Exosomal sorting of the cytoplasmic domain of bovine leukemia virus TM Env protein", CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, ACADEMIC PRESS, GB LNKD- DOI:10.1016/J.CELIBI.2008.10.001, vol. xx, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1-13, XP002508299, ISSN: 1065-6995 [retrieved on 2008-10-01]	1-7,10, 13-39
Y	le document en entier, particulièrement p.8, 9 and fig's 1, 8 and 9. -----	8,9,11, 12
Y	REUTHER G W ET AL: "Analysis of function and regulation of proteins that mediate signal transduction by use of lipid-modified plasma membrane-targeting sequences", METHODS IN ENZYMOLOGY 2000 US LNKD- DOI:10.1016/S0076-6879(00)27288-1, vol. 327, 2000, pages 331-350, XP009132699, ISSN: 0076-6879 le document en entier, particulièrement fig. 1 -----	8,9,11, 12
Y	SILVERMAN LAUREN ET AL: "Lysine residues form an integral component of a novel amino-terminal membrane targeting motif for myristylated pp60-v-src", JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 119, no. 2, 1992, pages 415-425, XP002579784, ISSN: 0021-9525 le document en entier, particulièrement tableau 1 -----	8,9,11, 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2010/052006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009115561 A1	24-09-2009	CA 2718868 A1 EP 2268816 A1 FR 2928926 A1	24-09-2009 05-01-2011 25-09-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/052006

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N15/62
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X, P	WO 2009/115561 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; MAMOUN ROBERT ZAINE EL ABIDDIN [FR]; TREN) 24 septembre 2009 (2009-09-24) le document en entier -----	1-39
X	NOVAKOVIC S ET AL: "Dileucine and YXXL motifs in the cytoplasmic tail of the bovine leukemia virus transmembrane envelope protein affect protein expression on the cell surface", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD-DOI:10.1128/JVI.78.15.8301-8311.2004, vol. 78, no. 15, 1 août 2004 (2004-08-01), pages 8301-8311, XP002508133, ISSN: 0022-538X	1-7, 10, 13-39
Y	le document en entier, particulièrement fig. 1 ----- -/-	8, 9, 11, 12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 janvier 2011

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/02/2011

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lüdemann, Susanna

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2010/052006

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DE GASSART A ET AL: "Exosomal sorting of the cytoplasmic domain of bovine leukemia virus TM Env protein", CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, ACADEMIC PRESS, GB LNDK- DOI:10.1016/J.CELIBI.2008.10.001, vol. xx, 1 janvier 2008 (2008-01-01), pages 1-13, XP002508299, ISSN: 1065-6995 [extrait le 2008-10-01] Le document en entier, particulièrement p.8, 9 and fig's 1, 8 and 9. -----	1-7,10, 13-39
Y	REUTHER G W ET AL: "Analysis of function and regulation of proteins that mediate signal transduction by use of lipid-modified plasma membrane-targeting sequences", METHODS IN ENZYMOLOGY 2000 US LNDK- DOI:10.1016/S0076-6879(00)27288-1, vol. 327, 2000, pages 331-350, XP009132699, ISSN: 0076-6879 Le document en entier, particulièrement fig. 1 -----	8,9,11, 12
Y	SILVERMAN LAUREN ET AL: "Lysine residues form an integral component of a novel amino-terminal membrane targeting motif for myristylated pp60-v-src", JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 119, no. 2, 1992, pages 415-425, XP002579784, ISSN: 0021-9525 Le document en entier, particulièrement tableau 1 -----	8,9,11, 12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2010/052006

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009115561 A1	24-09-2009	CA 2718868 A1 EP 2268816 A1 FR 2928926 A1	24-09-2009 05-01-2011 25-09-2009