

Université de Montréal

**L'expression de la protéine de l'hémochromatose HFE est modulée par les
lymphocytes T activés et inhibe la présentation antigénique par MHC I**

par
Alexandre Reuben

Programme de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Sciences Biomédicales

2013

© Alexandre Reuben, 2013

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

L'expression de la protéine de l'hémochromatose HFE est modulée par les lymphocytes T activés et inhibe la présentation antigénique par MHC I

Présentée par:

Alexandre Reuben

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Francis Rodier, président-rapporteur

Dr. Réjean Lapointe, directeur de recherche

Dr. Manuela M. Santos, co-directrice de recherche

Dr. Woong-Kyung Suh, membre du jury

Dr. Claude Daniel, examinateur externe

Dr. Isabelle Royal, représentante de la doyenne

Résumé

La présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) I est un processus ubiquitaire permettant la présentation de protéines endogènes qui reflètent l'état de la cellule à la surface cellulaire aux lymphocytes T CD8⁺ dans le contexte de la surveillance et la réponse immunitaires. Ainsi, l'expression des molécules du MHC I classiques est induite en réponse aux stimuli inflammatoires afin de favoriser la reconnaissance immunitaire et l'élimination des pathogènes. HFE est une molécule du MHC Ib non-classique qui sert de régulateur négatif de l'absorption du fer. HFE est associé au développement de l'hémochromatose héréditaire (HH), maladie associée au métabolisme du fer mais souvent accompagnée de défauts immunitaires. Ainsi, nous avons en premier lieu étudié l'impact de HFE sur la présentation antigénique par MHC I, afin d'expliquer en partie les défauts immunitaires liés à l'HH associée à HFE_{C282Y}. Puis, compte tenu de l'impact de l'inflammation sur l'expression des molécules du MHC I classiques, nous avons étudié la régulation de l'expression de HFE en réponse aux stimuli inflammatoires induits par les cellules du sang périphérique mononucléées (PBMC).

Nous avons mis au point un système d'expression antigénique dans lequel nous contrôlons l'expression de MHC I, de HFE et d'un antigène pour lequel nous avons généré des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques. Nos résultats démontrent que la forme sauvage de HFE (HFE_{WT}), contrairement à sa forme mutée (HFE_{C282Y}), inhibe la reconnaissance de complexes MHC I/peptide (pMHC).

Nous avons également démontré que l'inhibition de la reconnaissance est maintenue, indépendamment des niveaux d'expression de MHC I à la surface, d'une compétition pour la β 2-microglobuline, de la capacité de HFE d'interagir avec le récepteur de la transferrine, de l'origine de l'antigène ou de l'affinité de celui-ci. Par ailleurs, nous avons identifié les domaines α 1-2 de HFE_{WT} comme étant responsables de l'inhibition de la reconnaissance antigénique. Par contre, la reconnaissance de peptides chargés de manière externe sur les molécules du MHC I présentes à la surface n'a démontré aucune inhibition en présence de HFE_{WT}, suggérant que HFE_{WT} pourrait affecter la reconnaissance en interférant avec le processus d'apprêtement antigénique intracellulaire.

À l'inverse, nous avons souhaité déterminer si les lymphocytes T activés pouvaient influencer les niveaux d'expression de HFE. En termes de régulation de l'expression de HFE, nous avons établi que HFE est exprimé dans les tissus sains chez l'humain et induit chez les lignées de cancers du colon, du sein, du poumon, du rein et du mélanome. Par ailleurs, en co-cultivant des lymphocytes T activés avec ces lignées tumorales, nous avons démontré que l'expression de HFE est fortement inhibée dans toutes ces lignées tumorales lorsqu'exposées à des lymphocytes T activés. Finalement, la modulation de l'expression de HFE est indépendante du contact cellulaire et semble médiée en partie par le GM-CSF, l'IFN- γ et le TNF.

En somme, ces résultats suggèrent que les lymphocytes T de l'hôte modulent l'expression de HFE dans le microenvironnement inflammatoire, ce qui pourrait promouvoir la reconnaissance des antigènes présentés sur les molécules du MHC I présentées aux lymphocytes T CD8⁺ antigène-spécifiques. De plus, ces études soulèvent la possibilité d'un

nouveau rôle physiologique de HFE_{WT} dans la voie de présentation antigénique par MHC I, qui pourrait moduler l'immunogénicité des antigènes et la réponse immunitaire cellulaire chez l'hôte.

Mots clefs

HFE

Hémochromatose héréditaire

MHC I

Présentation antigénique

Apprêtement antigénique

Abstract

MHC class I antigen presentation is an ubiquitous process by which cells present endogenous proteins to CD8⁺ T lymphocytes during immune surveillance and response. Accordingly, classical MHC I molecules are up-regulated in response to inflammatory stimuli to favor immune recognition and pathogen clearance. HFE is a non-classical, MHC Ib molecule which acts as a negative regulator of iron absorption. HFE has been linked to the development of hereditary hemochromatosis (HH), an iron overload disease often associated to immune defects. Firstly, we studied the impact of HFE expression on MHC I antigen presentation, as a hypothesis for HH-associated immunological defects observed in HFE_{C282Y}-mutated HH patients. Secondly, we evaluated whether, like its classical MHC I counterparts, HFE expression could be modulated in response to peripheral blood mononuclear cell (PBMC) inflammation.

We developed an antigen presentation system in which we control MHC I expression, HFE expression, and expression of a model antigen for which we have generated antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes. Our results demonstrate that wild-type HFE (HFE_{WT}), but not C282Y-mutated HFE (HFE_{C282Y}), inhibits recognition of MHC I antigens. We further demonstrate that inhibition of antigen recognition is maintained regardless of MHC I surface levels, β 2-microglobulin competition, HFE ability to interact with transferrin receptor, antigen origin, or epitope affinity. We identified the α 1-2 domains of HFE_{WT} as being responsible for inhibiting antigen recognition. However, recognition of externally peptide-pulsed 293-A2 remained uninhibited in presence of HFE_{WT}, indicating that HFE may affect T cell recognition by interfering with intracellular antigen processing.

We also questioned whether activated T lymphocytes may influence HFE expression. We established that HFE is widely expressed in healthy human tissues and induced in colon cancer, breast cancer, lung cancer, kidney cancer and melanoma cell lines. Furthermore, HFE mRNA expression was drastically inhibited in all tumor cell lines when exposed to activated T lymphocytes. Down-regulation of HFE mRNA expression was independent of cell contact and appears to be partially mediated by GM-CSF, IFN- γ , and TNF.

Overall, these data suggest that host T lymphocytes may alter HFE expression levels in the inflammatory microenvironment, which could, in turn, promote recognition of MHC I antigens presented to antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes. Accordingly, this could suggest a new physiological role for HFE_{WT} in the MHC I antigen presentation pathway, which could modulate antigen immunogenicity and the cellular immune response.

Keywords

HFE

Hereditary hemochromatosis

MHC I

Antigen presentation

Antigen processing

Table des matières

Pages liminaires

Résumé.....	iv
Mots clefs	vii
Abstract.....	viii
Keywords	x
Table des matières.....	xi
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xiv
Liste des abréviations	xvii
Dédicace	xxi
Remerciements	xxii
SECTION I.....	1
1. Objectif général et structure	2
2. Introduction.....	3
3. Métabolisme du fer	5
3.1 HFE.....	7
3.2 Hémochromatose héréditaire (HH).....	14
4. Présentation antigénique	17
4.1 Les composantes de la présentation antigénique par MHC I.....	20
4.2 Voie de synthèse <i>de novo</i> et de présentation des molécules du MHC I	28
4.3 Activation primaire et secondaire des lymphocytes T CD8 ⁺	40
4.4 Régulation de la présentation antigénique par MHC I.....	41
4.5 Les molécules du MHC I sont ciblées par différents agents infectieux.....	42
4.6 Le variant allélique du MHC I - HLA-A2	43
5. Relation entre le métabolisme du fer et le système immunitaire.....	44
6. HFE et la voie de présentation antigénique par MHC I.....	45
7. Raisonnement	46
8. Hypothèse.....	47
9. Objectifs du projet de doctorat.....	49
SECTION II	50
1. Article I: Impact de HFE sur la présentation antigénique par MHC I.....	50
2. Figures supplémentaires.....	86
3. Résultats supplémentaires.....	94
SECTION III.....	109
Article II: Modulation de l'expression de HFE par les lymphocytes T activés.....	109
SECTION IV	132

1. Discussion	133
1.1 Retour sur les résultats de notre étude	138
1.2 Origine, dissémination et sélection de la mutation HFE _{C282Y}	141
1.3 Portée des résultats et spéculation.....	145
2. Perspectives	155
3. Conclusion	170
4. Modèle	172
5. Références	174
6. Annexes	193

Liste des tableaux

Tableau 1. Sommaire du comportement de HFE.....	136
--	-----

Liste des figures

SECTION I

Figure 1. Structure de HFE.	8
Figure 2. Schématisation de la liaison de HFE et de ses deux ligands, les TfR1 et 2.	9
Figure 3. Le cycle de captation du fer par le TfR1.	10
Figure 4. Localisation des mutations de HFE.	12
Figure 5. Homéostasie systémique du fer.	13
Figure 6. Voies de présentation antigénique par MHC I et MHC II.	19
Figure 7. Synapse immunologique entre la APC et le lymphocyte T CD8 ⁺	27
Figure 8. Schématisation des étapes impliquées dans la voie classique de présentation antigénique par MHC I.	39
Figure 9. Activation primaire et secondaire des lymphocytes T CD8 ⁺	41
Figure 10. Les protéines MHC I et HFE empruntent une voie semblable.	48

SECTION II

Figure 11 (1^{ml}). The 293-A2 antigen presentation system.	78
Figure 12 (2^{ml}). HFE abrogates CD8 ⁺ T lymphocyte activation in response to HLA-A2 antigens.	79
Figure 13 (3^{ml}). The α 1-2 domains of HFE _{WT} are required for inhibition of CD8 ⁺ T lymphocyte activation.	80
Figure 14 (4^{ml}). HFE interference with CD8 ⁺ T lymphocyte activation affects the secretion of a broad spectrum of soluble factors.	81
Figure 15 (5^{ml}). Inhibition of CD8 ⁺ T lymphocyte activation by HFE _{WT} is independent of HLA-A2 and β 2-m expression levels.	82
Figure 16 (6^{ml}). HFE suppression of CD8 ⁺ T lymphocyte activation is not mediated by its interaction with TfR.	83
Figure 17 (7^{ml}). HFE blocks CD8 ⁺ T lymphocyte activation in response to low- and high-affinity epitopes to the same extent.	84
Figure 18 (8^{ml}). HFE _{WT} inhibition of CD8 ⁺ T lymphocyte activation is independent of internal antigen processing.	85
Figure 19 (S1^{ml}). Titration of HFE plasmid in T cell antigen recognition mediated by HLA-A2.	87
Figure 20 (S2^{ml}). HFE inhibits T cell antigen recognition mediated by HLA-A2 in MelS-FB melanoma cells.	88

Figure 21 (S3^{m1}) . HFE must be expressed in <i>cis</i> of antigen to affect CD8 ⁺ T lymphocyte activation.....	89
Figure 22 (S4^{m1}) . MHC I surface expression is restored by β 2-m co-transfection.....	90
Figure 23 (S5^{m1}) . HFE _{WT} does not alter the expression of MHC I chaperones involved in the peptide loading complex.....	91
Figure 24 (S6^{m1}) . MHC I glycosylation is unaffected by HFE _{WT}	92
Figure 25 (S7^{m1}) . Transfection efficiency in 293-A2.	93
Figure 26 . Le contrôle HLA-A*0101 n'inhibe pas la reconnaissance.	96
Figure 27 . Titration de plasmides encodant gp100 ou pour le minigène gp100 ₂₀₉₋₂₁₇	97
Figure 28 . Niveaux d'expression des mRNA encodant la β 2-m dans des cellules 293-A2 en présence de HFE.	98
Figure 29 . Niveaux d'expression des mRNA encodant les chaperones impliquées dans l'apprêtement antigénique par MHC I dans des cellules 293-A2 en présence de HFE. ...	99
Figure 30 . HFE _{WT} ne cause pas d'UPR.	100
Figure 31 . Co-immunoprécipitation de certaines chaperones impliquées dans l'apprêtement antigénique par MHC I en compagnie de HFE.....	103
Figure 32 . HFE n'altère pas les niveaux d'expression des chaînes lourdes HLA-ABC non-liées à la β 2-m.	105
Figure 33 . HFE n'affecte pas l'activation des lymphocytes T CD8 ⁺ en réponse aux peptides chargés à la surface cellulaire.	106
Figure 34 . Voies de présentation antigénique par MHC I étudiées.	108

SECTION III

Figure 35 (1^{m2}) . HFE is ubiquitously-expressed in healthy human tissues but induced in cancer cell lines.....	126
Figure 36 (2^{m2}) . Endogenous tumor-derived HFE expression is inhibited by activated PBMC in multiple cancer cell lines.	127
Figure 37 (3^{m2}) . Inhibition of HFE expression by activated PBMC is contact-independent.	128
Figure 38 (4^{m2}) . HFE down-regulation in tumor cells is mediated by both CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T lymphocytes.	129
Figure 39 (5^{m2}) . Activated CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T lymphocytes produce numerous soluble mediators.....	130
Figure 40 (6^{m2}) . Modulation of HFE expression in KTCL-140 cells is mediated by GM-CSF, IFN- γ , and TNF.....	131

SECTION IV

Figure 41. Variants et contrôles HFE employés dans notre étude et liaison avec le Tfr1....	135
Figure 42. Étapes impliquées dans la voie classique de présentation par MHC I.	137
Figure 43. Modélisation de l'effet des variants de HFE sur l'influx de fer ainsi que sur la présentation antigénique par MHC I.	147
Figure 44. HFE _{WT} inhibe la reconnaissance par les lymphocytes T CD8 ⁺ sans altérer l'activité des cellules NK.	149
Figure 45. Proposition de variants de HFE à tester afin d'établir le domaine et le mécanisme responsables de l'inhibition de la présentation antigénique par MHC I.	159
Figure 46. Le transport de HFE jusqu'à la surface cellulaire n'est pas responsable de l'inhibition de la reconnaissance sur MHC I par HFE.	160
Figure 47. HFE _{WT} n'affecte pas la présentation croisée par voie vacuolaire de l'antigène M1 ₅₈₋₆₆ sur MHC I.	161
Figure 48. Variants d'épissage de HFE décrits dans la littérature actuelle.	163
Figure 49. Modèle d'action de HFE dans la réponse immunitaire.	173

Liste des abréviations

ACD - Anemia of chronic disease

ADP/ATP - Adenosine diphosphate/Adenosine triphosphate

(p)APC - (professional) Antigen-presenting cell

ARF-6 - ADP-ribosylation factor-6

β 2-m - Beta2-microglobulin

BAP31 - B cell associated protein-31

BiP - Immunoglobulin-binding protein

CatS - Cathepsin S

CLIP - MHC II invariant chain-associated peptide

CMV - Cytomegalovirus

CNX - Calnexin

COOH - Carboxyterminal

COPII - Coat protein II

CRT - Calreticulin

CT - Cytoplasmic domain

DC - Dendritic cells

DMT-1 - Divalent metal transporter-1

DRiP - Defective ribosomal product

EAE - Experimental autoimmune encephalomyelitis

ER - Endoplasmic reticulum

ERAP - ER-associated aminopeptidase

ERp57 - Endoplasmic reticulum protein-57

GI/GII - Glucosidase I/II

Glu - Glucose

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

GVHD - Graft versus host disease

HFE - Hemochromatosis protein (**H**emochromatosis, **Fe**)

HFE_{C282Y} - HFE with cysteine-282 mutated to a tyrosine

HFE_{H63D} - HFE with histidine-63 mutated to an aspartic acid

HFE_{V100A} - HFE with valine-100 mutated to an alanine

HFE_{WT} - Wild-type HFE

HH - Hereditary hemochromatosis

HIV - Human immunodeficiency virus

HLA - Human leukocyte antigen

HSV - Herpes simplex virus

IFN- γ - Interferon-gamma

IL - Interleukin

IS - Immunological synapse

KKMP - Lysine - Lysine - Methionine - Proline

LPS - Lipopolysaccharide

M ϕ - Macrophages

Man - Mannose

MHC - Major histocompatibility complex

MHC I - MHC class I

MHC II - MHC class II

MIP-1 β - Macrophage inflammatory protein 1-beta

miRNA - MicroRNA

mRNA - Messenger RNA

MS - Multiple sclerosis

NAc - N-acetylglucosamine

NBD - Nucleotide-binding domain

NH₂ - Amino-terminal

NTBI - Non transferrin-bound iron

OST - Oligosaccharyl transferase

OVA - Ovalbumin

PapMV - Papaya mosaic virus

PBMC - Peripheral blood mononucleated cells

PLC - Peptide-loading complex

pMHC - MHC I-peptide complex

Poly I:C - Polyinosinic:polycytidylic acid

RA - Rheumatoid arthritis

REC - Reticulo-endothelial cells

SLC11A1/Nramp1 - Natural resistance-associated macrophage protein-1

SRP - Signal sequence recognition particle

SS - Signal sequence

SSP - Signal sequence protease

TAP - Transporter associated with antigen processing

TBI - Transferrin-bound iron

TCR - T cell receptor

Tf - Transferrin

TfR1 - Transferrin receptor 1

TfR2 - Transferrin receptor 2

TLR - Toll-like receptor

TM - Transmembrane domain

TNF - Tumor necrosis factor

TPN - Tapasin

TPPII - Tripeptidyl peptidase II

UGT-1 - UDP glucuronosyltransferase-1

UPR - Unfolded protein response

To Keith & Michèle.

Remerciements

Cette section est facilement celle dont je suis le moins fier. Les personnes ayant contribué à mon cheminement scientifique et à ma vie personnelle sont trop nombreuses pour être énumérées et il m'est malheureusement impossible de verbaliser adéquatement leur apport et à quel point je leur suis reconnaissant. Je m'en excuse d'avance, et les remercie.

Tout commence avec Réjean. Réjean, j'ai énormément appris de toi. Je te remercie de ton attitude optimiste, et de ta passion pour la science et pour tes projets, c'est contagieux et ça motive tes étudiants. Je te remercie d'avoir pris la chance de m'engager il y a sept ans, quand ton labo avait grandement besoin de testostérone, et je te remercie d'avoir été patient avec moi. J'ai beaucoup appris de toi et je t'en serai éternellement reconnaissant.

Manuela, I'm extremely lucky to have had the chance to work with you. You have no idea how much I've learned from you in presenting, writing papers and grants, and planning experiments. I'm extremely grateful for the opportunity you gave me in hiring me, and I wish to thank you for your patience throughout my studies, and for giving me the opportunity to work for you seven years ago.

Merci à mon labo paternel. J'ai été accueilli dès mon arrivée par Jessica et Marie-Andrée, qui m'ont enseigné presque toutes les techniques que je maîtrise et qui sont d'excellentes formatrices. Merci de votre patience et de votre instruction. Merci d'avoir eu le sens de l'humour et de vos encouragements et de votre support. Merci de m'avoir montré que "doctorat" n'est pas nécessairement synonyme de "maturité". J'ai également eu la chance de bénéficier de l'expertise de Dominique. Merci d'avoir appris à tolérer mon sens de l'humour, Dominique, ainsi que pour ta patience. Paméla, merci de tout, tout, tout ce que tu as fait et continues à faire pour moi et pour le reste du labo, souvent même à ton propre détriment. Le labo sera en bonnes mains tant que tu en feras partie. Merci de ton support, et de m'avoir écouté quand j'en avais besoin. Finalement, merci aux membres du labo, passés et présents. Stéphanie, David, Anne, Nadia, je suis content que vous fassiez partie du labo.

Laïla et Cécile, j'ai l'impression qu'on a fait tout notre cheminement ensemble et qu'on a traversé toutes les étapes cruciales ensemble. Ça m'a permis de partager le fardeau avec vous dans les moments un peu plus difficiles et j'espère que vous vous êtes également senties ainsi. Je vous aime et j'ai énormément d'admiration et de respect pour vous. Je suis extrêmement fier de vous, et je suis heureux d'avoir pu partager notre cheminement. Merci de votre support et de vos encouragements inconditionnels.

Merci à mon labo maternel. I was initially welcomed by Sanae, Dongmei and Hua. They were extremely supportive, patient, and understanding and I am very thankful. Thank you Hua and Antonio for sharing our struggles and successes. Merci aussi Annie et Gabriela, de m'avoir trop souvent aidé avec mon projet avec trop peu en échange. Also, thank you to Edward, who was very helpful in sharing his feedback and experience.

D'un point de vue scientifique, je veux aussi remercier Jean-François Cailhier et Marie-Joëlle. JF, ton attitude est rafraichissante dans un monde où les gens peuvent parfois se prendre trop au sérieux et tes conseils m'ont été extrêmement bénéfiques. Merci aussi à Simon Turcotte et à Sandy pour leurs conseils et leur support et de s'être joints à notre équipe avec leurs expertises respectives. Finalement merci au labo Stagg. Nous avons beaucoup bénéficié de votre arrivée au CRCHUM. Particulièrement John et Sandra, vous avez beaucoup profité à mon projet, en portant un regard nouveau sur un projet qui, à l'époque, stagnait devant certains obstacles. Merci aussi d'avoir pris un intérêt personnel en ma situation et en mon succès, votre aide m'est immesurable.

Merci à mon comité de suivi de doctorat: Alexandre Prat, Claude Perreault et Jean-François Cailhier, d'avoir su voir mon projet à la fois pour ce qu'il était et pour ce qu'il pouvait être et d'avoir été sévère, mais juste. Je vous en suis reconnaissant.

Merci à Mikaël, mon seul et unique stagiaire, d'avoir fait grandement avancer notre projet. Merci d'avoir su t'intégrer et d'avoir pris plaisir à travailler parmi nous et avec moi. Merci d'avoir été patient avec moi pendant que j'apprenais à diriger à tes dépens.

Merci à Daniel Lajeunesse, directeur du programme de Sciences biomédicales à l'Université de Montréal, d'avoir toujours été accessible, disponible et agréable.

Nous avons la chance de faire partie de l'ICM financièrement, socialement et scientifiquement. On peut y collaborer, communiquer, socialiser, emprunter des réactifs et partager nos expertises. Merci Maral et Anne-Marie de votre travail acharné dans le but de nous permettre une ressource et un environnement tels l'ICM. Merci Nathalie et Julie.

D'un point de vue personnel, merci Julie, d'avoir été une super amie durant mon passage à l'ICM, de m'avoir supporté à bien des reprises, de ta bonne humeur contagieuse et de tes hugs. Merci d'avoir toujours été prête à me donner de ton temps.

Merci aussi à tous les membres de l'ICM, qui m'ont aidé, supporté, fait rire, boire et fêter. Un merci tout particulier à toi, Yannick, d'avoir été aussi attentionné et encourageant et

d'être devenu un bon ami. Merci également à Gany pour ton support et d'avoir été aussi chaleureuse à mon égard.

En plus du support scientifique, j'ai bénéficié d'un support exceptionnel sur le plan personnel. Merci Jimmy, Piotr, Vlad, Raph, Nicolas. Je suis chanceux de vous avoir dans ma vie et d'avoir pu compter sur vous quand j'en avais besoin. Merci de votre support, de votre compréhension, de vos encouragements, de votre divertissement. Merci d'être là pour moi et d'être vous. Je vous aime.

Jessica, je ne crois pas ma chance de t'avoir rencontrée: t'es une personne absolument exceptionnelle. T'es une perle et je te remercie d'avoir été aussi extraordinaire depuis notre première rencontre. Je m'excuse de t'avoir fait subir ma dernière année. Tu m'as supporté sans cesse, inconditionnellement et je t'en serai toujours reconnaissant. Merci d'avoir accepté d'être dans ma vie et d'être toi. Je t'aime.

Merci à ma famille, mes cousins, cousines, oncles, tantes, grands-mères et grands-pères. Merci de votre support, de votre amour et de vos encouragements. Je suis reconnaissant d'avoir hérité d'une famille aussi extraordinaire. Je vous aime. Thank you to my family, cousins, uncles, aunts, grandmothers and grandfathers. Thank you for your support, love and encouragements. I am thankful to have inherited such an extraordinary family. I love you.

Finally, thank you to Keith and Michèle, my parents. Difficult to put into words all you've done for me, all you represent and how thankful I am. Thank you for your support, encouragements, advice, and for following with interest everything I have undertaken in academia as much as in athletics. You've always allowed me to confront any challenge knowing you're fully behind me. I have always been able to count on you, and I will never be capable of properly expressing my gratitude and appreciation. I love you. Thank you, thank you, thank you.

Merci à Keith, Michèle, Réjean, Manuela, Marie-Andrée, Jessica, Cécile, Laïla, Jean-Daniel, Dominique, Urszula, Stéphanie, Philippe, Julie, Hua, Antonio, Gabriela, Edward, Simon, Jason, Annie, Jean-Baptiste, Michael, Institut du Cancer de Montréal, Nicolas, Piotr, Jimmy, Université de Montréal, Vlad, Raph, Véronique, Manon, Yannick, Gany, Maxime, David, François, Kapil Mehta, Audrey, Nellie, Frannie, Danielle, Arsène, Hervé, Rose, Florence, Vincent, Carole, Kenneth, Andrew, Kristopher, Xavier, Grands Frères et Grandes Soeurs du Grand Montréal, Kimberly, Laura, Mira, Gary, Shirley, June, Jonathan, Anique, Jessica, Carmen, Jimmy, Jason, Derek, Jessica, Centre de Recherche du CHUM, Victor, Marie-Pier, Marina, Nomades de Laval, Johanna, Emma, Dani, Pogos Rancuniers de la Rive-Sud, Alexandre Prat, Claude Perreault, Jean-François, Marie-Joëlle, Dani, Xavier, Claude Daniel, Woong-Kyung Suh, Isabelle Royal, Francis Rodier, John, Maria, Bertrand, Guizmo, Martin, Sandra, Denis, Lise, Ahmit Verma, Denis, Anne-Marie Mes-Masson, Maral, Nathalie, Sabrina, Macha, Marco, Sanae, Valérie, Hector, Monique, Mélanie, Meriem, Paméla, Anne, Nadia, Véronique, Britney, Sandy, Dongmei, Hubert, Richard, Maral, Nathalie, Mikaël, Guerlain, Marie-Pier, Phyl, Vernon, Christophe, Kishu, Maxime, Alexia, Daniel Lajeunesse, Ingrid, International Bioiron Society, Christine, Kathleen, Raffick, Guillaume, et tous ceux que j'ai omis. Vous êtes nombreux et je m'en excuse.

SECTION I

Introduction, Objectifs et Hypothèse

1. Objectif général et structure

L'objectif général de ce projet de doctorat consiste à caractériser l'impact de la protéine de l'hémochromatose HFE, sur la présentation antigénique par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC I). La SECTION I décrit les connaissances entourant les voies de métabolisme du fer et de présentation antigénique par MHC I ainsi que les études antérieures permettant la mise en contexte de notre étude. La SECTION II est constituée d'un manuscrit caractérisant l'impact de HFE sur la présentation d'antigènes par MHC I, ainsi que plusieurs expériences visant à élucider le mécanisme en cause. La SECTION III est composée d'un deuxième manuscrit décrivant l'impact des lymphocytes T activés sur la régulation de l'expression de HFE dans des lignées de cancer. La SECTION IV comporte la discussion, les perspectives et la conclusion du projet, le modèle proposé ainsi que les permissions de reproduire les articles et figures publiés.

2. Introduction

Le corps humain déploie de multiples mécanismes afin de maintenir l'homéostasie métabolique [1]. De plus, le système immunitaire est d'importance primordiale puisqu'il assure la protection de l'organisme face aux infections bactériennes [2] et virales [3] et, jusqu'à un certain degré, face aux transformations malignes qui pourraient mener au développement de cancers [4]. Par ailleurs, plusieurs éléments métaboliques essentiels à l'être humain peuvent également bénéficier aux pathogènes qui tentent de l'infiltrer et de le coloniser [5]. Ainsi, les voies métaboliques, en plus de promouvoir la vie humaine, doivent freiner la prolifération et la persistance des pathogènes qui dépendent souvent des mêmes éléments essentiels que l'organisme [6]. De plus, le système immunitaire doit maintenir un tel équilibre en s'attaquant sans restriction aux corps étrangers tout en épargnant les cellules du soi, sous risque de développer des maladies auto-immunes qui pourraient avoir des conséquences davantage dévastatrices [7]. Les systèmes métabolique et immunitaire se doivent donc d'être finement régulés afin de profiter à l'hôte.

Certains liens ont été récemment établis entre la métabolomique et le système immunitaire, avec des découvertes telles celle de l'impact de la glycolyse sur la maturation et l'état d'activation des lymphocytes T [8, 9], principaux acteurs de l'immunité cellulaire adaptative. Par ailleurs, une altération de l'équilibre entre les populations lymphocytaires, comme les cellules natural killer T (NKT), peut avoir des répercussions majeures sur le métabolisme des cellules adipeuses [10], confirmant ainsi la relation étroite et bidirectionnelle entre les systèmes métabolique et immunitaire [11].

La protéine de l'hémochromatose (HFE) est une protéine à l'interface du métabolisme et de l'immunité, mais dont le rôle premier demeure d'agir comme régulateur négatif de l'absorption du fer dans l'intestin [12]. HFE peut aussi, lorsque muté, mener au développement d'une maladie nommée l'hémochromatose héréditaire (HH) [13]. Par contre, un lien direct entre HFE et le système immunitaire, bien que suggéré par l'abondance de défauts immunitaires identifiés chez les patients atteints d'HH [14, 15], n'a pas encore été démontré.

HFE fut initialement classifié parmi les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC I) chez l'humain sous le nom de HLA-H [13]. D'après la séquence d'ADN initiale, on croyait que HFE représentait une nouvelle molécule du MHC I classique impliquée dans la présentation d'antigènes au système immunitaire. Par contre, il fut vite déterminé que malgré son homologie structurale avec les molécules du MHC I [13], HFE était incapable de présenter des peptides en raison d'une niche peptidique trop étroite [16] et était plutôt impliqué dans le cycle de la transferrine (Tf) et de la captation du fer par son récepteur 1 (TfR1) [16].

La présente thèse vise donc à établir l'impact de HFE sur la présentation antigénique par MHC I, ainsi qu'à mieux comprendre la régulation de l'expression de HFE en réponse aux stimuli inflammatoires induits par les lymphocytes T.

3. Métabolisme du fer

Tous les organismes vivants sont dépendants de la présence du fer [17]. Par contre, la dualité de l'impact de cet élément conférée par sa grande toxicité [18] ainsi que l'incapacité de l'être humain à l'excréter de manière efficace [19], impose l'existence d'un système excessivement délicat et complexe assurant sa régulation.

La distribution du fer dans l'organisme peut dépendre de plusieurs facteurs comme l'âge, la nutrition et l'état de santé général de la personne [20]. Chez les enfants, les réserves de fer sont relativement limitées, mais s'accroissent avec l'âge à partir de l'adolescence, alors que les femmes maintiennent des réserves stables jusqu'à la ménopause [21]. Bien que la forte majorité du fer soit employée pour l'érythropoïèse qui permet le transport d'oxygène à travers l'organisme [17], celui-ci circule aussi dans le sang afin d'approvisionner toutes les cellules de l'organisme. Sur les 35 à 45 mg de fer présents chez l'adulte, seuls 1-2 mg sont ingérés, perdus à chaque jour [22-24] et remplacés par le fer issu de l'alimentation dans le duodénum: la forte majorité du fer utilisé pour l'érythropoïèse provient du recyclage de fer extrait d'érythrocytes défunts par les macrophages (M ϕ) [25].

Le fer est principalement absorbé dans le duodénum et peut provenir de son ingestion sous forme d'hème (présent dans la viande) ou de non-hème (*via* les plantes et les produits laitiers); la majorité du fer ingéré à chaque jour l'est sous forme de fer "non-hème". Le fer pénètre les entérocytes présents dans le duodénum avant de traverser la paroi en brosse de ces cellules.

Puis, le fer dans les entérocytes est transféré vers le sang *via* leur membrane basolatérale grâce au seul exporteur de fer connu: la ferroportine [22, 26, 27].

Une fois entré en circulation, le fer libre se lie à la Tf en circulation (TBI) et peut être internalisé grâce à l'interaction de la Tf avec son récepteur présent à la surface de toutes les cellules: le TfR1 [28]. Puis, lorsque relâché dans la cellule grâce au pH acide des endosomes, l'entreposage du fer s'effectue majoritairement sous forme de ferritine afin de diminuer sa toxicité, d'accroître sa stabilité et d'ainsi limiter sa capacité à générer des radicaux libres [17, 22].

Puisqu'il n'existe pas de mécanisme efficace d'excrétion du fer chez l'être humain [19], une très faible fraction de celui-ci est perdue à chaque jour dans les excréments et dans l'urine. Par contre, une forte proportion de fer peut être perdue lors du cycle menstruel chez la femme ou lors d'hémorragies [29].

TfR1

Le TfR1 est exprimé de manière ubiquitaire à la surface cellulaire et médie l'internalisation du fer circulant sous forme de TBI *via* l'endocytose couplée à un récepteur dans des puits de clathrine [30]. Suite à son internalisation, le TBI est relâché du TfR1 en raison du pH acide des endosomes [31], ce qui affecte l'affinité du complexe et permet l'export du TBI vers le cytosol *via* le transporteur de métaux divalent-1 (DMT-1), afin que celui-ci soit entreposé sous forme de ferritine [32]. Le complexe TfR1/Tf est alors recyclé vers la surface cellulaire afin de permettre la liaison à un nouveau complexe de TBI. Ce processus est actif dans la majorité des

cellules et constitue le mécanisme principal de captation du fer dans toutes les cellules de l'organisme.

TfR2

Le TfR2 est une protéine membranaire homologue à 45% au TfR1 et découverte en 1999 [33, 34]. Malgré des patrons d'expression et de distribution tissulaires limités aux hépatocytes et aux entérocytes, il fut déterminé que le TfR2 possédait une capacité semblable, bien que décrie comparativement au TfR1, à lier le TBI [33]. Par contre, le TfR2 réussit tout de même à internaliser le TBI dans les entérocytes et les hépatocytes [35]. Le TfR2 lie également HFE de par son domaine $\alpha 3$, contrairement au TfR1 qui lie le domaine $\alpha 1$ de HFE [36, 37].

3.1 HFE

3.1.1 Structure de HFE

Le gène HFE situé sur le chromosome 6p21.3, proche du locus HLA, résulte en la synthèse d'une protéine de surface transmembranaire (TM) de 343 acides aminés et 45 kDa, composée de trois domaines α qui lient la beta2-microglobuline ($\beta 2$ -m) (**Figure 1**) [38]. La structure de l'ectodomaine de HFE est fortement homologue à celle des molécules du MHC I, avec lesquelles elle possède 37% d'homologie [38, 39]. HFE possède également trois sites de glycosylation situés aux asparagines (N) présentes aux positions N-110, -130 et -234 [40, 41].

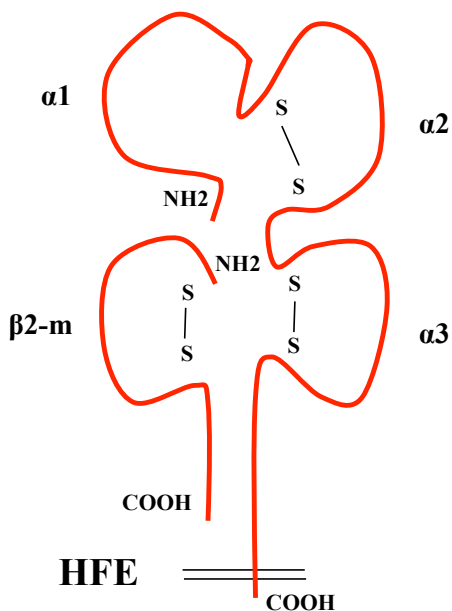


Figure 1. Structure de HFE.

HFE est composé d'une chaîne polypeptidique possédant trois domaines extracellulaires analogues aux domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des molécules du MHC I. La $\beta 2$ -m est une protéine dérivée d'un gène distinct qui interagit avec HFE de manière non-covalente au domaine $\alpha 3$, une caractéristique commune aux molécules du MHC I. La protéine HFE possède aussi un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique.

3.1.2 Fonction

HFE s'implique dans le métabolisme du fer en interagissant *via* son domaine $\alpha 1$ avec le TfR1 afin de réguler négativement son activité [16]. Par ailleurs, la découverte récente de l'existence du TfR2 permet d'établir que HFE interagit également avec celui-ci *via* son domaine $\alpha 3$ (**Figure 2**) [36].

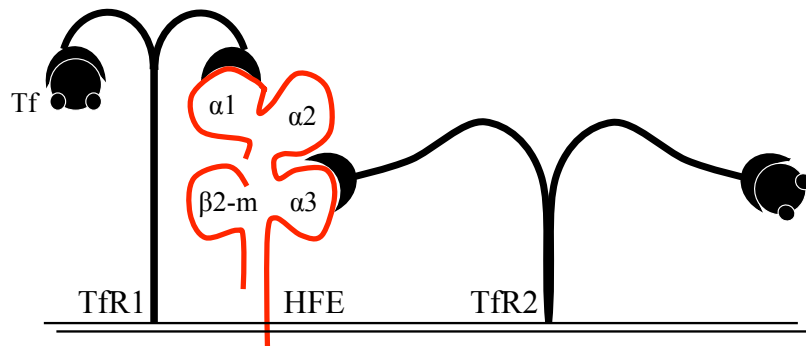


Figure 2. Schématisation de la liaison de HFE et de ses deux ligands, les TfR1 et 2.

HFE peut lier les TfR1 *via* son domaine $\alpha 1$ et TfR2 *via* son domaine $\alpha 3$. Les TfR1 et 2 peuvent par ailleurs lier la holotransferrine avec les mêmes sites utilisés pour lier HFE.

Par contre, la fonction première et la mieux documentée de HFE demeure son interaction avec le TfR1 à la surface cellulaire (**Figure 3**). Tel que décrit plus tôt, le TfR1 lie le TBI en circulation et permet son internalisation pour assurer l'approvisionnement de la cellule en fer, souvent emmagasiné sous forme de ferritine (non toxique) lors de son relâchement des endosomes *via* le transporteur DMT-1. L'expression de HFE à la surface cellulaire permet sa liaison au TfR1 au même site que le TBI, et permet ainsi sa régulation négative de la captation du fer à la surface cellulaire [16].

Ainsi, de par sa capacité à interagir avec les TfR1 et 2, HFE pourrait faire la navette entre ces deux complexes à la surface cellulaire [36]. En conditions d'absence de fer, HFE est lié au TfR1 à la surface cellulaire, laissant le TfR2 non-lié. Puis, une fois les concentrations de fer accrues, le TBI serait lié par le TfR1 de par son affinité accrue, libérant ainsi HFE et lui permettant d'interagir avec le TfR2. L'interaction de HFE avec le TfR2 servirait donc de "senseur" du métabolisme du fer, en induisant un signal qui résulte en la production d'hepcidine, peptide antimicrobien et principale hormone régulatrice du métabolisme du fer

[42]. La production d'hepcidine assure la dégradation de la ferroportine à la surface basolatérale des entérocytes [43] en plus de limiter leur captation du fer [44], inhibant ainsi l'influx de fer au niveau intestinal. Pareillement, la dégradation de la ferroportine par l'hepcidine au niveau des M ϕ empêche le recyclage du fer par ceux-ci, menant à l'accumulation du fer dans les M ϕ . En somme, ces réponses déclenchées par la réponse immunitaire innée peuvent mener au développement de l'anémie des maladies chroniques (ACD) [45], aussi nommée anémie fonctionnelle, car malgré la présence de fer dans le corps, celui-ci demeure inaccessible au processus d'érythropoïèse.

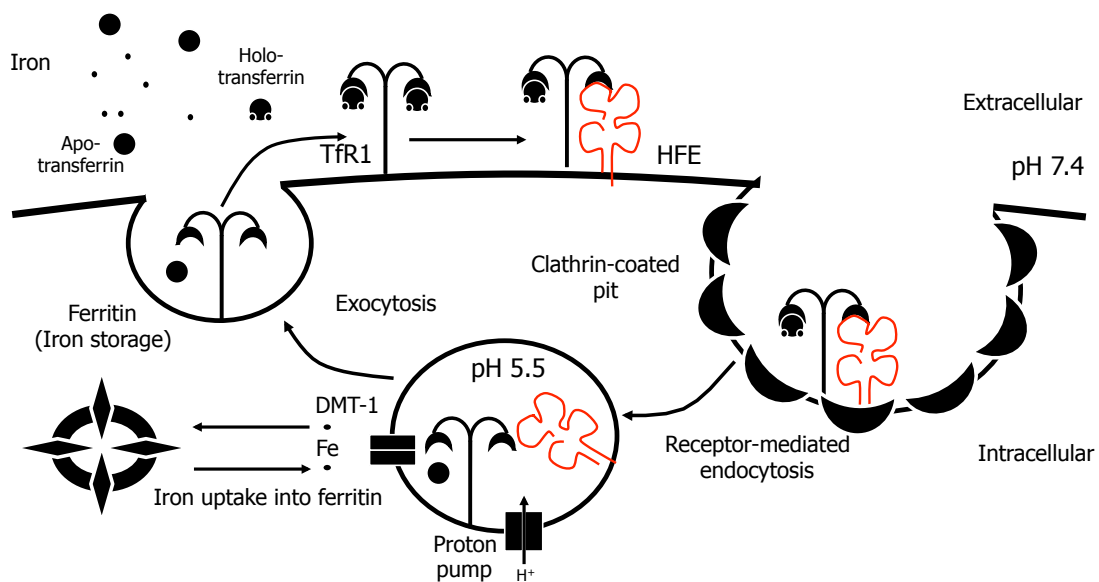


Figure 3. Le cycle de captation du fer par le TfR1.

Le TfR1 est situé à la surface cellulaire où il lie le TBI. HFE est également situé à la surface cellulaire et compétitionne avec le TBI afin de limiter sa liaison au TfR1. Puis, le complexe TfR1/TBI/HFE est internalisé par endocytose clathrine-dépendante avant que le TBI ne soit libéré du complexe dans les endosomes en raison du pH acide de 5.5. Le fer est ensuite exporté des endosomes vers le cytosol grâce au transporteur DMT-1 afin d'être entreposé et disponible sous forme de ferritine dans le cytosol.

3.1.3 Mutations de HFE

Plusieurs mutants de HFE ont été exploités afin d'étudier leur impact sur l'interaction de HFE avec le TfR1. Les mutations les plus prévalentes sont, par contre, HFE_{C282Y} et HFE_{H63D}, identifiées chez la forte majorité des patients HH [13, 16]. HFE_{WT} possède une forte affinité pour le TfR1, affinité qui peut être considérablement altérée lorsque certaines mutations apparaissent [16]. La protéine HFE compétitionne avec la Tf en circulation pour un même site de liaison sur le TfR1. Par contre, la Tf possède une affinité pour le TfR1 légèrement accrue comparativement à HFE_{WT}.

En ce qui concerne les mutations de HFE liées à l'HH, la mutation HFE_{C282Y} empêche la formation du pont disulfure situé dans le domaine $\alpha 3$ de la protéine HFE [16] et empêche donc son interaction avec la $\beta 2$ -m [46], ce qui nuit à la stabilité de la protéine [13, 47]. Puis, la chaîne lourde, incapable d'être correctement repliée, est marquée et rétrotransloquée vers le cytoplasme *via* le translocon Sec61, afin d'être dégradée par le protéasome [48]. La mutation HFE_{C282Y} empêche donc toute expression de surface de HFE [46] et ainsi, toute interaction avec le TfR1 et toute inhibition de la captation du fer subséquente [16].

La mutation HFE_{H63D} se situe dans le domaine $\alpha 1$ de la protéine HFE et n'affecte pas sa stabilité, puisque la protéine HFE_{H63D} lie la $\beta 2$ -m et est correctement exprimée à la surface cellulaire. Par contre, la substitution d'une histidine (H) pour un acide aspartique (D) affecte l'interaction de HFE avec le TfR1, ce qui décroît son affinité et limite la capacité de HFE_{H63D} à réguler négativement la captation du fer [16].

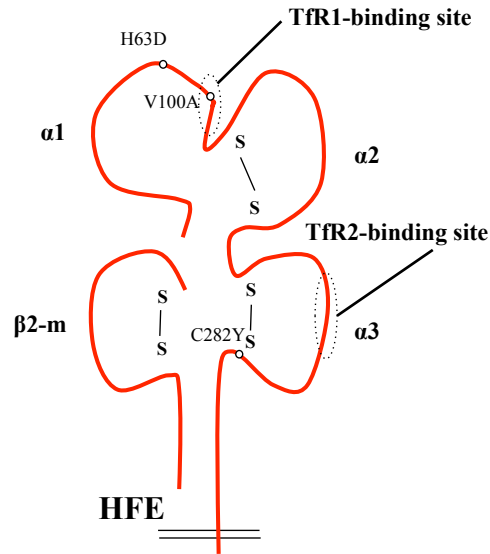


Figure 4. Localisation des mutations de HFE.

Emplacement des mutations clefs de HFE associées à l'HH (HFE_{H63D} et HFE_{C282Y}) ainsi que de la mutation synthétique HFE_{V100A} empêchant la liaison au Tfr1 [16].

Les mutations HFE_{R44E} , HFE_{W141A} et HFE_{P166V} ne sont pas retrouvées chez des patients mais présentent des affinités semblables à HFE_{H63D} *in vitro* [16]. La mutation HFE_{V100A} a démontré une affinité nulle pour le Tfr1, à l'image de la mutation HFE_{C282Y} , mais est exprimée à la surface cellulaire [16]. Par ailleurs, la mutation HFE_{W103A} présente une affinité similaire à HFE_{V100A} pour le Tfr1, soit 5000 fois moindre qu'avec HFE_{WT} [16]. Finalement, la substitution de la boucle des acides aminés 18 à 23 de HFE avec ceux du MHC I, ainsi que les mutations $HFE_{H87, 89, 94, 123S}$, confèrent des affinités décries de facteurs 19 et 17, respectivement [49]. Ceci semble suggérer que les résidus valine-100, tryptophane-103 et les acides aminés de la boucle 18 à 23 seraient impliqués dans la liaison au Tfr1. Par ailleurs, l'interaction de HFE avec le Tfr1 accroît sa constante de dissociation de la Tf d'un facteur 10 (**Figure 4**) [50].

Par contre, en plus d'affecter directement l'activité du TfR1 en s'y liant, HFE et ses mutants peuvent agir d'une multitude d'autres manières sur le métabolisme du fer, comme en modulant les niveaux d'expression de l'hepcidine par le foie afin d'altérer le relâchement du fer dans l'organisme (**Figure 5**) [51-53].

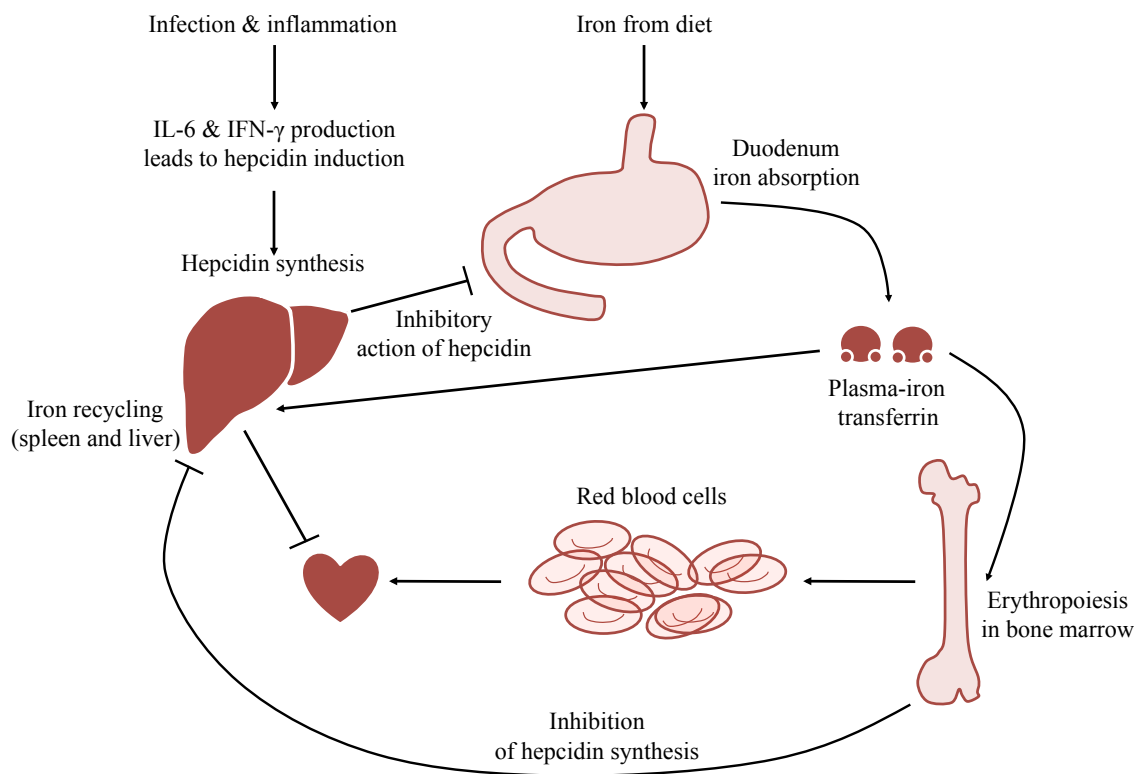


Figure 5. Homéostasie systémique du fer.

L'hepcidine inhibe l'absorption du fer dans le duodenum et le recyclage du fer par les M ϕ en empêchant l'export *via* la ferroportine. L'hepcidine est synthétisée dans le foie de manière accrue en réponse à des niveaux élevés de TBI dans le sérum. Le complexe HFE, TfR2 et hemojuveline (HFE2) semble responsable de cette régulation de l'hepcidine. L'hepcidine peut aussi être induite en réponse aux stimuli pro-inflammatoires par le lipopolysaccharide (LPS) et l'interleukine (IL)-6 (Adapté de [54]).

3.2 Hémochromatose héréditaire (HH)

L'HH est une maladie génétique transmise sous un mode autosomal récessif et causée par une surabsorption du fer dans l'intestin et par son emmagasinage dans certains organes essentiels comme le coeur, le foie et le pancréas qui peuvent en être irréversiblement endommagés. L'HH est la maladie génétique la plus commune au Canada et parmi les personnes d'origine caucasienne, avec une personne sur 300 atteinte [55-57]. La mutation HFE_{C282Y} est présente chez 1.9% de la population mondiale, avec une prévalence de 8.1% pour la mutation HFE_{H63D} [58]. L'HH se développe généralement chez les patients HFE_{C282Y}^{+/+} (environ 90% des cas) et chez les porteurs de la forme hétérozygote HFE_{C282Y}/HFE_{H63D} (5 à 10% des cas). Malgré la forte prévalence de ces mutations, les multiples facteurs impliqués dans le développement de l'HH confèrent une pénétrance relativement faible de cette maladie, même en présence des mutations prédisposantes. Chez la souris, la délétion de HFE (HFE^{-/-}) reproduit l'HH chez l'humain tout en générant des souris viables mais sujettes à une surabsorption et une surcharge de fer [59].

3.2.1 Développement de l'HH causé par la mutation HFE_{C282Y}

L'HH est causée par la mutation HFE_{C282Y} dans la forte majorité des cas (90%) [60]. Initialement, le fer non-lié à la Tf (NTBI) est internalisé par les entérocytes grâce à DMT-1, transporteur également impliqué dans le relâchement du fer des endosomes. Puis, le fer présent dans les entérocytes est libéré *via* la ferroportine vers la circulation sanguine. Par contre, la mutation HFE_{C282Y} cause une baisse de l'expression de l'hepcidine, ce qui signifie que la ferroportine (non-dégradée en raison de l'absence d'hepcidine) exporte le fer hors des

entérocytes sans retenue. Le fer se voit donc relâché vers la circulation sanguine à des niveaux plus élevés en présence de HFE_{C282Y}. Le NTBI dans la circulation sanguine est par la suite complexé par la Tf circulante pour former le TBI davantage stable, afin d'être internalisé par les cellules *via* le TfR1. Typiquement, le TfR1 est inhibé par HFE_{WT} afin de décroître l'influx de fer, mais en présence de HFE_{C282Y}, le TfR1 est libre d'internaliser le fer sans retenue ce qui cause une captation accrue de celui-ci (HFE_{C282Y} > HFE_{H63D} > HFE_{WT}).

De plus, l'influx accru de fer cause éventuellement une saturation de la Tf (TBI), ce qui mène à l'accumulation dans le sang de NTBI [61]. Le NTBI peut créer des radicaux libres (électrons libres sur la couche externe de l'atome) [62]. Ceci signifie que le fardeau de NTBI doit être entièrement assumé par des organes spécialisés comme le foie, le coeur et le pancréas capables de son internalisation [63], ce qui peut causer le développement de fibrose, de cirrhose et d'hépatocarcinome [64], de cardiomyopathie [65, 66] et du diabète [67]. Éventuellement, ces organes se voient complètement surchargés par le NTBI qui cause ensuite des dommages irréversibles et la destruction de ces organes souvent observée dans les cas avancés d'HH [68].

3.2.2 Diagnostic et traitement

L'HH demeure mal diagnostiquée. Malgré la simplicité des tests de diagnostic, des symptômes peu caractéristiques comme la fatigue, les douleurs aux articulations, ainsi que la faiblesse signifient que l'HH est souvent la dernière des pathologies diagnostiquées [69-71]. Par contre, une fois détectée, l'HH est relativement simple à contrôler et à traiter, si celle-ci n'est pas trop

avancée et si les dommages aux organes essentiels ne sont pas entamés. Malgré l'avancée des technologies, le traitement le plus efficace demeure la phlébotomie [71, 72].

La phlébotomie est une saignée permettant de diminuer la quantité de fer emmagasiné. Ce traitement consiste à faire subir des saignées d'une pinte (500 mL de sang \approx 200 mg de fer) aux patients atteints d'HH à toutes les semaines lors de la première année de traitement [73, 74]. Ces saignées causent une certaine anémie chez le patient par la perte de globules rouges, qui résulte en un relâchement compensatoire du fer accumulé dans les organes afin d'accroître l'érythropoïèse. Les niveaux de fer normaux sont donc éventuellement rétablis [72, 75]. Par contre, dans les cas d'HH liée aux mutations de HFE, le fer recommence à s'accumuler graduellement, ce qui impose que les saignées soient maintenues à fréquence réduite (d'une à deux fois par année). Ce traitement simple permet donc de ramener les niveaux de fer à des niveaux normaux, ainsi que de contrôler la progression de la maladie. Aucun remède n'existe, ce qui exige la poursuite du traitement pour le restant des jours de la personne atteinte. Certains traitements à base de chélateurs du fer existent aussi, mais semblent moins efficaces. Ceux-ci lient le fer et l'empêchent ainsi d'être absorbé et de générer des dommages aux cellules spécialisées [76].

L'HH est affectée par des facteurs comme l'âge, le sexe, l'alimentation, l'ingestion d'alcool, l'infection au virus de l'hépatite C, le don de sang et les pertes sanguines [77]. Ainsi, l'HH est davantage prévalente chez l'homme, tout en étant détectée plus tard chez la femme, après la ménopause, puisque les pertes sanguines associées au cycle menstruel lui servent de phlébotomies naturelles [78].

4. Présentation antigénique

L'importance des processus biologiques est illustrée par leur conservation entre les espèces et leur ubiquité intra-organisme. La présentation antigénique par MHC I est un mécanisme de surveillance actif dans tous les types de cellules nucléées chez l'être humain alors que celle par MHC II est limitée aux cellules présentatrices d'antigènes (APC). Ces processus sont extrêmement délicats: ils requièrent un équilibre parfait entre spécificité et promiscuité des antigènes qui peuvent être présentés sur une même molécule du MHC de manière stable et efficace [79].

Qu'est-ce que la présentation antigénique?

La présentation antigénique est un processus permettant la présentation à la surface cellulaire de peptides reflétant l'état de la cellule ou de son entourage sur les molécules du MHC I ou MHC II aux lymphocytes T CD8, ou CD4, respectivement. La présentation classique par MHC I permet la présentation de peptides dérivés de protéines endogènes, que celles-ci originent du soi, de virus ou de bactéries intracellulaires, ou de transformation maligne. Les protéines présentées sont digérées dans le cytosol par le protéasome, avant d'être acheminées vers le ER grâce au transporteur associé à la présentation antigénique (TAP) et d'être chargées sur les molécules du MHC I nouvellement synthétisées pour être transportées jusqu'à la surface cellulaire (**Figure 6**) [80]. La présentation classique par MHC II, quant à elle, permet la présentation de peptides dérivés de l'espace extracellulaire. Les protéines présentées sont générées grâce à la digestion d'antigènes endocytés par la APC grâce aux protéases présentes

dans les lysosomes comme la cathepsine S (CatS) [81]. Puis, ces endolysosomes fusionnent avec les vésicules contenant les molécules du MHC II associées au peptide de la chaîne invariable du MHC II (CLIP). Les molécules HLA-DM et HLA-DO présentes catalysent ensuite le remplacement de CLIP par les peptides générés par la CatS, afin de permettre le transport des molécules du MHC II chargées jusqu'à la surface cellulaire (**Figure 6**) [82].

Outre ces deux voies de présentation antigénique classiques, les APC sont dotées de la capacité à mettre en oeuvre d'autres types de présentation. La présentation croisée permet la présentation sur molécules du MHC I de peptides dérivés d'antigènes extracellulaires. Deux voies de présentation croisée ont été décrites et débutent par l'endocytose d'antigènes extracellulaires. La voie cytosolique requiert ensuite le passage de l'antigène vers le cytosol à partir de l'endosome, grâce au rétrotranslocon Sec61 et à l'ATPase p97 [83, 84]. Puis l'antigène est digéré grâce au protéasome et accède à la voie de présentation classique dans le ER grâce au transporteur TAP (**Figure 6**). La voie vacuolaire, quant à elle, est initiée par la fusion des endosomes avec des lysosomes porteurs de protéases comme la CatS, qui permettent la dégradation des antigènes en peptides. Puis, la fusion des endolysosomes avec les endosomes de recyclage contenant les molécules du MHC I permet le chargement de peptides exogènes sur celles-ci (**Figure 6**) [85]. Finalement, la macroautophagie d'antigènes endogènes fournit des antigènes aux lysosomes où ils peuvent être dégradés et fusionner avec les vésicules transportant les molécules du MHC II nouvellement synthétisées afin d'être chargées et transportées jusqu'à la surface cellulaire (**Figure 6**) [86].

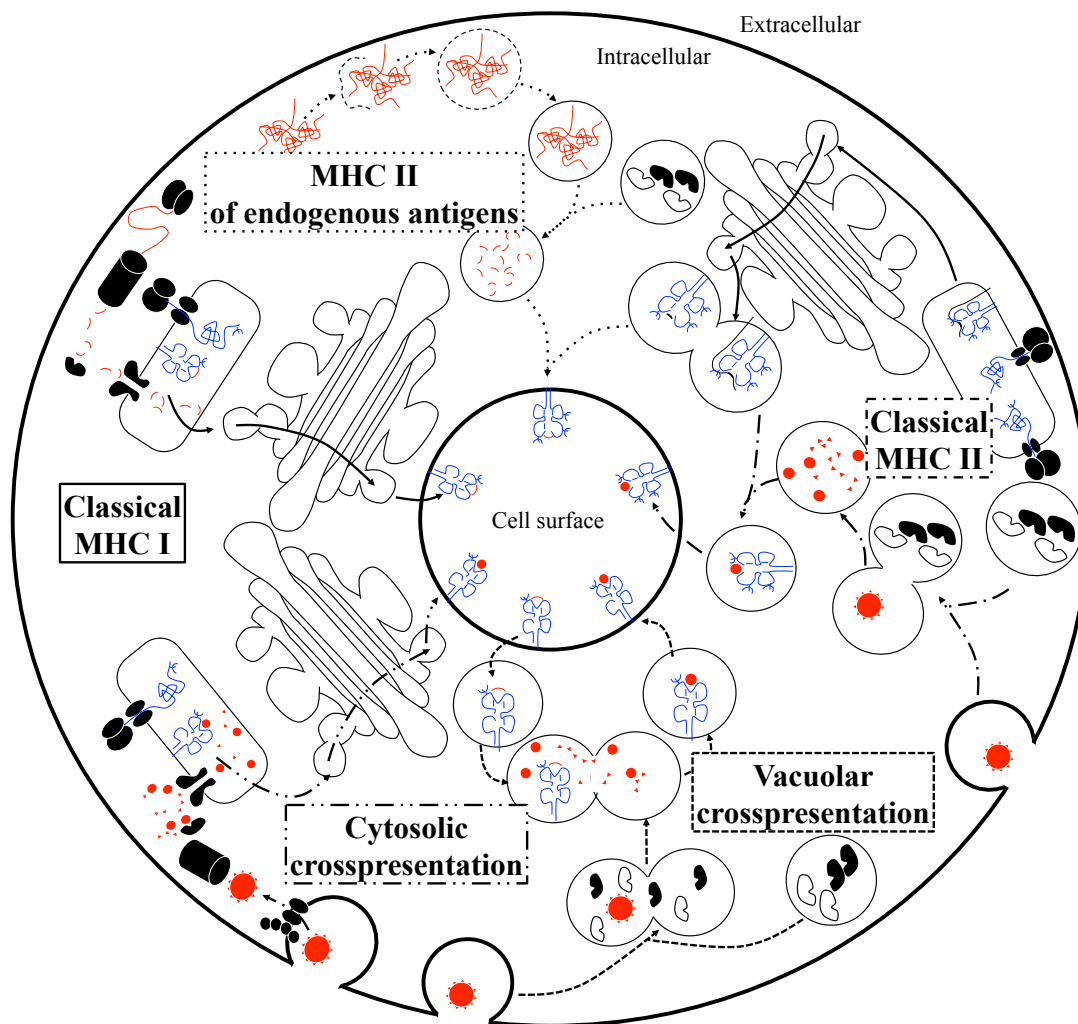


Figure 6. Voies de présentation antigénique par MHC I et MHC II.

Schématisation des principales voies de présentation antigénique par MHC I et MHC II classiques et croisées.

4.1 Les composantes de la présentation antigénique par MHC I

4.1.1 Les antigènes

Les antigènes présentés sur les molécules du MHC I y sont pour beaucoup dans l'efficacité de l'expression d'une molécule du MHC I et pour sa reconnaissance efficace par le système immunitaire. Ainsi, plusieurs études se sont penchées sur les caractéristiques des peptides présentés dans l'espoir de mieux comprendre ce processus essentiel. La présente section décrit brièvement les courants de pensée majeurs décrivant les antigènes présentés sur MHC I.

4.1.1.1 Sources d'antigènes présentés sur les molécules du MHC I

L'origine des protéines servant de bassin à la cellule pour la présentation antigénique peut varier selon l'état de la cellule. Les cellules victimes d'un stress du ER subissent une sélection des protéines du ER et une stabilisation des protéines cytosoliques [87], afin de libérer le ER des protéines qui le monopolisent et qui causent ce stress [87]. Par contre, à l'état d'équilibre, les protéines présentées par le MHC I peuvent provenir de tout compartiment cellulaire.

Certaines études des caractéristiques des protéines présentées sur MHC I divergent tout de même considérablement. Une chose demeure essentielle: la cellule infectée se doit de présenter, dans de courts délais, des peptides dérivés du virus l'infectant, puisque le cycle répliatif des virus peut être extrêmement rapide; plusieurs virus ont des durées de répliation de 6 à 12 heures, ce qui requiert une reconnaissance et une élimination rapides par le système immunitaire, puisqu'une cellule tuée tardivement aura déjà arboré et relâché le virus et les milliers de virions issus de sa répliation [88]. Pourtant, les demi-vies des protéines cellulaires

et virales varient d'une durée de quelques minutes à quelques semaines, avec une moyenne de un à deux jours [89, 90]. Celles-ci sont donc mal adaptées à la détection d'infections virales, qui peut être faite dans des délais aussi courts qu'une heure suivant l'infection. Par ailleurs, la machinerie de présentation antigénique semble en mesure de différencier la synthèse d'une même protéine sous contrôle viral, ou cellulaire. Ceci permettrait aux cellules de présenter davantage de protéines virales tout en évitant la présentation et les dépenses énergétiques liées à la présentation d'antigènes du soi en conditions d'infection [91].

Cette observation ne peut que réfuter l'hypothèse selon laquelle les protéines présentées par les molécules du MHC I seraient issues de la dégradation normale des protéines vieillissantes (dites retraitées). D'autres hypothèses davantage adaptées à ce concept permettent une meilleure compréhension de la provenance de tous les peptides détectés à la surface cellulaire.

4.1.1.1 Antigènes abondants

On croyait initialement que les antigènes présentés sur les molécules du MHC I dérivait des protéines les plus abondantes. Ceci n'est vrai qu'en partie: les antigènes présentés à la surface dérivent de protéines nouvellement synthétisées et présentent donc un aperçu de la synthèse protéique et des protéines les plus abondamment synthétisées en tout temps. Par contre, comment expliquer que certaines protéines très abondantes ne soient davantage présentées?

Une étude récente établit un lien entre les peptides présentés et le contrôle des microRNA (miRNA). Dans cette étude, la caractérisation des peptides élus démontra que ceux-ci

proviennent de protéines impliquées dans de multiples voies cellulaires [92]. Par contre, les antigènes les plus fortement exprimés étaient les mieux représentés, mais partageaient avant tout la caractéristique d'être gérés par certains miRNA qui contrôlent leur rythme de dégradation [92]. Dans cette étude, la quasi-totalité des antigènes présentés dérivait de protéines possédant des sites de liaison aux miRNA. Celle-ci projette donc un regard nouveau sur l'origine des peptides associés au MHC I [92].

4.1.1.1.2 Antigènes nouvellement synthétisés

Les protéines nouvellement synthétisées semblent représenter la principale source d'antigènes ciblés pour la présentation antigénique par MHC I. Ce bassin de protéines est d'importance cruciale, puisqu'il permet à la cellule de présenter son état actuel. Logiquement, une cellule pourrait vouloir éviter de présenter des protéines qui datent de plusieurs jours ou semaines puisqu'elles pourraient refléter un état dépassé et susciter une réponse immunitaire contre un agent éliminé.

Ainsi, il fut établi par certains groupes que jusqu'à 40% des protéines nouvellement synthétisées étaient rapidement dégradées (moins de 10 minutes) *via* le protéasome [88, 93, 94]. Ceci semble suggérer que les protéines nouvellement synthétisées forment le bassin majeur de protéines fournissant la cellule en peptides pour le MHC I.

4.1.1.1.3 Defective Ribosomal Products (DRiP)

L'hypothèse des DRiP adopte cette perception [95]. Selon cette hypothèse, chaque protéine

aurait deux demi-vies: sa demi-vie normale et longue, associée à la conformation native de la protéine et sa demi-vie raccourcie liée à la protéine tronquée ou mal repliée et rapidement étiquetée pour être dégradée. Par contre, les DRiP ne sont pas les seules sources d'antigènes et leur apport peut varier selon la protéine. Par exemple, presque tous les peptides de l'ovalbumine (OVA), ainsi que ceux de la neuraminidase du virus de l'influenza présentés sur les molécules du MHC I sont dérivés de DRiP alors que ce taux est nettement plus faible chez d'autres antigènes [96]. Les DRiP peuvent également être causés par des mRNA mal traduits en raison de codons STOPS prématurés [97].

4.1.1.1.4 Présence de dégrons

L'hypothèse des dégrons prétend que certaines séquences d'acides aminés dirigent la dégradation des protéines. Celles-ci peuvent être N-terminales (N-dégon) ou C-terminales (C-dégon). Par ailleurs, l'hydrophobicité pourrait également servir de signal de dégradation rapide [98]. C'est le cas dans certaines études qui ont établi que l'exposition du domaine TM typiquement hydrophobe de certaines protéines pouvait mener à leur dégradation rapide. Par ailleurs, un simple acide aminé N-terminal (N-end rule) peut avoir un impact majeur sur la stabilité de la protéine; il fut établi qu'une méthionine peut stabiliser la protéine, alors qu'une arginine la déstabilise et promeut une dégradation accélérée [99].

4.1.1.1.5 Ribosomes stratégiquement isolés

Compte tenu de la rapidité de la détection des protéines virales dans les cellules humaines, il est proposé que certains antigènes dérivés de protéines intracellulaires seraient immédiatement

dégradés puisque leurs ribosomes pourraient être isolés. Selon cette hypothèse, la SS synthétisée et non-liée par la SRP rendrait la protéine vulnérable au protéasome [100]. Ceci aurait pour impact qu'une protéine synthétisée dans le cytosol pourrait être dégradée de manière co-translationnelle *via* le protéasome [88]. Ainsi, la présentation antigénique ne serait pas dérivée de peptides originaires de protéines sénescents, mais bien de protéines nouvellement synthétisées et reflétant l'état actuel de la cellule.

4.1.2 Peptides associés au MHC I

Peu importe l'origine et la séquence du peptide présenté, celui-ci se doit de se lier à une niche peptidique qui possède une structure constante. Celle-ci est formée de deux hélices- α flanquantes assises sur un feuillet- β formé des domaines α 1-2 [101]. La niche peptidique est liée par les extrémités libres NH₂- et COOH-terminales des peptides ainsi que par les résidus "ancres" numéros 2, 3 et 9 (**Figure 7**).

Le variant le plus prévalent de MHC I dans la population caucasienne est HLA-A*02 (environ 50%). HLA-A*02 démontre une préférence pour les peptides composés d'une leucine en position-2 et d'une valine en position-9. Par ailleurs, la longueur optimale des peptides présentés sur MHC I pourrait être déterminée par leur probabilité d'être glycosylés, une modification capable d'induire une auto-immunité [102]. Une telle longueur serait idéale pour qu'ils puissent être présentés sur MHC I tout en minimisant leurs chances d'être glycosylés.

Certains résidus d'un peptide sont nécessaires pour en faire un bon ligand du MHC I. Malgré qu'ils puissent différer d'un variant allélique MHC I à l'autre, les résidus importants lient

habituellement les poches de liaison des niches peptidiques des molécules du MHC I. Les résidus les plus importants sont les résidus d'ancrage, souvent situés en position-2 et au C-terminus (position-9), malgré que certains variants MHC I ne soient capricieux à la position-3 (HLA-A*01) ou -5 du peptide (HLA-B*08). Certains résidus qui servent d'ancres secondaires peuvent aussi être d'importance non-négligeable [103].

4.1.3 Récepteur des lymphocytes T (TCR)

La présentation d'antigènes par MHC I n'est d'aucune importance si les antigènes présentés ne peuvent être reconnus par leur récepteur, le TCR [104]. Les molécules du MHC I sont reconnues exclusivement par les lymphocytes T CD8⁺ qui reconnaissent le complexe formé de la molécule du MHC I, du peptide (pMHC I) qui y est présenté et des molécules de co-stimulation présentes à proximité de la synapse immunologique (IS), interface entre le lymphocyte T et la APC (**Figure 7A**). Malgré que les peptides ne soient sélectionnés dans la APC pour leur capacité à lier les molécules du MHC I avec une forte affinité, ceux-ci, une fois présentés à la surface, peuvent également lier le TCR du lymphocyte T CD8⁺ et ainsi affecter la réactivité des lymphocytes. Jusqu'à présent, il semble que les résidus en position-6 et -7 des peptides présentés interagissent directement avec le TCR [105, 106]. Une fois l'antigène reconnu, la ligation du TCR ainsi que du co-récepteur CD8 cause l'activation du ligand CD3 présent à la IS et cause un signalement subséquent chez le lymphocyte T CD8⁺ [107]. Ce signalement résulte en la production de cytokines, en l'activation du lymphocyte T CD8⁺ et ultimement en la lyse de la cellule infectée grâce à la production de protéases comme les granzymes [108] et la perforine [109], ainsi que l'expression de Fas-ligand [110] qui causent

l'apoptose de la APC infectée [111].

4.1.4 CD8

Le co-récepteur CD8 est exprimé en forte majorité sur les lymphocytes T cytotoxiques. La molécule CD8 est retrouvée à proximité de la IS comportant le TCR des lymphocytes T CD8⁺, ainsi que la molécule de signalement CD3 et les molécules de costimulation associées [112]. CD8 lie les molécules du MHC I *via* leur domaine $\alpha 3$ alors que le TCR lie le peptide et les résidus polymorphiques présents dans les domaines $\alpha 1-2$ des molécules du MHC I chez la APC (**Figure 7A**) [113].

Le co-récepteur CD4 présent sur les lymphocytes T CD4⁺ lie les molécules du MHC II, exprimées principalement sur les APC professionnelles (pAPC) que sont les M ϕ , les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes B.

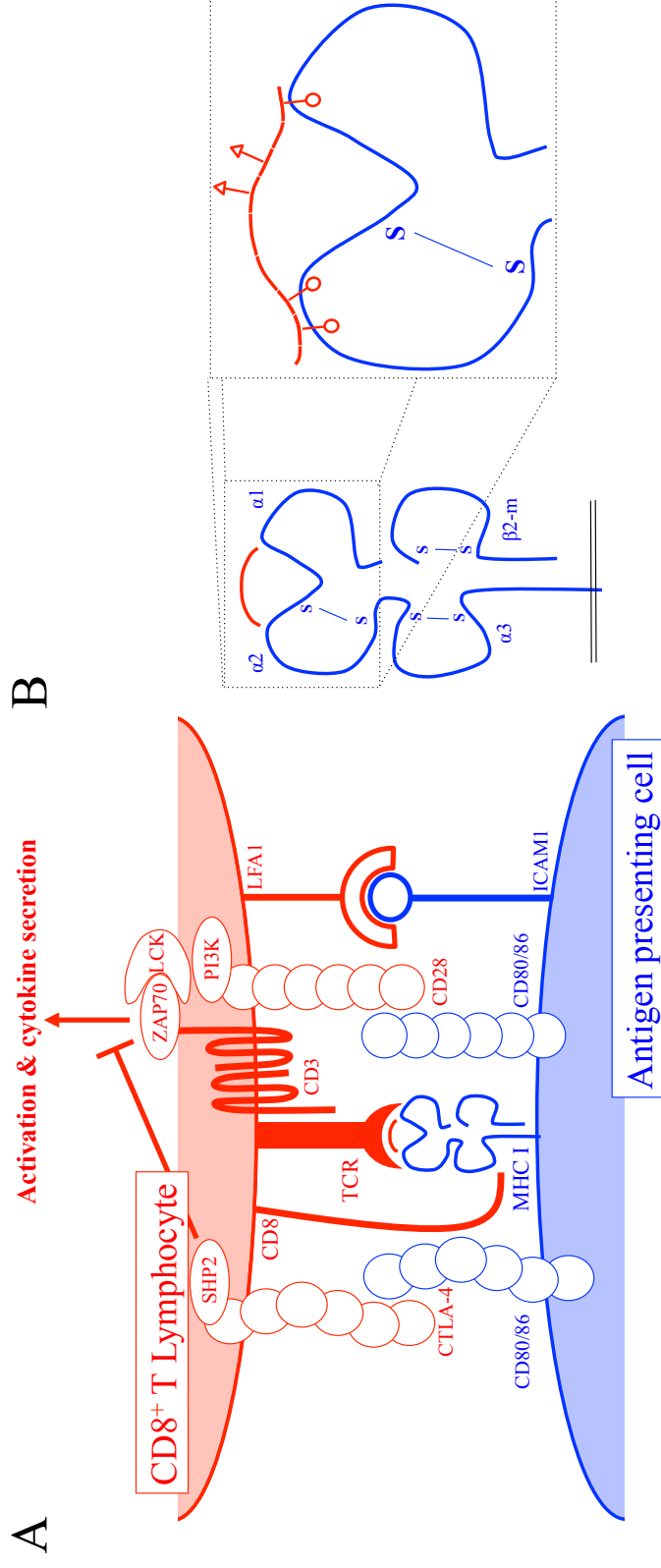


Figure 7. Synapse immunologique entre la APC et le lymphocyte T CD8⁺.

A) Schématisation de l'interface entre les APC et les lymphocytes T CD8⁺. Le centre de la IS est formé par la molécule du MHC I présentant le peptide d'intérêt sur la APC, ainsi que le TCR et le co-récepteur CD8 qui lient le complexe pMHC I. B) Gros plan des résidus du peptide impliqués dans l'affinité pour la niche peptidique de la molécule du MHC I (résidus 2, 3 et 9, cercles) et ceux impliqués dans l'interaction avec le TCR du lymphocyte T CD8⁺ (résidus 6 et 7, triangles).

4.2 Voie de synthèse *de novo* et de présentation des molécules du MHC I

Les molécules du MHC I et les antigènes qui y sont présentés subissent une multitude de modifications afin de les rendre compatibles l'un à l'autre, et d'être exprimés à la surface cellulaire. La présente section vise à décrire ce processus à partir de la préparation de l'antigène, jusqu'à celle de la molécule du MHC I, et au chargement de la molécule du MHC I avec le peptide généré pour son transport jusqu'à la surface cellulaire dans le but d'être reconnu par un lymphocyte T CD8⁺ antigène-spécifique.

4.2.1 Étape 1 - Apprêtement de l'antigène

4.2.1.1 Synthèse et digestion par le protéasome et par la tripeptidyl peptidase II (TPPII)

Une forte proportion des antigènes présentés sur les molécules du MHC I dérivent des protéines nouvellement synthétisées qui, pour des raisons qui varient, sont ciblées par le protéasome afin d'être dégradées en polypeptides. Le protéasome clive la protéine ciblée en courts peptides de 3 à 22 acides aminés en longueur afin de permettre leur transport *via* TAP (**Figure 8 et 42 - 2**). L'activité du protéasome permet également de générer une extrémité C-terminale du polypeptide compatible avec la niche peptidique des molécules du MHC I, de par la présence d'un acide aminé hydrophobe [114]. L'extrémité N-terminale du polypeptide, par contre, nécessite davantage d'apprêtement afin de devenir compatible avec la niche des molécules du MHC I.

L'immunoprotéasome est une variante du protéasome induite en conditions inflammatoires et particulièrement compétente afin de générer des peptides qui peuvent être présentés sur MHC I [115]. Malgré que certains peptides puissent être générés par les deux types de protéasomes, d'autres sont spécifiques à l'un ou l'autre. Par ailleurs, l'immunoprotéasome génère des peptides qui semblent davantage compatibles avec les préférences du transporteur TAP [116].

Les polypeptides générés par le protéasome sont, par la suite, digérés davantage par la peptidase TPPII présente dans le cytosol qui retire, par groupes de trois, les acides aminés N-terminaux présents sur les polypeptides de plus de 15 acides aminés en longueur (**Figure 8 et 42 - 3**) [117, 118].

4.2.1.2 Transport vers le ER *via* le transporteur TAP

Le transporteur TAP assure par la suite le transport des polypeptides dans le ER. L'activité préalable du protéasome est cruciale, puisque TAP lie et transporte préférentiellement les peptides de 8 à 12 acides aminés, bien que des peptides jusqu'à 40 acides aminés en longueur puissent être occasionnellement transportés. Par ailleurs, la présence d'un acide aminé hydrophobe en extrémité C-terminale du peptide générée par le protéasome accroît l'efficacité du transport vers le ER grâce à TAP [101].

L'abondance d'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire assure que l'ATP est en constante

interaction avec les domaines de liaison aux nucléotides (NBD) de TAP. Puis, le polypeptide généré par le protéasome et par TPPII lie TAP. L'interaction de l'ATP avec TAP cause la dimérisation des NBD alors que la liaison du peptide induit un changement structural dans la position des domaines TM. La dimérisation des NBD permet le relâchement du polypeptide vers le lumen du ER et l'hydrolyse de l'ATP en ADP cause la dédimérisation des NBD (**Figure 8 et 42 - 4**). Cette dissociation permet le relâchement de l'ADP et son remplacement par l'ATP cytosolique en préparation d'une nouvelle translocation peptidique.

4.2.1.3 Digestion N-terminale des polypeptides dans le ER

Les peptides déjà C-termino-compatibles avec les niches peptidiques des molécules du MHC I requièrent un apprêtement subséquent par les aminopeptidases présentes dans le ER afin de rendre compatible leur extrémité N-terminale et de les raccourcir jusqu'à leur longueur optimale de 8 à 11 acides aminés (**Figure 8 et 42 - 5**) [119]. L'aminopeptidase associée au ER (ERAP) est la chaperone principale responsable de cette digestion. ERAP digère les peptides un acide aminé à la fois à partir de leur extrémité N-terminale et a une préférence pour les peptides de 9 à 16 acides aminés en longueur, ce qui favorise leur apprêtement rapide afin d'être chargés sur les molécules du MHC I [120]. L'interaction du domaine régulateur de ERAP avec l'extrémité C-terminale des peptides alors que son site catalytique digère l'extrémité N-terminale assure que les peptides rendus à une longueur de 9 acides aminés sont digérés plus lentement afin de favoriser leur chargement sur les molécules du MHC I. Par contre, malgré l'importance évidente d'ERAP, son activité prolongée peut être nuisible,

puisque les aminopeptidases détruisent 99% des peptides du ER, les rendant ainsi imprésentables par les molécules du MHC I [121].

4.2.2 Étape 2 - Apprêtement des molécules du MHC I

Les molécules du MHC I subissent plusieurs modifications afin de les rendre compétentes à présenter des peptides à la surface cellulaire. La suite décrit les étapes empruntées par les molécules du MHC I, à partir de leur synthèse jusqu'à leur transport jusqu'à la surface cellulaire et leur recyclage intracellulaire. Ce processus se déroule parallèlement à la préparation de l'antigène présenté sur MHC I (Étape 1).

4.2.2.1 Synthèse des chaînes lourdes du MHC I

La chaîne lourde des molécules du MHC I est synthétisée dans le cytosol par les ribosomes, en usant de l'mRNA comme matrice. Puis, dès sa synthèse, les 22 premiers résidus traduits encodant la SS sont reconnus co-translationnellement par la SRP dans le cytosol.

4.2.2.2 Translocation des chaînes lourdes du MHC I vers le ER

Les protéines ne possédant pas de SS sont digérées par le protéasome et entrent typiquement dans le ER par voie du transporteur TAP. Ainsi, afin d'assurer l'intégrité de la chaîne lourde qui compose la molécule du MHC I, celle-ci doit être dirigée au ER de manière à éviter le

protéasome. La liaison de la SS par la SRP permet donc de rapprocher le complexe de synthèse composé du ribosome, ainsi que de la protéine en cours de traduction du ER. La SRP se lie à son récepteur (SRP-R) à proximité du translocon Sec61 [122], ce qui permet la synthèse dirigée de la protéine vers la lumière du ER (**Figure 8 et 42 - A**) [123]. La SS de la chaîne lourde ne fait pas partie de la protéine native et subit donc un clivage à l'intérieur de la bicouche lipidique du ER grâce à la SS peptidase (SSP) afin d'être relâchée vers le cytosol.

4.2.2.3 Insertion des chaînes lourdes du MHC I dans la membrane du ER

Les molécules du MHC I sont des protéines de type II TM et possèdent donc un domaine hydrophobe qui sert d'ancrage. Les résidus d'ancrage hydrophobes de la chaîne lourde du MHC I sont donc reconnus au niveau du translocon Sec61 lors de leur traduction, ce qui cause un arrêt temporaire de la traduction [124]. Puis, les résidus d'ancrage de la protéine passent au travers de la paroi du translocon afin de s'intégrer dans la bicouche lipidique du ER, alors que la synthèse de l'extrémité cytosolique de la chaîne lourde de la protéine se poursuit vers le cytosol [125].

4.2.2.4 Stabilisation des chaînes lourdes du MHC I

La durée des modifications co- et post-traductionnelles des protéines du ER dépend du nombre et de la nature de celles-ci. Ces modifications peuvent inclure le clivage de SS, la N-glycosylation, la formation de ponts disulfures et leur réorganisation, l'ajout d'ancres phosphatidylinositols, ainsi que l'insertion dans la membrane bilipidique [126]. Les chaînes

lourdes du MHC I doivent donc être stabilisées initialement et tout au cours de ces modifications afin de ne pas être étiquetées comme mal repliées et d'éviter la rétrotranslocation et la dégradation subséquente. Ainsi, lors de leur traduction, les protéines du MHC I sont immédiatement liées par la protéine de liaison des immunoglobulines (BiP). BiP lie les chaînes lourdes non-repliées du MHC I dans le ER et les maintient dans un état stable et compétent pour leur repliement subséquent [127]. BiP discrimine entre les protéines correctement et incorrectement repliées, tout en s'associant à une multitude de protéines peu homologues grâce à sa préférence pour les résidus hydrophobes exposés [128]. La liaison de BiP aux chaînes lourdes permet également d'empêcher la formation d'aggrégats protéiques.

4.2.2.5 N-glycosylation des chaînes lourdes du MHC I

La N-glycosylation des protéines dans le ER leur fournit des groupements encombrants et hautement hydrophiles qui permettent de maintenir les glycoprotéines en solution lors de leur repliement ou de moduler leur conformation en forçant le rapprochement des acides aminés adjacents à une asparagine. En plus de permettre le trafic intracellulaire, la régulation de la synthèse protéique et la reconnaissance cellule-cellule, ce type de glycosylation promeut également le recrutement des lectines qui facilitent le repliement de la chaîne lourde du MHC I dans le ER [129, 130]. La glycosylation des protéines nouvellement synthétisées dépend du dolichol et de l'oligosaccharyl transférase (OST). Le dolichol diphosphate (PP-dolichol) est préalablement chargé en plusieurs étapes grâce à l'hydrolyse de molécules d'uridine diphosphate (UDP), premièrement dans le cytosol, puis dans le ER. L'ajout d'un arbre glycosylique composé de deux résidus NAc, neuf Man, et trois Glu résulte en la

formation de la molécule $\text{Glu}_3\text{Man}_9\text{NAc}_2\text{-PP-dolichol}$. Puis, l'OST parcourt la séquence de la chaîne lourde du MHC I en cours de synthèse à la recherche d'une asparagine incluse dans le séquon consensus *asparagine - acide aminé autre que proline - sérine / thréonine* (N-X-S/T) et catalyse le transfert de l'arbre glycosylique à partir du PP-dolichol vers le résidu asparagine alors que celui-ci est situé à une distance de 12 à 14 résidus de la membrane (**Figure 8 et 42 - B**) [131, 132]. Les molécules du MHC I sont glycosylées en position N-86 [133], mais pas tous les séquons ne sont glycosylés systématiquement, suggérant que d'autres facteurs peuvent affecter ce processus [134].

4.2.2.6 Déglucosylation partielle des chaînes lourdes du MHC I

La protéine N-glycosylée doit par la suite être partiellement déglucosylée afin de lui permettre l'accès au système de repliement par les lectines qui interagissent avec les protéines monoglucosylées. Ceci signifie que la chaîne lourde possédant trois résidus Glu est initialement inaccessible à cette machinerie de repliement. Ainsi, les glucosidases I (GI) et II (GII) interviennent afin de partiellement déglucosyler les chaînes lourdes du MHC I. La GI associée à la membrane du ER retire le résidu Glu le plus éloigné de l'embranchement NAc grâce à sa spécificité pour les liens $\alpha 1,2$. Puis, la GII soluble retire le deuxième Glu en raison de sa préférence pour les liens $\alpha 1,3$ présents (**Figure 8 et 42 - C**) [132].

4.2.2.7 Repliement des chaînes lourdes du MHC I

Les chaînes lourdes du MHC I nouvellement synthétisées et monoglucosylées sont ensuite reconnues par la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT) grâce à leur activité lectine [135].

En premier lieu, la CNX se lie au N-glycan en plus de s'associer à la protéine du ER-57 (ERp57) par l'intermédiaire de son bras P (**Figure 8 et 42 - D**). L'association subséquente de la chaîne lourde du MHC I avec la β 2-m [136] mène à la dissociation du complexe membranaire CNX/ERp57 de la chaîne lourde du MHC I et au recrutement du complexe homologue soluble CRT/ERp57. L'association de ERp57 avec la CNX et la CRT permet la formation des ponts disulfures entre les résidus cystéines 101-164 du domaine α 2 qui forment la niche peptidique, ainsi qu'entre les résidus cystéines 203-259 présents dans le domaine α 3 liant la β 2-m (**Figure 8 et 42 - E**) [137, 138]. Puis, la fin de l'interaction entre la chaîne lourde maintenant liée à la β 2-m et le complexe CRT/ERp57 permet l'accès à la GII qui retire le Glu restant, mettant fin à la capacité de la molécule du MHC I d'interagir avec les lectines (**Figure 8 et 42 - F**). Par contre, l'UDP-glucuronosyltransférase-1 (UGT-1), senseur de repliement, détecte les régions hydrophobes exposées et rajoute un résidu Glu en α 1,3 au Man_9NAc_2 présent sur les protéines mal repliées, leur permettant à nouveau l'accès au système de repliement CNX/CRT afin de subir un cycle subséquent de repliement (**Figure 8 et 42 - G**). Chez les protéines correctement repliées, les groupements hydrophobes sont cachés et épargnés par la UGT-1, ce qui permet de procéder au chargement peptidique. L'action de l'UGT-1 prolonge la rétention des protéines dans le ER et ralentit considérablement leur export, mais accroît significativement l'efficacité de leur repliement [139].

4.2.3 Étape 3 - Chargement du peptide sur le MHC I et transport

4.2.3.1 Chargement peptidique des molécules du MHC I

La molécule du MHC I correctement repliée et associée à la β 2-m est reconnue par la tapasine (TPN) et recrutée à proximité du transporteur TAP qui lui est associé par l'intermédiaire de ses domaines TM et cytoplasmique (CT) [140]. De plus, la liaison de la TPN permet, une fois de plus, le recrutement de ERp57. Le rapprochement physique du MHC I et du transporteur TAP par l'intermédiaire de la TPN permet également un chargement optimal des molécules du MHC I, grâce à la concentration accrue de peptides MHC I-compatibles en cet emplacement; TAP se déplace au sein de la membrane du ER proportionnellement à l'influx de peptides et y entraîne le complexe de liaison peptidique (PLC) qui lui est associé. La TPN, en plus de stabiliser TAP et d'accroître sa demi-vie [141, 142], permet donc aux molécules du MHC I d'être chargées avec une abondance de peptides reflétant l'état actuel de la cellule [143]. Finalement, la TPN fournit une barrière énergétique à surmonter en empêchant la formation des ponts hydrogènes à l'extrémité C-terminale de la niche peptidique du MHC I, ce qui résulte en un échange de peptides plus rapide en présence de TPN, et en l'élargissement de la niche peptidique. Ainsi, les peptides incapables de déloger la TPN ne sont pas présentés et sont remplacés par d'autres peptides plus affins. La liaison d'un peptide plus affiné altère la conformation de la niche peptidique et promeut la dissociation de la TPN et l'export du complexe pMHC nouvellement formé (**Figure 8 et 42 - G**) [144-148].

4.2.3.2 Transport des molécules du MHC I vers la surface

Transport à partir du ER vers l'appareil de Golgi

L'association de la TPN à la protéine associée aux cellules B-31 (BAP31) dans le ER permet son recrutement à proximité des molécules du MHC I. BAP31 agit comme récepteur de cargo des molécules du MHC I sous la régulation de son partenaire d'interaction BAP29 [149] et permet, de par son interaction avec les chaînes lourdes des molécules du MHC I, avec la TPN, ainsi qu'avec la protéine COPII, de recruter le complexe pMHC aux sites d'export du ER (**Figure 8 et 42 - H**) [150]. Puis, lors du transport antérograde à partir du ER vers l'appareil de Golgi, BAP31 demeure associé aux molécules du MHC I et permet d'assurer leur transport rétrograde grâce à son motif de rétention dilysine [151] si le peptide présenté est délogé. Les molécules du MHC I associées à BAP31 peuvent donc, si nécessaire, être retournées vers le ER afin d'y assurer leur chargement avec un nouveau peptide antigénique (**Figure 8 et 42 - I'**) [152-154].

Transport à partir de l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire

La protéine CD99, impliquée dans l'adhésion cellulaire, joue un rôle dans le transport à partir de l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire des molécules du MHC I puisque son absence mène à une forte accumulation de celles-ci dans l'appareil de Golgi [155-157]. Par ailleurs, l'association physique des domaines TM de CD99 et des molécules du MHC I confirme le rôle de CD99 dans le transport des complexes pMHC jusqu'à la surface cellulaire (**Figure 8 et 42 - J**) [158].

4.2.3.3 Recyclage des complexes pMHC exprimés à la surface cellulaire

Afin de maintenir un bon aperçu des protéines synthétisées dans la cellule et des infections et transformations malignes potentielles, le portrait des pMHC présentés doit être constamment actualisé [159]. C'est ainsi que les complexes pMHC présents à la surface cellulaire sont recyclés afin d'être chargés avec un nouveau peptide présentant une meilleure affinité et reflétant davantage l'état actuel de la cellule. Le nouveau complexe pMHC est, par la suite, ré-exprimé à la surface cellulaire. Le recyclage des complexes pMHC se fait typiquement une fois par heure [160], alors que la demi-vie des molécules du MHC I est typiquement de 10 à 12 heures [160], ce qui signifie qu'une même molécule du MHC I réussira à présenter plusieurs peptides.

Le recyclage de molécules du MHC I s'effectue grâce à l'invagination de la membrane cellulaire causée par le facteur de ribosylation d'ADP-6 (ARF-6), suivant la phosphorylation des molécules du MHC I en sérine-335 et leur ubiquitinylation. Puis, les molécules du MHC I sont internalisées *via* une voie d'endocytose vésiculo-tubulaire, grâce à ARF-6 et à la synthèse localisée de phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (**Figure 8 et 42 - K et L**). Ces deux facteurs promeuvent l'incorporation de membrane plasmique et l'internalisation de la molécule du MHC I qui peut alors être chargée par un nouveau peptide antigénique avant d'être retournée à la surface cellulaire [161].

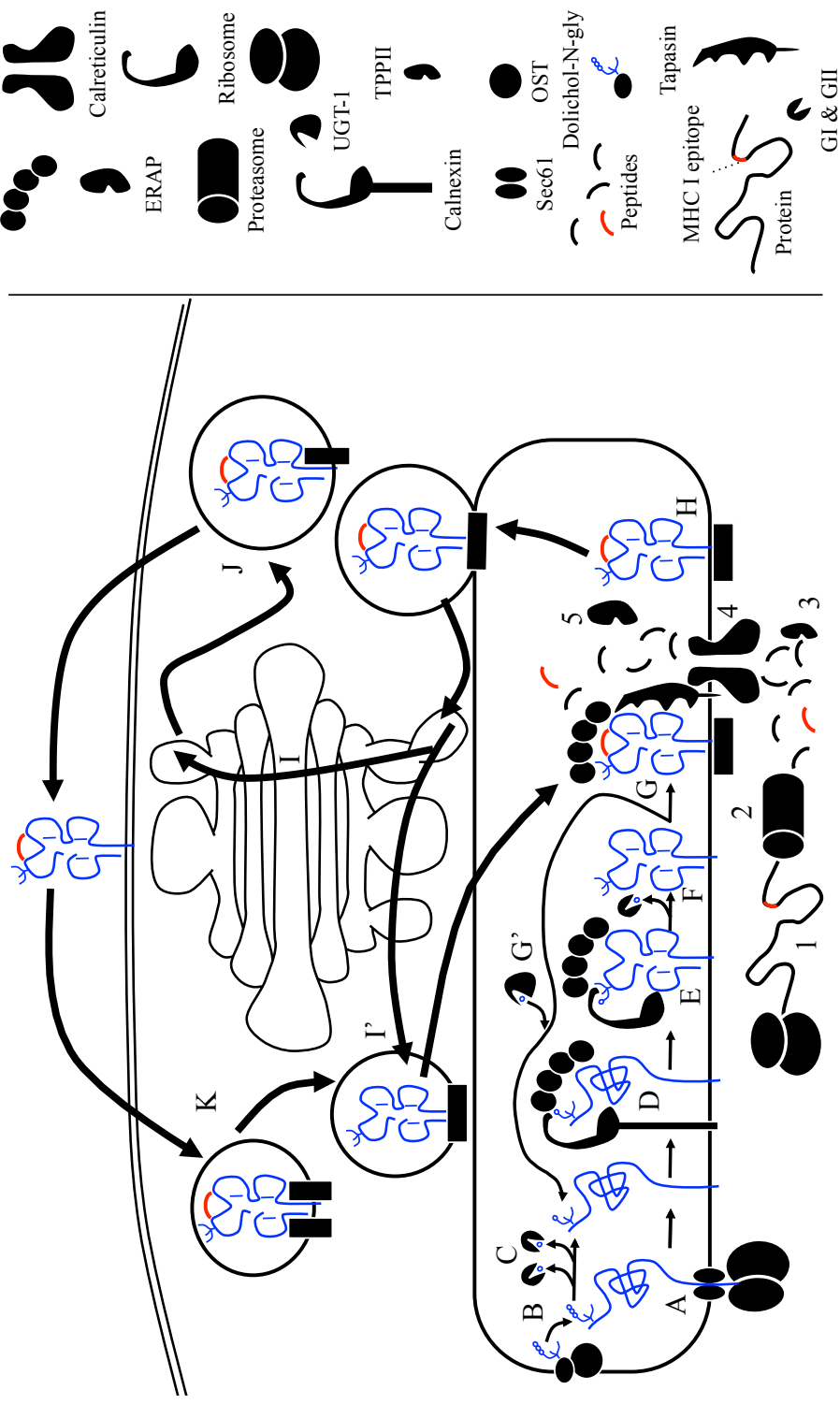


Figure 8. Schématisation des étapes impliquées dans la voie classique de présentation antigénique par MHC I.

4.3 Activation primaire et secondaire des lymphocytes T CD8⁺

L'activation initiale des lymphocytes T CD8⁺ requiert la présentation dans les ganglions d'un peptide spécifique sur MHC I (signal 1) avec l'interaction entre le co-récepteur CD8 et le domaine $\alpha 3$ du MHC I [162]. Par ailleurs, l'engagement de la molécule de costimulation CD28 sur les lymphocytes T CD8 par la molécule CD80/CD86 (signal 2) sur la cellule présentatrice d'antigènes professionnelle (pAPC) [163] mène à l'activation du lymphocyte T CD8, un signal en absence duquel le lymphocyte T CD8⁺ deviendrait anergique [164]. Finalement, plusieurs études suggèrent l'importance d'un signal médié par la production de cytokines comme l'IL-12 [165] afin de promouvoir une activation primaire et une prolifération des lymphocytes T CD8⁺ optimales (signal 3) [166] (**Figure 9A**).

Les besoins de l'activation secondaire sont moins élaborés: les lymphocytes T CD8⁺ ne requièrent plus les signaux 2 et 3 après leur activation initiale, puisque ceci limiterait le spectre de leurs cibles aux pAPC, seules cellules exprimant les molécules de costimulation constituant le signal 2. Ainsi, seul le signal 1 antigène-spécifique est requis pour l'activation secondaire des lymphocytes T CD8⁺, qui résulte en la lyse des cellules cibles infectées dans le but de contrôler l'infection (**Figure 9B**).

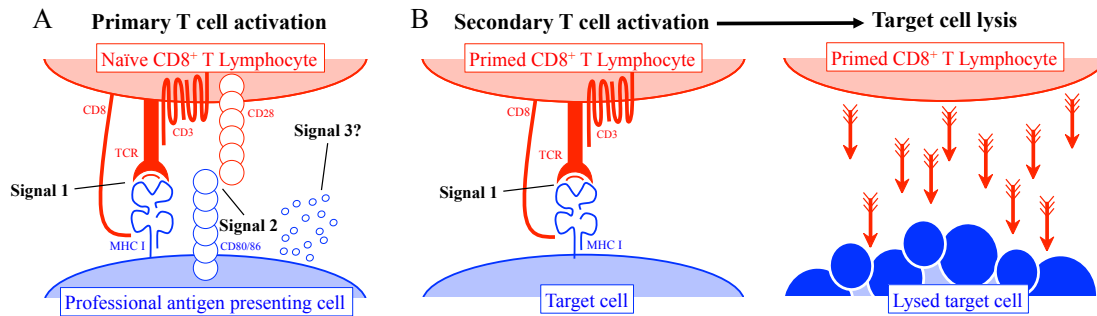


Figure 9. Activation primaire et secondaire des lymphocytes T CD8⁺.

A) L'activation primaire des lymphocytes T CD8 naïfs prend place grâce aux antigènes présentés par les pAPC sur MHC I (signal 1), à la ligation de la molécule de costimulation CD28 avec CD80/CD86 sur la pAPC (signal 2), ainsi que, selon certains, la production de cytokines comme l'IL-2 par la pAPC (signal 3). B) L'activation secondaire des lymphocytes T CD8 peut être causée par n'importe quelle cellule nucléée présentant l'antigène d'intérêt sur MHC I (signal 1) uniquement, et résulte en la lyse de la cellule infectée suite à une production de granzymes et de perforine ou à l'interaction avec Fas-ligand.

4.4 Régulation de la présentation antigénique par MHC I

L'inflammation influence la présentation antigénique [167]. Le besoin de constamment sonder les protéines présentées à la surface des cellules de l'organisme tout en maintenant une tolérance face aux antigènes du soi qui sont présentés à l'état d'équilibre, nécessite une étroite régulation de la présentation des antigènes par MHC I afin d'éviter une auto-immunité tout en assurant une protection efficace contre les infections. Ainsi, l'apprêtement des molécules du MHC I est étroitement régulé en réponse aux stimuli inflammatoires afin de répondre aux besoins immédiats de l'organisme.

Les cytokines IL-2, IFN- γ et GM-CSF sont des composantes majeures déployées lors de la réponse à des infections et ont l'effet d'induire une augmentation de l'expression des molécules

du MHC I et de l'efficacité de leur apprêtement [168]. Par ailleurs, plusieurs des composantes de la voie de présentation antigénique par MHC I comme les immunoprotéasomes ainsi que certaines chaperones peuvent être induites en réponse à ces cytokines, ce qui contribue à accroître l'efficacité de la présentation antigénique dans de telles circonstances [169, 170].

4.5 Les molécules du MHC I sont ciblées par différents agents infectieux

Plusieurs pathologies exploitent ou modifient les composantes de la machinerie de présentation antigénique du MHC I à leur avantage, afin d'éviter la reconnaissance et l'attaque du système immunitaire. Ceci leur permet de mieux survivre, se propager et prendre les dessus sur l'organisme [171]. Par exemple, l'antigène EBNA1 du virus Epstein-Barr (EBV) agit comme inhibiteur de l'activité du protéasome, empêchant ainsi la génération de peptides qui pourraient être immunogéniques. Puis, la protéine US6 du cytomégalovirus (CMV) empêche la liaison de TAP aux peptides et à l'ATP [172]. La TPN peut aussi être ciblée par la protéine US3 du CMV qui empêche ainsi l'optimisation des peptides transportés ainsi que le recrutement de la TPN au sein du PLC [172]. D'autres virus peuvent causer la rétention de molécules du MHC I dans le ER, ou promouvoir leur dégradation protéosomale comme le font les protéines E3-19K adénovirales [173]. Finalement, certains virus peuvent causer l'endocytose accélérée des molécules du MHC I en surface, ou leur redirection vers les compartiments lysosomiaux, comme le fait la protéine Nef du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) [174]. Les virus ont donc confirmé l'importance de cette voie de présentation antigénique en perfectionnant le ciblage de ses composantes de manière délétère [173-176].

4.6 Le variant allélique du MHC I - HLA-A2

Chaque individu hérite de deux variants des molécules du MHC I (HLA-A, HLA-B, et HLA-C) de chacun de ses parents. Compte tenu de la diversité majeure et des polymorphismes qui existent au sein de ces molécules, chaque personne possède donc des variants HLA qui peuvent lui être propres et qui peuvent présenter divers peptides associés à une multitude de pathologies avec des efficacités variables [177].

Parmi les molécules de HLA-A, le variant le plus fréquent chez la population caucasienne est HLA-A*0201 (HLA-A2), présent chez environ 50% de la population [178]. La structure cristalline de la molécule HLA-A2, élucidée en 1987, permet d'établir que cette protéine est composée de 284 résidus extracellulaires qui composent les trois domaines α [179], ainsi que d'un domaine TM et d'une queue CT qui lient la β 2-m [179]. Le domaine le plus éloigné de la membrane est composé de 8 feuillets- β anti-parallèles garnis d'hélices- α qui forment la niche peptidique. La protéine HLA-A2 ne peut présenter que les peptides qui lui sont compatibles et chaque variant HLA présente donc des peptides qui peuvent lui être spécifiques et qui ne sont reconnus que par des lymphocytes T HLA-compatibles.

5. Relation entre le métabolisme du fer et le système immunitaire

Les patients d'HH sont atteints d'un éventail de défauts et de maladies auto-immunes. Plusieurs sont causés par un surplus de fer secondaire à l'HH, qui peut mener à la destruction de certains organes, ou à une exploitation du fer par les pathogènes. Le prochain paragraphe fait un survol des liens entre l'HH et la modulation de la réponse immune.

Le fer peut directement affecter le phénotype des lymphocytes, comme en démontre son inhibition *in vitro* de l'expression de la molécule d'adhésion CD2, ainsi que du co-récepteur CD4 [180]. Par contre, *in vivo*, les patients atteints d'HH peuvent également présenter des nombres de lymphocytes T décrus dans certains organes comme le foie [181]. Par ailleurs, plusieurs études ont documenté une présence accrue de lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ à profil régulateur chez les mêmes patients [182], ainsi que des défauts dans l'activité de la kinase p56Lck associée au TCR [183, 184], qui pourraient ainsi perturber le signalement et l'activation des lymphocytes T. On retrouve également des niveaux accrus de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10, ainsi que l'IL-4 qui pourrait favoriser une polarisation davantage Th2 de la réponse immune inefficace dans certains contextes [185]. Finalement, des protéines comme le transporteur du fer Nramp1 présentent une capacité à inhiber la présentation antigénique par MHC II [186], alors que d'autres comme le TfR1 ont servi de cible dans le but de moduler la réponse immune en raison de leur proximité de la IS [187]. Ces études et plusieurs autres suggèrent un lien étroit et indéniable entre la réponse immune, l'HH et la surcharge de fer.

6. HFE et la voie de présentation antigénique par MHC I

Notre projet s'intéresse au lien entre HFE et la présentation antigénique par MHC I, une relation peu explorée jusqu'à présent. Par contre, les PBMC de patients d'HH HFE_{C282Y} présentent des niveaux inférieurs d'expression de MHC I [188] en raison d'un taux d'endocytose accru causé par la dissociation prématurée des peptides ainsi que de la β 2-m. De plus, la présence de HFE_{C282Y} est associée à des niveaux accrus de chaînes lourdes libres de MHC I (non-liées à la β 2-m) dans les lymphocytes et monocytes de patients HH. Des études de stabilité ont, par ailleurs, démontré que HFE_{C282Y} cause un chargement antigénique et un export accélérés des molécules du MHC I qui résulte en une instabilité et une demi-vie réduite des molécules du MHC I chez les patients d'HH [189]. Finalement, malgré son incapacité à présenter des peptides directement, HFE peut être reconnu par certaines sous-populations de lymphocytes T CD8⁺ à TCR $\alpha\beta$ [190], renforçant davantage le lien fonctionnel entre HFE et la présentation antigénique par MHC I.

7. Raisonnement

Il existe plusieurs liens entre le système immunitaire et la machinerie de métabolisme du fer [191-193]. Par contre, l'impact majeur de HFE sur le métabolisme du fer, la tendance de certains virus à cibler cette protéine, mais avant tout la forte homologie structurale de HFE avec les molécules du MHC I suggèrent que HFE pourrait être lié de manière intrinsèque au système immunitaire, plus particulièrement *via* la voie de présentation antigénique par MHC I.

8. Hypothèse

Compte tenu des travaux antérieurs décrivant un lien entre le système immunitaire et l'HH, des multiples défauts immunitaires décrits chez les patients d'HH, mais surtout de l'homologie de la structure de HFE comparativement aux molécules du MHC I classiques, nous avons émis l'hypothèse que HFE pourrait affecter la voie de présentation antigénique par MHC I (**Figure 10**). Par ailleurs, la régulation dynamique des molécules du MHC I en conditions inflammatoires suggère que l'expression de HFE pourrait également être modulée en réponse à l'inflammation.

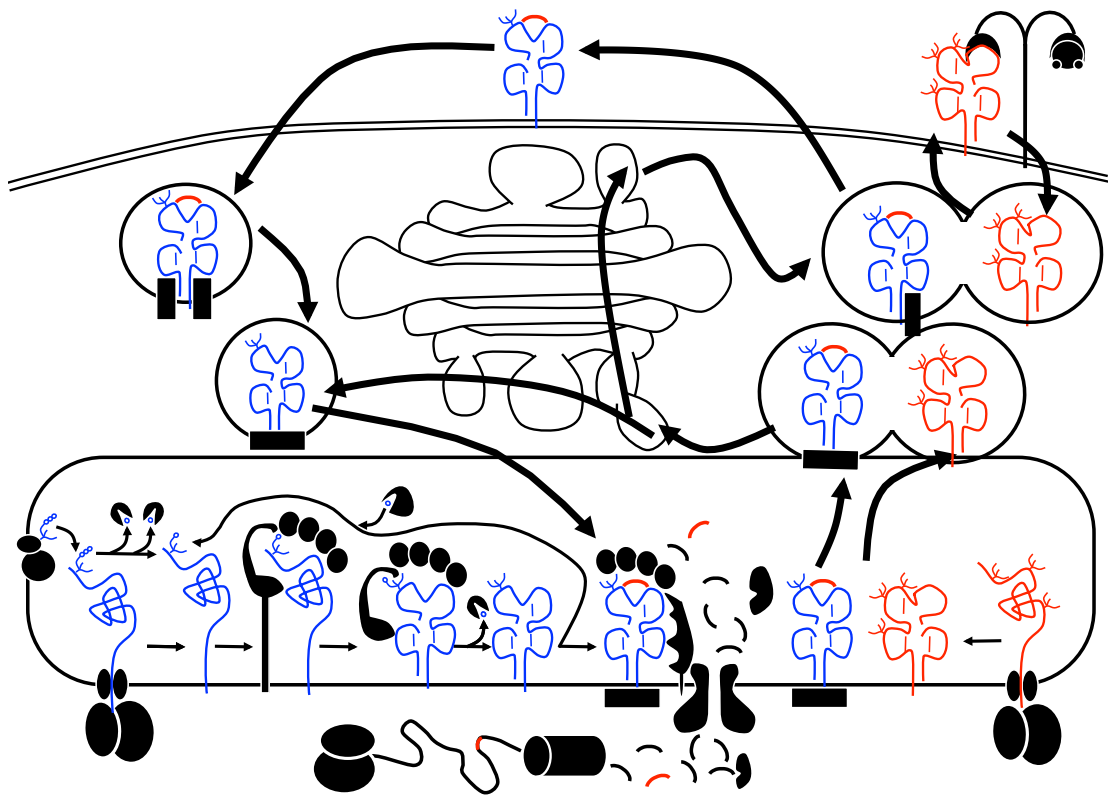


Figure 10. Les protéines MHC I et HFE empruntent une voie semblable.

Les molécules du MHC I (bleu) sont N-glycosylées dans le ER, puis associées à la β 2-m qui assure leur stabilité et facilite leur transport jusqu'à la surface cellulaire. HFE (rouge) est également N-glycosylé dans le ER avant son association avec la β 2-m et son transport jusqu'à la surface cellulaire. Ces similitudes ainsi que l'homologie entre les séquences et structures de ces deux protéines soulèvent la possibilité d'un lien fonctionnel.

9. Objectifs du projet de doctorat

Notre objectif est d'établir l'impact de HFE sur la présentation antigénique par MHC I ainsi que d'étudier la régulation de l'expression de HFE en réponse à l'inflammation.

SECTION II

1. Article I: Impact de HFE sur la présentation antigénique par MHC I

The wild-type hemochromatosis protein HFE inhibits CD8⁺ T-lymphocyte activation

Alexandre Reuben^{1,2}, Mikaël Phénix^{1,2}, Manuela M. Santos^{1,2,*}, Réjean Lapointe^{1,2,*}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

²Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

*M.M.S. and R.L. shared senior authorship of this report

Keywords: antigen presentation, HFE, MHC I, T-cell activation

Abbreviations: 293-A2 (HEK293 cells expressing HLA-A*0201 as antigen-presenting cells); TfR (Transferrin receptor).

Summary

MHC class I (MHC I) antigen presentation is an ubiquitous process by which cells present endogenous proteins to CD8⁺ T lymphocytes during immune surveillance and response. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, is involved in cellular iron uptake but, while structurally homologous to MHC I, is unable to bind peptides. However, increasing evidence suggests a role for HFE in the immune system. Here, we investigated the impact of HFE on CD8⁺ T-lymphocyte activation. Using transient HFE transfection assays in a model of antigen-presenting cells (293-A2), we show that wild-type HFE (HFE_{WT}), but not C282Y-mutated HFE, inhibits secretion of MIP-1 β from antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes. HFE_{WT} expression also resulted in major decreases in CD8⁺ T-lymphocyte activation as measured by 4-1BB expression. We further demonstrate that inhibition of CD8⁺ T-lymphocyte activation was independent of MHC I surface levels, β 2-m competition, HFE interaction with transferrin receptor, antigen origin, or epitope affinity. Finally, we identified the α 1-2 domains of HFE_{WT} as being responsible for inhibiting CD8⁺ T-lymphocyte activation. Our data imply a new role for HFE_{WT} in altering CD8⁺ T-lymphocyte reactivity, which could modulate antigen immunogenicity.

Introduction

Classical MHC class Ia (MHC Ia) molecules are highly polymorphic and serve a fundamental role in adaptive immunity by presenting short peptide antigens to cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes. In addition to classical MHC Ia molecules, non-classical class Ib MHC I molecules (MHC Ib) have been identified. While structurally similar to MHC Ia molecules, MHC Ib molecules possess distinct functions: they are involved in both innate and adaptive immunity, are far less polymorphic than their classical counterparts, can have a more limited pattern of expression and may bind non-peptide ligands [1].

HFE is a MHC Ib protein associated with type I hereditary hemochromatosis (HH) [2], a common genetic disorder in Caucasian populations characterized by high levels of iron absorption from the diet which results in iron accumulation in the liver and other organs. The two most common mutations in *HFE* associated with HH are C282Y and H63D. As with other MHC I molecules, HFE must associate with β 2-m for appropriate cell surface expression as demonstrated by the absence of HFE_{C282Y} at the cell surface [3, 4]. Accordingly, mice lacking HFE or β 2-m recapitulate HH in humans and develop iron overload primarily in the liver due to hyperabsorption of iron in the duodenum [5-7].

Unlike classical antigen-presenting MHC Ia molecules, HFE interacts with transferrin receptors (TfRs) 1 [4] and 2 [8], senses iron body status and activates downstream signaling pathways which regulate iron homeostasis [9]. However, several lines of evidence indicate that the role of HFE may extend beyond its known interaction with TfRs and toward a role in immunity. For example, although its antigen-binding groove was deemed too narrow to bind

peptides [4], HFE can be recognized directly by the TCR of a specific subset of $\alpha\beta$ CD8⁺ T lymphocytes in mice lacking MHC Ia molecules [10]. Another distinguishing feature is that, unlike ubiquitously-expressed MHC Ia molecules, HFE expression is far more restricted [11] to antigen-presenting cells (APCs) [12-14], suggesting that HFE may influence antigen presentation.

In this study we investigated the hypothesis that HFE may have a distinctive function in the process of MHC I antigen presentation. In order to assess the effects of HFE expression on T-cell recognition, we used an *in vitro* model of antigen presentation in which we expressed wild-type HFE (HFE_{WT}) and the most common HH-related HFE variants (HFE_{H63D} and HFE_{C282Y}) in HEK293 cells over-expressing HLA-A*0201 (HLA-A2) as APCs (293-A2), and tested their ability to present various peptides to antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes by measuring the ensuing production of soluble factors and expression of T-cell activation markers.

Results

Wild-type HFE expression in model APCs leads to decreased CD8⁺ T-lymphocyte activation

To evaluate the impact of HFE on antigenic presentation, we used a conventional system in 293-A2 cells summarized in **Figure 11** [15, 16]. These 293-A2 cells were used to assess presentation of diverse peptides in the context of the highly prevalent MHC I variant, HLA-A2. We co-transfected 293-A2 cells with the full-length gp100 melanoma antigen in combination with HFE_{WT}, HFE_{H63D}, HFE_{C282Y}, or control HLA-A1 constructs. To quantify T-cell reactivity, transfected 293-A2 cells were then incubated with CD8⁺ T-lymphocyte clones generated to specifically recognize the gp100₂₀₉₋₂₁₇ peptide derived from intracellular processing of the full-length gp100 protein, and presented on HLA-A2 molecules. As shown in **Figure 12A**, HFE_{WT} expression dramatically inhibited MIP-1 β cytokine production by gp100₂₀₉₋₂₁₇-specific CD8⁺ T lymphocytes, compared with that by the HLA-A1 control. The inhibitory effect of HFE_{WT} was maintained even at lower plasmid concentration (0.125 μ g; **Figure 19**). We confirmed the inhibitory effect of HFE_{WT} in MelS-FB melanoma cells with IFN- γ (**Figure 20**). All subsequent experiments were performed in 293-A2 cells because they are transfected with high efficiency. Significant inhibition of MIP-1 β production, albeit to a lesser extent, was also observed when HFE_{H63D}, but not HFE_{C282Y}, was expressed in 293-A2 cells. Similar results were obtained when measuring IFN- γ production (data not shown) but MIP-1 β was used throughout the study due to higher sensitivity. In addition, we found that induction of the T-cell activation marker 4-1BB in gp100₂₀₉₋₂₁₇-specific CD8⁺ T lymphocytes was also reduced by two-fold when 293-A2 cells co-expressed HFE_{WT} (**Figure 12B**; $P < 0.05$).

Next, to further evaluate whether the observed inhibitory effect of HFE_{WT} was limited to the gp100 antigen, we tested the MART-1 melanoma and matrix (M1) influenza antigens in co-cultures with CD8⁺ T lymphocytes specifically recognizing the MART-1₂₆₋₃₅ or M1₅₈₋₆₆ peptides presented on HLA-A2 molecules [17]. As shown in **Figures 12C and 2E**, similar levels of inhibition of MIP-1 β as well as suppression of 4-1BB expression (**Figure 12D and 2F**) were observed when testing these antigens in 293-A2 cells transfected with HFE_{WT} and, to some extent, with HFE_{H63D}, when compared with those of 293-A2 cells transfected with the HLA-A1 control. In contrast, the HFE_{C282Y} variant had no influence on both MIP-1 β secretion (**Figure 12C and 12E**) and 4-1BB induction (**Figure 12D and 12F**). Taken together, these results demonstrate that HFE_{WT}, and to a lesser extent HH-related HFE variants, inhibit the secretion and expression of crucial CD8⁺ T-lymphocyte factors such as chemokines, and the expression of T-cell activation markers.

The α 1-2 domains of HFE are essential for inhibition of CD8⁺ T-lymphocyte activation

To identify the HFE domain(s) responsible for the inhibition of CD8⁺ T-lymphocyte activation, we generated HLA-A1/HFE_{WT} chimeras by interchanging α 1-2, α 3 and transmembrane/cytoplasmic (TM/CT) domains. As shown in **Figure 13**, all chimeras with HFE α 1-2 domains inhibited MHC I recognition to the same extent. Conversely, the inhibitory effect was abolished when using any chimeric molecules lacking HFE α 1-2 domains. Chimera expression was quantified by FLAG western blot to ensure lack of effect was not attributable to lack of expression (data not shown). These data demonstrate that the α 1-2 domains of HFE_{WT} are mechanistically linked to HFE inhibitory activity.

HFE interference with CD8⁺ T-lymphocyte activation affects the secretion of numerous soluble factors

We then questioned whether HFE inhibited production of cytokines from a specific subtype or whether the effect extended to all secreted factors following T-cell activation. We thus quantified the presence of 27 soluble factors including Th1, Th2 and Th17 cytokines, pleiotropic cytokines, cytolytic proteins and chemokines. Of the 27 soluble factors tested, we detected 9 factors in culture supernatants (**Figure 14**), namely IFN- γ , sCD178/sFasL, IL-5, IL-13, MIP-1 α /CCL3, IL-8, sTNFR1I/CD120b and RANTES/CCL5, in addition to previously shown MIP-1 β /CCL4 (**Figure 12A, C, E**). The secretion of all these factors was significantly and consistently inhibited in presence of HFE_{WT}, whereas the effect of HH-related variants was more variable, particularly with HFE_{C282Y} (**Figure 14**). Thus, HFE_{WT} inhibition of T-cell recognition and secretion of soluble factors is not limited to a specific subfamily, but rather encompasses a broad spectrum of secreted factors.

HFE inhibits CD8⁺ T-lymphocyte activation when expressed in *cis* of MHC I antigens

Considering the ability of HFE to inhibit CD8⁺ T-lymphocyte activation, we questioned whether HFE may inhibit CD8⁺ T-lymphocyte activation when expressed in *trans* of antigen. Therefore, we transfected two distinct populations of 293-A2 cells with either HFE, or full-length gp100 antigen plasmids before mixing them and incubating them with gp100₂₀₉₋₂₁₇-specific CD8⁺ T lymphocytes. As shown in **Figure 21**, HFE_{WT} expression was unable to inhibit CD8⁺ T-lymphocyte activation when expressed in *trans* of gp100₂₀₉₋₂₁₇-expressing cells, thereby confirming that HFE must be expressed in *cis* of gp100₂₀₉₋₂₁₇ antigen to affect CD8⁺ T-lymphocyte activation.

HFE impairs T-cell activation independently of HLA-A2 expression and β 2-m competition

Because HFE must be expressed in *cis* of antigen to impact CD8⁺ T lymphocytes, we sought to establish the mechanism by which CD8⁺ T-lymphocyte activation is inhibited. Recent publications reported that MHC I expression is down-regulated in HFE_{WT}-transfected 293 cells [18, 19], which led us to question whether MHC I down-regulation could be responsible for the inhibition of CD8⁺ T-lymphocyte activation. As shown in Supporting Information **Figure 22A**, these results were replicated in 293-A2 cells. Hence, we specifically evaluated the expression of HLA-A2 and found that, similarly, transfection of HFE variants in 293-A2 cells resulted in a decrease of HLA-A2 expression (**Figure 15A**). Since β 2-m co-transfection with HFE has been shown to restore MHC I levels in 293 cells [18, 19], we next co-transfected 293-A2 cells with β 2-m and either HLA-A1 or HFE plasmids. As shown in **Figures 15B** and **Figure 22B**, addition of β 2-m did indeed restore HLA-A2 and pan-MHC I expressions to levels observed in control HLA-A1-transfected cells. However, despite detection of similar levels of HLA-A2 surface expression in all conditions, T-cell recognition of the gp100₂₀₉₋₂₁₇ epitope remained significantly decreased in 293-A2 cells co-expressing HFE variants and β 2-m (**Figure 15C**), but not in cells co-expressing HLA-A1 and β 2-m (HFE_{WT} - $P < 0.0001$; HFE_{H63D} - $P < 0.0001$ and HFE_{C282Y} - $P < 0.01$; compared with HLA-A1). Importantly, we confirmed that HLA molecules expressed at the cell surface were properly folded and bound to β 2-m (data not shown). Therefore, our results indicate that HFE impairs T-cell recognition independently of HLA-A2 expression levels and competition for β 2-m.

Interaction with TfR1 is not necessary for HFE-mediated inhibition of MHC I presentation

Because HFE has been shown to interact with TfR1 at the cell surface [4], we next questioned the relevance of this association to the inhibition of CD8⁺ T-lymphocyte activation. To this end, we employed a mutated version of HFE, namely V100A, which abrogates binding to TfR1 [20]. We found no differences in CD8⁺ T-lymphocyte activation levels between HFE_{WT}- and HFE_{V100A}-transfected 293-A2 cells co-expressing gp100, compared with HLA-A1, as judged by MIP-1 β secretion (**Figure 16A**) and 4-1BB (**Figure 16B**) levels, indicating that the effect of HFE was not dependent on its interaction with TfR1.

HFE impairs CD8⁺ T-lymphocyte activation independently of MHC I epitope affinity

MHC I molecule stability is dependent on the presence of a peptide in the binding-cleft. The stability of the MHC I complex, and hence T-cell recognition efficiency, is proportional to the peptide's affinity for the MHC I groove [21]. To further understand whether the HFE-mediated inhibition of T-cell recognition was dependent on peptide affinity, we used a gp100 point mutant in which the methionine at the 210 position has been substituted by a threonine (gp100_{209-217-2M}). This substitution results in a peptide with 9-fold increased affinity for HLA-A2 as compared with that of the wild-type gp100₂₀₉₋₂₁₇ epitope [22]. As expected, T-cell recognition of the high affinity gp100_{209-217-2M} peptide significantly increased when compared with the lower affinity wild-type gp100₂₀₉₋₂₁₇ peptide in all conditions tested, as judged by MIP-1 β secretion (**Figure 17A**) and 4-1BB T-lymphocyte surface expression (**Figure 17B**). Moreover, when compared with the HLA-A1 control, HFE_{WT} inhibited MIP-1 β secretion by 83% when the low-affinity epitope was tested and by 86% when the high-affinity epitope was

used, while 4-1BB expression was suppressed by 75% with the low-affinity epitope and 67% with the high-affinity epitope, meaning that both peptides were inhibited to the same extent independently of epitope affinity. Regarding HH-related variants, HFE_{H63D} significantly affected MIP-1 β secretion (**Figure 17A**) with the high-affinity epitope, but otherwise had no effect on the expression of 4-1BB (**Figure 17B**).

Overall, these results show that the effect exerted by HFE_{WT} on T-cell recognition is independent of MHC I/peptide affinity.

HFE_{WT} inhibition of CD8⁺ T-lymphocyte activation is independent of internal antigen processing

To evaluate whether internal antigen processing is necessary for the observed HFE_{WT} effect, we generated a plasmid coding for the minimal M1 epitope (M1₅₈₋₆₆ minigene), which does not require any internal processing. As shown in **Figure 18A**, HFE_{WT} affects the presentation of the full-length M1 antigen and the M1₅₈₋₆₆ minigene to similar extent. Minigene titration was performed to ensure non-saturating antigen concentrations (data not shown).

We further confirmed that HFE_{WT} expression does not act through altering antigen processing by directly measuring proteasome activity. As shown in **Figure 18B**, 293-A2 cells transfected with HLA-A1 or HFE-variant plasmids, and exposed to a luminescent proteasome substrate, revealed that none of the constructs was able to alter proteasome activity. In contrast, and as expected, proteasomal activity was blocked by the known specific inhibitor bortezomib. These data demonstrate that HFE does not alter proteasome activity.

Lastly, we questioned the impact of HFE on expression levels of well characterized MHC I chaperones involved in antigen processing (**Figure 23**), as well as HFE's capacity to alter MHC I glycosylation which could affect proper folding and antigen presentation (**Figure 24**) and established that HFE was unable to alter both chaperone levels and MHC I glycosylation.

Discussion

In the present study, we investigated the role of HFE in CD8⁺ T-lymphocyte activation. Based on multiple T-lymphocyte activation read-outs, we showed that HFE_{WT} expression in 293-A2 cells and, to a lesser extent, pathology-related HFE mutants, substantially affect the ability of HLA-A2 molecules to present the endogenously-processed gp100 melanoma epitope (gp100₂₀₉₋₂₁₇), and we demonstrated that this was linked to the HFE α 1-2 domains. HFE-mediated inhibition of T-lymphocyte recognition was independent of epitope and antigen origin, as shown when testing the melanoma MART-1 and influenza M1 antigens. Moreover, T-lymphocyte recognition was similarly affected when comparing epitopes with low- and high-affinity for MHC I molecules [23]. Finally, we show that this effect was not mediated through HFE interaction with TfR1, which is known to regulate cellular iron uptake [9, 24], as MHC I presentation was suppressed to similar levels in the presence of wild-type HFE and the HFE_{V100A} mutant preventing the HFE-TfR1 interaction [20]. Collectively, these results demonstrate that HFE_{WT} inhibits T-lymphocyte activation independently of the nature of the peptide being presented by MHC I molecules and of MHC I/peptide complex stability [25]. Importantly, despite our antigen-specific CD8⁺ T-lymphocyte clones having been generated from different donors, these results were highly reproducible, indicating that the inhibition of T-lymphocyte recognition was not donor-dependent.

Previous studies have shown that over-expression of HFE_{WT} or the HFE_{C282Y} mutant in 293 cells leads to a significant reduction in surface MHC I [18, 19]. In these studies, MHC I reduction was attributed to the competition between HFE_{WT} and MHC I molecules for binding to a limiting pool of endogenous β 2-m [19]. Accordingly, we show that β 2-m co-transfection

in the presence of HFE_{WT}, HFE_{H63D} or HFE_{C282Y} successfully restored HLA-A2 surface expression. However, β 2-m complementation was manifestly unable to revert the inhibition of CD8⁺ T-lymphocyte activation by HFE_{WT} (**Figure 15C**), demonstrating that competition for β 2-m binding is not responsible for the inhibition of CD8⁺ T-lymphocyte activation. This interpretation is further strengthened by the HLA-A1 control, which also requires β 2-m for expression and thereby competes for β 2-m as does HFE_{WT}.

Importantly, our data suggest that the inhibitory effect of HFE lay downstream of antigen processing by the proteasome and ER-resident proteases, since HFE equally inhibited MHC I recognition of both full-length antigen and minimal epitope. On the other hand, the effect of HFE_{WT} was not recapitulated by the HFE_{C282Y} variant, which is retained in the ER, indicating that HFE must travel to the surface in order to exert its effect, and that HFE retention in the ER may abolish its inhibitory effect. This is further confirmed by the apparent relationship between HFE_{H63D} intermediate surface detection levels and its T-cell intermediate inhibition profile, which may be related to HFE cell surface levels. These results suggest that HFE may interfere with MHC I/peptide complex mobilization to the cell surface, induction of an UPR and accelerated degradation due to HFE_{C282Y} may rescue recognition levels, or HFE_{WT} may induce an inhibitory molecule in the same cells where it is expressed which could impede antigen presentation, as does the MCMV m04/gp34 gene product [26]. Further experiments pursuing the biological and biochemical aspects of MHC I in our model must be done.

Given HFE homology with MHC I molecules [2], HFE_{WT} could exert its effect during the different steps of the classical presentation pathway, including during the translocation of

antigenic peptides from the cytoplasm into the ER *via* TAP, loading into the peptide groove of newly-synthesized MHC I molecules (HLA-A2 in our system) associated with β 2-m, and/or transport of the MHC I/peptide complex to the plasma membrane for recognition by peptide-specific CD8⁺ T lymphocytes [27]. HFE_{C282Y} has been previously shown to increase calreticulin mRNA levels [28], suggesting that HFE may alter expression levels of crucial MHC I chaperones. However, so far, we have not observed noteworthy differences in expression levels of several chaperones in the presence of HFE (Supporting Information **Figure 23**). Nevertheless, HFE could exert its effect through direct interactions with chaperones. In fact, the HFE α 1-2 domains share specific chaperone binding sites with MHC I [2], and we have clearly demonstrated the implication of the α 1-2 domains in the HFE inhibitory activity (**Figure 13**). Alternatively, HFE could alter the MHC I glycosylation pattern, which would impact mobilization of the MHC I/peptide complex to cell surface and hence antigen presentation and CD8⁺ T-lymphocyte activation. However, we found that sensitivity of MHC I to two important glycosidases Endo H and PNGase F, remained unchanged in the presence of HFE (**Figure 24**).

Past studies reported effects exerted by the HH-associated HFE_{H63D} and HFE_{C282Y} mutants in a range of biological and cellular functions such as TfR-mediated iron uptake [29-31], and the activation of ER stress and unfolded protein responses [18, 32, 33]. Interestingly, regarding MHC I antigen presentation, it is HFE_{WT} rather than HH-variants that had by far the most potent capacity to inhibit T-cell recognition. When comparing HFE_{WT} exclusively with the HFE_{C282Y} mutant, our data (**Figure 12**) are in agreement with previous studies showing that peptide-loading in MHC I is higher in PBMCs isolated from HFE_{C282Y} homozygotes when

compared with that of wild-type donors [34]. However, basal recognition levels with the HLA-A1 control in our system allow us to interpret these results differently, because the effect of HFE_{C282Y} and HLA-A1 on MHC I presentation was indistinguishable. Therefore, it is HFE_{WT} that suppressed MHC I presentation rather than HFE_{C282Y} which enhanced it, revealing a new physiological role for wild-type HFE.

Most MHC Ib molecules have been shown to be involved in immunological processes [1], and increasing evidence indicates that HFE may be no exception. For example, HFE can be recognized by specific T-cell subsets [10], possesses numerous cytokine-response elements in its promoter [35] and has recently been described as a skin-associated histocompatibility antigen [36]. Our finding that HFE_{WT} affects CD8⁺ T-lymphocyte activation provides further evidence for a role for HFE in shaping immune responses and could have pertinent implications in the development of autoimmune diseases and the immune response to various pathogens. For example, the lack of suppressive potential of the HFE_{C282Y} mutant on the presentation of self-antigens by MHC I molecules could affect the development of autoimmune diseases, such as autoimmune thyroiditis and multiple sclerosis, where increased prevalence, earlier onset and aggravated symptoms of the disease have been reported [37, 38].

In evolutionary terms, the rapid spread and high prevalence of the HFE_{C282Y} mutation in the Caucasian population has been mainly attributed to an advantage in terms of protection against iron deficiency, particularly during pregnancy [39]. Furthermore, the relative iron-depletion seen in hemochromatotic macrophages, Kupffer cells and intestinal epithelial cells [14, 40] has also been suggested to hamper the growth of intracellular pathogens, because iron is required

to sustain bacterial growth. Accordingly, recent studies show that HFE knockout mice better survive typhoid fever compared to wild-type mice [41]. Further studies hypothesize that, similarly, the HFE_{C282Y} mutation may have been rapidly selected during episodes of the European plague caused by *Yersinia pestis* [42]. Since these bacterial infections involve CD8⁺ T lymphocytes [43, 44], our results further suggest that, in addition to the demonstrated effect in limiting iron availability for intracellular bacterial growth, presence of the HFE_{C282Y} mutant may additionally bestow better cellular immunity due to its lack of inhibition of MHC I recognition by CD8⁺ lymphocytes, thereby augmenting immune responses against infected cells.

In summary, our study provides strong evidence for a role of wild-type HFE in antigen processing and presentation in humans. HFE_{WT} may be involved in fine-tuning the density of MHC I/peptide complexes at the cell surface, thus modulating antigen immunogenicity. Dynamic regulation of HFE expression levels could explain that HFE_{WT} may help prevent development of autoimmune diseases in homeostatic conditions, but upon down-regulation due to inflammatory mediators in the immediate environment, allow increased MHC I antigenic presentation and pathogen clearance. This is further supported by the effect of inflammatory mediators such as LPS and polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C)] which down-regulate HFE expression *in vivo* in mice [45]. Ultimately, a better understanding of the molecular mechanisms of action of HFE on MHC I presentation may lead to a better control of the cellular immune response in autoimmunity and against pathogens.

Materials and Methods

Cell lines

HEK293 (293) and T2 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). 293 cells stably expressing HLA-A*0201 (293-A2) and MelS-FB melanoma cells were kindly provided by Dr. Paul Robbins (Surgery Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD). All cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamycin (all from Wisent, St-Bruno, Canada).

Generation and expansion of antigen-specific peripheral CD8⁺ T lymphocytes and cloning of antigen-specific bulk T-cell cultures

This study was approved by the Ethics Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Informed consent was obtained from each donor prior to the collection of blood samples. Using PBMCs from HLA-A2 donors, T-cell clones specific to gp100₂₀₉₋₂₁₇, MART-1₂₆₋₃₅ or M1₅₈₋₆₆ HLA-A2-restricted epitopes were generated as described previously [15, 17, 46]. T-cell clone specificities were evaluated as before, by co-culture with gp100₂₀₉₋₂₁₇, MART-1₂₆₋₃₅ or M1₅₈₋₆₆-pulsed T2 cells followed by IFN-γ and MIP-1β secretion quantification by ELISA.

Frozen antigen-specific T cells (1×10^5 - 5×10^5) generated as described were thawed and expanded with a rapid expansion protocol, as previously published [47].

Plasmids

pcDNA3.1⁺ vectors containing the human wild-type HFE (HFE_{WT}), H63D (HFE_{H63D}) and C282Y (HFE_{C282Y}) HFE mutations with a C-terminal FLAG tag, and pBA-CGAGG β2-m plasmid were a kind gift from Dr. Kostas Pantopoulos (Lady Davis Institute, McGill, Canada) [29]. HFE V100A (HFE_{V100A}) with a C-terminal FLAG tag was synthesized by Mutagenex (Piscataway, NJ). HLA-A1/HFE chimeras shown in **Figure 13** containing C-terminal FLAG sequences were also generated by Mutagenex. Constructs were identified by restriction analysis and sequenced to confirm the presence of the mutations. The HLA-A*0101 (HLA-A1) construct with a C-terminal FLAG tag in pcDNA3.1⁺ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) was generated by Biomatik (Cambridge, Canada). pcDNA3.1⁺ plasmids containing full-length gp100, gp100-2M, and MART-1 sequences were kindly provided by Dr. Paul Robbins (NIH, Bethesda, MD). M1 cDNA sequence was optimized with GeneOptimizer and synthesized by Geneart (Invitrogen Life Technologies) before being cloned into pcDNA3.1⁺ [48]. Minigene plasmids (mini-gp100₂₀₉₋₂₁₇ and mini-M1₅₈₋₆₆) encoding Kozak consensus sequence, initiation codon, HLA-A2 epitope sequence and STOP codon were synthesized and subcloned into pcDNA3.1⁺ by Biomatik.

Transfection

293-A2 cells plated at 5×10^5 per well in 6-well plates were transiently transfected employing Lipofectamine and Plus Reagent (Invitrogen Life Technologies) according to the instructions of the manufacturer. Transfected cells were cultured for 24 hours. We routinely reached 70% and above transfection efficiency (**Figure 25**).

MeIS-FB cells at 5×10^5 per well in 6-well plates were transiently transfected by employing the MP-100 electroporation system (Invitrogen Life Technologies) according to the instructions of the manufacturer with 3 pulses, for a duration of 10 ms, at 1600 volts. Transfected cells were cultured for 24 hours. We routinely reached 40% efficiency.

Western blotting

Transfected 293-A2 cells were harvested 24 hours following transfection with HLA-A1 or HFE plasmids for FLAG expression analysis. PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) were probed with mouse anti-DYKDDDDK (FLAG) (GenScript Corporation, Piscataway, NJ), mouse anti-calreticulin (Abcam, Cambridge, MA), mouse anti-calnexin (BD Biosciences, Mississauga, Canada), rabbit anti-ERp57 (Cell Signaling, Danvers, MA), rat anti-BAP31 (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL) or mouse anti- β -actin (Millipore, Billerica, MA) antibodies and goat anti-mouse, anti-rat, or anti-rabbit (H + L) HRP (Millipore) antibodies. Membranes were revealed using ECL Plus (Amersham GE Healthcare Life Sciences, Arlington Heights, IL).

Glycosylation assay

293-A2 cells were co-transfected with untagged HLA-A1, HFE_{WT}, or HFE_{C282Y} plasmids and HLA-A1 FLAG. The next day, proteins were extracted digested with endoglycosidase H (Endo H) or peptide N-glycosidase F (PNGase F) (New England Biolabs, Whitby, Canada) for one hour at 37°C according to manufacturer guidelines. Following treatment, digested protein

extracts were analyzed by Western blot and probed with FLAG antibody to detect glycosidase-sensitive and -resistant HLA-A1 bands.

Proteasome activity assays

293-A2 cells were transfected with HLA-A1 or HFE variant plasmids. The next day, cells were harvested and treated with Proteasome-Glo (Promega, Madison, WI) reagent to evaluate chymotrypsin-like protease activity associated with the proteasome complex, according to manufacturer guidelines. Bortezomib (Selleck Chemicals, Houston, TX) served as a proteasome inhibitor.

T-cell assays

293-A2 cells were co-transfected with HLA-A1 or HFE variants, and relevant antigen plasmids. The following day, antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes were co-cultured with transfected cells at a ratio of 1:1 in 96-well round-bottom plates [49]. For *cis* and *trans* assays, HFE-transfected cells and antigen-transfected cells were mixed at a 1:1 ratio before being co-cultured with antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes in 96-well round-bottom plates. The following day, T cells were assessed for cytokine production by ELISA or Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences) and for activation status by flow cytometry. Cell viability in all experiments was assessed using the LIVE/DEAD cell stain kit (Invitrogen Life Technologies) and was found to be consistently above 97% viable T cells.

Cytokine release assays

Supernatants from T-cell assays were harvested for cytokine secretion assays by CBA or ELISA, as done before [50]. CBA was performed according to the instruction manual of CBA Human Soluble Protein master buffer kit (BD Biosciences) and supernatants of three independent T-cell assays were pooled for cytokine assessment. Sample acquisition was performed on a BD LSRFortessa instrument and analysis was done with the FCAP Array software (BD Biosciences). MIP-1 β ELISA was performed according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN). Cytokine secretion was considered positive and specific when values were above 50 pg/mL and double the value of the negative, irrelevant-antigen control.

Flow cytometry

We transfected 293 and 293-A2 cells with HLA-A1 or HFE variant plasmids and incubated overnight. The next day, cells were stained with an HLA-ABC allophycocyanin (BD Biosciences) or HLA-A2 Alexa-647 (AbD Serotec, Kidlington, UK) antibody for 30 minutes at 4°C. Antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes were co-cultured with 293-A2 cells expressing HLA-A1, or HFE variants and stained the next day with LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell stain kit to exclude dead cells from analysis (Invitrogen Life Technologies), CD8 R-PE (Invitrogen Life Technologies), and 4-1BB (CD137) allophycocyanin (BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C. Cells were washed in PBS (Wisent) with 0.5% BSA (Sigma) and 0.1% sodium azide (BioShop, Burlington, Canada). Cells were acquired on a BD LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences) and data was analyzed with FlowJo software (Tree Star, Ashland,

OR).

Statistical analysis

Statistics were calculated using Prism 5.0 for Mac (GraphPad Software, La Jolla, CA). Values in figures are expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test.

Acknowledgements

Grant Support: This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant no. MOP-123246 to MMS) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant no. 298515-2011 to MMS). AR is the recipient of Ph.D. scholarships from the ICM and Université de Montréal. MMS and RL are the recipients of Research Scholarships (Senior) from the FRQ-S (Fonds de recherche du Québec - Santé).

A special thank you to Marie-Andrée Forget, Cécile Grange and Laïla-Aïcha Hanafi for their critical review of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 **Rodgers, J. R. and Cook, R. G.**, MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. **5**: 459-471.
- 2 **Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F. et al.**, A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 1996. **13**: 399-408.
- 3 **Feder, J. N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V. K., Mapa, F. A., Morikang, E., Prass, C. E. et al.**, The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 1997. **272**: 14025-14028.
- 4 **Lebrón, J. A., Bennett, M. J., Vaughn, D. E., Chirino, A. J., Snow, P. M., Mintier, G. A., Feder, J. N. and Bjorkman, P. J.**, Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998. **93**: 111-123.
- 5 **Zhou, X. Y., Tomatsu, S., Fleming, R. E., Parkkila, S., Waheed, A., Jiang, J., Fei, Y. et al.**, HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998. **95**: 2492-2497.
- 6 **Santos, M., Schilham, M. W., Rademakers, L. H., Marx, J. J., de Sousa, M. and Clevers, H.**, Defective iron homeostasis in beta 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 1975-1985.
- 7 **Ajioka, R. S., Levy, J. E., Andrews, N. C. and Kushner, J. P.**, Regulation of iron absorption in Hfe mutant mice. *Blood* 2002. **100**: 1465-1469.
- 8 **Goswami, T. and Andrews, N. C.**, Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J. Biol. Chem.* 2006. **281**: 28494-28498.
- 9 **Schmidt, P. J., Toran, P. T., Giannetti, A. M., Bjorkman, P. J. and Andrews, N. C.**, The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* 2008. **7**: 205-214.
- 10 **Rohrlich, P. S., Fazilleau, N., Ginhoux, F., Firat, H., Michel, F., Cochet, M., Laham, N. et al.**, Direct recognition by alphabeta cytolytic T cells of Hfe, a MHC class Ib molecule without antigen-presenting function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. **102**: 12855-12860.
- 11 **Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R. S., Feder, J. N., Tsuchihashi, Z., Schatzman, R. C., Bacon, B. R. and Sly, W. S.**, Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. **94**: 2534-2539.
- 12 **Brinkmann, M., Teuffel, R., Laham, N., Ehrlich, R., Decker, P., Lemonnier, F. A. and Pascolo, S.**, Expression of iron transport proteins divalent metal transporter-1, Ferroportin-1, HFE and transferrin receptor-1 in human monocyte-derived dendritic cells. *Cell. Biochem. Func.* 2007. **25**: 287-296.
- 13 **Chitambar, C. R. and Wereley, J. P.**, Iron transport in a lymphoid cell line with the hemochromatosis C282Y mutation. *Blood* 2001. **97**: 2734-2740.
- 14 **Makui, H., Soares, R. J., Jiang, W., Constante, M. and Santos, M. M.**, Contribution of Hfe expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading. *Blood* 2005. **106**: 2189-2195.

- 15 **Lapointe, R., Royal, R. E., Reeves, M. E., Altomare, I., Robbins, P. F. and Hwu, P.,** Retrovirally transduced human dendritic cells can generate T cells recognizing multiple MHC class I and class II epitopes from the melanoma antigen glycoprotein 100. *J. Immunol.* 2001. **167**: 4758-4764.
- 16 **Lapointe, R., Toso, J. F., Butts, C., Young, H. A. and Hwu, P.,** Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 2000. **30**: 3291-3298.
- 17 **Toso, J. F., Lapointe, R. and Hwu, P.,** CD40 ligand and lipopolysaccharide enhance the in vitro generation of melanoma-reactive T-cells. *J. Immunol. Methods* 2002. **259**: 181-190.
- 18 **de Almeida, S. F., Fleming, J. V., Azevedo, J. E., Carmo-Fonseca, M. and de Sousa, M.,** Stimulation of an unfolded protein response impairs MHC class I expression. *J. Immunol.* 2007. **178**: 3612-3619.
- 19 **Vahdati-Ben Arieh, S., Laham, N., Schechter, C., Yewdell, J. W., Coligan, J. E. and Ehrlich, R.,** A single viral protein HCMV US2 affects antigen presentation and intracellular iron homeostasis by degradation of classical HLA class I and HFE molecules. *Blood* 2003. **101**: 2858-2864.
- 20 **Lebrón, J. A. and Bjorkman, P. J.,** The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis. *J. Mol. Biol.* 1999. **289**: 1109-1118.
- 21 **Parker, K. C., Bednarek, M. A. and Coligan, J. E.,** Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 1994. **152**: 163-175.
- 22 **Parkhurst, M. R., Salgaller, M. L., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Rosenberg, S. A. and Kawakami, Y.,** Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.* 1996. **157**: 2539-2548.
- 23 **Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G.,** Allele-Specific Motifs Revealed by Sequencing of Self-Peptides Eluted from Mhc Molecules. *Nature* 1991. **351**: 290-296.
- 24 **Lakhal, S., Talbot, N. P., Crosby, A., Stoepker, C., Townsend, A. R., Robbins, P. A., Pugh, C. W. et al.,** Regulation of growth differentiation factor 15 expression by intracellular iron. *Blood* 2009. **113**: 1555-1563.
- 25 **Clay, T. M., Custer, M. C., McKee, M. D., Parkhurst, M., Robbins, P. F., Kerstann, K., Wunderlich, J. et al.,** Changes in the fine specificity of gp100(209-217)-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue. *J. Immunol.* 1999. **162**: 1749-1755.
- 26 **Hengel, H., Reusch, U., Gutermann, A., Ziegler, H., Jonjic, S., Lucin, P. and Koszinowski, U. H.,** Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol Rev* 1999. **168**: 167-176.
- 27 **Donaldson, J. G. and Williams, D. B.,** Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules. *Traffic* 2009. **10**: 1745-1752.
- 28 **Pinto, J. P., Ramos, P., de Almeida, S. F., Oliveira, S., Breda, L., Michalak, M., Porto, G. et al.,** Protective role of calreticulin in HFE hemochromatosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2008. **44**: 99-108.

- 29 **Wang, J., Chen, G. and Pantopoulos, K.,** The haemochromatosis protein HFE induces an apparent iron-deficient phenotype in H1299 cells that is not corrected by co-expression of beta 2-microglobulin. *Biochem. J.* 2003. **370**: 891-899.
- 30 **Riedel, H. D., Muckenthaler, M. U., Gehrke, S. G., Mohr, I., Brennan, K., Herrmann, T., Fitscher, B. A. et al.,** HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells. *Blood* 1999. **94**: 3915-3921.
- 31 **Waheed, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Fleming, R. E., Zhou, X. Y., Tomatsu, S., Britton, R. S. et al.,** Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999. **96**: 1579-1584.
- 32 **Liu, Y., Lee, S. Y., Neely, E., Nandar, W., Moyo, M., Simmons, Z. and Connor, J. R.,** Mutant HFE H63D protein is associated with prolonged endoplasmic reticulum stress and increased neuronal vulnerability. *J. Biol. Chem.* 2011. **286**: 13161-13170.
- 33 **Lawless, M. W., Mankan, A. K., White, M., O'Dwyer, M. J. and Norris, S.,** Expression of hereditary hemochromatosis C282Y HFE protein in HEK293 cells activates specific endoplasmic reticulum stress responses. *BMC Cell. Biol.* 2007. **8**: 30.
- 34 **de Almeida, S. F., Carvalho, I. F., Cardoso, C. S., Cordeiro, J. V., Azevedo, J. E., Neefjes, J. and de Sousa, M.,** HFE cross-talks with the MHC class I antigen presentation pathway. *Blood* 2005. **106**: 971-977.
- 35 **Sanchez, M., Queralt, R., Bruguera, M., Rodes, J. and Oliva, R.,** Cloning, sequencing and characterization of the rat hereditary hemochromatosis promoter: comparison of the human, mouse and rat HFE promoter regions. *Gene* 1998. **225**: 77-87.
- 36 **Boucherma, R., Kridane-Miledi, H., Vives, F. L., Vauchy, C., Borg, C., Kleinclauss, F., Fiette, L. et al.,** Loss of central and peripheral CD8+ T-cell tolerance to HFE in mouse models of human familial hemochromatosis. *Eur. J. Immunol.* 2012. **42**: 851-862.
- 37 **Ristic, S., Lovrecic, L., Brajenovic-Milic, B., Starcevic-Cizmarevic, N., Jazbec, S. S., Sepcic, J., Kapovic, M. and Peterlin, B.,** Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 2005. **383**: 301-304.
- 38 **Tamagno, G., De Carlo, E., Murialdo, G. and Scandellari, C.,** A possible link between genetic hemochromatosis and autoimmune thyroiditis. *Minerva Med.* 2007. **98**: 769-772.
- 39 **Distante, S., Robson, K. J., Graham-Campbell, J., Arnaiz-Villena, A., Brissot, P. and Worwood, M.,** The origin and spread of the HFE-C282Y haemochromatosis mutation. *Hum. Genet.* 2004. **115**: 269-279.
- 40 **Block, M., Moore, G., Wasi, P. and Haiby, G.,** Histogenesis of the hepatic lesion in primary hemochromatosis: with consideration of the pseudo-iron deficient state produced by phlebotomies. *Am. J. Pathol.* 1965. **47**: 89-123.
- 41 **Nairz, M., Theurl, I., Schroll, A., Theurl, M., Fritsche, G., Lindner, E., Seifert, M. et al.,** Absence of functional Hfe protects mice from invasive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection via induction of lipocalin-2. *Blood* 2009. **114**: 3642-3651.
- 42 **Moalem, S., Percy, M. E., Kruck, T. P. A. and Gelbart, R. R.,** Epidemic pathogenic selection: an explanation for hereditary hemochromatosis? *Med. hypotheses* 2002. **59**: 325-329.

- 43 **Lin, J. S., Szaba, F. M., Kummer, L. W., Chromy, B. A. and Smiley, S. T.,** Yersinia pestis YopE contains a dominant CD8 T cell epitope that confers protection in a mouse model of pneumonic plague. *J. Immunol.* 2011. **187**: 897-904.
- 44 **Lo, W. F., Ong, H., Metcalf, E. S. and Soloski, M. J.,** T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to Salmonella infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J. Immunol.* 1999. **162**: 5398-5406.
- 45 **Layoun, A., Huang, H., Calve, A. and Santos, M. M.,** Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 is required for sustained endotoxin-induced acute hyperferremic response in mice. *Am. J. Pathol.* 2012. **180**: 2340-2350.
- 46 **Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. and Hwu, P.,** CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Can. Res.* 2003. **63**: 2836-2843.
- 47 **Dudley, M. E., Wunderlich, J., Nishimura, M. I., Yu, D., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J. et al.,** Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* 2001. **24**: 363-373.
- 48 **Doucet, J. D., Forget, M. A., Grange, C., Rouxel, R. N., Arbour, N., von Messling, V. and Lapointe, R.,** Endogenously expressed matrix protein M1 and nucleoprotein of influenza A are efficiently presented by class I and class II major histocompatibility complexes. *J. Gen. Virol.* 2011. **92**: 1162-1171.
- 49 **Pelletier, S., Tanguay, S., Lee, S., Gunaratnam, L., Arbour, N. and Lapointe, R.,** TGF-alpha as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. **58**: 1207-1218.
- 50 **Forget, M. A., Huon, Y., Reuben, A., Grange, C., Liberman, M., Martin, J., Mes-Masson, A. M. et al.,** Stimulation of wnt/beta-catenin pathway in human CD8(+) T lymphocytes from blood and lung tumors leads to a shared young/memory phenotype. *PLoS One* 2012. **7**: e41074.

Reuben *et al.*

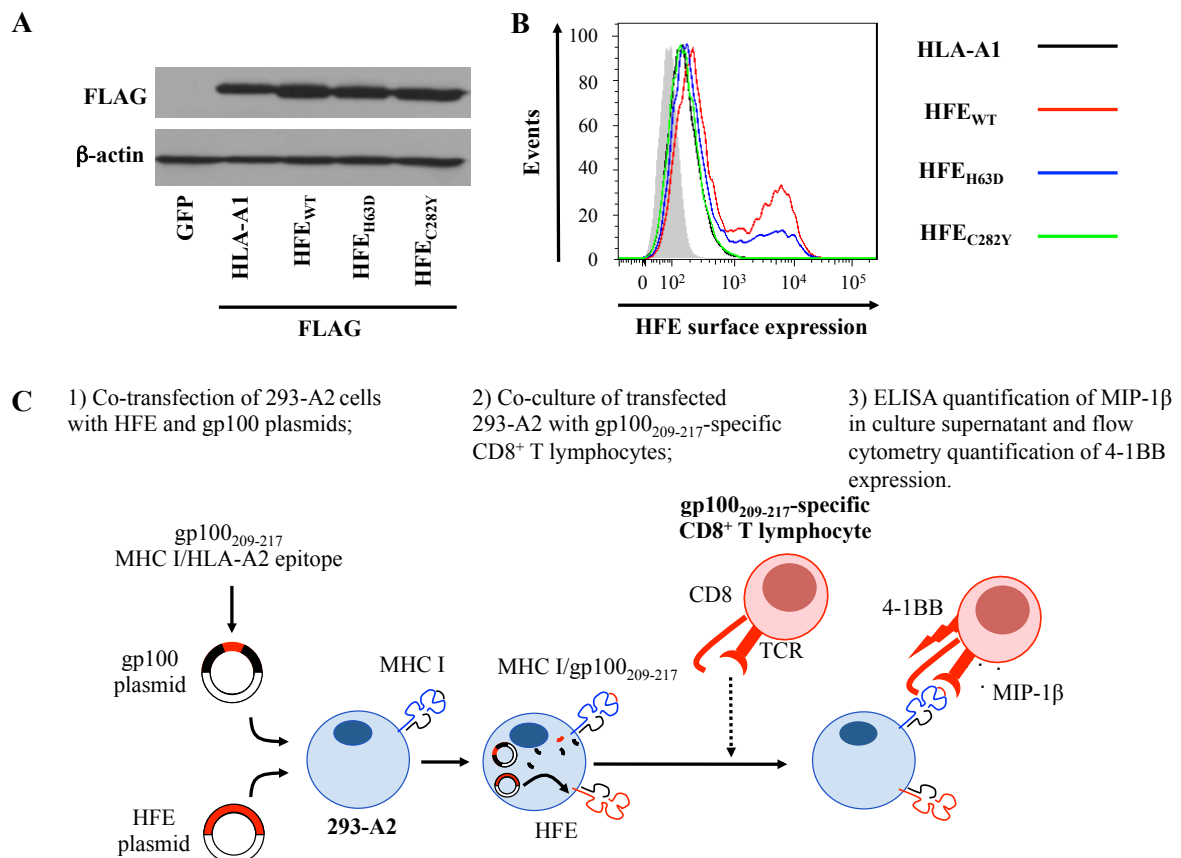


Figure 11 (1^{m1}). The 293-A2 antigen presentation system.

(A) Western blot showing total expression of FLAG tag in permeabilized 293-A2 cells transfected with GFP, HLA-A1 or HFE variant plasmids. (B) Flow cytometry analysis of HFE expression at the cell surface in 293-A2 cells transfected with HLA-A1 or HFE variant plasmids. Grey histogram in B represents unstained control. (C) Schematic representation of the T cell recognition experimental system. 293-A2 cells (over-expressing HLA-A2) are used as antigen presenting cells (293-A2) and are co-transfected with a plasmid containing the full-length gp100 melanoma antigen, for example, and with an HFE variant plasmid. To assess antigen presentation, transfected 293-A2 are then incubated with CD8⁺ T lymphocyte clones generated to specifically-recognize the gp100₂₀₉₋₂₁₇ peptide derived from intracellular processing of the gp100 protein, and presented on HLA-A2 molecules. As a measure of T cell activation, MIP-1 β production by T cells and surface expression of the T cell activation marker 4-1BB (CD137) are then evaluated. For B and C, HLA-A1 = black, HFE_{WT} = red, HFE_{H63D} = blue, HFE_{C282Y} = green.

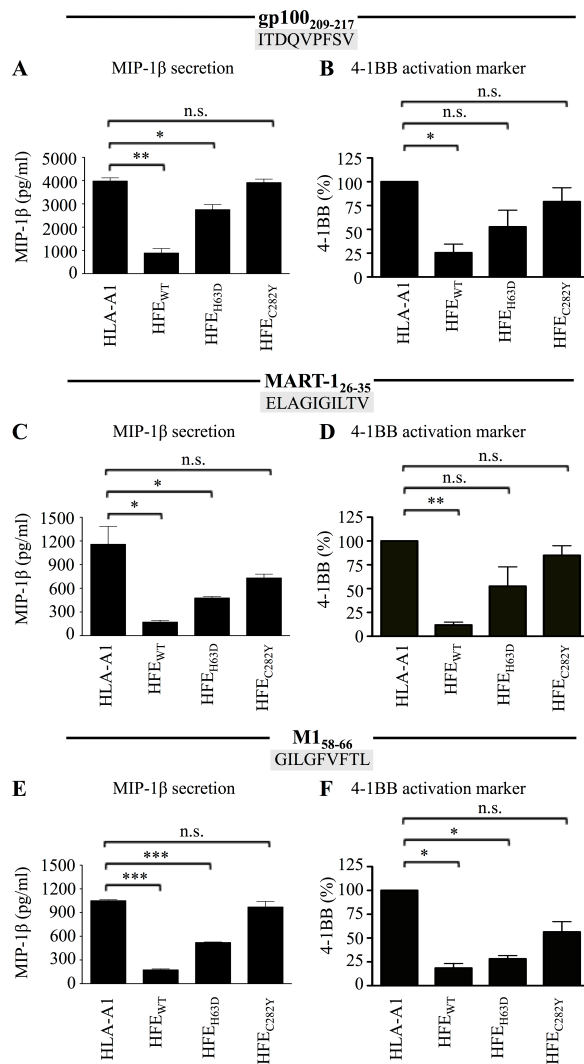


Figure 12 (2^{m1}). HFE abrogates CD8⁺ T lymphocyte activation in response to HLA-A2 antigens.

(A, C, E) MIP-1β secretion and (B, D, F) 4-1BB expression by (A-B) gp100₂₀₉₋₂₁₇-, (C-D) MART-1₂₆₋₃₅-, or (E-F) M1₅₈₋₆₆-specific CD8⁺ T lymphocytes following co-culture with 293-A2 co-transfected with HLA-A1 or HFE variants and (A-B) gp100, (C-D) MART-1, or (E-F) M1 plasmids. Amino acid sequences of the tested epitopes are highlighted below the name of corresponding epitope. MIP-1β and 4-1BB statistics were calculated after combining values from three to four independent experiments. Data for 4-1BB are presented as percentage of HLA-A1. Results are representative of three similar experiments performed. Values expressed as mean ± SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 when compared to HLA-A1; n.s. - not significant.

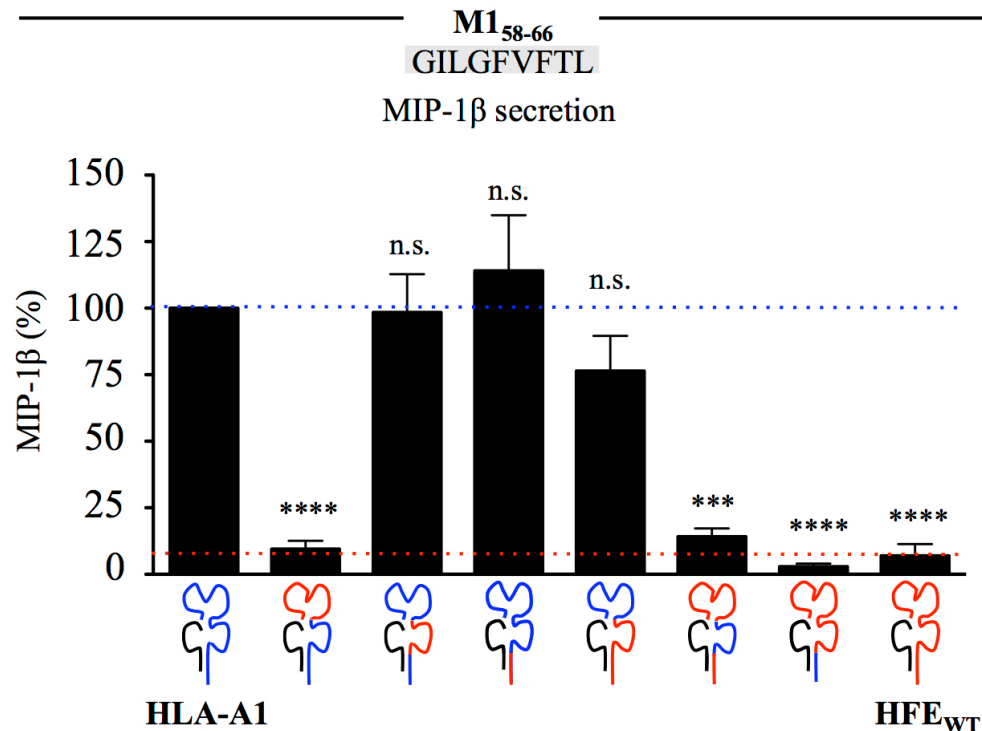


Figure 13 (3^{m1}). The α 1-2 domains of HFE_{WT} are required for inhibition of CD8⁺ T lymphocyte activation.

MIP-1 β secretion by M1₅₈₋₆₆-specific CD8⁺ T lymphocytes following co-culture with 293-A2 co-transfected with M1 antigen plasmid and HLA-A1 (blue) or HFE (red) wild-type versions, or chimeras composed of indicated combinations of α 1-2, α 3, and transmembrane/cytoplasmic (TM/CT) domain plasmids. The amino acid sequence of the M1₅₈₋₆₆ epitope is highlighted at the top of the figure. Data are presented as percentage of HLA-A1. Results are representative of three similar experiments performed. Values expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. *** P < 0.001 and **** P < 0.0001 when compared to HLA-A1; n.s. - not significant.

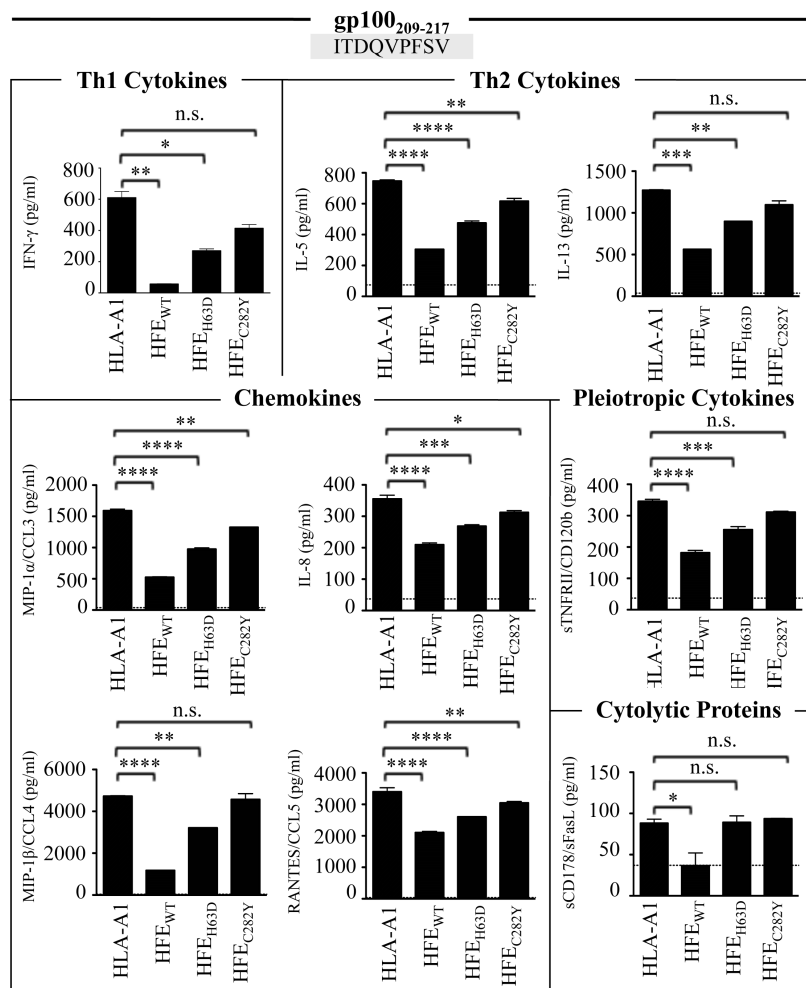


Figure 14 (4^{m1}). HFE interference with CD8⁺ T lymphocyte activation affects the secretion of a broad spectrum of soluble factors.

Production of soluble factors by gp100₂₀₉₋₂₁₇-specific CD8⁺ T lymphocytes following co-culture with 293-A2 co-transfected with HLA-A1 or HFE variants and gp100 plasmids. Black dotted lines indicate background levels as measured with irrelevant antigen. The amino acid sequence of the gp100₂₀₉₋₂₁₇ epitope is highlighted at the top of the figure. IFN- γ production was quantified by ELISA and all other soluble mediators shown were quantified in supernatants pooled from three independent experiments by cytometric bead array. Values expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 and **** P < 0.0001 when compared to HLA-A1; n.s. - not significant.

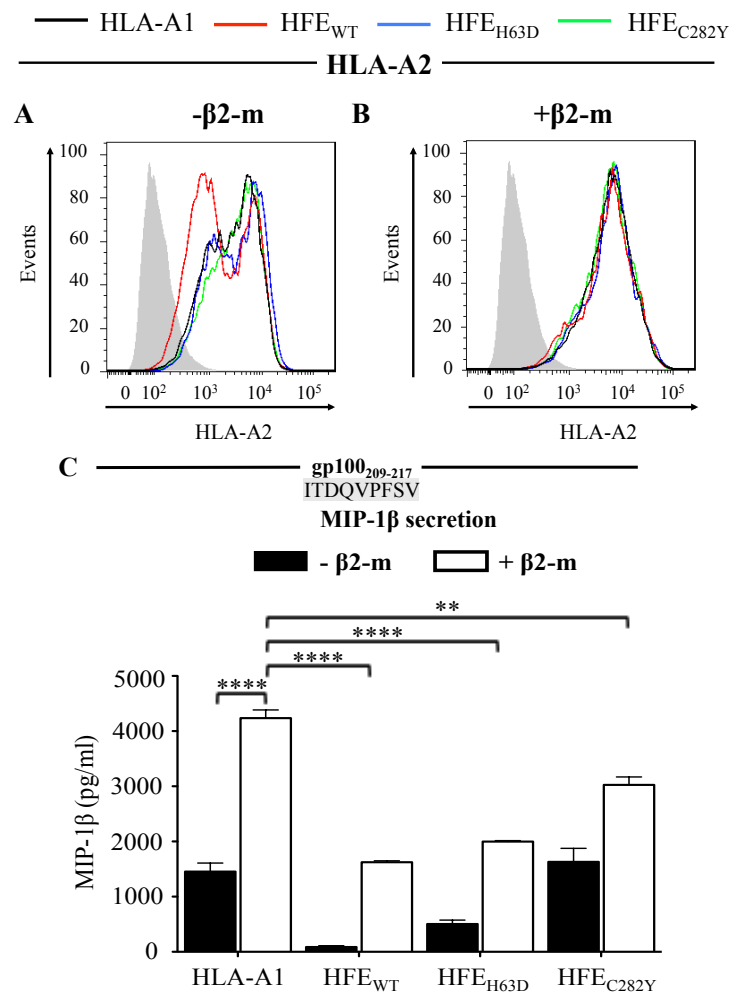


Figure 15 (5^{m1}). Inhibition of CD8⁺ T lymphocyte activation by HFE_{WT} is independent of HLA-A2 and β2-m expression levels.

(A and B) HLA-A2 surface expression in 293-A2 transfected with HLA-A1 or HFE variants (A) without and (B) with β2-m plasmid. Grey histograms in A and B represent unstained controls. (C) MIP-1β secretion by gp100₂₀₉₋₂₁₇-specific CD8⁺ T lymphocytes following co-culture with 293-A2 transfected with HLA-A1 or HFE variants and gp100 plasmids, without (black bars) or with β2-m plasmid (white bars). The amino acid sequence of the gp100₂₀₉₋₂₁₇ epitope is highlighted at the top of panel. Results are representative of three similar experiments performed. Values expressed as mean ± SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. ***P* < 0.01 and *****P* < 0.0001 when compared to HLA-A1; n.s. - not significant. For A and B, HLA-A1 = black, HFE_{WT} = red, HFE_{H63D} = blue, HFE_{C282Y} = green.

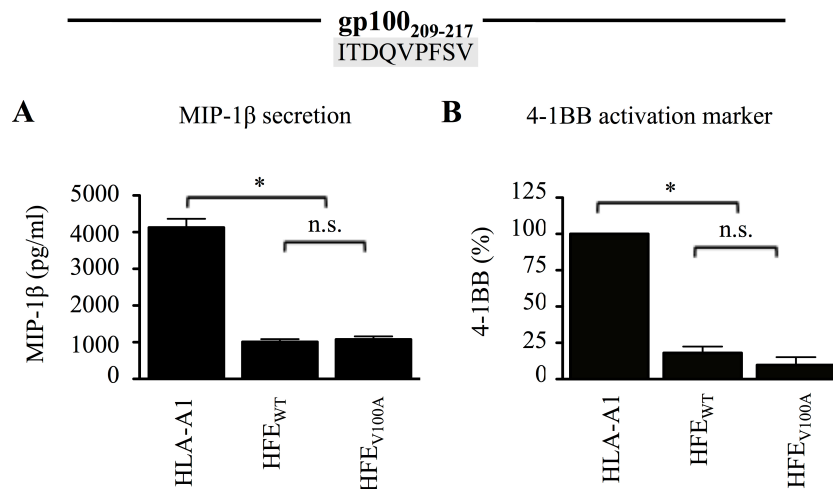


Figure 16 (6^{m1}). HFE suppression of CD8⁺ T lymphocyte activation is not mediated by its interaction with Tfr.

(A) MIP-1 β production and (B) 4-1BB activation marker levels in CD8⁺ T lymphocytes exposed to 293-A2 co-transfected with HLA-A1, HFE_{WT} or HFE_{V100A}, and gp100 plasmids. The amino acid sequence of the gp100₂₀₉₋₂₁₇ epitope is highlighted at the top of the figure. MIP-1 β and 4-1BB statistics were calculated after combining values from three to four independent experiments. Results are representative of three similar experiments performed. Values expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. Data for 4-1BB are presented as percentage of HLA-A1. * P < 0.05 when compared to HLA-A1; n.s. - not significant.

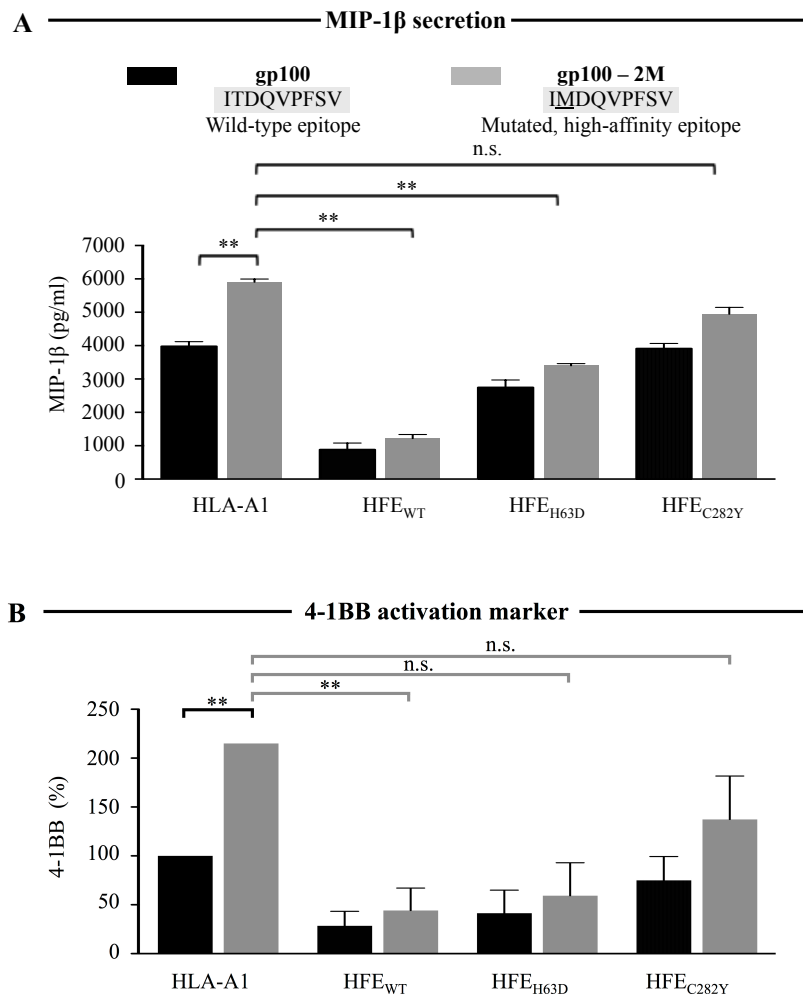


Figure 17 (7^{m1}). HFE blocks CD8⁺ T lymphocyte activation in response to low- and high-affinity epitopes to the same extent.

(A) MIP-1 β production and (B) 4-1BB activation marker levels in CD8⁺ T lymphocytes exposed to 293-A2 co-transfected with HLA-A1 or HFE variants and the wild-type gp100 melanoma antigen (black bars) or the high-affinity gp100-2M point mutant (grey bars). Amino acid sequences of the gp100 and gp100-2M epitopes are highlighted at the top of each panel. MIP-1 β and 4-1BB statistics were calculated after combining values from three independent experiments. Results are representative of three similar experiments performed. Values expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. Data for 4-1BB are presented as percentage of HLA-A1. ** $P < 0.01$ when compared to HLA-A1; n.s. - not significant.

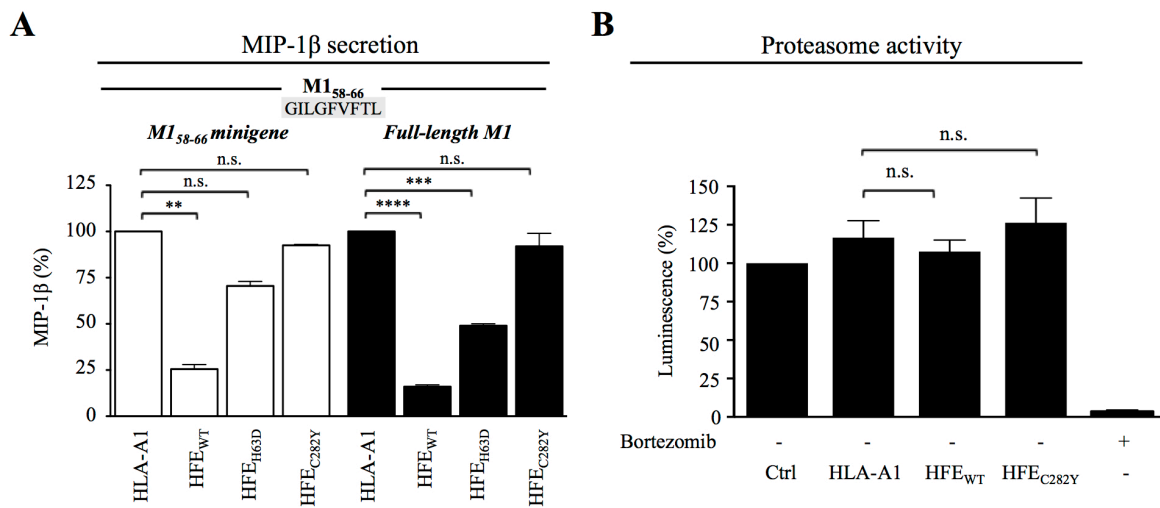


Figure 18 (8^{m1}). HFE_{WT} inhibition of CD8⁺ T lymphocyte activation is independent of internal antigen processing.

(A) HFE_{WT} equally inhibits MHC I presentation by 293-A2 cells transfected with plasmids coding for the minimal M1₅₈₋₆₆ epitope (M1₅₈₋₆₆ minigene; white bars) or the full-length M1 antigen (Full-length M1; black bars), and co-transfected with HLA-A1 or HFE variants. MIP-1 β secretion by M1₅₈₋₆₆-specific CD8⁺ T lymphocytes is shown. Amino acid sequences of the tested epitopes are highlighted below the name of corresponding epitope. (B) HFE_{WT} has no effect on proteasome activity. 293-A2 were transfected with HLA-A1, or HFE variant plasmids. Proteasome activity was measured after treatment with Proteasome-Glo reagent followed by luminescence quantification. Bortezomib was used as a control for inhibiting proteasome activity. Statistics were calculated after combining values from three independent experiments, and data are presented as percentage of HLA-A1 (A) or untransfected cells (Ctrl; B). Results are representative of three similar experiments performed. Values expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. ** P < 0.01, *** P < 0.001 and **** P < 0.0001 when compared to HLA-A1; n.s. - not significant.

2. Figures supplémentaires

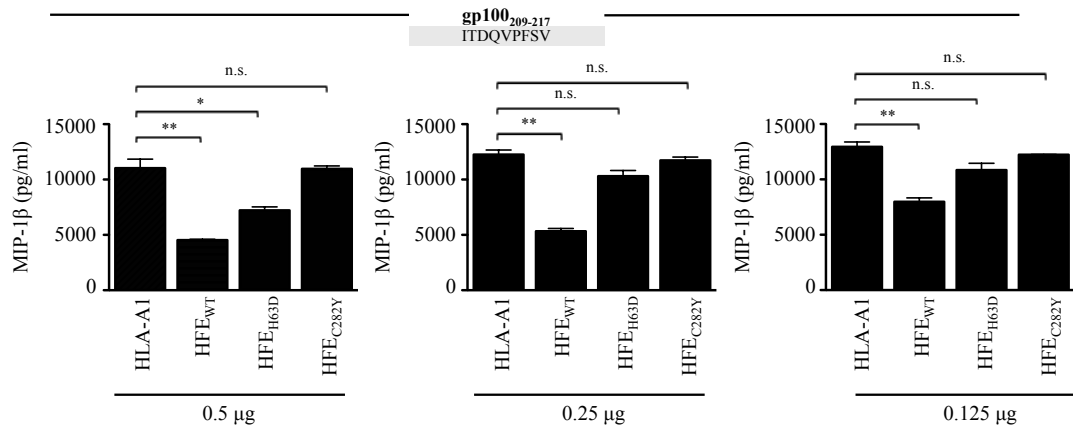


Figure 19 (S1^{m1}). Titration of HFE plasmid in T cell antigen recognition mediated by HLA-A2.

293-A2 were transfected with decreasing doses of HLA-A1, or HFE variant plasmids and constant dose of gp100 plasmid. MIP-1 β secretion by gp100₂₀₉₋₂₁₇-specific CD8⁺ T lymphocytes following co-culture with transfected 293-A2. MIP-1 β statistics were calculated after combining values from three independent experiments. Amino acid sequence of the tested epitope is highlighted below the name of the epitope. Results are representative of three similar experiments performed. Values expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. * $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$ when compared to HLA-A1; n.s. - not significant.

Reuben *et al.*

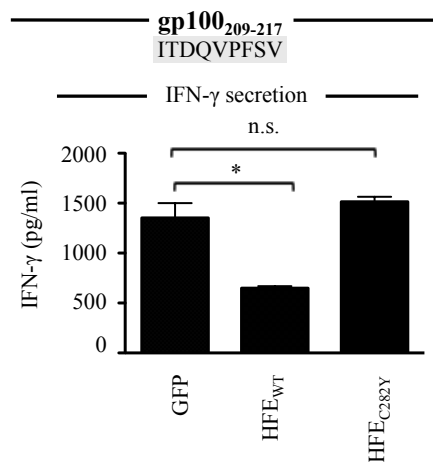


Figure 20 (S2^{m1}). HFE inhibits T cell antigen recognition mediated by HLA-A2 in MelS-FB melanoma cells.

IFN- γ secretion by gp100₂₀₉₋₂₁₇-specific CD8⁺ T lymphocytes following co-culture with MelS-FB cells co-transfected with GFP or HFE variants and gp100 plasmids. Amino acid sequence of the tested epitope is highlighted below the name of the epitope. IFN- γ statistics were calculated after combining values from two independent experiments. Results are representative of three similar experiments performed. Values expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. * $P < 0.05$ when compared to GFP; n.s. - not significant.

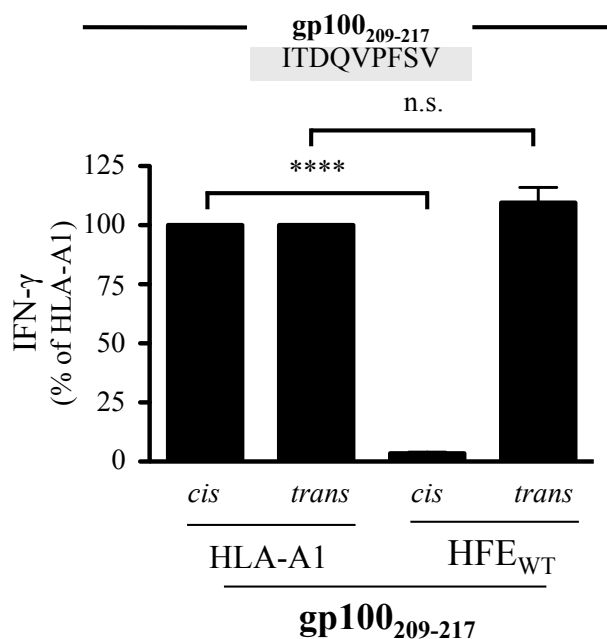


Figure 21 (S3^{m1}). HFE must be expressed in *cis* of antigen to affect CD8⁺ T lymphocyte activation.

293-A2 were transfected with HLA-A1 or HFE_{WT} plasmids. In parallel, 293-A2 cells were transfected with exclusively HLA-A1 or HFE_{WT} plasmids, or exclusively gp100 antigen plasmid. Both HLA-A1 or HFE_{WT}-transfected and gp100-transfected 293-A2 cell populations were mixed at a 1:1 ratio and IFN- γ secretion by gp100₂₀₉₋₂₁₇-specific CD8⁺ T lymphocytes following co-culture with transfected 293-A2 was quantified. IFN- γ statistics were calculated after combining values from two independent experiments. Amino acid sequence of the tested epitope is highlighted below the name of the epitope. Results are representative of two similar experiments performed. Values expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. **** P < 0.0001 when compared to HLA-A1; n.s. - not significant.

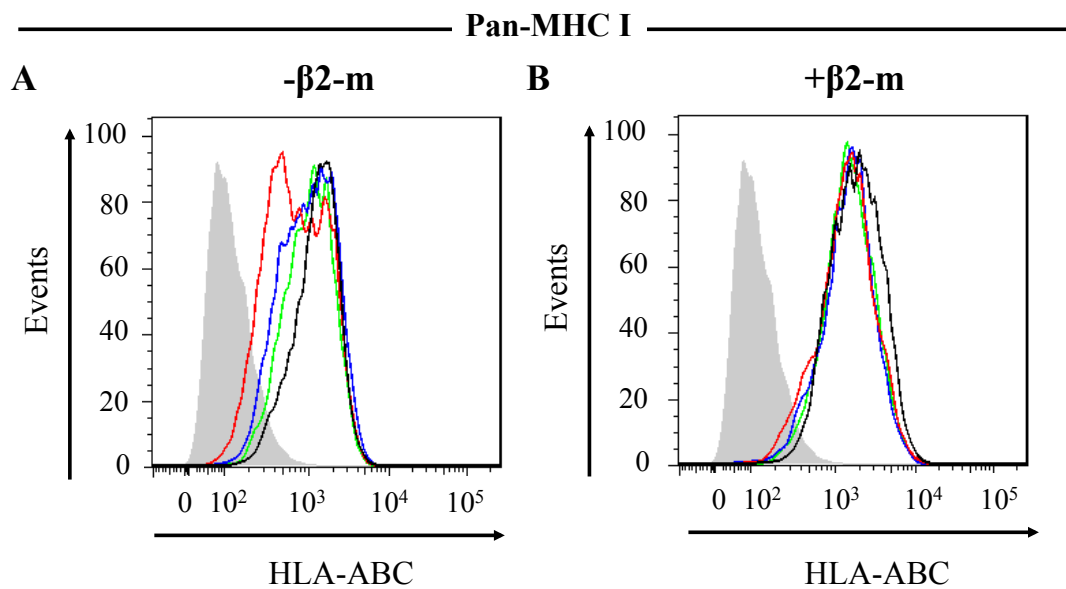


Figure 22 (S4^{m1}). MHC I surface expression is restored by β2-m co-transfection.

MHC I expression in 293-A2 co-transfected with HLA-A1, or HFE variants A) without or B) with β2-m plasmids. Results are representative of three similar experiments performed. Grey histograms represent unstained controls and dotted lines indicate threshold for positivity. For A and B, HLA-A1 = black, HFE_{WT} = red, HFE_{H63D} = blue, HFE_{C282Y} = green.

Reuben *et al.*

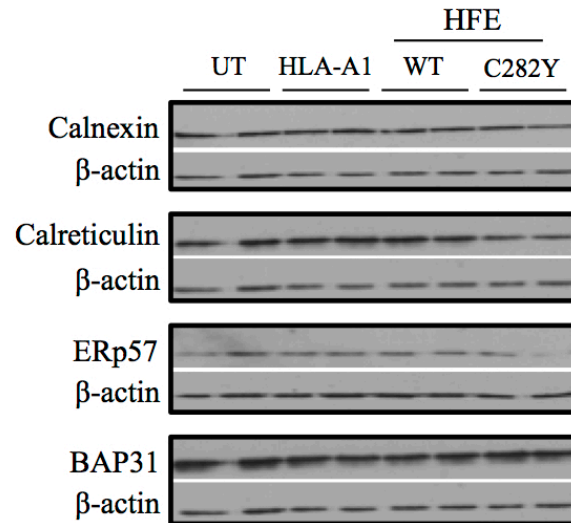


Figure 23 (S5^{m1}). HFE_{WT} does not alter the expression of MHC I chaperones involved in the peptide loading complex.

293-A2 were transfected with HLA-A1, or HFE variant plasmids in duplicates. Protein levels of MHC I chaperones were quantified by Western blotting. Results are representative of at least two similar experiments performed.

Reuben *et al.*

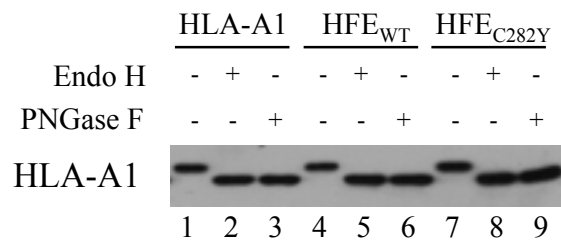


Figure 24 (S6^{m1}). MHC I glycosylation is unaffected by HFE_{WT}.

We evaluated the sensitivity of MHC I to Endo H (lanes 2, 5, 8) and PNGase F (lanes 3, 6, 9) glycosidases in 293-A2 transfected with untagged HLA-A1, HFE_{WT}, or HFE_{C282Y} plasmids and HLA-A1 FLAG. Protein extracts left undigested are shown in lanes 1, 4, and 7. Extracts were evaluated by Western blot and probed with anti-FLAG antibody. Results are representative of three similar experiments performed.

Reuben *et al.*

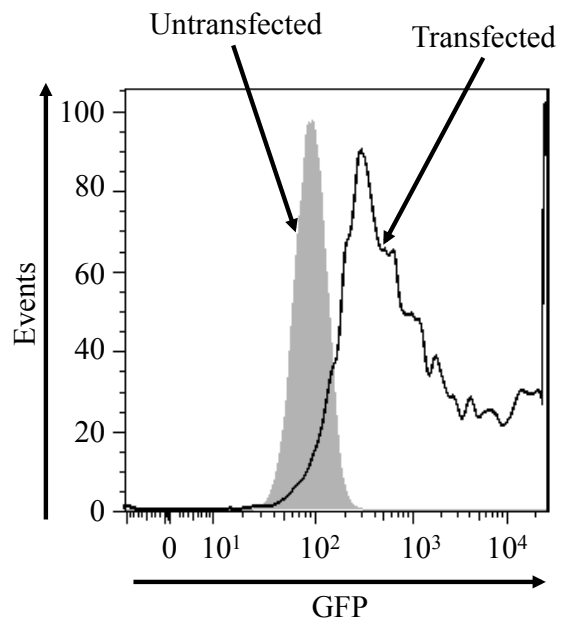


Figure 25 (S7^{m1}). Transfection efficiency in 293-A2.

293-A2 were transfected with the GFP plasmid. Results are representative of three similar experiments performed. Grey histogram represents untransfected control.

3. Résultats supplémentaires

Résultats supplémentaires

Nous avons évalué plusieurs mécanismes pouvant éclaircir l'effet de HFE sur la présentation antigénique par MHC I sans l'identifier avec certitude. Nos résultats excluent l'importance d'une compétition pour la β 2-m, d'une modulation de l'activité du protéasome ou des aminopeptidases du ER, de l'affinité des antigènes présentés et de l'interaction de HFE avec le TfR1. Par contre, notre étude nous a permis d'établir que l'apprêtement intracellulaire des molécules du MHC I est affecté par HFE, puisque la reconnaissance des antigènes chargés de manière extracellulaire n'est pas inhibée par HFE_{WT}. Les travaux qui suivent contribuent à mieux contrôler et à élucider davantage le mécanisme exploité par HFE.

Le contrôle MHC I (HLA-A*01) n'inhibe pas la reconnaissance comparativement au contrôle MHC I-indépendant GFP

HFE est une protéine appartenant à la famille des MHC I. Afin de dissocier un effet causé simplement par la surexpression d'une molécule du MHC I, tous nos travaux ont été faits en comparant l'impact de HFE à celui de HLA-A1, une molécule du MHC I classique. Par contre, nous ne pouvions exclure la possibilité que, à la base, le contrôle HLA-A1 cause une certaine inhibition grâce à une compétition pour la β 2-m ou pour d'autres raisons inconnues. Ainsi, nous avons comparé l'impact de HLA-A1 à celui de la protéine GFP, indépendante du MHC I. Les résultats nous permettent d'établir que le contrôle HLA-A1 n'inhibe pas la reconnaissance par MHC I, contrairement à HFE_{WT} (**Figure 26**).

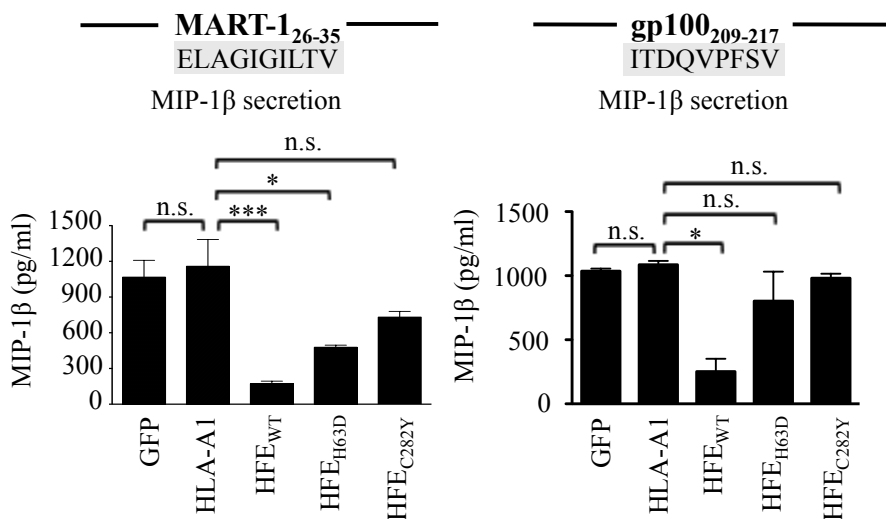


Figure 26. Le contrôle HLA-A*0101 n'inhibe pas la reconnaissance.

Sécrétion de MIP-1 β par les lymphocytes T CD8⁺ MART-1₂₆₋₃₅- (gauche) ou gp100₂₀₉₋₂₁₇-spécifiques (droite) suivant la co-culture avec des cellules 293-A2 co-transfectées avec GFP, HLA-A1 ou les plasmides encodant les variants HFE et gp100. Séquences d'acides aminés des épitopes de MART-1₂₆₋₃₅ et gp100₂₀₉₋₂₁₇ surlignées en gris. Statistiques calculées en combinant les valeurs de trois expériences indépendantes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ lorsque comparé à HLA-A1; n.s. - not significant.

Titration des plasmides encodant gp100 et le minigène gp100₂₀₉₋₂₁₇

Bien que HFE_{WT} ait démontré une capacité à inhiber la reconnaissance antigénique suite à la co-expression d'un minigène (**Figure 18A**), nous avons voulu nous assurer que nous ne générions pas des conditions saturantes d'antigène puisque les antigènes exprimés par un minigène sont présentés à des niveaux accrus [194]. Ainsi, nous avons effectué des titrations de plasmides encodant l'antigène gp100 pleine-longueur ainsi que pour le minigène gp100₂₀₉₋₂₁₇ et avons établi que, même à des doses d'antigène plus faibles, HFE_{WT} maintient sa capacité d'inhiber la reconnaissance du minigène gp100₂₀₉₋₂₁₇ comparativement à HLA-A1 (**Figure 27**).

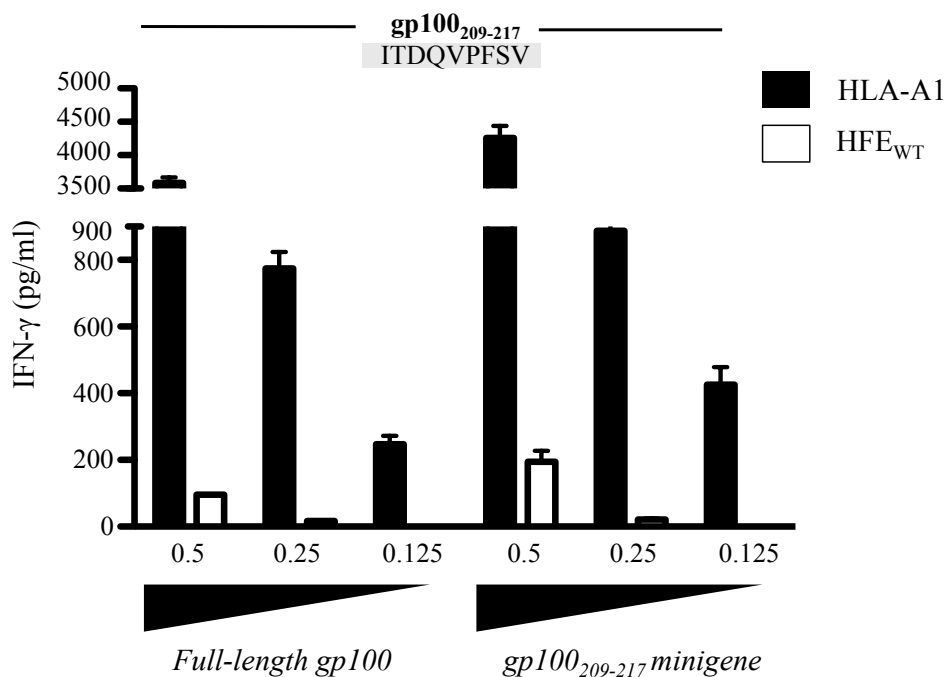


Figure 27. Titration de plasmides encodant gp100 ou pour le minigène gp100₂₀₉₋₂₁₇.

Méthodologie identique à celle de la **Figure 18A**. De plus, les plasmides encodant gp100 pleine-longueur et le minigène gp100₂₀₉₋₂₁₇ ont été dilués afin d'assurer des concentrations d'épitope gp100₂₀₉₋₂₁₇ non-saturantes.

HFE_{WT} n'altère pas les niveaux d'expression de β 2-m

Certaines études décrivent que l'expression de HFE_{WT} cause, paradoxalement, une augmentation de l'expression protéique de β 2-m [195, 196] bien que ceci puisse être lié à une sécrétion décriue de β 2-m en raison de sa rétention par HFE_{WT}. D'autres ont par ailleurs suggéré que HFE_{WT} pourrait compétitionner pour la β 2-m et ainsi en priver les molécules du MHC I qui en dépendent [188]. Notre étude (**Figures 15 et 22**) confirme qu'une compétition pour la β 2-m peut causer une légère baisse de l'expression de MHC I, mais exclut ce mécanisme comme étant responsable de l'inhibition de la reconnaissance par MHC I (**Figure 15C**). Ainsi, nous avons quantifié les niveaux d'expression de β 2-m en présence de HFE_{WT}, pour vérifier si la hausse de l'expression de β 2-m observée pourrait être due à une hausse de sa transcription associée à la β 2-m ou tout simplement à sa rétention accrue par une liaison à HFE_{WT}. Les résultats de la **Figure 28** démontrent que l'expression de β 2-m demeure stable, malgré la surexpression des divers variants HFE, suggérant que HFE_{WT} accroît les niveaux de β 2-m intracellulaire en assurant sa rétention.

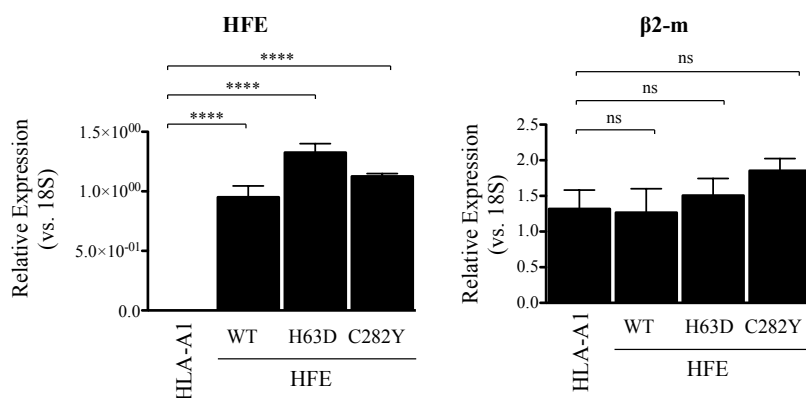


Figure 28. Niveaux d'expression des mRNA encodant la β 2-m dans des cellules 293-A2 en présence de HFE.

Des cellules 293-A2 ont été transfectées avec les variants HFE, puis l'mRNA a été extrait et transcrit en cDNA avant de quantifier par qRT-PCR les niveaux d'expression de β 2-m.

HFE_{WT} n'altère pas les niveaux d'mRNA encodant les chaperones impliquées dans la présentation antigénique par MHC I

Selon certaines études, l'expression de HFE cause une induction de l'expression de chaperones comme la CRT [197, 198], impliquée dans la présentation par MHC I. Nos résultats suggèrent que HFE_{WT} n'altère pas les niveaux d'expression des diverses chaperones impliquées dans l'apprêtement du MHC I (**Figure 23**). Par ailleurs, dans notre modèle, l'expression de HFE_{C282Y} n'accroît pas l'expression de CRT, contrairement à ce qui a été décrit précédemment (**Figure 29**) [197].

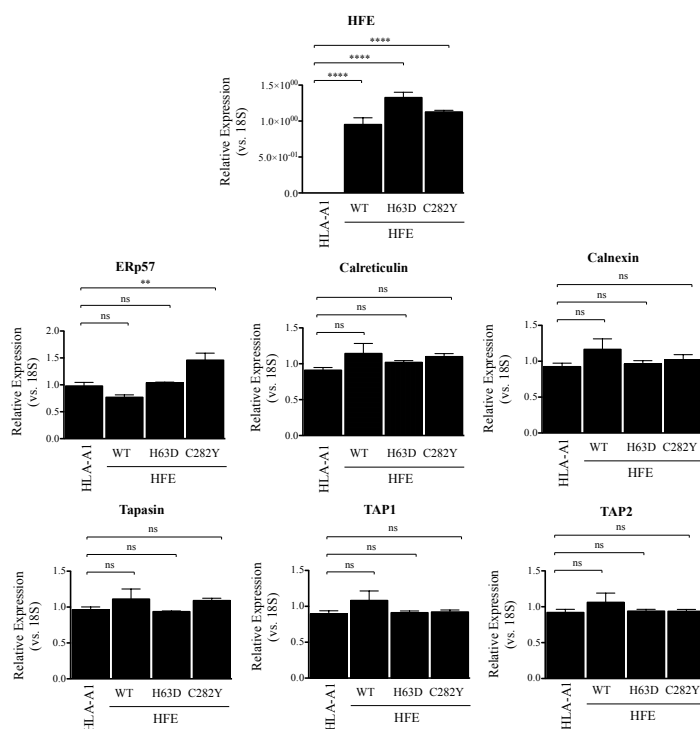


Figure 29. Niveaux d'expression des mRNA encodant les chaperones impliquées dans l'apprêtement antigénique par MHC I dans des cellules 293-A2 en présence de HFE.

Des cellules 293-A2 ont été transfectées avec les variants HFE, puis l'mRNA a été extrait et transcrit en cDNA avant de quantifier par qRT-PCR les niveaux d'expression des chaperones impliquées dans l'apprêtement antigénique par MHC I.

L'expression de HFE_{WT} ne cause pas de UPR

Dans certaines conditions, l'expression de HFE_{C282Y} et HFE_{H63D} cause une UPR [197]. De plus, l'induction d'une UPR peut avoir des impacts majeurs sur la présentation antigénique par MHC I, en altérant les sources d'antigènes présentés [87]. Ainsi, dans notre modèle, nous avons évalué si l'expression de HFE causait une UPR et si celle-ci pourrait expliquer l'impact de HFE_{WT} sur la reconnaissance par MHC I. Nous avons quantifié les niveaux d'expression de la protéine CHOP liée à la UPR et n'avons observé aucune induction en présence de HFE_{WT}, alors qu'une légère tendance vers la hausse était observable avec HFE_{C282Y}, bien que non statistiquement significative (**Figure 30**).

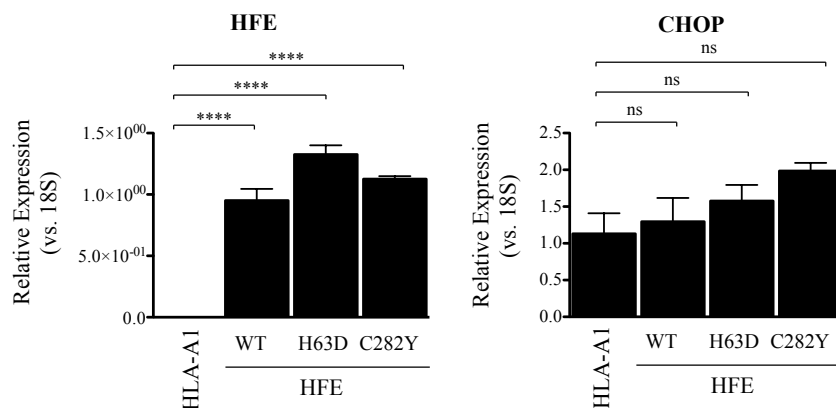


Figure 30. HFE_{WT} ne cause pas d'UPR.

Des cellules 293-A2 ont été transfectées avec HLA-A1 et les variants HFE. Puis, le lendemain, l'mRNA a été extrait et transcrit en cDNA avant qu'une qRT-PCR ne soit complétée afin de quantifier l'induction de la chaperone CHOP associée à l'UPR.

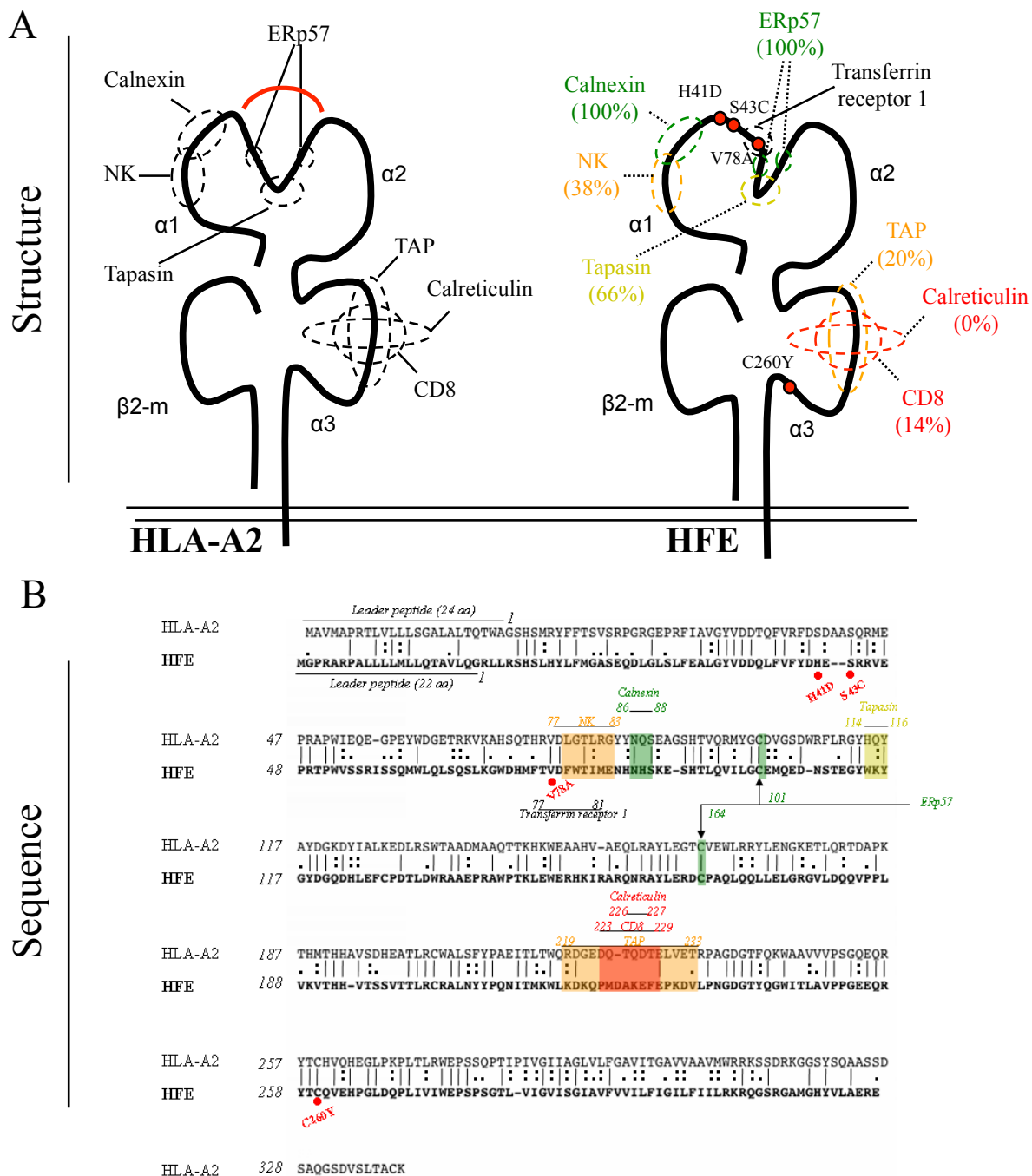
Co-immunoprécipitation de HFE avec les chaperones impliquées dans l'apprêtement par MHC I

Compte tenu de l'homologie entre HFE et les MHC I [16], nous avons évalué la conservation de certains des sites d'interaction des chaperones impliquées dans la présentation antigénique par MHC I chez HFE. Pour ce faire, nous avons aligné les séquences protéiques de HFE et de HLA-A*02 et déterminé quels étaient les résidus impliqués dans la liaison aux chaperones du MHC I [149, 199-207]. Puis, nous avons comparé les sites de liaison et avons déterminé leur degré de conservation (**Figure 31A et B**). Un site de liaison conservé pourrait suggérer que HFE lie cette chaperone et l'empêche d'agir efficacement dans la voie de présentation antigénique par MHC I, causant ainsi l'inhibition observée.

En analysant l'alignement des séquences, nous avons établi que certains sites de liaison étaient conservés à 100% (ERp57, CNX), ou partiellement (TAP, TPN), alors que d'autres étaient absents (CRT). Il est à noter que HFE ne lie pas le co-récepteur CD8 des lymphocytes T, malgré sa conservation modeste à 14% [16]. Par ailleurs, malgré une homologie de 38% pour le site de liaison des cellules NK, HFE ne lie pas et n'altère pas l'activité de ce type cellulaire [208].

Nous avons donc procédé à la co-immunoprécipitation des molécules de HFE transfectées dans les cellules 293, afin d'identifier toute interaction potentielle pouvant justifier l'effet de HFE. Les co-immunoprécipitations, bien que peu concluantes, suggèrent que HFE_{WT} lie la CNX, la CRT et ERp57. Par contre, l'association de HFE_{WT} avec ces chaperones n'est pas enrichie comparativement au contrôle HLA-A1. Ainsi, il est peu probable que HFE_{WT}

monopolise ces chaperones et les empêche de participer au chargement d'antigènes sur les molécules du MHC I (**Figure 31C**).



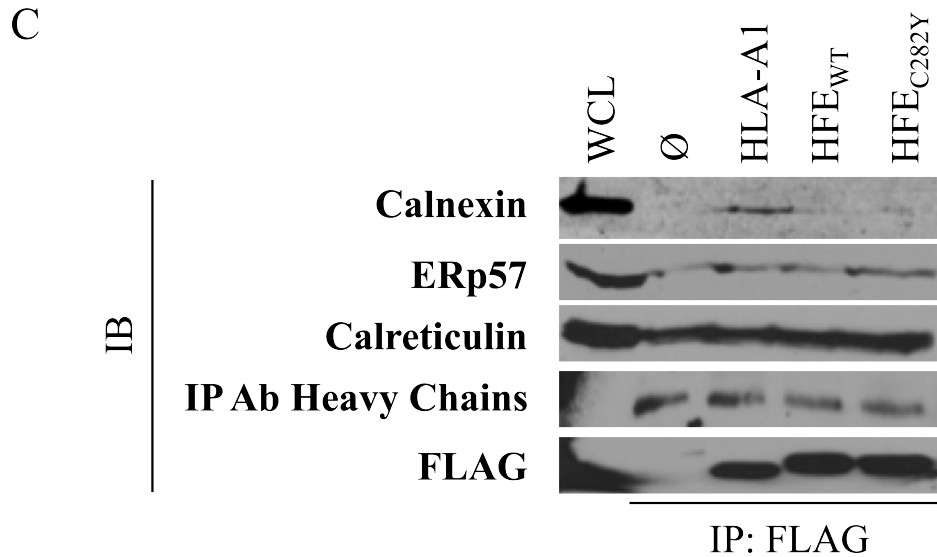


Figure 31. Co-immunoprécipitation de certaines chaperones impliquées dans l'apprêtement antigénique par MHC I en compagnie de HFE.

A) Représentation des structures de HLA-A2 (gauche) et HFE_{WT} (droite). B) Alignement des séquences protéiques de HLA-A2 et HFE. vert = haut degré de conservation; jaune = degré de conservation modéré; rouge = degré de conservation faible ou nul. C) Des cellules 293-A2 ont été transfectées avec les variants HFE exprimant un FLAG C-terminal, avant de subir une immunoprécipitation avec un anticorps anti-FLAG (IP: FLAG) et un immunobuvardage de type Western (IB) afin de quantifier la détection des chaperones du MHC I en présence de HFE. À noter que la numérotation des mutations présentées en A et B diffère puisqu'elle ne tient pas compte de la séquence signal de 22 acides aminés clivée dans la protéine sous sa forme native. WCL = whole cell lysate, Ø = untransfected cells, IB = immunoblot, IP = immunoprecipitation, IP Ab Heavy Chains = heavy chains of the anti-FLAG antibody used for IP.

HFE n'altère pas les niveaux d'expression des MHC I non-liés à la β 2-m

L'établissement d'une expression constante à la surface des molécules HLA-ABC et HLA-A2 dans notre système en présence de HFE_{WT} (**Figures 15 et 22**) soulève la possibilité que les molécules du MHC I exprimées à la surface sont incorrectement repliées et non-associées à la β 2-m mais pourraient tout de même être reconnues par les anticorps anti-HLA employés. Dans plusieurs contextes de maladies comme la spondyloarthrite ankylosante, on retrouve des chaînes lourdes du MHC I non-liées à la β 2-m à la surface cellulaire [209-211]. Ainsi, nous avons quantifié la présence de chaînes lourdes du MHC I non-liées à la β 2-m à la surface cellulaire avec un anticorps reconnaissant uniquement les chaînes lourdes du MHC I sous cette forme, en présence de HFE, afin d'expliquer leur incapacité à présenter correctement les peptides dérivés de l'apprêtement antigénique par MHC I. Le marquage intracellulaire de ces chaînes lourdes non-liées à la β 2-m nous a servi de contrôle positif pour l'anticorps, puisque les chaînes lourdes y sont détectables avant leur liaison à la β 2-m et leur transport à la surface (**Figure 32A**). Nos résultats démontrent que l'expression de HFE ne cause pas de changement dans les niveaux d'expression de surface des molécules du MHC I non-associées à la β 2-m (**Figure 32**). Il est à noter que le contrôle du MHC I HLA-A1 est reconnu par cet anticorps pan-HLA-ABC non-lié à la β 2-m, contrairement aux variants HFE, ce qui explique la faible augmentation dans la détection de chaînes lourdes non-liées dans ce cas (**Figure 32B et C**).

HFE n'affecte pas la reconnaissance des peptides chargés

HFE inhibe la reconnaissance de l'antigène pleine-longueur gp100 ainsi que du minigène gp100₂₀₉₋₂₁₇ qui résultent tous deux en la présentation de l'épitope gp100₂₀₉₋₂₁₇ à la surface cellulaire. Par contre, ces deux formes d'antigènes requièrent un apprêtement intracellulaire et un chargement sur molécules du MHC I nouvellement synthétisées dans le ER. Ainsi, nous avons étudié l'impact de HFE sur la reconnaissance de la forme peptidique de gp100₂₀₉₋₂₁₇ qui ne requiert aucun apprêtement intracellulaire, afin de mieux élucider le mécanisme de HFE. Pour ce faire, des cellules 293-A2 ont été incubées avec le peptide gp100₂₀₉₋₂₁₇ pendant trois heures, avant d'être lavées et co-cultivées avec des lymphocytes T CD8⁺ gp100₂₀₉₋₂₁₇-spécifiques. Les résultats démontrent que HFE n'a aucun impact sur la reconnaissance d'antigènes chargés de manière extracellulaire, suggérant ainsi que HFE semble agir sur l'apprêtement intracellulaire des antigènes du MHC I (**Figure 33**).

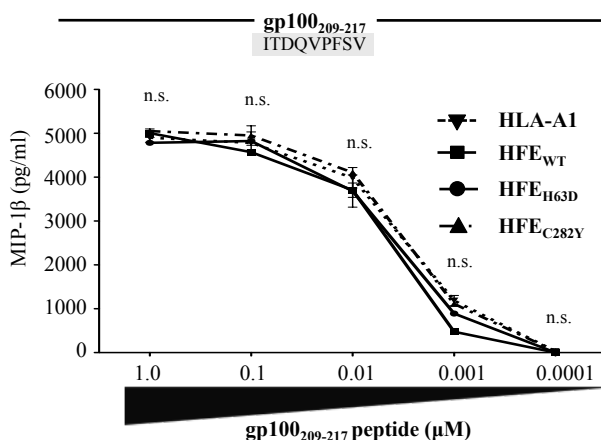


Figure 33. HFE n'affecte pas l'activation des lymphocytes T CD8⁺ en réponse aux peptides chargés à la surface cellulaire.

Production de MIP-1β détectée par ELISA dans les surnageants de lymphocytes T CD8⁺ gp100₂₀₉₋₂₁₇-spécifiques exposés à des cellules 293-A2 transfectées avec HLA-A1 ou les variants HFE et chargés avec des doses décroissantes de peptide gp100₂₀₉₋₂₁₇. Données représentatives de cinq expériences. Valeurs exprimées comme moyenne ± SEM.

HFE affecte l'apprêtement intracellulaire des antigènes présentés sur MHC I

Nous avons étudié l'impact de HFE sur trois voies de présentation antigénique différant de par leur apprêtement de l'antigène présenté (intracellulaire avec digestion par le protéasome, TPPII et ERAP (**Figure 34A**), intracellulaire sans digestion (**Figure 34B**) et extracellulaire sans digestion ni apprêtement (**Figure 34C**)), qui requièrent certaines chaperones communes alors qu'elles se distinguent par d'autres besoins. Le plasmide encodant la protéine pleine longueur M1 suscite la présentation *via* la voie décrite à la **Figure 34A**. Par ailleurs, l'emploi du minigène M1₅₈₋₆₆ requiert les composantes décrites à la **Figure 34B**. Finalement, l'étude de l'effet de HFE sur la reconnaissance du peptide M1₅₈₋₆₆ dépend de la voie décrite à la **Figure 34C**. Il est à noter que dans les trois voies, le bras d'apprêtement de la molécule du MHC I requiert les mêmes étapes. Par contre, celles-ci divergent de par leurs besoins en termes d'apprêtement de l'antigène présenté. Le plasmide encodant la protéine pleine longueur requiert une digestion par le protéasome, TPPII, ainsi que par ERAP dans le ER, alors que le minigène M1₅₈₋₆₆ ne requiert aucune digestion mais passe par le cytosol et le ER, et que le peptide M1₅₈₋₆₆ est chargé de manière extracellulaire et évite donc tout besoin d'apprêtement intracellulaire. Ces travaux suggèrent que HFE affecte l'apprêtement intracellulaire des l'antigènes.

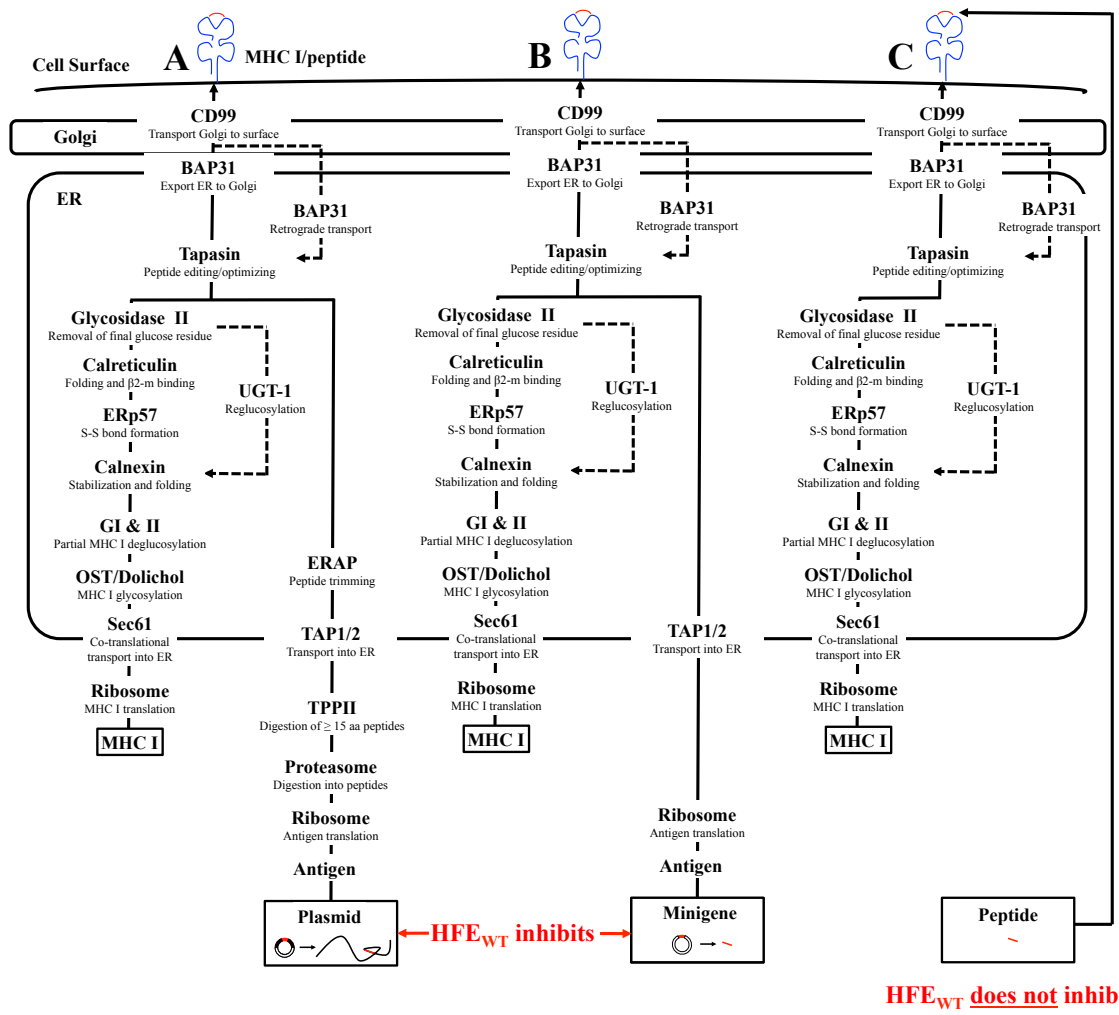


Figure 34. Voies de présentation antigénique par MHC I étudiées.

Survol des protéines et chaperones impliquées dans l'apprêtement et la présentation par MHC I des antigènes de notre étude et rappel de l'impact de HFE_{WT} défini sur ces trois voies d'apprêtement.

SECTION III

Article II: Modulation de l'expression de HFE par les lymphocytes T activés

**T lymphocytes inhibit HFE expression in cancer cells through production of
GM-CSF, IFN- γ , and TNF**

Alexandre Reuben^{a,b}, Manuela M. Santos^{a,b,c} and Réjean Lapointe^{a,b,c}

^aCentre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and
Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9

^bDépartement de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

^cM.M.S. and R.L. shared senior authorship of this report

Running title: T lymphocytes inhibit HFE in tumors

Abstract

The immune system and tumors are closely intertwined during the tumor elimination, equilibrium, and escape steps of immune editing. Over this period, tumors evolve to promote self-survival through immune escape. Mutations in components involved in MHC I presentation of tumor antigens to the immune system remain major targets mutated in cancers. Furthermore, the immune system has been shown to influence tumors through production of immunosuppressive cytokines, recruitment and polarization of cells which may favor tumor escape or through production of anti-tumor cytokines which may promote tumor rejection. We previously discovered that HFE, a negative regulator of iron absorption, acts as an inhibitor of classical MHC I antigen presentation. In this study, we evaluated the impact of circulating immune cells on HFE expression in tumor cell lines. We co-cultured tumor cell lines from melanoma, lung, and kidney cancers with activated PBMC and established that HFE expression is increased in tumor cell lines compared to healthy tissues, and that exposure of tumor cells to activated PBMC results in significant down-regulation of HFE expression. Furthermore, HFE inhibition was mediated by both CD4 and CD8 T lymphocytes, through production of soluble mediators, namely GM-CSF, IFN- γ , and TNF. These results suggest that the immune system may modulate HFE expression in inflammatory conditions in order to modulate MHC I antigen presentation and promote tumor clearance.

Introduction

Tumors are heterogeneous masses, which are composed of stromal, transformed, and infiltrating immune cells. The high proliferative potential of tumors, as well as constant evolution of such tumors to become resistant, requires high nutrient availability in order not to blunt tumor growth. Iron is one such nutrient, which has been demonstrated to be essential for tumor progression. It has been demonstrated that iron depletion stunts cell growth, and that tumors manipulate their environment through diverse mechanisms to enhance iron content. Accordingly, hereditary hemochromatosis (HH), an iron overload disease, has been linked in many instances to cancer development and progression, particularly in the liver [212]. Interestingly, HH patients have also demonstrated certain immunological defects such as low T lymphocyte numbers and modified T cell polarization, among others, suggesting that, in addition to iron, HH patients may promote tumor development through certain immunological mechanisms.

HFE, the MHC I-like molecule involved in iron metabolism and mutated in HH, has been extensively studied since its discovery in 1996 [13] for its role as a negative regulator of iron absorption [213] and uptake as well as for its binding partner, the transferrin receptor 1 (TfR1) [16, 214]. However, subsequent demonstration that HFE was structurally homologous to classical major histocompatibility complex (MHC) class I molecules involved in presentation of cellular antigens suggested that HFE may be linked to the immune system [38]. Furthermore, identification of impaired CD8⁺ T lymphocyte numbers in HH patients [215, 216], as well as increased susceptibility of these patients to autoimmune diseases such as multiple sclerosis [217] and rheumatoid arthritis [218] further reinforced the link of HFE with the immune system. Finally, demonstration that HFE mutations affect MHC I surface expression [188], peptide-

loading kinetics [189], and stability of MHC I molecules [189], in addition to the discovery of HFE's capacity to be directly recognized by CD8⁺ T lymphocytes [190] irrespective of its inability to present peptides cemented its role as an immune molecule.

Recently, we identified HFE as being capable of inhibiting recognition of multiple tumor and viral antigens by antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes, and determined that this impairment is likely due to a disruption of intracellular antigen processing by HFE, which results in inhibited antigen recognition and subsequent CD8⁺ T lymphocyte activation. Considering the widespread expression of HFE [13, 208] and the inclination of tumors for targeting MHC I antigen presentation components [219, 220] in order to evade the immune system and avoid destruction, we questioned the expression of HFE in cancer cells from breast, colon, melanoma, kidney, and lung cancers. Finally, immune cells are potent in their capacity to induce MHC I antigen presentation in inflammatory conditions to better stave off infections [221, 222]. We therefore questioned whether activated immune cells may be capable of modulating HFE expression, considering the potency of HFE's capacity to inhibit MHC I antigen presentation [223].

Materials and Methods

Cell lines - HEK293 human embryonic kidney, KTCL-140 kidney cancer, SK23mel melanoma, MDA-MB-231 breast cancer, HCT116 colon cancer and H460 lung cancer cells were obtained from ATCC (Manassas, VA). All cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamycin (all from Wisent, St-Bruno, Canada). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors, and were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 7.5% Human AB serum (Gemini, West Sacramento, CA), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamycin.

Human normal tissue RNA bank - Human normal tissue RNA bank was purchased from BD Clontech (Mountain View, CA). All 20 tissue sample mRNA were pooled from three independent donors.

Tumor cell line and PBMC co-cultures - Tumor cells were counted and 10^5 cells (in 100 µl complete IMDM) were added per well in 96-well V-bottom plates with 2×10^5 PBMC, enriched CD8⁺ T lymphocytes, or enriched CD4⁺ T lymphocytes (in 100 µl IMDM). StemCell magnetic selection kits (Vancouver, BC). Cells were co-cultured for 24 hours before being harvested for mRNA extraction (Qiagen, Venlo, Netherlands) and qRT-PCR (Qiagen) quantification of HFE expression.

Transwell assays - Tumor lines at 10^5 cells (in 150 µl IMDM) per well were added to 96-well V-bottom plates with 2×10^5 PBMC (in 50 µl IMDM), enriched CD8⁺ T lymphocytes, or enriched CD4⁺ T lymphocytes in the top chamber of Transwell inserts (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Cells were co-cultured for 24 hours before tumor cell lines were harvested for

mRNA extraction (Qiagen) and qRT-PCR quantification (Qiagen) of HFE expression.

T cell activation - 2×10^5 PBMC, CD4⁺ T lymphocytes or CD8⁺ T lymphocytes were incubated overnight in pre-anti-CD3- (OKT3) (eBioscience, San Diego, CA) or IgG2a-coated 96-well flat-bottom plates, in 100 μ l of IMDM. The next day, cells were harvested for tumor cell co-cultures and quantification of HFE mRNA expression.

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) - mRNA was extracted from tumor cells and PBMC by Qiagen RNEasy Micro Kit according to the manufacturer's instructions. Extracted mRNA were quantified by spectrometry and 250 ng of mRNA per condition were used for cDNA reverse transcription with Qiagen Omniscript enzyme according to the manufacturer's instructions. Random hexamer and Oligo dT (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) were used as primers and reaction was carried out at 42°C for 1 hour, in a T3 thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany).

cDNA was diluted at 1:20 in RNase-free water, and qRT-PCR was performed with Qiagen Sybr Green reagent in 15 μ l final reaction volume. HFE qRT-PCR (FWD - ACCACAGCAAGGAGTCCCAC, REV - AGCCCTCGGTACTGTTGTCTT - Integrated DNA Technologies (IDT)) was carried out with a program of 15 minutes at 95°C, 45 cycles (30 second denaturation at 95°C, 30 second annealing at 55°C and 30 second elongation at 72°C), followed by a melt of 72°C to 99°C. 18S qRT-PCR (FWD - ATCAACTTTCGATGGTAGTCG, REV - TCCTTGGATGTGGTAGCCG - IDT) was carried out with a program of 15 minutes at 95°C, 35 cycles (30 second denaturation at 94°C, 45 second annealing at 60°C and 30 second elongation at 72°C), followed by a melt step from 72°C to 99°C.

Cytokine release assays - Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad, Hercules, CA) was performed according to manufacturer's protocol.

Statistical analysis - Statistics were calculated using Prism 5.0 for Mac (GraphPad Software, La

Jolla, USA). Values in figures are expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons were evaluated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test.

Results

HFE is ubiquitously expressed in healthy tissues and overexpressed in tumor cells

HFE is an iron-related protein which has been shown to negatively-regulate iron uptake through binding with the TfR [39, 224]. Since all cells require iron [22], we evaluated the expression pattern of HFE in healthy human tissues by quantifying HFE mRNA expression in a commercial tissue bank. As shown in **Figure 35A**, HFE was detected in all tissues, albeit to varying extents. HFE was most strongly expressed in the kidney and liver, with the weakest expression coming in the heart and brain (**Figure 35A**).

The high proliferative potential of tumors has lead to induction or repression of genes which may promote tumor escape [225, 226]. Considering the impact of HFE on iron uptake [39] and the requirement of iron for tumor cell proliferation [226], we quantified the expression of HFE in HEK293 cells, as well as melanoma (SK23mel), breast (MDA-MB-231), colon (HCT116), kidney (KTCL-140), and lung (H460) cancer cells. As shown in **Figure 35B**, HFE was detected in all tumor cell lines, but absent from HEK293 cells. Furthermore, HFE expression in cancer cell lines was much stronger than in healthy human tissues. Finally, we quantified HFE expression in circulating immune cells which were defined as PBMC, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte populations and established that HFE was weakly expressed in these cell types (**Figure 35C**).

Activated PBMC inhibit HFE expression in tumor cells

Tumors are infiltrated by immune cells which present an activated phenotype [227] and which may modify tumor phenotype and survival [228-230]. To this effect, we studied the impact of activated PBMC on tumor cell HFE expression. We activated PBMC from healthy donors

overnight with anti-CD3, and co-cultured PBMC with tumor cells before tumor cell HFE expression quantification. To do so, we chose the cell lines with the highest HFE expression in **Figure 35B**: KTCL-140 kidney, SK23mel melanoma and H460 lung cancer cells. As shown in **Figure 36**, HFE expression was strongly inhibited by activated PBMC in all cancer cells, with the strongest inhibition (approximately 80%) coming in KTCL-140 kidney cancer cells (**Figure 36A**).

Inhibition of HFE expression by activated PBMC is cell contact-independent

PBMC may affect their environment through production of soluble factors [231, 232] or by directly interacting with surrounding cells through interaction of cell surface ligands and receptors [233]. Therefore, we evaluated the capacity of PBMC to modulate HFE expression in tumor cells in absence of cell-cell contact. To do so, we co-cultured activated PBMC in the top chamber of Transwell inserts, with KTCL-140, SK23mel, or H460 lung tumor cells in the bottom chamber. The next day, harvested cells were stained for CD3 flow cytometry analysis. As shown in **Figure 37A, B, C, and D**, T lymphocytes were not harvested in Transwell experiments. Furthermore, as shown in **Figure 37E, F and G**, HFE expression was down-regulated to the same extent in KTCL-140, SK23mel and H460 lung cancer cells with and without cell contact, suggesting that activated PBMC affect HFE expression in tumor cells through production of soluble factors. Importantly, use of Transwell inserts allowed us to exclude the possibility that the detected HFE down-modulation was due to weak HFE expression in PBMC (**Figure 35C**) by allowing harvesting of tumor cell lines in total absence of contaminant PBMC (**Figure 37D**).

HFE down-regulation is mediated by both CD4 and CD8 T lymphocytes

PBMC activation and HFE down-regulation was achieved through CD3 stimulation, a molecule exclusively expressed on T lymphocytes [234, 235], a cell population accounting for up to 70% of PBMC. Therefore, we sought to better determine which T lymphocyte population was involved in HFE regulation by purifying CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from bulk PBMC. Cells were magnetically-separated from the blood of healthy donors (**Figure 38A, B, and C**) before overnight activation. As shown in **Figure 38D**, both CD4⁺ and CD8⁺ fractions were capable of replicating the effect observed with activated PBMC, suggesting both these cell populations may contribute to HFE down-modulation in tumor cells.

T lymphocytes inhibit HFE expression through production of GM-CSF, IFN- γ and TNF

Considering the involvement of CD3⁺ T lymphocytes in HFE down-regulation in tumors and lack of requirement for cell contact, we evaluated the production of soluble mediators by CD4 and CD8 T lymphocytes upon activation. To determine which mediators were involved in HFE down-regulation by activated PBMC, we magnetically-separated PBMC into CD4⁺ and CD8⁺ fractions, before overnight activation. The next day, activated T lymphocyte supernatants from three independent blood donors were pooled and cytokine production was evaluated by multiplex array of 27 soluble mediators. As shown, both activated CD4 (**Figure 39A**) and CD8 (**Figure 39B**) T lymphocytes produced multiple cytokines, with activation causing increases in production of all soluble factors detected, other than IL-8. Secretion profiles between CD4 and CD8 were strikingly similar, with the one major difference being production of large amounts of IL-8 by both stimulated and unstimulated CD4 T lymphocytes (**Figure 39A**) whereas only unstimulated CD8 T lymphocytes were capable of IL-8 secretion (**Figure 39B**).

Next, we selected soluble factors which were produced to levels above 50 pg/mL in supernatants of both CD4 and CD8 T lymphocytes. We exposed KTCL-140 kidney cancer cells to IL-2, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MIP-1 α , RANTES and TNF overnight, before quantifying HFE expression. As shown in **Figure 40**, GM-CSF, IFN- γ , and TNF all demonstrated a capacity to inhibit HFE expression in KTCL-140 cells, although this decrease was only statistically significant with TNF.

Discussion

In the present study, we investigated the regulation of HFE expression in tumor cells. We show that HFE expression is increased in tumor cell lines compared to healthy human tissues but down-regulated in tumor cell lines upon exposure to activated PBMC. Furthermore, we demonstrate that HFE down-modulation is mediated by both CD4 and CD8 T lymphocytes, with no requirement for cell contact. Down-regulation was induced by production of GM-CSF, IFN- γ , and TNF. Importantly, these results were consistent with PBMC from multiple healthy donors suggesting that this phenomenon is not donor-dependent.

HFE has been well described as a negative regulator of cellular iron uptake through its binding with the TfR. However, we recently showed that HFE expression causes inhibition in antigen-specific CD8⁺ T lymphocyte activation through impediment of MHC I antigen presentation and processing. Considering the propensity of tumors to target both the iron metabolism and antigen presentation pathways, we evaluated the expression of HFE in kidney, melanoma and lung tumor cell lines. Surprisingly, we determined that HFE expression was induced in tumor cell lines compared to healthy tissues, suggesting that these cells could require less iron. However, modeling immune infiltration in tumors with activated PBMC yielded a major inhibition of HFE expression in tumor cells, suggesting that HFE expression may respond to environmental factors.

Immune cells are capable of affecting their environment through direct interaction between cell surface ligands and receptors, or production of soluble mediators such as cytokines and

chemokines. To this effect, we demonstrated through use of Transwell inserts that HFE expression may be down-regulated in absence of cell surface ligands by GM-CSF, IFN- γ , and TNF. Bizarrely, IFN- γ has been known to induce expression of MHC I molecules and processing components. However, demonstration that IFN- γ down-regulates HFE expression in numerous tumor cell lines, as well as studies showing IFN- γ treatment reduces HFE expression in mice *in vivo* suggests otherwise. Interestingly, absence of requirement for cell contact suggests that HFE expression could be altered from a distance through cytokine production, thereby influencing more than the immediate inflammatory environment.

Finally, demonstration that activated T lymphocytes are capable of inhibiting HFE expression in tumor cells suggests a relevance for the immune system in controlling tumor HFE expression. Our previous studies suggest the immune system may target HFE expression by production of GM-CSF, IFN- γ , and TNF in order to promote MHC I antigen presentation and tumor clearance. However, down-regulation of tumor-HFE may, in turn, promote cellular iron uptake and tumor cell proliferation. The balance between the defined impacts of HFE on iron metabolism and MHC I antigen presentation deserves further attention and could help better predict tumor outcome.

References

1. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nature genetics, 1996. **13**(4): p. 399-408.
2. Parkkila, S., et al., *Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2534-9.
3. Lebrón, J.A., et al., *Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor*. Cell, 1998. **93**(1): p. 111-123.
4. Feder, J.N., et al., *The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(4): p. 1472-1477.
5. Gerhard, G.S., A.E. Ten Elshof, and M.J. Chorney, *Hereditary haemochromatosis as an immunological disease*. British journal of haematology, 1998. **100**(2): p. 247-255.
6. Macedo, M.F., et al., *Low numbers of CD8 +T lymphocytes in hereditary haemochromatosis are explained by a decrease of the most mature CD8 +effector memory T cells*. Clinical and experimental immunology, 2010. **159**(3): p. 363-371.
7. Macedo, M.F., et al., *Low serum transferrin levels in HFE C282Y homozygous subjects are associated with low CD8(+) T lymphocyte numbers*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2005. **35**(3): p. 319-325.
8. Rubio, J.P., et al., *Extended haplotype analysis in the HLA complex reveals an increased frequency of the HFE-C282Y mutation in individuals with multiple sclerosis*. Human Genetics, 2004. **114**(6): p. 573-580.
9. Hamilton, E., *Joint disease in haemochromatosis*. Mod Trends Rheumatol, 1971. **2**: p. 338-47.
10. de Almeida, S.F., et al., *Stimulation of an unfolded protein response impairs MHC class I expression*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3612-9.
11. de Almeida, S.F., *HFE cross-talks with the MHC class I antigen presentation pathway*. Blood, 2005. **106**(3): p. 971-977.
12. Rohrllich, P.S., et al., *Direct recognition by alphabeta cytolytic T cells of Hfe, a MHC class Ib molecule without antigen-presenting function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(36): p. 12855-12860.
13. Pascolo, S., et al., *The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells*. International Immunology, 2005. **17**(2): p. 117-122.
14. Reinis, M., *Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors*. Future Oncol, 2010. **6**(10): p. 1577-89.
15. Garcia-Lora, A., et al., *MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components*. Int J Cancer, 2003. **106**(4): p. 521-7.
16. Svane, I.M., et al., *Interferon-gamma-induced MHC class I expression and defects in Jak/Stat signalling in methylcholanthrene-induced sarcomas*. Scand J Immunol, 1997. **46**(4): p. 379-87.

17. Propper, D.J., et al., *Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 84-92.
18. Gross, C.N., et al., *Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(34): p. 22068-22074.
19. Riedel, H.D., et al., *HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3915-3921.
20. Aisen, P., C.A. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2001. **33**(10): p. 940-959.
21. Feger, F., et al., *Role of iron in tumor cell protection from the pro-apoptotic effect of nitric oxide*. Cancer Research, 2001. **61**(13): p. 5289-5294.
22. Deugnier, Y., *Iron and liver cancer*. Alcohol (Fayetteville, NY), 2003. **30**(2): p. 145-150.
23. Godin-Ethier, J., et al., *Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(12): p. 7752-7760.
24. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature Immunology, 2002. **3**(11): p. 991-998.
25. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**: p. 329-360.
26. Ostrand-Rosenberg, S., *Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity*. Current opinion in genetics & development, 2008. **18**(1): p. 11-18.
27. Rytel, M.W. and J. Balay, *Impaired production of interferon in lymphocytes from immunosuppressed patients*. J Infect Dis, 1973. **127**(4): p. 445-9.
28. Tovell, D. and K. Cantell, *Kinetics of interferon production in human leukocyte suspensions*. J Gen Virol, 1971. **13**(3): p. 485-9.
29. Crone, M., C. Koch, and M. Simonsen, *The elusive T cell receptor*. Transplant Rev, 1972. **10**: p. 36-56.
30. Tsoukas, C.D., et al., *Structural and functional characteristics of the CD3 (T3) molecular complex on human thymocytes*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3885-90.
31. Weiss, A., et al., *The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation*. Annu Rev Immunol, 1986. **4**: p. 593-619.
32. Schwarz, D.A., et al., *Novel regulation of an MHC class I gene response to interferon-gamma*. Cell Immunol, 1993. **150**(1): p. 90-100.
33. Fruh, K. and Y. Yang, *Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(1): p. 76-81.
34. Strehl, B., et al., *Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing*. Immunological reviews, 2005. **207**: p. 19-30.
35. Beninga, J., K.L. Rock, and A.L. Goldberg, *Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(30): p. 18734-18742.

36. Heink, S., et al., *IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(26): p. 9241-9246.
37. Steegmann-Olmedillas, J.L., *The role of iron in tumour cell proliferation*. Clin Transl Oncol, 2011. **13**(2): p. 71-6.
38. Yang, Y., et al., *Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7257-61.
39. Klar, D. and G.J. Hammerling, *Induction of assembly of MHC class I heavy chains with beta 2microglobulin by interferon-gamma*. EMBO J, 1989. **8**(2): p. 475-81.
40. Sánchez, M., et al., *Cloning, sequencing and characterization of the rat hereditary hemochromatosis promoter: comparison of the human, mouse and rat HFE promoter regions*. Gene, 1998. **225**(1-2): p. 77-87.

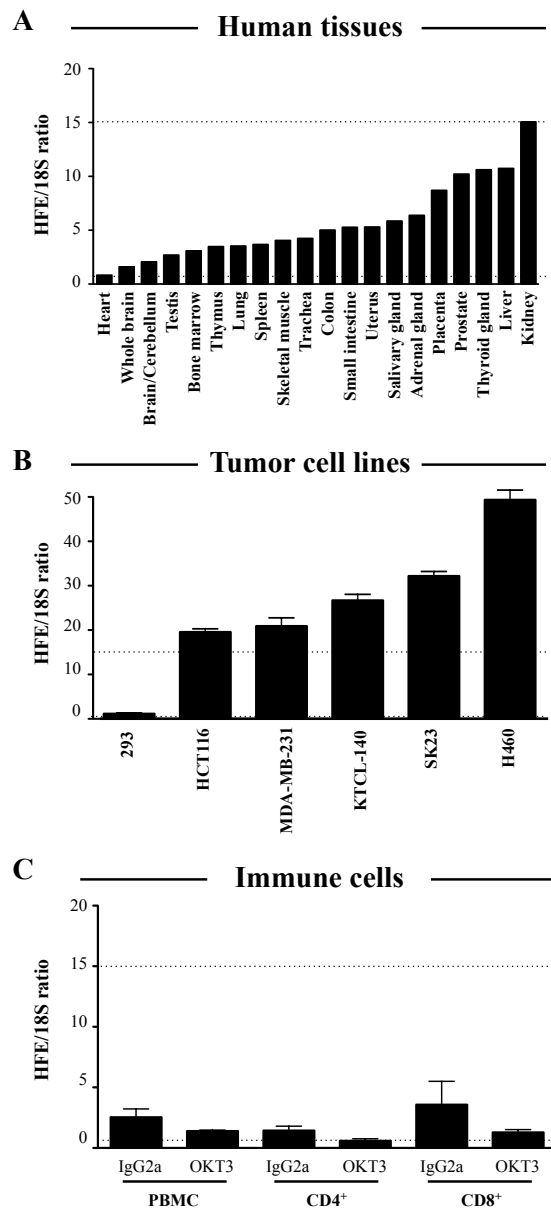


Figure 35 (1^{m2}). HFE is ubiquitously-expressed in healthy human tissues but induced in cancer cell lines.

A) HFE expression in human tissue samples was quantified by qRT-PCR. B) mRNA from specified cell lines was extracted and HFE expression levels were measured by qRT-PCR. C) HFE expression from PBMC, CD4⁺, or CD8⁺ T lymphocytes activated or not with anti-CD3 overnight by qRT-PCR. (A, B, C) Dotted lines illustrate HFE expression levels in the highest- (kidney) and lowest- (heart) expressing tissues, for comparison. Scales are consistent in all panels.

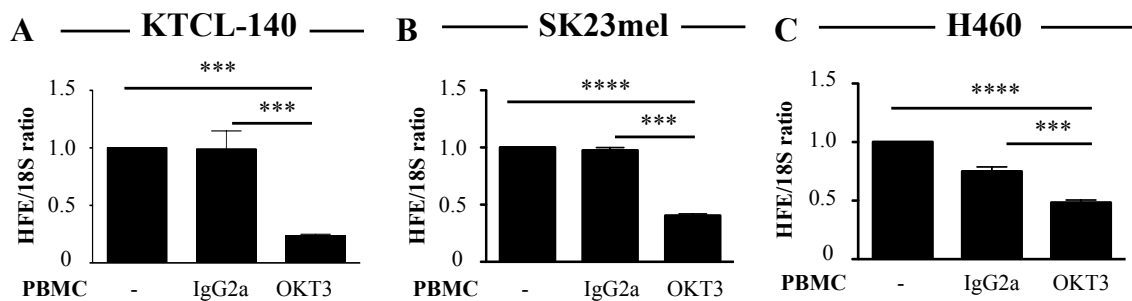


Figure 36 (2^{m2}). Endogenous tumor-derived HFE expression is inhibited by activated PBMC in multiple cancer cell lines.

PBMC from normal donors were activated overnight with anti-CD3 before being co-cultured with indicated tumor cell lines overnight in 96-well V-bottom plates. RNA was extracted and HFE expression was quantified by qRT-PCR. Statistics were calculated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ when compared to KTCL-140, SK23mel, or H460 alone.

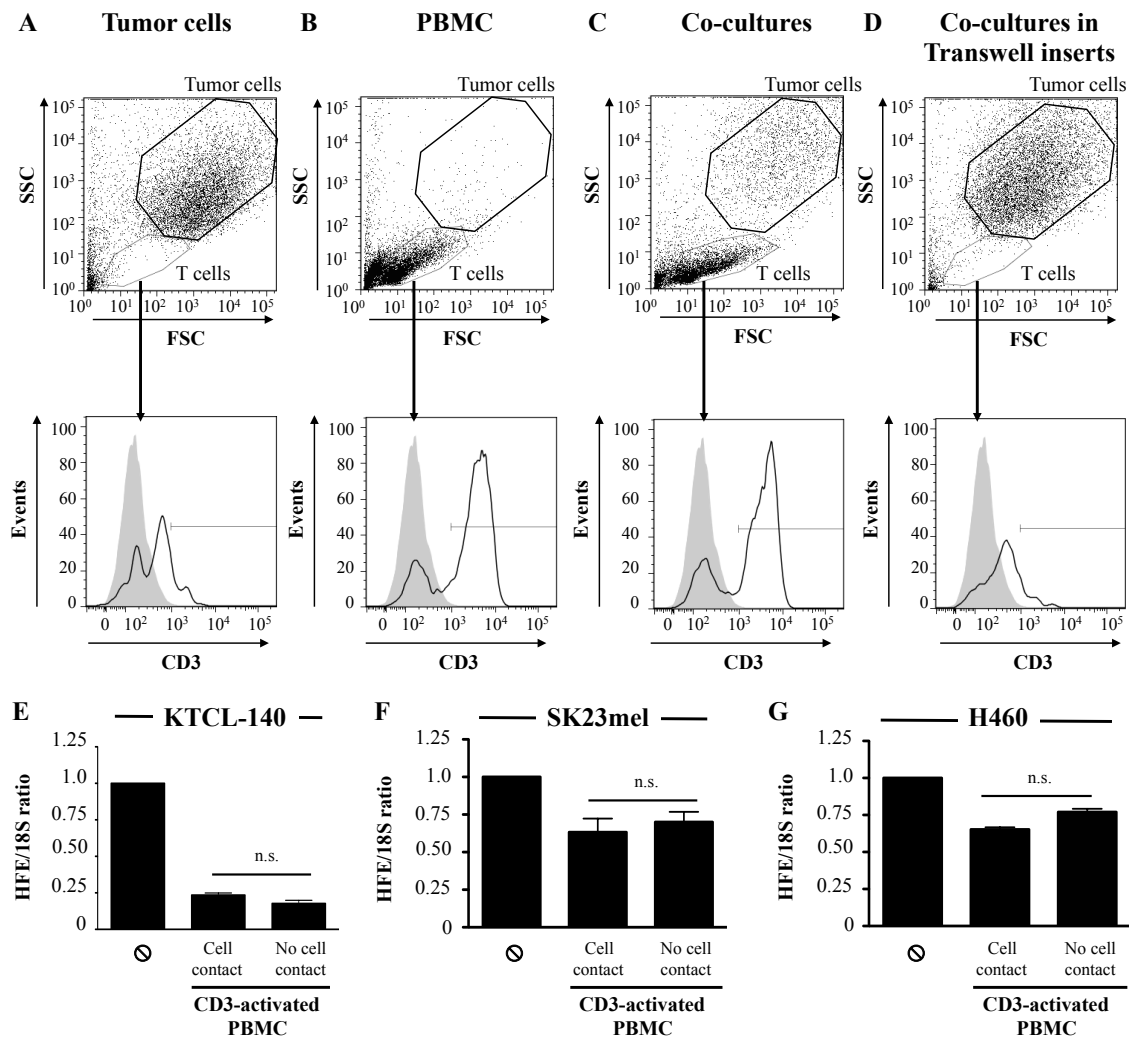


Figure 37 (3^{m2}). Inhibition of HFE expression by activated PBMC is contact-independent.

Tumor cells (A) or activated PBMC (B) were cultured alone or co-cultured without (C) or with (D) Transwell inserts. The next day, cells in the bottom chamber were harvested for flow cytometry CD3 staining. KTCL-140 kidney cancer cells (E), SK23mel melanoma cells (F) and H460 lung cancer cells (G) were cultured in 96-well plates with anti-CD3-activated PBMC in direct contact or in Transwell inserts, before quantifying HFE expression in cell lines by qRT-PCR. Statistics were calculated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. n.s. - not significant.

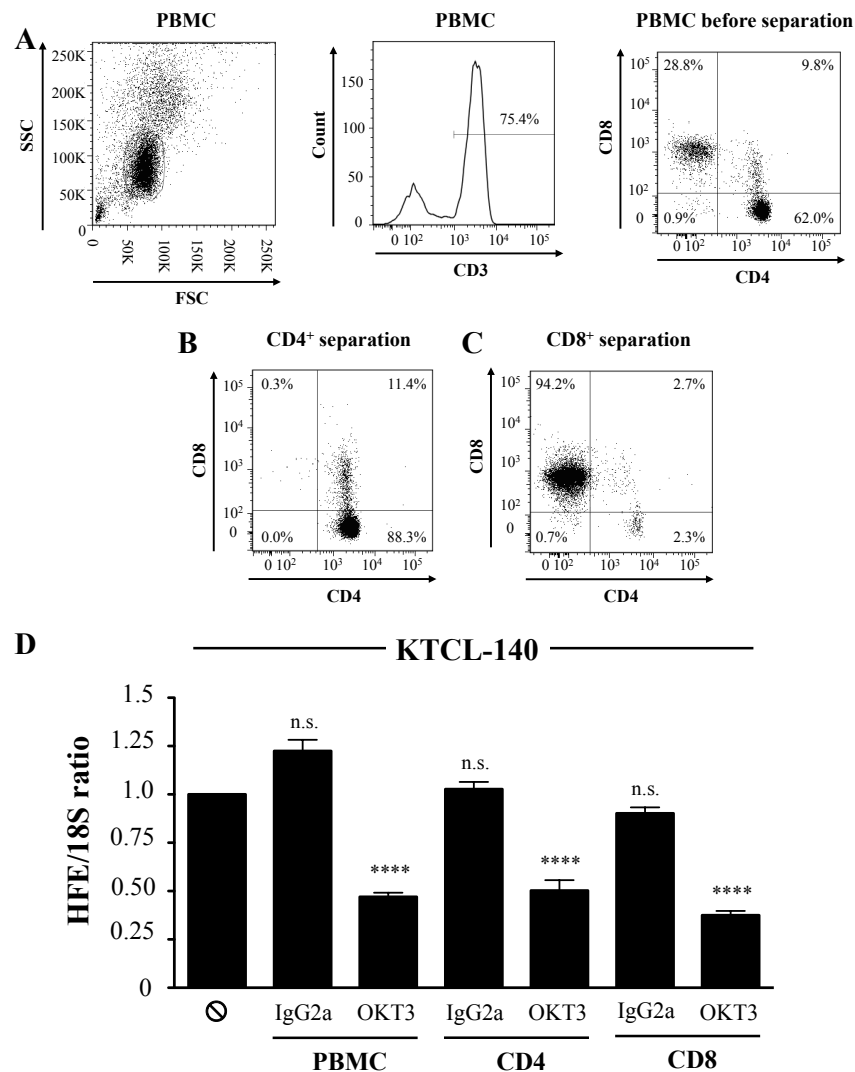


Figure 38 (4^{m2}). HFE down-regulation in tumor cells is mediated by both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes.

A) PBMC were separated magnetically for CD4⁺ (B) or CD8⁺ (C), before being stained for CD3, CD4, and CD8 to evaluate purity of cell fractions prior to anti-CD3 overnight activation. D) The next day, activated PBMC, CD4, or CD8 cells were co-cultured with KTCL-140 overnight in 96-well V-bottom plates before HFE quantification by qRT-PCR. Statistics were calculated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. **** $P < 0.0001$ when compared to KTCL-140 alone. n.s. - not significant.

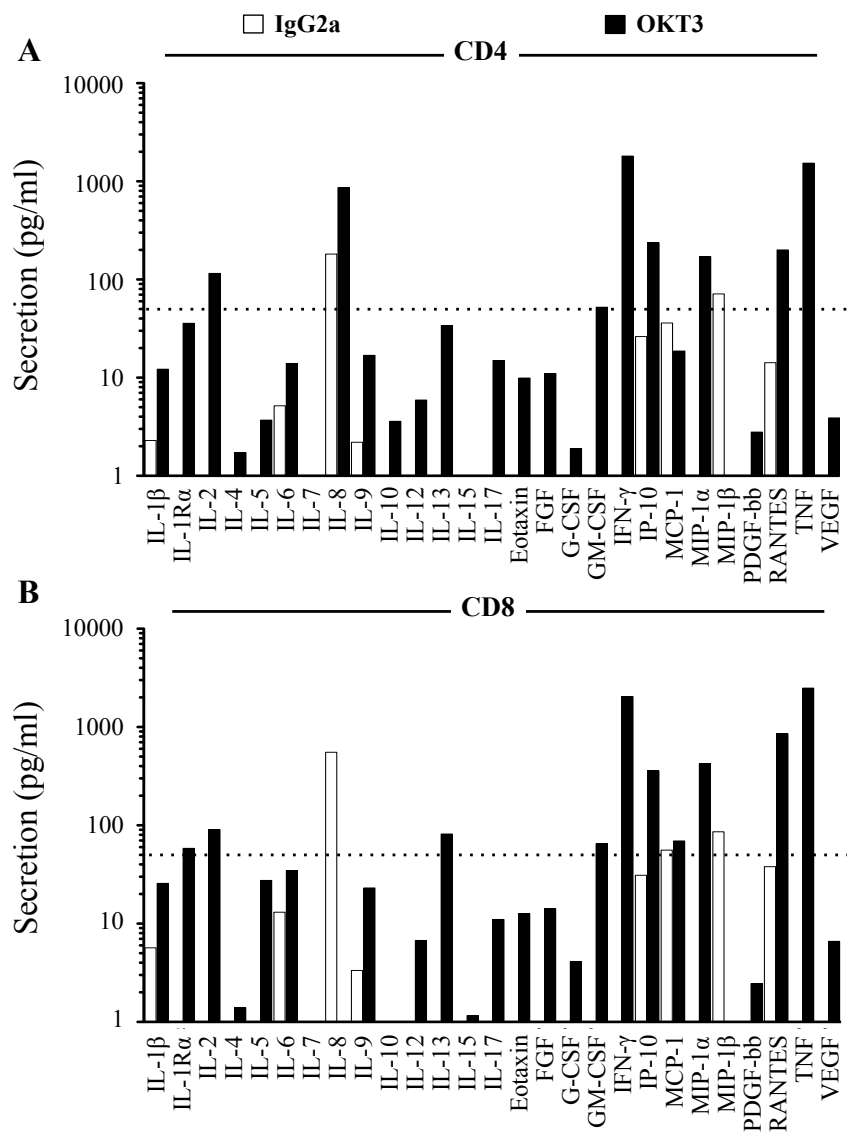


Figure 39 (5^{m2}). Activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes produce numerous soluble mediators.

PBMC were magnetically-separated into A) CD4⁺ and B) CD8⁺ fractions. Separated cells were then activated overnight with anti-CD3, before harvesting supernatant. Supernatant from three donors was pooled and secretion of 27 cytokines was quantified by cytokine multiplex. Dotted lines indicate 50 pg/mL of soluble factor concentration, the considered threshold for positivity.

Reuben *et al.*

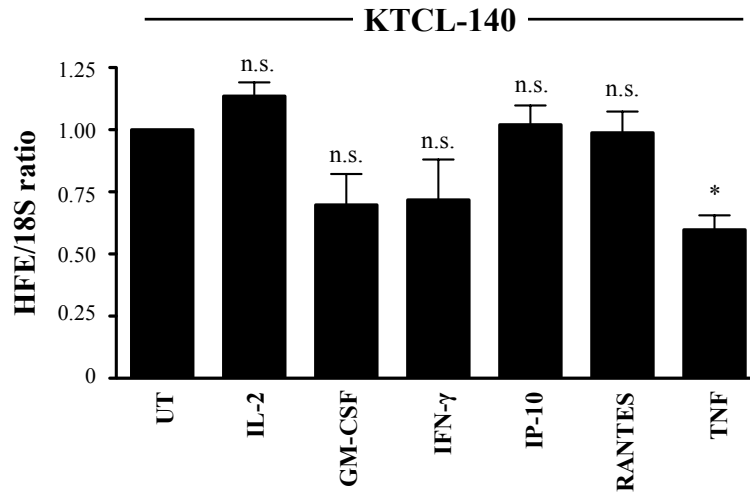


Figure 40 (6^{m2}). Modulation of HFE expression in KTCL-140 cells is mediated by GM-CSF, IFN- γ , and TNF.

KTCL-140 kidney cancer cells were cultured in presence of IL-2, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, RANTES, or TNF overnight in 96-well V-bottom plates. RNA was extracted and HFE expression was quantified by qRT-PCR. Statistics were calculated by 1-way ANOVA, followed by the Bonferroni multiple comparison test. * $P < 0.05$ when compared to KTCL-140 alone. n.s. - not significant. UT = untreated.

SECTION IV

Discussion, Conclusion et Perspectives

1. Discussion

1. Discussion

L'être humain est protégé d'infections grâce au fin équilibre entre les mécanismes suppresseurs et inducteurs régissant le système immunitaire [228]. En temps normal, les cellules humaines présentent des antigènes dérivés de protéines saines intracellulaires à leur surface dans le contexte de la présentation antigénique classique par MHC I. Ces protéines sont représentées par des épitopes qui dérivent de leur dégradation et qui sont reconnus par des lymphocytes T CD8⁺ [236]. Par contre, bien que certains peptides associés au soi puissent être présentés sur les molécules du MHC I, le processus de sélection négative assure généralement la délétion des lymphocytes T CD8⁺ qui pourraient reconnaître ces antigènes afin d'éviter une auto-réactivité et le développement de maladies auto-immunes. Ainsi, les antigènes du soi présentés à la surface de cellules en santé sont habituellement ignorés par les lymphocytes T sélectionnés pour leur capacité à reconnaître des antigènes étrangers.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de HFE, molécule du MHC I non-classique, sur la présentation par MHC I d'antigènes tumoraux et viraux. Nos travaux démontrent que, bien que la protéine HFE soit incapable de directement présenter des peptides aux lymphocytes T CD8⁺, celle-ci inhibe la réactivité des lymphocytes T CD8⁺ en réponse aux antigènes présentés sur les molécules du MHC I. Ceci suggère un nouveau rôle immuno-modulateur de HFE, qui s'ajoute à son rôle de régulateur négatif de la captation du fer. Le **Tableau 1** présente un survol du comportement de HFE décrit dans les études antérieures. L'expression des variants de HFE et leur liaison au TfR1 sont illustrées à la **Figure 41**.

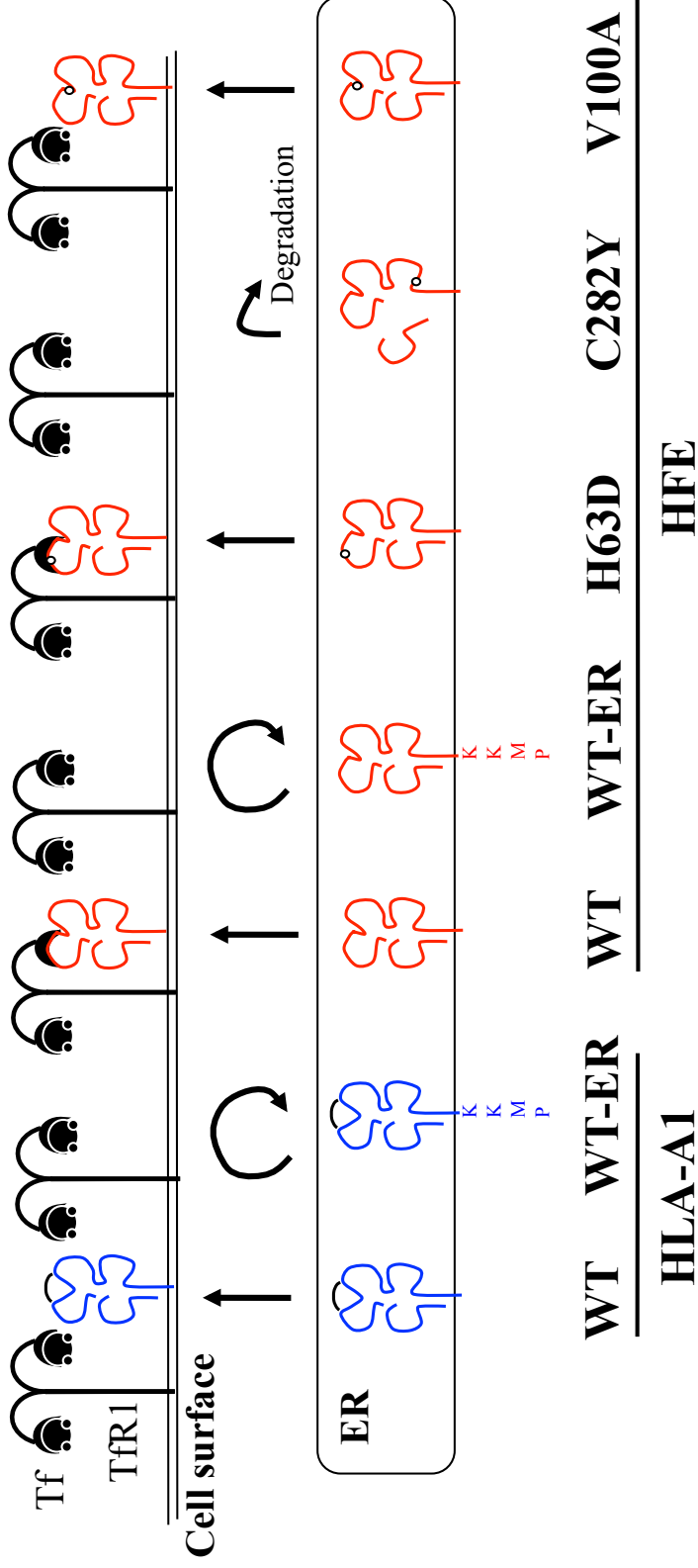


Figure 41. Variants et contrôles HFE employés dans notre étude et liaison avec le Tfr1.

Impact des mutants de HFE employés dans cette étude sur leur liaison au Tfr1. La molécule HLA-A1 (bleu) présente un peptide (non-HLA-A2 et non-reconnu par les lymphocytes T CD8⁺ employés dans notre système), alors que les variants HFE_{WT} (forte), HFE_{H63D} (intermédiaire) et HFE_{V100A} (nulle) lient le Tfr1 avec des affinités variables grâce aux résidus dans leurs domaines α 1-2 responsables de cette interaction. HFE_{C282Y} ne lie pas le β 2-m, est instable et est dégradé de manière intracellulaire et ne lie donc pas le Tfr1 (identique à HFE_{V100A}). Les mutants HLA-A1_{WT-ER} et HFE_{WT-ER} possèdent un motif de rétention dans le ER qui assure leur absence à la surface cellulaire.

HLA-A1

HFE

WT		H63D		C282Y	V100A	References
-	ER*	-	ER*			

WT		H63D		C282Y	V100A	References
-	ER*	-	ER*			
Binds TfR1?	No	No	Yes	No	No	[16, 237]
Alters hepcidin expression?	No	Yes	NA	↓	NA	[52, 53, 238, 239]
Affects iron uptake?	No	↓	NA	↑	↑	[12, 240]
Expressed at cell surface?	Yes	No	Yes	No	Yes	[241]
Causes ER stress / UPR?	No	NA	Yes	Yes	NA	OS, [242, 243]
Is unstable / degraded?	No	NA	No	Yes	No	[242]
Alters MHC I chaperone mRNA levels?	No	NA	No	↑ ERp57, CRT	No	OS, [197]
Alters MHC I chaperone protein levels?	No	NA	No	No	No	OS
Affects MHC I antigen presentation?	No	↓	↓	No	↓	OS
gp100 ₂₀₉₋₂₁₇ melanoma?	No	↓	NA	No	↓	OS
MART-1 ₂₆₋₃₅ melanoma?	No	↓	NA	No	NA	OS
M1 ₅₈₋₆₆ influenza?	No	↓	↓	No	↓	OS
Affects high affinity antigens?	No	↓	NA	No	NA	OS
Alters surface MHC I expression?	No	↓	NA	No	No	OS, [189]
Binds β2-m?	Yes	Yes	Yes	No	Yes	OS
Affects minigene?	No	↓	NA	No	NA	OS
Affects pulsed peptides?	No	NA	NA	No	No	OS
α1-2 domain homologous to HFE _{WT} ?	No	Yes	No	Yes	No	OS
Alters ER aminopeptidase activity?	No	NA	NA	No	No	OS
Alters pan-cytokine production?	No	↓	NA	No	NA	OS
Alters TCR reactivity at surface?	No	No	No	No	No	OS
Alters glycosylation?	No	NA	NA	No	No	OS
Enriched chaperone binding?	No	NA	NA	No	NA	OS
Affects antigen presentation in <i>trans</i> ?	No	NA	NA	NA	NA	OS

Tableau 1. Sommaire du comportement de HFE.

*Résultats avec les mutants KKMP retenus dans le ER décrits dans la section Perspectives. NA = not available, OS = our study, ↑ = increase, ↑↑ = strong increase, ↓ = decrease, ↓↓ = strong decrease.

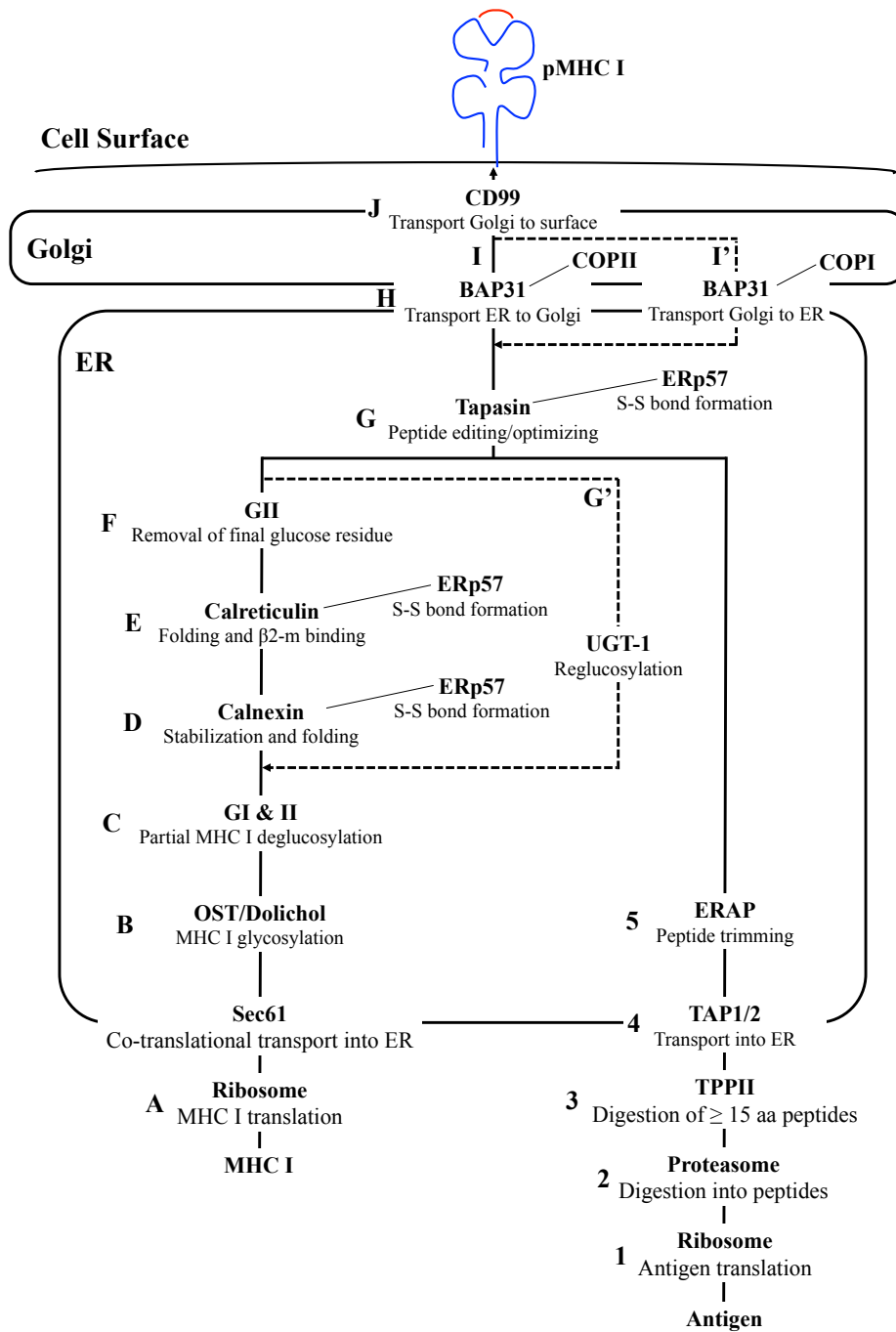


Figure 42. Étapes impliquées dans la voie classique de présentation par MHC I.

1.1 Retour sur les résultats de notre étude

Notre projet s'est intéressé à l'impact de HFE, molécule du MHC I non-classique impliquée dans le métabolisme du fer, sur la présentation antigénique par voie classique du MHC I. Notre étude suggère que HFE_{WT} affecte l'apprêtement intracellulaire des antigènes par MHC I (**Figures 12 et 33**) et pourrait ainsi exercer un rôle dans le contrôle de l'immunogénicité des antigènes dans divers contextes qui seront discutés plus loin.

Certaines études suggèrent ont suggéré que HFE_{C282Y} pourrait induire une UPR, de par son repliement abrogé causé par une incapacité à s'associer à la β 2-m et par son accumulation subséquente dans le ER [188, 244]. Par contre, l'induction d'une UPR peut également avoir un certain impact sur la présentation antigénique par MHC I, en diminuant les niveaux d'expression des molécules du MHC I et en causant un enrichissement de la présentation de certaines protéines sur les molécules du MHC I. Ainsi, nous avons évalué la capacité de HFE_{WT} à induire une UPR, qui aurait pu contribuer à une sélection des protéines présentées sur MHC I et à une diminution subséquente de la reconnaissance. Tel que démontré à la **Figure 30**, l'expression de HFE_{C282Y} cause une induction, bien que non statistiquement-significative, de CHOP, chaperone associée à la UPR, alors que HFE_{WT} n'a aucun impact sur CHOP. Ces résultats suggèrent que HFE_{WT} n'affecte pas la reconnaissance par MHC I grâce à une induction de UPR.

D'autres études suggèrent que l'expression de HFE_{C282Y} induit une hausse subséquente de l'expression de CRT [197, 245], lectine cruciale impliquée dans le repliement des molécules

du MHC I. Ainsi, nous nous sommes interrogés sur la capacité de HFE_{WT} à moduler les niveaux d'expression de chaperones, ce qui pourrait résulter en l'inhibition de la présentation et de la reconnaissance par MHC I. Les expériences en **Figure 23** (protéine) et **Figure 29** (mRNA) suggèrent que toutes les chaperones présentes dans les cellules 293-A2 sont exprimées à des niveaux stables en présence de HFE_{WT}. Ceci suggère que HFE_{WT} n'affecte pas la reconnaissance en altérant les niveaux d'expression de chaperones du MHC I.

Il a été suggéré dans certaines études que l'expression de HFE_{WT} cause des augmentations dans l'expression de β 2-m. Ainsi, l'expression de HFE_{WT} pourrait, en modulant les niveaux d'expression de β 2-m, affecter la capacité des molécules du MHC I à être correctement repliées et exprimées. Pour étudier cette hypothèse, nous avons quantifié les niveaux d'expression de β 2-m en présence de HFE_{WT} (**Figure 28**). Tel que démontré, les niveaux d'expression de β 2-m demeurent constants en toutes circonstances, suggérant que la modulation de l'expression de β 2-m décrite est due à une rétention accrue de la β 2-m qui serait autrement sécrétée, par HFE. Ces résultats confirment que HFE n'agit pas en altérant les niveaux d'expression de β 2-m dans les cellules transfectées.

HFE et HLA-A2 possèdent des structures qui sont fortement homologues [13]. Compte tenu de l'association de multiples chaperones avec le MHC I et de la caractérisation élaborée de l'emplacement de ces sites, nous avons procédé à l'alignement des séquences protéiques (**Figure 31B**). Tel que démontré, plusieurs des sites d'interaction des chaperones du MHC I sont conservés à divers degrés dans la séquence de HFE. Ainsi, nous avons questionné la capacité de HFE_{WT} à lier les chaperones détectées dans les cellules 293-A2 (**Figure 23**) et à

ainsi affecter l'efficacité de la présentation antigénique par MHC I. Tel que démontré à la **Figure 31C**, malgré la capacité de HFE_{WT} à lier partiellement certaines des chaperones MHC I, aucune augmentation de la liaison de ces chaperones n'a été identifiée en présence de HFE_{WT}, ce qui suggère qu'une interaction avec les chaperones ne peut expliquer l'effet de HFE_{WT} sur la présentation antigénique par MHC I.

Tel que démontré à la **Figure 15**, les niveaux de détection de HLA-A2 à la surface sont identiques en présence de β 2-m. Par contre, il est possible que les molécules du MHC I détectées à la surface en présence de HFE_{WT} soient mal repliées et instables en raison d'une liaison absente ou inefficace avec la β 2-m, qui pourrait compromettre leur capacité à présenter des peptides antigéniques ou à être reconnues par les lymphocytes T CD8⁺ antigène-spécifiques. Ainsi, nous avons quantifié les niveaux d'expression des molécules du MHC I non-liées à la β 2-m en surface cellulaire en présence de HFE_{WT} et établi que la présence de ces chaînes n'était pas accrue en présence de HFE_{WT} (**Figure 32**), excluant ainsi cette hypothèse comme mécanisme. La capacité des molécules du MHC I détectées à la surface à présenter les peptides chargés de manière extracellulaire suggère, par ailleurs, que ces molécules sont correctement repliées et compétentes (**Figure 33**).

Finalement, la démonstration que l'expression de HFE est inhibée par les lymphocytes T activés (**Figure 36**) suggère que, compte tenu des résultats de notre étude, le système immunitaire pourrait réprimer l'expression de HFE et, du fait même, favoriser une meilleure élimination des agents pathogènes et des tumeurs en améliorant la présentation antigénique par MHC I.

1.2 Origine, dissémination et sélection de la mutation HFE_{C282Y}

La forte prévalence de la mutation HFE_{C282Y} soulève plusieurs questions quant à son origine, sa dissémination et sa sélection, tout en étant impliquée dans le développement d'une maladie potentiellement fatale: l'HH. Cette section fait un survol des connaissances à ce sujet.

1.2.1 Origine

La fréquence des mutations HFE_{C282Y} est accrue en Europe, particulièrement dans les populations celtiques, au Royaume-Uni et en France. Celle-ci est liée à un effet fondateur dans la population celte [246], chez laquelle on croit qu'elle serait survenue autour de l'an 1000 av. J.-C. Par contre, certaines études suggèrent que celle-ci serait survenue il y a 60 à 70 générations, ou environ 600 à 800 ans apr. J.-C., ce qui démontre une certaine zone grise quant à la période de son apparition.

1.2.2 Dissémination

La mutation HFE_{C282Y} se serait par la suite répandue par migration vers l'Europe centrale, du sud-ouest et sud-centrale pour arriver en Irlande avant l'an 100 av. J.-C., hypothèse supportée par le gradient décroissant de patients HH du nord vers le sud de l'Europe [247]. Les Vikings auraient également pu contribuer à la dissémination de cette mutation, de par leurs conquêtes entre les VIII^{ème} et X^{ème} siècles. Le port de la mutation HFE_{C282Y} aurait permis aux Vikings de mieux survivre aux carences de fer en mer, et expliquerait l'existence de cette mutation dans les pays scandinaves, là où aucune immigration celte n'a pris place [246].

1.2.3 Sélection

Les études divergent quant aux causes de la sélection de cette mutation. Certaines suggèrent qu'elle offrirait un avantage sélectif lié à l'alimentation et aux carences de fer, alors que d'autres proposent que cette mutation aurait été sélectionnée grâce à une résistance conférée envers certains agents infectieux en périodes d'épidémies.

1.2.3.1 Avantage nutritionnel

La majorité des études suggère que la mutation HFE_{C282Y} aurait été sélectionnée il y a longtemps, lorsque l'être humain est passé d'une alimentation riche en viande et en fer, vers des habitudes alimentaires riches en végétaux et faibles en fer. Le port de cette mutation aurait permis de mieux compenser pour la baisse significative de fer issu de l'alimentation et aurait promu la sélection de cette mutation. Par contre, malgré l'avantage nutritionnel évident, cette mutation n'est pas retrouvée en Afrique, ce qui suggère que cette mutation pourrait conférer un avantage autre qu'exclusivement alimentaire.

1.2.3.2 Résistance aux infections

Plusieurs études suggèrent que, en plus d'un avantage fourni grâce à l'apport accru en fer en périodes de carences, la mutation HFE_{C282Y} aurait pu permettre une meilleure résistance à certaines infections.

Plusieurs pathogènes dépendent du fer en circulation afin de se répliquer et de survivre [248, 249]. Ainsi, puisque HFE_{C282Y} accroît l'affinité de la Tf pour le TfR1 [16] et favorise ainsi l'internalisation du fer dans la cellule, les niveaux de fer circulant s'en voient décrus, et

pourraient ainsi nuire au développement de pathogènes qui dépendent de cette source de fer. La mutation HFE_{C282Y} pourrait donc conférer un avantage sélectif quant à une résistance accrue face à certains pathogènes extracellulaires.

À l'inverse, les M ϕ et les cellules réticulo-endothéliales (REC) agissent paradoxalement dans l'HH. Malgré la captation de fer accrue, ces types cellulaires ont tendance à relâcher davantage de fer. Ce comportement est essentiel, puisque plusieurs types de pathogènes intracellulaires, comme *Salmonella typhi*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Chlamydia pneumoniae*, dépendent de concentrations intracellulaires de fer accrues dans ces cellules pour se multiplier [250]. Ainsi, un relâchement accru du fer assure une concentration intracellulaire basse aux M ϕ et aux cellules REC, et empêche ainsi aux pathogènes infectants de profiter du luxe conféré par de hautes concentrations de fer. Par ailleurs, les pathogènes intracellulaires facultatifs sont généralement plus virulents sous cette forme; une baisse des niveaux de fer intracellulaires et une obligation de se répliquer de manière extracellulaire et moins virulente pourrait donc favoriser l'organisme. De plus, l'étude de la sidérose africaine [251], maladie héréditaire de surcharge du fer exacerbée par certains éléments de l'alimentation africaine, permet d'établir des parallèles et distinctions avec l'HH. Les M ϕ des patients atteints de sidérose africaine, contrairement à ceux d'HH, se distinguent par leur contenu riche en fer. Ces patients sont davantage affectés par certaines infections bactériennes intracellulaires, dû à leur contenu en fer macrophagien accru, ce qui confirme l'importance de la mutation HFE_{C282Y} pour sa capacité à diminuer le contenu en fer chez les M ϕ . La mutation HFE_{C282Y} pourrait donc conférer un avantage sélectif quant à une résistance accrue face à certains pathogènes intracellulaires [252, 253].

Finalement, il est possible que l'avantage sélectif attribué à HFE_{C282Y} soit associé à la mutation CCR5Δ32 qui lui présente un déséquilibre de liaison [254]. La mutation CCR5Δ32 est associée à une résistance à l'infection du HIV en raison de la mutation dans la protéine CCR5 accessoire à l'entrée du virus dans les lymphocytes T CD4⁺ ciblés [255], et aurait aussi pu conférer une résistance accrue envers *Yersinia pestis* chez les porteurs de HFE_{C282Y}.

1.2.4 Notre étude dans le contexte de la sélection de HFE_{C282Y}

Les résultats de notre étude permettent de renforcer l'hypothèse selon laquelle la mutation HFE_{C282Y} aurait pu conférer une résistance accrue à certains types d'infections. Selon nos résultats (**Figure 12**), la présence de HFE_{C282Y} permet une présentation accrue des antigènes par MHC I, ce qui aurait permis à tout pathogène intracellulaire d'être mieux présenté et mieux éliminé que chez les porteurs de HFE_{WT} ou de HFE_{H63D}. Ces résultats s'enlignent avec la capacité accrue des porteurs de HFE_{C282Y} à combattre certaines infections décrite précédemment, ainsi que l'impact nutritionnel de HFE_{C282Y} dans le contexte de sa sélection accélérée.

1.3 Portée des résultats et spéculation

La mutation HFE_{C282Y} est-elle davantage prévalente dans les cancers?

Le rôle majeur de HFE en métabolisme du fer justifie les multiples études ayant tenté de corréler la présence de mutations HFE_{C282Y} et HFE_{H63D} avec le développement du cancer [256-266]. L'apport du fer aux processus cellulaires ainsi qu'à la prolifération cellulaire le placent en position clef dans le développement de cette maladie.

Plusieurs études ont d'ailleurs noté des corrélations positives entre la présence de la mutation HFE_{C282Y} et le développement de cancers d'origines diverses [256-266]. Par contre, bien qu'une forte proportion des études complétées aient réussi à établir une corrélation positive, certaines démontrent une absence de corrélation [267], ce qui pourrait signifier une prévalence accrue de la forme HFE_{WT} ou du mutant HFE_{H63D}. Pourquoi n'observe-t-on pas davantage d'études corrélant HFE_{C282Y} au développement du cancer quand l'importance du fer est si majeure? Pourrait-ce être en raison de l'effet de HFE_{C282Y} sur la présentation antigénique par MHC I établi dans notre étude (**Figure 12**) qui pourrait tamponner les bienfaits dérivés d'une captation du fer accrue par les tumeurs?

Selon notre étude, la présence de HFE_{C282Y}, malgré son impact sur le métabolisme du fer [214], n'aurait aucun effet inhibiteur sur la reconnaissance des antigènes par MHC I (**Figure 12**). L'évasion au système immunitaire est maintenant reconnue comme une des signatures des tumeurs [268]. Ainsi, le besoin des tumeurs de passer sous le radar du système immunitaire

pourrait surpasser tout autre besoin, métabolique ou autre, qui permettrait d'amplifier sa survie et sa progression. Dans ce contexte, il serait préférable d'exprimer HFE_{WT} ou HFE_{H63D} dans les tumeurs, afin d'inhiber la reconnaissance par MHC I et d'accroître la possibilité d'évader au système immunitaire. Le port de la mutation HFE_{H63D} pourrait donc présenter un compromis avantageux pour la tumeur, puisqu'elle permettrait d'accroître la concentration de fer capté [214] par les cellules comparativement à HFE_{WT}, tout en inhibant les niveaux de reconnaissance par MHC I comparativement à HFE_{C282Y} (**Figure 12**).

Dans cette même optique, il est intéressant de noter que certaines études soulignent un impact de l'hétérozygotie de HFE_{C282Y} [269]. La présence d'un allèle HFE_{C282Y} pourrait accroître l'apport de la cellule en fer, alors que l'autre allèle (HFE_{WT} ou HFE_{H63D}) permettrait une inhibition de la reconnaissance MHC I-dépendante des tumeurs par les lymphocytes T CD8⁺ [212, 269]. Une forte proportion des études démontre tout de même une prévalence accrue des mutations HFE_{C282Y} et HFE_{H63D} dans les tumeurs [256-266], ce qui pourrait indiquer que l'impact d'une captation accrue du fer prévaut et compense pour la présentation antigénique par MHC I accrue observée en présence de HFE_{C282Y} [270]. Par contre, les études corrélant HFE_{H63D} plutôt que HFE_{C282Y} avec divers cancers pourraient confirmer l'importance de l'apport inhibiteur de la reconnaissance par MHC I de HFE dans le développement des tumeurs (**Figure 43**) [262].

Finalement, malgré l'importance de ces mutations de HFE en métabolisme du fer, aucune étude n'a pu établir que HFE ne deviendrait sélectivement muté vers une forme HFE_{C282Y} ou HFE_{H63D} au sein des tumeurs afin de permettre une meilleure progression des cancers [257].

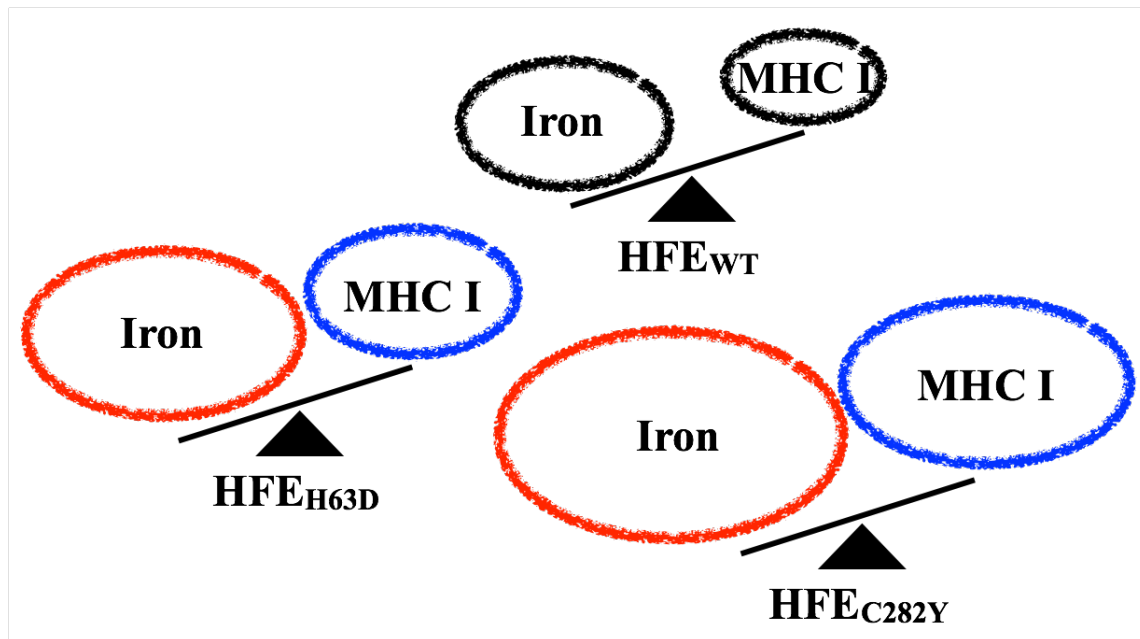


Figure 43. Modélisation de l'effet des variants de HFE sur l'influx de fer ainsi que sur la présentation antigénique par MHC I.

noir = neutre, rouge = avantage l'agent infectieux, bleu = avantage l'hôte.

Les niveaux d'expression de HFE sont-ils accrus dans les cancers?

Jusqu'à présent, l'étude de HFE dans les cancers s'est concentrée sur une augmentation de la prévalence de la mutation HFE_{C282Y} ou HFE_{H63D} qui confère un taux de fer accru aux cellules, condition qui pourrait favoriser le développement de tumeurs [271]. Ainsi, plusieurs études se sont penchées sur la prévalence de ces mutations dans certains cas de cancers [257-266].

Par contre, l'évaluation des niveaux d'expression de HFE dans les tissus sains et malins d'un même patient n'a jamais été rapportée. Nos résultats suggèrent qu'une simple augmentation des niveaux de HFE_{WT} pourrait favoriser une évansion tumorale plus efficace (**Figures 12 et 19**). Malheureusement, la majorité des études se concentrent sur la prévalence des mutations

plutôt que de s'intéresser à leurs niveaux d'expression [257-266]. Cette optique pourrait expliquer l'absence de corrélation observée par certaines études, ainsi que la corrélation négative établie dans d'autres [267]. Au lieu de s'intéresser uniquement aux mutations de HFE_{C282Y} et HFE_{H63D} présentes, les études devraient pousser davantage la quantification de l'expression de HFE_{WT} dans la tumeur.

HFE n'altère pas l'activité des cellules NK

Les cellules NK sont davantage impliquées dans la réponse immunitaire innée [272], puisqu'elles ne requièrent pas de reconnaissance antigène-spécifique afin de tuer les cellules infectées [273]. Ces cellules tuent spécifiquement les cellules qui perdent leur expression de surface de molécules du MHC I [274], afin de reconnaître les cellules tumorales et virus qui emploient cette stratégie [275, 276]. Ainsi, une cellule infectée est typiquement bien reconnue par soit les lymphocytes T CD8⁺ antigène-spécifiques grâce aux molécules du MHC I, soit les cellules NK en raison d'une absence ou d'une baisse d'expression de MHC I.

Il a été spéculé que HFE pourrait affecter la réactivité des cellules NK qui reconnaissent certaines molécules du MHC I non-classiques. Par contre, HFE n'est pas reconnu directement par les cellules NK [208] comme peut l'être HLA-E [277] et, malgré son impact sur la présentation par MHC I, l'expression de HFE n'altère pas la réactivité des cellules NK indirectement [208]. L'impact de HFE sur les niveaux d'expression de MHC I est donc insuffisant pour susciter une réponse des cellules NK résultant de la perte des molécules du MHC I classiques qui agissent comme récepteur inhibiteur [278].

Finalement, HLA-E, -F, et -G lient et affectent les cellules NK, mais ce n'est point le cas pour HFE (HLA-H) [208]. Ainsi, d'après nos résultats, HFE_{WT} pourrait conférer un phénotype immunologique avantageux, en affectant négativement la présentation antigénique par MHC I, tout en n'induisant aucune hausse de la réactivité des cellules NK (**Figure 44**).

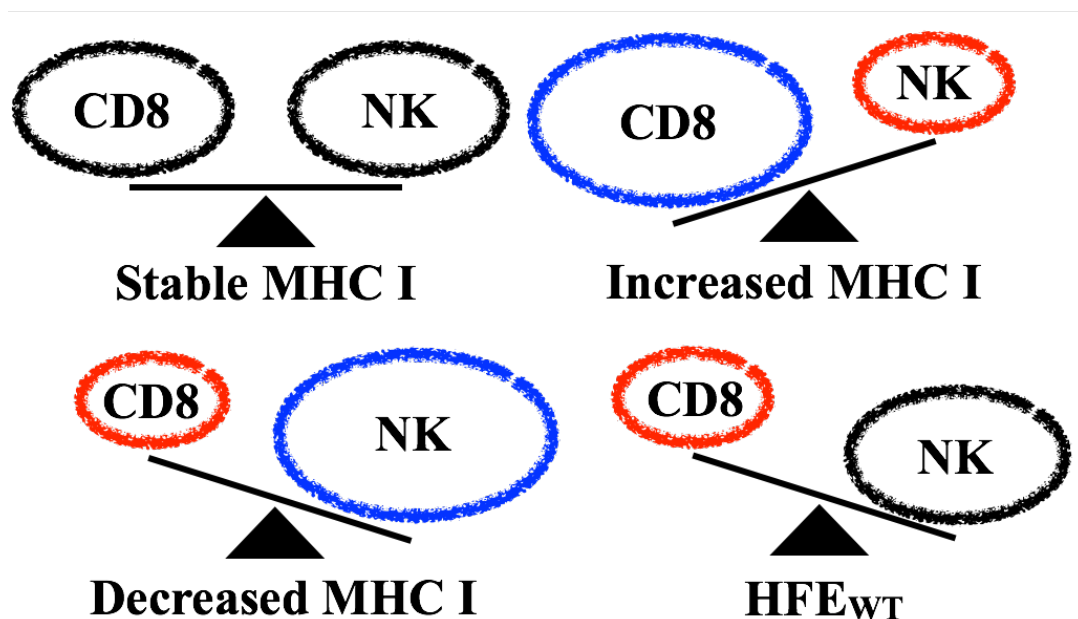


Figure 44. HFE_{WT} inhibe la reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺ sans altérer l'activité des cellules NK.

Représentation de l'impact des modulations en expression de MHC I sur la reconnaissance par les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. Illustration de l'impact potentiel de HFE_{WT} sur ces niveaux de reconnaissance dans le contexte de notre étude. noir = neutre, rouge = avantage l'agent infectieux, bleu = avantage l'hôte.

À la lumière de notre étude, la présence de HFE_{WT} pourrait donc n'induire aucune augmentation de la réactivité des cellules NK [278], en plus de diminuer l'efficacité de la présentation antigénique par MHC I. HFE_{WT} pourrait abaisser la reconnaissance de MHC I sous le seuil de détection des lymphocytes T CD8⁺, tout en n'altérant pas les niveaux

expression de surface de MHC I et en ne causant donc pas l'augmentation de la réactivité des cellules NK. L'expression de HFE_{WT} pourrait constituer le scénario optimal pour toute infection [208].

HFE comme médiateur de l'immunoprivilège humain

Malgré que le système immunitaire se doive de surveiller les infections dans l'ensemble de l'organisme, certains organes peuvent bénéficier d'un statut immunoprivilégié [279, 280]. Typiquement, les organes immunoprivilégiés sont caractérisés par la présence de barrières physiques limitant l'infiltration du système immunitaire [281], la présence de cytokines immunosuppressives ainsi qu'une plus faible expression de molécules du MHC I classiques et une présence de certaines molécules du MHC Ib non-classiques.

HFE est exprimé de façon ubiquitaire mais ses niveaux d'expression varient énormément d'un tissu à l'autre (**Figure 35A**) [13, 208]. À la lumière de l'impact de HFE sur la présentation antigénique par MHC I (**Figure 12**), HFE pourrait exercer un rôle dans les tissus humains en santé, à l'état d'homéostasie.

Certaines études suggèrent que le foie est un de ces organes, dits immunoprivilégiés [282-284]. Par ailleurs, on observe dans plusieurs études que l'expression de HFE dans le foie est parmi les plus élevées (**Figure 35A**) [13, 208, 285]. Ainsi, mis à part le rôle important du foie dans le métabolisme du fer [52], la présence accrue de HFE dans le foie par rapport aux autres organes humains pourrait offrir une signification immunologique. L'expression de HFE dans le

foie pourrait permettre de limiter la réactivité des lymphocytes T CD8⁺ infiltrant le foie et, par conséquent, tout l'éventail de cellules immunitaires stimulées indirectement suite à cette activation des lymphocytes T CD8⁺. Le foie pourrait donc bénéficier d'une capacité décrie des molécules classiques du MHC I à présenter des antigènes au système immunitaire (**Figure 12**) [286], ainsi que d'une expression accrue de molécules du MHC Ib non-classiques (en l'occurrence, HFE). La protection du foie par HFE pourrait être d'importance majeure, compte tenu du rôle central du foie et de sa production d'hormones dans l'organisme.

En contrepartie, un organe immunoprivilégié comme le cerveau ne nécessiterait pas cette protection par HFE, puisque son immunoprivilège serait assuré par la présence de la barrière hémato-encéphalique physique qui y restreint l'accès aux cellules immunes [281], fournissant ainsi une explication potentielle pour les niveaux faibles de HFE détectés dans le cerveau (**Figure 35**) [279]. Cette explication pourrait également s'appliquer aux testicules, également largement démunis de HFE, mais dotés d'une barrière hémato-testiculaire qui y limite l'infiltration immune.

Importance de l'expression des variants d'épissage de HFE

L'expression de divers variants d'épissage de HFE dans l'organisme ainsi que leur patron d'expression restreint suggèrent une fonction qui pourrait différer selon le tissu [287, 288]. Notre étude démontre que les domaines α 1-2 de HFE_{WT} sont responsables de l'inhibition de la reconnaissance par MHC I (**Figure 13**). Par contre, plusieurs des variants d'épissage de HFE résultent en l'exclusion de divers domaines [287, 289]. Ces isoformes peuvent être dépourvues

des domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 1-2$, $\alpha 1-2-3$, ou $\alpha 1-2-3$ et TM [287, 289]. Ainsi, d'après nos résultats, les isoformes possédant les domaines $\alpha 1-2$ pourraient agir de manière davantage immunosuppressive alors que les autres pourraient avoir un effet négligeable sur le système immunitaire.

Par ailleurs, l'isoforme d'inclusion de l'intron-4 [287] de HFE mène à l'expression d'une protéine de HFE dépourvue de ses domaines TM et CT. Ceci résulte donc en l'expression d'une protéine HFE soluble (sHFE) qui pourrait exercer un impact immunosuppresseur à distance [290], compte tenu de la présence des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (**Figure 13**). L'absence d'effet de HFE en *trans* (**Figure 21**) n'exclut pas la possibilité que HFE pourrait être sécrété et ainsi affecter la présentation antigénique en *trans*, puisque le domaine TM ancrant la protéine à la membrane cellulaire assure l'absence de sHFE dans ces expériences. L'étude approfondie de l'impact de sHFE mérite une attention particulière.

Auto-immunité - Sclérose en plaques (MS)

On observe que les patients HH porteurs de la mutation HFE_{C282Y} présentent des symptômes plus sévères de MS, une plus forte prévalence de cette maladie ainsi qu'une survenue accélérée de celle-ci [217, 291, 292]. Ceci pourrait être lié à l'expression de la mutation HFE_{C282Y} qui augmenterait l'auto-réactivité des lymphocytes T CD8⁺ qui traversent la barrière hémato-encéphalique permissive dans le contexte de la MS de par une présentation antigénique par MHC I accrue. La mutation HFE_{C282Y} pourrait résulter en une présentation accrue des auto-antigènes liés à la MS au-delà d'un seuil de reconnaissance causant le déclenchement et la

progression de la maladie, contrairement à HFE_{WT} qui pourrait inhiber cette présentation et maintenir une immunosuppression face à ces antigènes [291-293].

Mécanisme dépendant du récepteur du mannose 6-phosphate cation-indépendant (CI-MPR / CD222 / IGF2R)?

HFE peut se lier au récepteur ubiquitaire CD222 *in vitro* [294] par l'entremise des domaines α 1-2 également impliqués dans son inhibition de la reconnaissance par MHC I (**Figure 13**). HFE pourrait ainsi agir de par son interaction avec CD222. CD222 a été décrit comme gène suppresseur de tumeurs [295, 296] ayant des ligands multiples à la surface cellulaire [297] et impliqué dans la reconnaissance des résidus Glu, ce qui pourrait affecter le comportement des chaperones lectines du ER. CD222 lie également plusieurs chaperones contenant des résidus Man-6-P mais aussi plusieurs autres sans Man-6-P [298-300]. Finalement, CD222 est impliqué dans l'endocytose, ce qui suggère qu'il pourrait potentiellement affecter le recyclage de complexes MHC I [301]. L'étude de cette interaction pourrait permettre d'élucider le mécanisme en cause dans notre étude.

Modulation de l'expression de HFE et impact sur la présentation antigénique

L'expression des molécules du MHC I classiques est induite par l'IFN- γ [167]. Par contre, la répression de l'expression de HFE par l'inflammation dérivée des lymphocytes T est contraire à ce à quoi on pourrait s'attendre en raison de la classification de HFE comme molécule du MHC Ib (**Figure 40**). Nous croyons que l'expression de HFE pourrait être modulée

différentiellement des molécules du MHC I en réponse aux stimuli libérés par les lymphocytes T activés afin d'optimiser la présentation antigénique par MHC I dans différents contextes, en équilibre avec son rôle en captation du fer.

2. Perspectives

2. Perspectives

Inhibition du MHC I par HFE dépendante de CD222?

Malgré les difficultés éprouvées à identifier précisément le mécanisme responsable de l'inhibition de la présentation antigénique par HFE, la découverte de la capacité de HFE à lier CD222 offre des perspectives intéressantes [294]. Étant donné que HFE lie CD222 de par ses domaines $\alpha 1-2$ [294] également identifiés comme responsables de l'inhibition de la reconnaissance par MHC I dans notre étude (**Figure 13**), il est fort possible que CD222 soit au cœur du mécanisme de HFE. Par ailleurs, l'effet inhibiteur de HFE_{H63D} et HFE_{V100A} dans notre étude pourrait également être justifié par cette hypothèse, puisque ces deux mutants lient également CD222 [294].

D'autres expériences devront être complétées afin de valider cette hypothèse. Il est confirmé que CD222 est exprimé dans les cellules 293 employées dans notre étude [302]. Ainsi, l'interaction entre CD222 et HFE_{WT} devra être abrogée en mutant le site d'interaction précis de CD222 sur HFE_{WT}. Puis, des essais de reconnaissance avec des lymphocytes T CD8⁺ antigène-spécifiques devront être complétés afin d'évaluer la capacité du nouveau mutant HFE à inhiber la reconnaissance en absence d'interaction avec CD222. L'interaction entre HFE et CD222 se fait par l'intermédiaire des résidus Man phosphorylés présents sur HFE et donc la mutation de ces sites chez HFE pourrait également abroger l'interaction avec CD222 et permettre l'étude de l'importance de ce récepteur dans la capacité de HFE à inhiber la reconnaissance par MHC I.

Présentation d'un épitope HLA-A2 immunodominant dérivé de HFE?

Tel que décrit dans l'introduction, les antigènes présentés sur les molécules du MHC I peuvent dériver de n'importe quelle protéine virale, tumorale, ou de l'hôte [94, 303]. Toute protéine endogène est passible d'être présentée et la présentation antigénique dérive avant tout des protéines abondantes et nouvellement synthétisées [304]. Ceci signifie que HFE pourrait interférer directement avec la présentation antigénique des épitopes dans notre système, en saturant les MHC I avec un épitope de haute affinité dérivé de sa synthèse.

La machinerie de présentation antigénique ne discrimine pas entre les origines des protéines présentées à la surface cellulaire sur les molécules du MHC I. Ainsi, puisqu'environ 30 à 40% des protéines intracellulaires sont immédiatement dégradées *via* le protéasome afin d'être présentées sur des molécules du MHC I [94], il se peut qu'une fraction de la protéine HFE exprimée dans notre système soit dégradée et que les peptides générés puissent être transportés vers le ER. Une fois dans le ER, les peptides les plus affins et conférant la meilleure stabilité au complexe pMHC sont chargés, peu importe leur origine [305]. Ainsi, il se peut qu'un ou plusieurs épitopes dérivés de la digestion de la protéine HFE soient immunodominants et donc préférentiellement présentés sur MHC I puisqu'ils confèrent une stabilité accrue au complexe MHC I. Ceci aurait pour effet d'empêcher, ou de diminuer la présentation des antigènes du mélanome ou de l'influenza employés dans notre système et donc de décroître leur présentation et leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8 qui leurs sont spécifiques.

Des logiciels tels que SYFPEITHI [306] permettront de déterminer quels peptides HLA-A2-compatibles sont les plus susceptibles d'être générés à partir de la dégradation de HFE. Bien qu'idéalement, l'épitope d'intérêt serait abrogé par la mutation HFE_{C282Y}, ceci ne constituerait pas le seul scénario validant cette hypothèse. Il est possible qu'en raison de sa structure, HFE_{C282Y} soit digéré différemment par la machinerie d'apprêtement antigénique et que des peptides différents en résultent.

Afin d'établir si un ou plusieurs épitopes immunodominants provenant de HFE peuvent être présentés par HLA-A2, nous transfecterons des cellules 293 avec les variants de HFE, puis nous procéderons à une élution à l'acide des peptides du MHC I présentés à la surface [307] afin d'identifier les peptides présentés par spectrométrie de masse [308]. De plus, nous pourrions comparer les peptides générés par HFE_{WT} à ceux générés en présence de HFE_{H63D} et HFE_{C282Y} afin de limiter les candidats qui pourraient être responsables de cette immunodominance. Finalement, des minigènes encodant uniquement les épitopes candidats pourront être transfectés dans des cellules 293-A2 dépourvues de HFE en présence d'un antigène d'intérêt afin de valider le maintien de l'inhibition de la reconnaissance.

Identification de la structure et de la localisation du domaine inhibiteur de HFE

L'identification du domaine α 1-2 de HFE comme inhibiteur (**Figure 13**) soulève plusieurs questions intéressantes. Lequel des domaines α 1 ou α 2 est responsable? Doivent-ils tous deux

être présents, ou est-ce l'interface entre les deux domaines qui affecte la reconnaissance? Une dissection délicate des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, ainsi que de leur interface permettra la génération de chimères HLA-A1 / HFE_{WT} pouvant répondre à cette question (**Figure 45**).

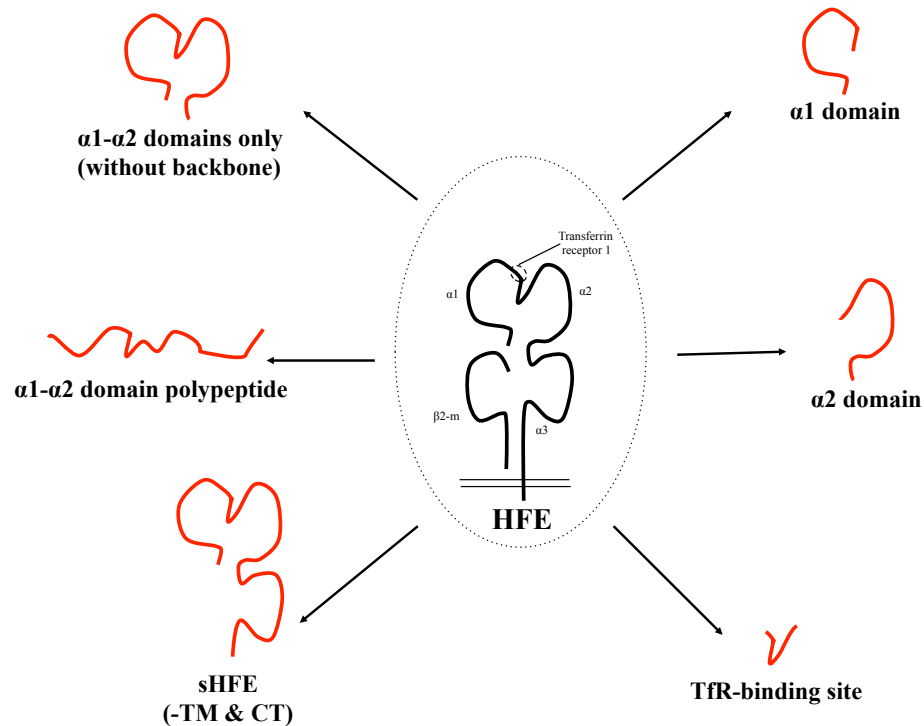


Figure 45. Proposition de variants de HFE à tester afin d'établir le domaine et le mécanisme responsables de l'inhibition de la présentation antigénique par MHC I.

Importance du transport de HFE_{WT} jusqu'à la surface cellulaire pour l'inhibition de la reconnaissance par MHC I?

L'effet de HFE est davantage marqué chez les variants de HFE transportés jusqu'à la surface cellulaire (**Figures 12 et 41**). Ainsi, il sera nécessaire d'établir l'impact de HFE sur la reconnaissance lors du transport jusqu'à la surface cellulaire. Pour ce faire, nous étudierons le

comportement d'un mutant de HFE_{WT} doté d'un motif de rétention KKMP en extrémité C-terminale [309]. Ce motif assure la rétention des protéines associées grâce à sa liaison du récepteur COPI [310] et au transport rétrograde subséquent, de l'appareil de Golgi vers le ER [310, 311] (**Figure 46A**). Ce mutant permettra d'établir l'impact de HFE sur la présentation par MHC I lors du transport jusqu'à la surface cellulaire. Les résultats préliminaires présentés à la **Figure 46B** suggèrent que le transport de HFE_{WT} n'est pas nécessaire afin d'inhiber la reconnaissance par MHC I, puisque le mutant HFE_{WT}-ER confiné à l'appareil de Golgi et au ER inhibe la reconnaissance de manière identique à HFE_{WT}. La rétention de ce mutant dans le ER et l'appareil de Golgi demeure à valider par immunofluorescence.

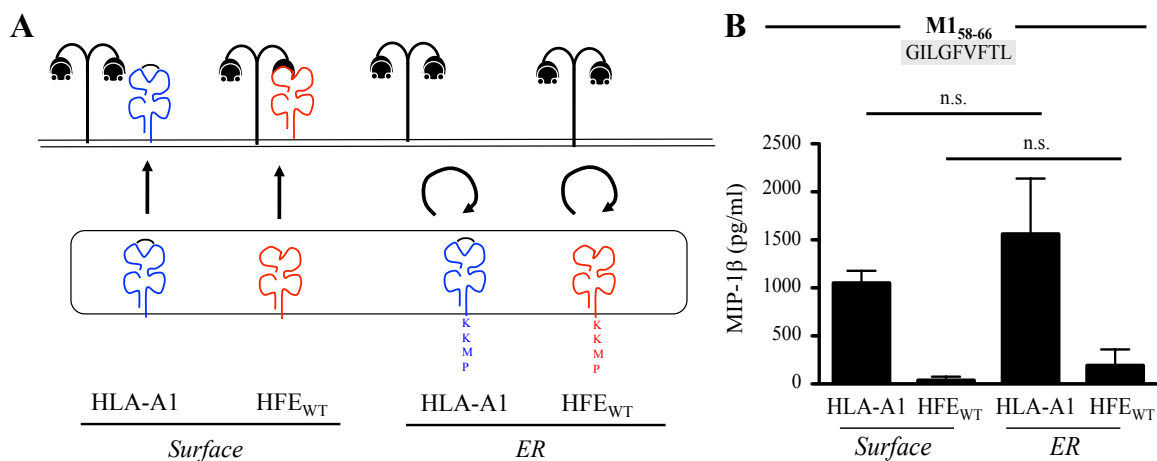


Figure 46. Le transport de HFE jusqu'à la surface cellulaire n'est pas responsable de l'inhibition de la reconnaissance sur MHC I par HFE.

Des cellules 293-A2 ont été transfectées avec un plasmide encodant l'antigène M1 de l'influenza ainsi que les variants de HFE exprimant ou non le motif de rétention KKMP assurant leur rétention dans le ER et le *cis*-Golgi. Puis, les cellules 293-A2 transfectées ont été co-cultivées avec des lymphocytes T CD8⁺ M1-spécifiques afin d'évaluer l'impact du transport de HFE sur la reconnaissance antigénique par MHC I. Essai représentatif de trois expériences indépendantes.

Impact de HFE_{WT} sur la voie de présentation croisée par MHC I?

Afin d'établir l'implication de HFE dans la voie de présentation classique des antigènes par le MHC I, nous évaluerons l'impact de HFE sur une voie de présentation antigénique alternative par MHC I: la voie de présentation croisée. Pour ce faire, nous étudierons les niveaux de reconnaissance de l'antigène M1₅₈₋₆₆ inséré dans la structure du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) en présence de HFE. Les épitopes insérés dans cette particule pseudovirale sont internalisés par les lymphocytes B activés au CD40 ligand (défini?) (CD40B) afin d'être présentés sur les molécules du MHC I par voie vacuolaire (**Figure 6**) [312-314]. Les résultats présentés à la **Figure 47**, bien que préliminaires en raison du type de APC utilisé, suggèrent que HFE_{WT} n'exerce aucun effet sur la reconnaissance d'antigènes par voie de présentation croisée vacuolaire sur MHC I. Ainsi, HFE_{WT} semble cibler les antigènes présentés par voie classique d'apprêtement antigénique sur MHC I.

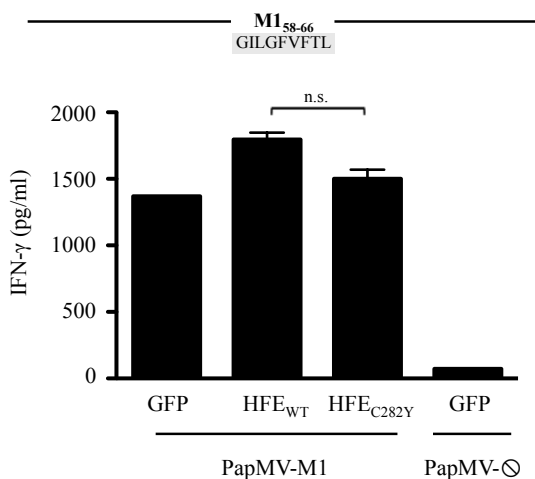


Figure 47. HFE_{WT} n'affecte pas la présentation croisée par voie vacuolaire de l'antigène M1₅₈₋₆₆ sur MHC I.

Des lymphocytes B stimulés au CD40L (CD40B) ont été électroporés avec des plasmides encodant GFP, HFE_{WT} ou HFE_{C282Y} et incubés en présence de PapMV avec (PapMV-M1) ou

sans (PapMV- \ominus) épitope de l'antigène M1₅₈₋₆₆ en position C-terminale. Par la suite, les CD40B ont été co-cultivés avec des lymphocytes T CD8⁺ M1₅₈₋₆₆-spécifiques afin d'évaluer les niveaux de reconnaissance en quantifiant la sécrétion d'IFN- γ dans le surnageant. Seule expérience de ce type complétée.

Les variants d'épissage de HFE exercent-ils tous le même effet sur la présentation par MHC I?

Malgré l'effet sur la présentation antigénique observé avec la protéine pleine-longueur de HFE (**Figure 13**), il est important de noter que plusieurs variants d'épissage alternatif ont été identifiés (**Figure 48**) [287]. Ainsi, l'étude des variants épissés de HFE et de leur impact sur la présentation antigénique par MHC I pourrait offrir d'autres indices quant au rôle et au mécanisme de HFE dans ce processus immunologique [287]. De plus, la purification de certains de ces variants exprimés dans divers tissus pourrait permettre de valider les essais chimériques et d'identifier le domaine inhibiteur de HFE en comparant l'impact des variants d'épissage de l'exon-2 et l'exon-3, dépourvus des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, respectivement, sur la présentation antigénique par MHC I. Le variant d'épissage d'inclusion de l'intron-4 cause également un arrêt prématuré de la traduction de HFE résultant en une protéine sHFE dont l'impact mérite une attention particulière (**Figure 48**).

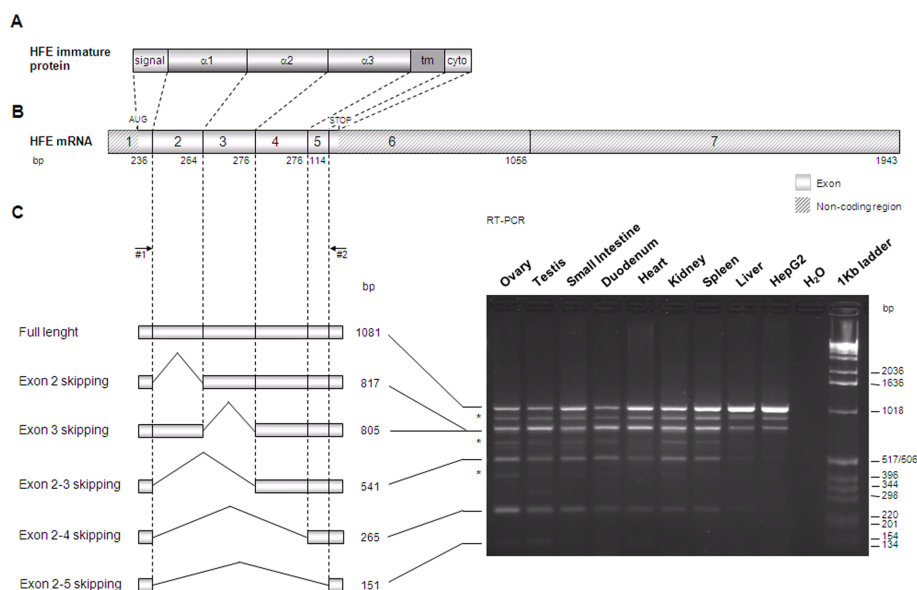


Figure 48. Variants d'épissage de HFE décrits dans la littérature actuelle.

Figure issue de [287].

Validation de l'impact de HFE endogène et expérience récapitulative liant l'impact de HFE sur MHC I à sa régulation par les lymphocytes T activés

Malgré l'intérêt de nos résultats, la surexpression de HFE par transfection dans des cellules 293 HFE-déficientes ne confirme pas d'emblée un impact à des niveaux physiologiques. La surexpression de HFE dans des cellules HFE^{-/-} constitue une étape importante et essentielle afin d'établir au niveau moléculaire, l'étendue du rôle de HFE puisqu'elle permet d'exprimer uniquement un variant de HFE d'intérêt à la fois afin de permettre une caractérisation optimale. Par contre, la surexpression de HFE dans les cellules 293 leur confère des niveaux d'expression de HFE potentiellement supérieurs aux niveaux retrouvés de manière endogène dans d'autres lignées cellulaires et dans les tissus humains (**Figure 35**).

Nos expériences de dose-réponse de HFE rapprochent nos observations des conditions physiologiques, puisque la concentration de HFE est décrie de 0.5 µg, à 0.25 µg, à 0.125 µg et que même à ces doses inférieures, l'effet de HFE_{WT} sur la présentation antigénique est maintenu, alors que HFE_{H63D} et HFE_{C282Y} n'exercent aucun effet (**Figure 19**). Par contre, l'étude de l'inhibition d'une expression endogène de HFE demeure la prochaine étape essentielle.

Il s'agit donc d'étudier l'impact de la répression de HFE endogène sur la reconnaissance d'un antigène connu grâce à un "short hairpin" RNA (shRNA) davantage stable ou à un "short interfering" (siRNA) davantage transitoire ciblant HFE. Ceci permettra d'établir si la répression de niveaux endogènes de HFE est suffisante pour résulter en une reconnaissance antigénique accrue.

Les cellules SK23mel constitueront un outil précieux, puisqu'elles expriment fortement HFE ainsi que HLA-A2 et les antigènes MART-1 et gp100 du mélanome. Il s'agira d'exposer ces cellules à des lymphocytes T activés par l'anti-CD3 afin de réprimer l'expression de HFE (**Figure 36B**), ce qui pourrait ainsi résulter en une efficacité accrue de la présentation antigénique des antigènes MART-1 et gp100 sur MHC I et en leur reconnaissance par des lymphocytes T CD8⁺ antigène-spécifiques. La reconnaissance pourrait par la suite être quantifiée grâce à des ELISA IFN-γ ou MIP-1β.

Cette expérience permettra d'établir si l'inhibition de l'expression de HFE par les lymphocytes T activés dans les cellules SK23mel est suffisante pour altérer les niveaux de reconnaissance

de celles-ci en présence de lymphocytes T CD8⁺ antigène-spécifiques, grâce à une présentation antigénique par MHC I non-inhibée en raison d'une baisse de HFE.

Expériences *ex vivo* chez les patients d'HH

Les patients HH offrent un modèle avantageux puisque ceux-ci, en guise de traitement, subissent des phlébotomies à intervalles réguliers [75]. De plus, le sang obtenu est généralement jeté au lieu de servir à de transfusions ce qui signifie un apport illimité au sang de patients qui pourrait permettre d'établir un lien entre nos observations *in vitro* et *ex vivo*.

L'obtention de phlébotomies de patients d'HH génotypés et la comparaison de celles-ci avec le sang de donneurs en santé permettrait d'établir un impact de HFE sur la présentation antigénique chez l'être humain. Il s'agira de faire une séparation des cellules du sang afin d'isoler les PBMC. Puis, nous pourrions en extraire les lymphocytes B par séparation magnétique ou par culture des PBMC en présence d'IL-4 et de CD40-ligand (CD40L) afin de n'obtenir que des lymphocytes B qui pourront servir de APC [315]. Puis, suivant la transfection de ces cellules avec un antigène connu, celles-ci pourront être exposées à des lymphocytes T antigène-spécifiques afin d'évaluer la reconnaissance et l'impact des différents variants de HFE chez l'humain. La difficulté principale de cette étude pourrait reposer en la disponibilité de patients HH qui présentent le variant du MHC I HLA-A2, puisque la forte majorité de ceux-ci sont HLA-A3-positifs, grâce à la sélection conjointe de ces deux locus au cours de l'évolution. Dans cette éventualité, des lymphocytes et peptides HLA-A3-

spécifiques pourront être générés.

Études dans les modèles murins

Les expériences *in vitro* offrent leurs avantages puisqu'elles permettent d'étudier des cellules et des mécanismes présents chez l'être humain. Par contre, l'emploi de modèles murins, bien qu'il utilise un organisme entièrement différent et parfois peu représentatif de la réalité chez l'être humain, permet de valider les mécanismes en tenant compte des différents systèmes présents chez la souris dans le contexte de diverses maladies. De plus, l'existence et la disponibilité de souris dépourvues de HFE (HFE^{-/-}) offre plusieurs possibilités [59]. Ainsi, la prochaine section vise à décrire quelques études dans le modèle murin qui seront à compléter afin de valider davantage l'importance de HFE ainsi que sa contribution à la tolérance immunitaire et à la progression des maladies.

Modèle de l'ovalbumine (OVA)

Plusieurs modèles de présentation antigénique chez la souris sont disponibles. Le croisement de souris OVA présentant l'antigène de l'ovalbumine avec des souris HFE^{-/-} permettra d'évaluer l'impact de l'absence de HFE sur la présentation antigénique.

Les cellules qui expriment le plus fortement HFE sont des M ϕ du foie nommés cellules de Kupffer. Ces cellules sont extrêmement difficiles à récolter puisque peu nombreuses, mais seraient idéales puisqu'elles permettraient d'observer l'impact de la délétion de HFE dans des

APC sur leur reconnaissance par des lymphocytes T CD8⁺ OVA-spécifiques (cellules OT-I) [316].

Carcinogénèse chimio-induite

L'impact de HFE sur la présentation antigénique et sur l'immunosuppression pourra être évalué dans un modèle de cancer. Il s'agira de traiter des souris HFE_{WT} ou HFE^{-/-} avec un agent chimique comme le méthylcholanthrène, agent utilisé pour la carcinogénèse chimioinduite [317] et d'évaluer le développement du cancer. Celui-ci pourrait survenir plus rapidement et être davantage agressif chez les souris HFE_{WT} puisqu'il pourrait y avoir inhibition de la présentation antigénique par MHC I et meilleure progression de la tumeur. Par ailleurs, la présence de HFE_{C282Y}^{+/+} (knock-in) [318] ou de HFE^{-/-} pourrait contrer le développement des tumeurs et promouvoir la survie des souris. Finalement, l'étude du développement de tumeurs suivant la déplétion des lymphocytes T CD8⁺ pourrait démontrer l'importance des lymphocytes T CD8⁺ dans ce modèle en plus d'exclure la dépendance de cet effet sur une altération du métabolisme du fer liée à HFE.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Les souris EAE reproduisent les symptômes de la MS [319] et pourront être d'intérêt compte tenu de la corrélation établie entre la mutation HFE_{C282Y} et la prévalence et l'agressivité de la MS chez l'humain [291, 320]. Leur croisement avec des souris HFE^{-/-} permettra d'étudier le développement de l'EAE, la progression de la maladie, le score clinique ainsi que la survie de

ces souris. Cette étude permettra d'établir si la délétion de HFE (HFE^{-/-} ou HFE_{C282Y}) cause une apparition accélérée ainsi qu'une agressivité accrue de la MS grâce à l'amélioration de la présentation antigénique comparativement aux souris HFE_{WT}.

Graft versus host disease (GVHD)

La GVHD est causée par la réaction des cellules immunitaires présentes dans un greffon envers l'hôte [321]. Dans ce contexte, les cellules immunes présentes dans la greffe peuvent réagir envers les variants HLA exprimés chez l'hôte, qui peuvent différer de ceux du donneur et être reconnus comme étant étrangers, ou envers les antigènes d'histocompatibilité mineurs (miHA) spécifiques à l'hôte [322]. Cette incompatibilité dépendante des miHA représente un scénario davantage cliniquement pertinent, puisque les greffes sont généralement contrôlées afin d'assurer l'agencement approprié des molécules HLA entre donneurs et receveurs.

Chez la souris, divers modèles de GVHD permettent d'étudier la réponse dépendante des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺. La greffe de moëlle osseuse d'une souris B10.BR vers une souris CBA présente un modèle reconnu pour être dépendant de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ envers les miHA de la souris receveuse CBA. L'étude de HFE dans ce contexte pourrait être particulièrement intéressant. En transplantant la moëlle osseuse de la souris B10.BR vers une souris CBA irradiée HFE_{WT}, nous pourrions étudier l'induction de la réponse GVHD et la comparer avec celle induite chez une souris receveuse CBA HFE^{-/-} ou HFE_{C282Y}^{+/+}.

Impact de HFE dans les maladies auto-immunes?

L'impact inhibiteur de HFE sur la présentation antigénique par MHC I soulève plusieurs questions, dont celle du potentiel de HFE dans le traitement des maladies auto-immunes. L'administration de HFE peut-elle empêcher ou ralentir le développement de ces maladies? Doit-elle être faite de manière prophylactique ou peut-elle être faite après le développement de la maladie? L'impact de sHFE pourrait être davantage intéressant puisqu'il a été documenté que, malgré sa capacité à interagir avec le TfR1 [290], sHFE n'altère pas l'homéostasie du fer [323]. Ainsi, il est possible que le traitement avec sHFE puisse conférer les avantages immunosuppresseifs de HFE_{WT} recherchés en transplantation sans altérer l'homéostasie du fer cellulaire avec les conséquences imprévisibles [323].

En somme, tous ces travaux permettront d'élucider le mécanisme de HFE et d'en établir l'impact dans le contexte de diverses maladies chez l'humain et chez la souris ainsi que de mieux comprendre l'origine des défauts immunitaires qui peuvent être liés à l'HH.

3. Conclusion

3. Conclusion

Nos résultats démontrent que HFE, protéine principalement étudiée pour son rôle dans le métabolisme du fer, est impliquée dans la voie de présentation antigénique par MHC I et exerce un rôle immuno-suppresseur. HFE pourrait jouer un rôle dans le développement de certaines maladies comme le cancer, dans le contrôle de certaines maladies auto-immunes et dans la réponse adaptative aux pathogènes.

L'expression de HFE pourrait varier de manière dynamique selon les médiateurs immunitaires présents dans le micro-environnement inflammatoire immédiat (**Figures 40 et 49**). HFE_{WT} pourrait, en conditions stables, décroître la présentation antigénique d'auto-antigènes sur les molécules du MHC I en atténuant celle-ci sous le seuil de détection des lymphocytes T CD8⁺, contrairement à HFE_{H63D} et HFE_{C282Y}. Cet impact de HFE_{WT} pourrait d'ailleurs expliquer la forte prévalence de défauts immunitaires présents chez les patients d'HH associée à HFE_{C282Y} [217], en plus de l'impact non-négligeable de l'apport du fer sur le développement de ceux-ci.

4. Modèle

4. Modèle

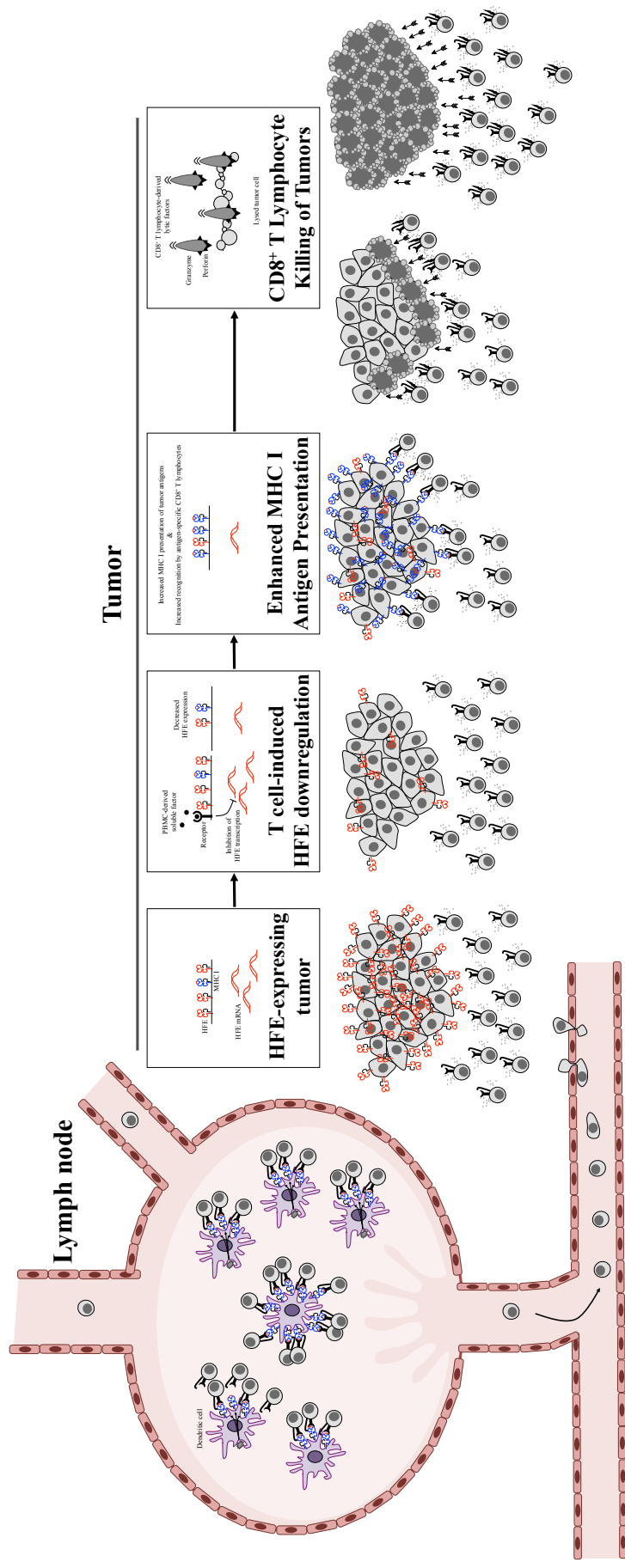


Figure 49. Modèle d'action de HFE dans la réponse immunitaire.

Initialement, les lymphocytes T circulants sont activés dans les ganglions lymphatiques par des DC matures [324]. Puis, ceux-ci circulent et arrivent au site de la tumeur, où ils s'extravasent. Les tumeurs expriment HFE, mais la présence de lymphocytes T activés et des facteurs solubles qu'ils produisent cause une baisse de l'expression de HFE au sein de la tumeur. La répression de l'expression de HFE cause une amélioration de la présentation d'antigènes tumoraux par la tumeur sur les molécules du MHC I. Puis, les antigènes tumoraux mieux présentés sur MHC I sont davantage reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ antigène-spécifiques, qui s'en voient activés et expriment des molécules d'activation comme 4-1BB [325] tout en sécrétant des cytokines comme l'IFN- γ et le MIP-1 β . Finalement, les lymphocytes T CD8⁺ activés reconnaissent leur antigène produisant des facteurs lytiques comme le granzyme et la perforine [108, 109] afin de lyser les cellules tumorales et mener à l'éradication de la tumeur.

5. Références

5. Références

1. Steinberg, D., *Fatty acid mobilization--mechanisms of regulation and metabolic consequences*. Biochem Soc Symp, 1963. **24**: p. 111-43.
2. Waldman, R.H. and R. Ganguly, *The role of the secretory immune system in protection against agents which infect the respiratory tract*. Adv Exp Med Biol, 1974. **45**(0): p. 283-94.
3. Klein, G. and E. Klein, *Immune surveillance against virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(5): p. 2121-5.
4. Oettgen, H.F., L.J. Old, and E.A. Boyse, *Human tumor immunology*. Med Clin North Am, 1971. **55**(3): p. 761-85.
5. Chandra, R.K., *Nutrition as a critical determinant in susceptibility to infection*. World Rev Nutr Diet, 1976. **25**: p. 166-88.
6. Tang, A.M. and E. Smit, *Selected vitamins in HIV infection: a review*. AIDS Patient Care STDS, 1998. **12**(4): p. 263-73.
7. Yunis, E.J., O. Stutman, and R.A. Good, *Thymus, immunity and autoimmunity*. Ann N Y Acad Sci, 1971. **183**: p. 205-20.
8. MacIver, N.J., R.D. Michalek, and J.C. Rathmell, *Metabolic regulation of T lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 259-83.
9. Wahl, D.R., et al., *Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 104-15.
10. Strodthoff, D., et al., *Lack of invariant natural killer T cells affects lipid metabolism in adipose tissue of diet-induced obese mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(6): p. 1189-96.
11. de Sousa, M., et al., *Iron and lymphocytes: reciprocal regulatory interactions*. Curr Stud Hematol Blood Transfus, 1991(58): p. 171-7.
12. Arredondo, M., et al., *HFE inhibits apical iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2001. **15**(7): p. 1276-1278.
13. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nature genetics, 1996. **13**(4): p. 399-408.
14. Walker, E.M., Jr. and S.M. Walker, *Effects of iron overload on the immune system*. Ann Clin Lab Sci, 2000. **30**(4): p. 354-65.
15. Bahram, S., et al., *Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(23): p. 13312-13317.
16. Lebrón, J.A., et al., *Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor*. Cell, 1998. **93**(1): p. 111-123.
17. Ponka, P., *Cellular iron metabolism*. Kidney Int Suppl, 1999. **69**: p. S2-11.
18. Okada, S., *Iron-induced tissue damage and cancer: the role of reactive oxygen species-free radicals*. Pathology international, 1996. **46**(5): p. 311-332.
19. Finberg, K.E., *Unraveling mechanisms regulating systemic iron homeostasis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 532-7.

20. Connor, J.R., et al., *Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains*. J Neurosci Res, 1990. **27**(4): p. 595-611.
21. Zacharski, L.R., et al., *Association of age, sex, and race with body iron stores in adults: analysis of NHANES III data*. Am Heart J, 2000. **140**(1): p. 98-104.
22. Aisen, P., C.A. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2001. **33**(10): p. 940-959.
23. Chua, A.C.G., et al., *The regulation of cellular iron metabolism*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2007. **44**(5-6): p. 413-459.
24. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004. **117**(3): p. 285-297.
25. Yam, L.T., et al., *Circulating iron-containing macrophages in hemochromatosis*. N Engl J Med, 1968. **279**(10): p. 512-4.
26. Donovan, A., et al., *The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis*. Cell Metabolism, 2005. **1**(3): p. 191-200.
27. Trinder, D., et al., *Iron uptake from plasma transferrin by the duodenum is impaired in the Hfe knockout mouse*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(8): p. 5622-5626.
28. Aisen, P., *Entry of iron into cells: a new role for the transferrin receptor in modulating iron release from transferrin*. Ann Neurol, 1992. **32 Suppl**: p. S62-8.
29. Thomas, J.D., *The determination of menstrual iron loss*. Biochem Med, 1970. **3**(4): p. 311-20.
30. Cheng, Y., et al., *Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex*. Cell, 2004. **116**(4): p. 565-576.
31. Eckenroth, B.E., et al., *How the binding of human transferrin primes the transferrin receptor potentiating iron release at endosomal pH*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(32): p. 13089-94.
32. Bauminger, E.R., et al., *Iron (II) oxidation and early intermediates of iron-core formation in recombinant human H-chain ferritin*. The Biochemical journal, 1993. **296 (Pt 3)**: p. 709-719.
33. West, A.P., et al., *Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(49): p. 38135-38138.
34. Chen, J. and C.A. Enns, *Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(3): p. 256-63.
35. Herbison, C.E., et al., *The role of transferrin receptor 1 and 2 in transferrin-bound iron uptake in human hepatoma cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(6): p. C1567-75.
36. Chen, J., et al., *HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1-HFE interactions*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 36862-70.
37. Goswami, T. and N.C. Andrews, *Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(39): p. 28494-28498.

38. Gerhard, G.S., A.E. Ten Elshof, and M.J. Chorney, *Hereditary haemochromatosis as an immunological disease*. British journal of haematology, 1998. **100**(2): p. 247-255.
39. Gross, C.N., et al., *Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(34): p. 22068-22074.
40. Bhatt, L., et al., *N-glycosylation is important for the correct intracellular localization of HFE and its ability to decrease cell surface transferrin binding*. The FEBS journal, 2010. **277**(15): p. 3219-3234.
41. Williams, D.B., *Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum*. Journal of cell science, 2006. **119**(4): p. 615-623.
42. Gao, J., et al., *Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression*. Cell Metabolism, 2009. **9**(3): p. 217-227.
43. Yeh, K.Y., M. Yeh, and J. Glass, *Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G385-94.
44. Mena, N.P., et al., *Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells*. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology, 2008. **294**(1): p. G192-8.
45. Weiss, G. and L.T. Goodnough, *Anemia of chronic disease*. The New England journal of medicine, 2005. **352**(10): p. 1011-1023.
46. Waheed, A., et al., *Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(23): p. 12384-12389.
47. Tysoe-Calnon, V.A., J.E. Grundy, and S.J. Perkins, *Molecular comparisons of the beta 2-microglobulin-binding site in class I major-histocompatibility-complex alpha-chains and proteins of related sequences*. The Biochemical journal, 1991. **277** (Pt 2): p. 359-369.
48. Feder, J.N., et al., *The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(22): p. 14025-14028.
49. Lebrón, J.A. and P.J. Bjorkman, *The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis*. Journal of molecular biology, 1999. **289**(4): p. 1109-1118.
50. Salter-Cid, L., *Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE: Implications for cellular iron homeostasis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(10): p. 5434-5439.
51. Ahmad, K.A., et al., *Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2002. **29**(3): p. 361-366.
52. Bridle, K.R., et al., *Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis*. Lancet, 2003. **361**(9358): p. 669-73.
53. Makui, H., et al., *Contribution of Hfe expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2189-2195.
54. Drakesmith, H. and A. Prentice, *Viral infection and iron metabolism*. Nature reviews Microbiology, 2008. **6**(7): p. 541-552.

55. Phatak, P.D., et al., *Prevalence and penetrance of HFE mutations in 4865 unselected primary care patients*. *Blood Cells Mol Dis*, 2002. **29**(1): p. 41-7.
56. de Villiers, J.N., et al., *Spectrum of mutations in the HFE gene implicated in haemochromatosis and porphyria*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(8): p. 1517-22.
57. Merryweather-Clarke, A. and J. Pointon, *Global prevalence of putative haemochromatosis mutations*. ... of Medical Genetics, 1997.
58. Merryweather-Clarke, A.T., et al., *Global prevalence of putative haemochromatosis mutations*. *J Med Genet*, 1997. **34**(4): p. 275-8.
59. Zhou, X.Y., et al., *HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(5): p. 2492-2497.
60. Feder, J.N., *The hereditary hemochromatosis gene (HFE): a MHC class I-like gene that functions in the regulation of iron homeostasis*. *Immunologic Research*, 1999. **20**(2): p. 175-185.
61. Brissot, P., et al., *Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1820**(3): p. 403-10.
62. Patel, M. and D.V. Ramavataram, *Non Transferrin Bound Iron: Nature, Manifestations and Analytical Approaches for Estimation*. *Indian J Clin Biochem*, 2012. **27**(4): p. 322-332.
63. Liuzzi, J.P., et al., *Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(37): p. 13612-13617.
64. Wistran, D.C. and C.S. Georas, *Idiopathic hemochromatosis, long term treatment and hepatoma: a case report and review of the literature*. *R I Med J*, 1977. **60**(2): p. 65-77.
65. Easley, R.M., Jr., B.F. Schreiner, Jr., and P.N. Yu, *Reversible cardiomyopathy associated with hemochromatosis*. *N Engl J Med*, 1972. **287**(17): p. 866-7.
66. von Herbay, A., et al., *-Cardiomyopathy as the cause of death in genetic hemochromatosis*. *Z Gastroenterol*, 1996. **34**(3): p. 178-82.
67. McCreery, A.H., *Diabetes Associated with Haemochromatosis*. *Can Med Assoc J*, 1917. **7**(6): p. 481-502.
68. Shander, A., M.D. Cappellini, and L.T. Goodnough, *Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions*. *Vox Sang*, 2009. **97**(3): p. 185-97.
69. Press, R.D., et al., *Hepatic iron overload: direct HFE (HLA-H) mutation analysis vs quantitative iron assays for the diagnosis of hereditary hemochromatosis*. *Am J Clin Pathol*, 1998. **109**(5): p. 577-84.
70. Nadakkavukaran, I.M., E.K. Gan, and J.K. Olynyk, *Screening for hereditary haemochromatosis*. *Pathology*, 2012. **44**(2): p. 148-52.
71. Flexner, J.M., *Hemochromatosis: diagnosis and treatment*. *Compr Ther*, 1991. **17**(11): p. 7-9.
72. Finch, S., D. Haskins, and C.A. Finch, *Iron metabolism; hematopoiesis following phlebotomy; iron as a limiting factor*. *J Clin Invest*, 1950. **29**(8): p. 1078-86.
73. Garry, P.J. and J.H. Saiki, *Idiopathic hemochromatosis: serum ferritin concentrations during therapy by phlebotomy*. *Clin Chem*, 1982. **28**(8): p. 1806-8.
74. Adams, P.C. and J.C. Barton, *How I treat hemochromatosis*. *Blood*, 2010. **116**(3): p. 317-25.

75. Houston, J.C., *Phlebotomy for haemochromatosis; effect of removing 52 pints of blood in sixteen months.* Lancet, 1953. **1**(6764): p. 766-8.
76. Nagler, M., M. Gregor, and W.A. Wuillemin, *Iron chelation with deferasirox in two patients with HFE hemochromatosis and chronic anemia.* Acta Haematol, 2011. **126**(2): p. 119-21.
77. Burke, W., N. Press, and S.M. McDonnell, *Hemochromatosis: genetics helps to define a multifactorial disease.* Clin Genet, 1998. **54**(1): p. 1-9.
78. Yen, A.W., T.L. Fancher, and C.L. Bowlus, *Revisiting hereditary hemochromatosis: current concepts and progress.* Am J Med, 2006. **119**(5): p. 391-9.
79. Madden, D.R., *The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes.* Annual Review of Immunology, 1995. **13**: p. 587-622.
80. Knittler, M.R., et al., *Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules.* Current biology : CB, 1999. **9**(18): p. 999-1008.
81. Belizaire, R. and E.R. Unanue, *Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(41): p. 17463-17468.
82. Bellemare-Pelletier, A., et al., *HLA-DO transduced in human monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen processing.* Journal of leukocyte biology, 2005. **78**(1): p. 95-105.
83. Römisch, K., *Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane.* Journal of cell science, 1999. **112** (Pt 23): p. 4185-4191.
84. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance.* Nature Reviews Immunology, 2001. **1**(2): p. 126-134.
85. Basha, G., et al., *MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells.* PLoS ONE, 2008. **3**(9): p. e3247.
86. Münz, C., *Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore?* Current opinion in immunology, 2010. **22**(1): p. 89-93.
87. Granados, D.P., et al., *ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides.* BMC Immunology, 2009. **10**(1): p. 10.
88. Eisenlohr, L.C., L. Huang, and T.N. Golovina, *Rethinking peptide supply to MHC class I molecules.* Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(5): p. 403-410.
89. Goldberg, A.L. and J.F. Dice, *Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells.* Annu Rev Biochem, 1974. **43**(0): p. 835-69.
90. Yewdell, J.W., L.C. Anton, and J.R. Bennink, *Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules?* J Immunol, 1996. **157**(5): p. 1823-6.
91. Dolan, B.P., et al., *MHC class I antigen processing distinguishes endogenous antigens based on their translation from cellular vs. viral mRNA.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(18): p. 7025-7030.
92. Granados, D.P., et al., *MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements.* Blood, 2012. **119**(26): p. e181-e191.
93. Wheatley, D.N., M.R. Giddings, and M.S. Inglis, *Kinetics of degradation of "short-" and "long-lived" proteins in cultured mammalian cells.* Cell Biol Int Rep, 1980. **4**(12): p. 1081-90.

94. Schubert, U., et al., *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 770-4.
95. Yewdell, J.W. and C.V. Nicchitta, *The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension*. Trends in immunology, 2006. **27**(8): p. 368-373.
96. Dolan, B.P., et al., *Defective Ribosomal Products Are the Major Source of Antigenic Peptides Endogenously Generated from Influenza A Virus Neuraminidase*. The Journal of Immunology, 2010. **184**(3): p. 1419-1424.
97. Apcher, S., et al., *Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(28): p. 11572.
98. Huang, L., M.C. Kuhls, and L.C. Eisenlohr, *Hydrophobicity as a driver of MHC class I antigen processing*. The EMBO journal, 2011. **30**(8): p. 1634-1644.
99. Varshavsky, A., *The N-end rule*. Cell, 1992. **69**(5): p. 725-35.
100. Janda, C.Y., et al., *Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle*. Nature, 2010. **465**(7297): p. 507-10.
101. Abele, R. and R. Tampé, *The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing*. Physiology, 2004. **19**(4): p. 216-224.
102. Szabó, T.G., et al., *Critical role of glycosylation in determining the length and structure of T cell epitopes*. Immunome Research, 2009. **5**(1): p. 4.
103. Chen, Y., J. Sidney, and S. Southwood, *Naturally processed peptides longer than nine amino acid residues bind to the class I MHC molecule HLA-A2.1 with high affinity and in different conformations*. The Journal of ..., 1994.
104. Weiss, A., *Structure and function of the T cell antigen receptor*. Journal of Clinical Investigation, 1990. **86**(4): p. 1015-1022.
105. Wang, F., et al., *On defining the rules for interactions between the T cell receptor and its ligand: a critical role for a specific amino acid residue of the T cell receptor beta chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5217-22.
106. Reiser, J.B., et al., *Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 291-7.
107. Dustin, M.L. and A.C. Chan, *Signaling takes shape in the immune system*. Cell, 2000. **103**(2): p. 283-294.
108. Takayama, H. and M.V. Sitkovsky, *Antigen receptor-regulated exocytosis in cytotoxic T lymphocytes*. J Exp Med, 1987. **166**(3): p. 725-43.
109. Kranz, D.M., M.S. Pasternack, and H.N. Eisen, *Recognition and lysis of target cells by cytotoxic T lymphocytes*. Fed Proc, 1987. **46**(2): p. 309-12.
110. Alderson, M.R., et al., *Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2231-5.
111. Rudolph, M.G., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson, *How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 419-66.
112. Irwin, M.J., W.R. Heath, and L.A. Sherman, *Species-restricted interactions between CD8 and the alpha 3 domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response*. The Journal of experimental medicine, 1989. **170**(4): p. 1091-1101.
113. Gao, G.F., et al., *Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 630-634.

114. Goldberg, A.L., et al., *The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides*. Mol Immunol, 2002. **39**(3-4): p. 147-64.
115. de Verteuil, D., et al., *Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules*. Molecular & Cellular Proteomics : MCP, 2010. **9**(9): p. 2034-2047.
116. Yewdell, J.W., *Immunoproteasomes: regulating the regulator*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(26): p. 9089-9090.
117. Reits, E., et al., *Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I*. Immunity, 2003. **18**(1): p. 97-108.
118. Reits, E., et al., *A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 495-506.
119. Yewdell, J.W. and X. Lu, *Don't mess with ERAAP!* Nat Immunol, 2012. **13**(6): p. 526-8.
120. Falk, K. and O. Rötzschke, *The final cut: how ERAP1 trims MHC ligands to size*. Nature Immunology, 2002. **3**(12): p. 1121-1122.
121. Groothuis, T. and J. Neefjes, *The ins and outs of intracellular peptides and antigen presentation by MHC class I molecules*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **300**: p. 127-48.
122. Raden, D. and R. Gilmore, *Signal recognition particle-dependent targeting of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum in the absence and presence of the nascent polypeptide-associated complex*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(1): p. 117-30.
123. Neuhof, A., et al., *Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(1): p. 103-15.
124. van Geest, M. and J.S. Lolkema, *Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2000. **64**(1): p. 13-33.
125. Zimmermann, R., et al., *Protein translocation across the ER membrane*. BBA - Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 912-924.
126. Sitia, R. and I. Braakman, *Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 891-894.
127. Gething, M.J., *Role and regulation of the ER chaperone BiP*. Seminars in Cell and Developmental Biology, 1999. **10**(5): p. 465-472.
128. Knarr, G., et al., *BiP binding sequences in antibodies*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27589-94.
129. Parodi, A.J., *Protein glucosylation and its role in protein folding*. Annual review of biochemistry, 2000. **69**: p. 69-93.
130. Parodi, A.J., *Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation*. The Biochemical journal, 2000. **348 Pt 1**: p. 1-13.
131. Shakin-Eshleman, S.H., S.L. Spitalnik, and L. Kasturi, *The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-*

- glycosylation efficiency*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(11): p. 6363-6366.
132. Ruddock, L.W. and M. Molinari, *N-glycan processing in ER quality control*. Journal of cell science, 2006. **119**(21): p. 4373-4380.
 133. Hounsell, E.F. and M.J. Davies, *Role of protein glycosylation in immune regulation*. Ann Rheum Dis, 1993. **52 Suppl 1**: p. S22-9.
 134. Gerber, S., et al., *Mechanism of Bacterial Oligosaccharyltransferase: in vitro quantification of sequon binding and catalysis*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(13): p. 8849-8861.
 135. Molinari, M. and A. Helenius, *Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum*. Science, 2000. **288**(5464): p. 331-3.
 136. Santos-Aguado, J., et al., *Amino acid sequences in the alpha 1 domain and not glycosylation are important in HLA-A2/beta 2-microglobulin association and cell surface expression*. Molecular and cellular biology, 1987. **7**(3): p. 982-990.
 137. Freedman, R.B., P. Klappa, and L.W. Ruddock, *Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains*. EMBO Rep, 2002. **3**(2): p. 136-40.
 138. Dick, T.P., et al., *Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes*. Immunity, 2002. **16**(1): p. 87-98.
 139. Molinari, M., et al., *Persistent glycoprotein misfolding activates the glucosidase II/UGT1-driven calnexin cycle to delay aggregation and loss of folding competence*. Mol Cell, 2005. **20**(4): p. 503-12.
 140. Pentcheva, T., E.T. Spiliotis, and M. Edidin, *Cutting edge: Tapasin is retained in the endoplasmic reticulum by dynamic clustering and exclusion from endoplasmic reticulum exit sites*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1538-41.
 141. Li, S., et al., *Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(3): p. 1581-1586.
 142. Ortmann, B., et al., *A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes*. Science, 1997. **277**(5330): p. 1306-9.
 143. Mester, G., V. Hoffmann, and S. Stevanović, *Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2011. **68**(9): p. 1521-1532.
 144. Chen, M. and M. Bouvier, *Analysis of interactions in a tapasin/class I complex provides a mechanism for peptide selection*. The EMBO journal, 2007. **26**(6): p. 1681-1690.
 145. Roder, G., et al., *Tapasin discriminates peptide-human leukocyte antigen-A*02:01 complexes formed with natural ligands*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(23): p. 20547-20557.
 146. Lehner, P.J., M.J. Surman, and P. Cresswell, *Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 221-31.
 147. Rizvi, S.M. and M. Raghavan, *Mechanisms of Function of Tapasin, a Critical Major Histocompatibility Complex Class I Assembly Factor*. Traffic (Copenhagen, Denmark), 2010. **11**(3): p. 332-347.

148. Zarling, A.L., et al., *Tapasin is a facilitator, not an editor, of class I MHC peptide binding*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 2003. **171**(10): p. 5287-5295.
149. Abe, F., et al., *Interaction of Bap31 and MHC class I molecules and their traffic out of the endoplasmic reticulum*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(8): p. 4776-4783.
150. Spiliotis, E.T., et al., *Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP*. Immunity, 2000. **13**(6): p. 841-851.
151. Stornaiuolo, M., et al., *KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex*. Molecular biology of the cell, 2003. **14**(3): p. 889-902.
152. Wakana, Y., et al., *Bap31 is an itinerant protein that moves between the peripheral endoplasmic reticulum (ER) and a juxtannuclear compartment related to ER-associated Degradation*. Molecular biology of the cell, 2008. **19**(5): p. 1825-1836.
153. Paquet, M.-E., et al., *Bap29/31 influences the intracellular traffic of MHC class I molecules*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 2004. **172**(12): p. 7548-7555.
154. Ladasky, J.J., et al., *Bap31 enhances the endoplasmic reticulum export and quality control of human class I MHC molecules*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 2006. **177**(9): p. 6172-6181.
155. Sohn, H.W., et al., *CD99 regulates the transport of MHC class I molecules from the Golgi complex to the cell surface*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 2001. **166**(2): p. 787-794.
156. Choi, E.Y., et al., *Engagement of CD99 induces up-regulation of TCR and MHC class I and II molecules on the surface of human thymocytes*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 1998. **161**(2): p. 749-754.
157. Chagnon, P., et al., *Identification and characterization of an Xp22.33;Yp11.2 translocation causing a triplication of several genes of the pseudoautosomal region 1 in an XX male patient with severe systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(4): p. 1270-8.
158. Bremond, A., et al., *Regulation of HLA class I surface expression requires CD99 and p230/golgin-245 interaction*. Blood, 2009. **113**(2): p. 347-57.
159. Grommé, M., et al., *Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(18): p. 10326-10331.
160. Tse, D.B., et al., *Recycling class I MHC antigens: dynamics of internalization, acidification, and ligand-degradation in murine T lymphoblasts*. The Journal of molecular and cellular immunology : JMCI, 1986. **2**(6): p. 315-329.
161. Moreau, K., et al., *Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D*. The Journal of Cell Biology, 2012. **196**(4): p. 483-496.
162. Salter, R.D., et al., *Polymorphism in the alpha 3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8*. Nature, 1989. **338**(6213): p. 345-347.
163. Moretta, A., et al., *Surface molecules involved in the activation and regulation of T or natural killer lymphocytes in humans*. Immunol Rev, 1989. **111**: p. 145-75.
164. Wells, A.D., et al., *Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy*. The Journal of clinical investigation, 2001. **108**(6): p. 895-903.

165. Keppeler, S.J., et al., *Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40865.
166. Curtsinger, J.M., D.C. Lins, and M.F. Mescher, *Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1141-51.
167. Klar, D. and G.J. Hammerling, *Induction of assembly of MHC class I heavy chains with beta 2microglobulin by interferon-gamma*. EMBO J, 1989. **8**(2): p. 475-81.
168. Agrawal, S. and M.C. Kishore, *MHC class I gene expression and regulation*. J Hematother Stem Cell Res, 2000. **9**(6): p. 795-812.
169. Yang, Y., et al., *Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7257-61.
170. Lee, N., et al., *Three novel downstream promoter elements regulate MHC class I promoter activity in mammalian cells*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15278.
171. Hansen, T.H. and M. Bouvier, *MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 503-13.
172. Vahdati-Ben Arieh, S., et al., *A single viral protein HCMV US2 affects antigen presentation and intracellular iron homeostasis by degradation of classical HLA class I and HFE molecules*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2858-2864.
173. Lippe, R., et al., *Adenovirus infection inhibits the phosphorylation of major histocompatibility complex class I proteins*. The Journal of experimental medicine, 1991. **174**(5): p. 1159-1166.
174. Kasper, M.R. and K.L. Collins, *Nef-mediated disruption of HLA-A2 transport to the cell surface in T cells*. Journal of virology, 2003. **77**(5): p. 3041-3049.
175. Deitz, S.B., et al., *MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(25): p. 13790-13795.
176. Vahdati-Ben Arieh, S., et al., *A single viral protein HCMV US2 affects antigen presentation and intracellular iron homeostasis by degradation of classical HLA class I and HFE molecules*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2858-64.
177. Zinkernagel, R.M., *Associations between major histocompatibility antigens and susceptibility to disease*. Annu Rev Microbiol, 1979. **33**: p. 201-13.
178. Gonzalez-Galarza, F.F., et al., *Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D913-9.
179. Bjorkman, P.J., et al., *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. Nature, 1987.
180. Santos, M. and M. de Sousa, *In vitro modulation of T-cell surface molecules by iron*. Cellular immunology, 1994. **154**(1): p. 498-506.
181. Cardoso, E.M., et al., *Hepatic damage in C282Y homozygotes relates to low numbers of CD8+ cells in the liver lobuli*. European journal of clinical investigation, 2001. **31**(1): p. 45-53.

182. Phoithirath, P., et al., *Generation of monocyte-derived dendritic cells in patients with hereditary hemochromatosis*. Clinical immunology (Orlando, Fla), 2002. **105**(1): p. 93-103.
183. Veillette, A., et al., *The lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck*. Semin Immunol, 1991. **3**(3): p. 143-52.
184. Arosa, F.A., et al., *Decreased CD8-p56lck activity in peripheral blood T-lymphocytes from patients with hereditary haemochromatosis*. Scand J Immunol, 1994. **39**(5): p. 426-32.
185. Fabio, G., et al., *Peripheral lymphocytes and intracellular cytokines in C282Y homozygous hemochromatosis patients*. Journal of hepatology, 2002. **37**(6): p. 753-761.
186. Stober, C.B., et al., *Slc11a1, formerly Nramp1, is expressed in dendritic cells and influences major histocompatibility complex class II expression and antigen-presenting cell function*. Infection and immunity, 2007. **75**(10): p. 5059-5067.
187. Salmerón, A., et al., *Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 1995. **154**(4): p. 1675-1683.
188. de Almeida, S.F., et al., *Stimulation of an unfolded protein response impairs MHC class I expression*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3612-9.
189. de Almeida, S.F., *HFE cross-talks with the MHC class I antigen presentation pathway*. Blood, 2005. **106**(3): p. 971-977.
190. Rohrich, P.S., et al., *Direct recognition by alphabeta cytolytic T cells of Hfe, a MHC class Ib molecule without antigen-presenting function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(36): p. 12855-12860.
191. Bahram, S., et al., *Experimental hemochromatosis due to MHC class I HFE deficiency: immune status and iron metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13312-7.
192. Bowlus, C.L., *The role of iron in T cell development and autoimmunity*. Autoimmunity reviews, 2003. **2**(2): p. 73-78.
193. Porto, G. and M. de Sousa, *Iron overload and immunity*. World journal of gastroenterology : WJG, 2007. **13**(35): p. 4707-4715.
194. Anton, L.C., J.W. Yewdell, and J.R. Bennink, *MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies*. J Immunol, 1997. **158**(6): p. 2535-42.
195. Bhatt, L., et al., *The hereditary hemochromatosis protein HFE and its chaperone beta2-microglobulin localise predominantly to the endosomal-recycling compartment*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **359**(2): p. 277-284.
196. Zhang, A.-S., et al., *Mechanisms of HFE-induced regulation of iron homeostasis: Insights from the W81A HFE mutation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(16): p. 9500-9505.
197. Pinto, J.P., et al., *Protective role of calreticulin in HFE hemochromatosis*. Free radical biology & medicine, 2008. **44**(1): p. 99-108.
198. Fergelot, P., et al., *Over-expression of wild-type and mutant HFE in a human melanocytic cell line reveals an intracellular bridge between MHC class I pathway and transferrin iron uptake*. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization, 2003. **95**(5): p. 243-255.

199. Antoniou, A.N., et al., *ERp57 interacts with conserved cysteine residues in the MHC class I peptide-binding groove*. FEBS letters, 2007. **581**(10): p. 1988-1992.
200. Turnquist, H.R., et al., *The interface between tapasin and MHC class I: identification of amino acid residues in both proteins that influence their interaction*. Immunologic Research, 2002. **25**(3): p. 261-269.
201. Simone, L.C., X. Wang, and J.C. Solheim, *A transmembrane tail: Interaction of tapasin with TAP and the MHC class I molecule*. Molecular immunology, 2009. **46**(10): p. 2147-2150.
202. Suh, W.K., et al., *Interaction of murine MHC class I molecules with tapasin and TAP enhances peptide loading and involves the heavy chain alpha3 domain*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 1999. **162**(3): p. 1530-1540.
203. Paquet, M.-E. and D.B. Williams, *Mutant MHC class I molecules define interactions between components of the peptide-loading complex*. International Immunology, 2002. **14**(4): p. 347-358.
204. Harris, M.R., et al., *Calreticulin and calnexin interact with different protein and glycan determinants during the assembly of MHC class I*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 1998. **160**(11): p. 5404-5409.
205. Pata, S., et al., *Association of CD99 short and long forms with MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 and recruitment into immunological synapses*. BMC Research Notes, 2011. **4**(1): p. 293.
206. Santos, S.G., et al., *Major histocompatibility complex class I-ERp57-tapasin interactions within the peptide-loading complex*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17587-93.
207. Quistgaard, E.M., et al., *Structural and biophysical characterization of the cytoplasmic domains of human BAP29 and BAP31*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71111.
208. Pascolo, S., et al., *The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells*. International Immunology, 2005. **17**(2): p. 117-122.
209. Vázquez, M.N. and J.A. López de Castro, *Similar cell surface expression of β 2-microglobulin-free heavy chains by HLA-B27 subtypes differentially associated with ankylosing spondylitis*. Arthritis and rheumatism, 2005. **52**(10): p. 3290-3299.
210. Merino, E., et al., *Disparate folding and stability of the ankylosing spondylitis-associated HLA-B*1403 and B*2705 proteins*. Arthritis and rheumatism, 2008. **58**(12): p. 3693-3704.
211. Tam, L.-S., J. Gu, and D. Yu, *Pathogenesis of ankylosing spondylitis*. Nature reviews Rheumatology, 2010. **6**(7): p. 399-405.
212. Hellerbrand, C., et al., *HFE C282Y heterozygosity in hepatocellular carcinoma: evidence for an increased prevalence*. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association, 2003. **1**(4): p. 279-284.
213. Parkkila, S., et al., *Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2534-9.
214. Feder, J.N., et al., *The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(4): p. 1472-1477.

215. Macedo, M.F., et al., *Low numbers of CD8 +T lymphocytes in hereditary haemochromatosis are explained by a decrease of the most mature CD8 +effector memory T cells*. Clinical and experimental immunology, 2010. **159**(3): p. 363-371.
216. Macedo, M.F., et al., *Low serum transferrin levels in HFE C282Y homozygous subjects are associated with low CD8(+) T lymphocyte numbers*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2005. **35**(3): p. 319-325.
217. Rubio, J.P., et al., *Extended haplotype analysis in the HLA complex reveals an increased frequency of the HFE-C282Y mutation in individuals with multiple sclerosis*. Human Genetics, 2004. **114**(6): p. 573-580.
218. Hamilton, E., *Joint disease in haemochromatosis*. Mod Trends Rheumatol, 1971. **2**: p. 338-47.
219. Reinis, M., *Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors*. Future Oncol, 2010. **6**(10): p. 1577-89.
220. Garcia-Lora, A., et al., *MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components*. Int J Cancer, 2003. **106**(4): p. 521-7.
221. Svane, I.M., et al., *Interferon-gamma-induced MHC class I expression and defects in Jak/Stat signalling in methylcholanthrene-induced sarcomas*. Scand J Immunol, 1997. **46**(4): p. 379-87.
222. Propper, D.J., et al., *Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 84-92.
223. Reuben, A., et al., *The WT hemochromatosis protein HFE inhibits CD8 T-lymphocyte activation*. Eur J Immunol, 2014.
224. Riedel, H.D., et al., *HFE downregulates iron uptake from transferrin and induces iron-regulatory protein activity in stably transfected cells*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3915-3921.
225. Feger, F., et al., *Role of iron in tumor cell protection from the pro-apoptotic effect of nitric oxide*. Cancer Research, 2001. **61**(13): p. 5289-5294.
226. Deugnier, Y., *Iron and liver cancer*. Alcohol (Fayetteville, NY), 2003. **30**(2): p. 145-150.
227. Godin-Ethier, J., et al., *Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(12): p. 7752-7760.
228. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature Immunology, 2002. **3**(11): p. 991-998.
229. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**: p. 329-360.
230. Ostrand-Rosenberg, S., *Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity*. Current opinion in genetics & development, 2008. **18**(1): p. 11-18.
231. Rytel, M.W. and J. Balay, *Impaired production of interferon in lymphocytes from immunosuppressed patients*. J Infect Dis, 1973. **127**(4): p. 445-9.
232. Tovell, D. and K. Cantell, *Kinetics of interferon production in human leukocyte suspensions*. J Gen Virol, 1971. **13**(3): p. 485-9.
233. Crone, M., C. Koch, and M. Simonsen, *The elusive T cell receptor*. Transplant Rev, 1972. **10**: p. 36-56.

234. Tsoukas, C.D., et al., *Structural and functional characteristics of the CD3 (T3) molecular complex on human thymocytes*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3885-90.
235. Weiss, A., et al., *The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation*. Annu Rev Immunol, 1986. **4**: p. 593-619.
236. Marusic-Galesic, S., et al., *Development of CD4-CD8+ cytotoxic T cells requires interactions with class I MHC determinants*. Nature, 1988. **333**(6169): p. 180-3.
237. Waheed, A., et al., *Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(5): p. 3117-3122.
238. Schmidt, P.J., et al., *The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression*. Cell Metabolism, 2008. **7**(3): p. 205-214.
239. Valenti, L., et al., *HFE mutations modulate the effect of iron on serum hepcidin-25 in chronic hemodialysis patients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(8): p. 1331-7.
240. Gao, J., et al., *The hereditary hemochromatosis protein, HFE, inhibits iron uptake via down-regulation of Zip14 in HepG2 cells*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(31): p. 21462-21468.
241. Parkkila, S., et al., *Cell surface expression of HFE protein in epithelial cells, macrophages, and monocytes*. Haematologica, 2000. **85**(4): p. 340-345.
242. Lawless, M.W., et al., *Expression of hereditary hemochromatosis C282Y HFE protein in HEK293 cells activates specific endoplasmic reticulum stress responses*. BMC cell biology, 2007. **8**: p. 30.
243. Liu, Y., et al., *Mutant HFE H63D Protein Is Associated with Prolonged Endoplasmic Reticulum Stress and Increased Neuronal Vulnerability*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(15): p. 13161-13170.
244. de Almeida, S.F., et al., *Chemical chaperones reduce endoplasmic reticulum stress and prevent mutant HFE aggregate formation*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(38): p. 27905-27912.
245. Oliveira, S.J., M. de Sousa, and J.P. Pinto, *ER Stress and Iron Homeostasis: A New Frontier for the UPR*. Biochemistry Research International, 2011. **2011**: p. 896474.
246. Lucotte, G., *Celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 1998. **24**(4): p. 433-438.
247. Lucotte, G. and F. Dieterlen, *A European allele map of the C282Y mutation of hemochromatosis: Celtic versus Viking origin of the mutation?* Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2003. **31**(2): p. 262-267.
248. Field, C.J., I.R. Johnson, and P.D. Schley, *Nutrients and their role in host resistance to infection*. Journal of leukocyte biology, 2002. **71**(1): p. 16-32.
249. Weinberg, E.D., *Iron and infection*. Microbiol Rev, 1978. **42**(1): p. 45-66.
250. Montosi, G., et al., *Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis*. Blood, 2000. **96**(3): p. 1125-1129.
251. Wainwright, J., *Siderosis in the African*. S Afr J Lab Clin Med, 1957. **3**(1): p. 1-28.
252. Moalem, S., et al., *Epidemic pathogenic selection: an explanation for hereditary hemochromatosis?* Medical hypotheses, 2002. **59**(3): p. 325-329.
253. Moalem, S., E.D. Weinberg, and M.E. Percy, *Hemochromatosis and the enigma of misplaced iron: implications for infectious disease and survival*. Biometals : an

- international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, 2004. **17**(2): p. 135-139.
254. Gharagozloo, M. and A. Ghaderi, *Coincident natural selection of CCR5Δ32 and C282Y in Europe: to be or not to be?* Journal of genetics, 2005. **84**(1): p. 47-48.
 255. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5.* Nature, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
 256. Dorak, M.T., *HFE H63D variant and leukemia susceptibility.* Leukemia & lymphoma, 2006. **47**(11): p. 2269-2270.
 257. Muller, C.I., et al., *Do cancer cells selectively mutate HFE to increase their intracellular iron?* Oncol Rep, 2005. **14**(2): p. 299-303.
 258. Altés, A., et al., *Colorectal cancer and HFE gene mutations.* Haematologica, 1999. **84**(5): p. 479-480.
 259. Shaheen, N.J., et al., *Association between hemochromatosis (HFE) gene mutation carrier status and the risk of colon cancer.* Journal of the National Cancer Institute, 2003. **95**(2): p. 154-159.
 260. Kallianpur, A.R., et al., *Increased prevalence of the HFE C282Y hemochromatosis allele in women with breast cancer.* Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2004. **13**(2): p. 205-212.
 261. Shi, Z., et al., *Haemochromatosis HFE gene polymorphisms as potential modifiers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer risk and onset age.* International journal of cancer Journal international du cancer, 2009. **125**(1): p. 78-83.
 262. Agudo, A., et al., *Hemochromatosis (HFE) gene mutations and risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study.* Carcinogenesis, 2013. **34**(6): p. 1244-50.
 263. Gannon, P.O., et al., *Impact of hemochromatosis gene (HFE) mutations on epithelial ovarian cancer risk and prognosis.* Int J Cancer, 2011. **128**(10): p. 2326-34.
 264. Jin, F., L.-S. Qu, and X.-Z. Shen, *Association between C282Y and H63D mutations of the HFE gene with hepatocellular carcinoma in European populations: a meta-analysis.* Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2010. **29**(1): p. 18.
 265. Fargion, S., L. Valenti, and A.L. Fracanzani, *Hemochromatosis gene (HFE) mutations and cancer risk: Expanding the clinical manifestations of hereditary iron overload.* Hepatology (Baltimore, Md), 2010. **51**(4): p. 1119-1121.
 266. Osborne, N.J., et al., *HFE C282Y homozygotes are at increased risk of breast and colorectal cancer.* Hepatology (Baltimore, Md), 2009. **51**(4): p. 1311-1318.
 267. Boige, V., et al., *Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis.* Gut, 2003. **52**(8): p. 1178-1181.
 268. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
 269. Gannon, P.O., et al., *Impact of hemochromatosis gene (HFE) mutations on epithelial ovarian cancer risk and prognosis.* International journal of cancer Journal international du cancer, 2010.
 270. Asberg, A., et al., *Cancer risk in HFE C282Y homozygotes: results from the HUNT 2 study.* Scand J Gastroenterol, 2013. **48**(2): p. 189-95.

271. Weinberg, E.D., *The role of iron in cancer*. European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP), 1996. **5**(1): p. 19-36.
272. Haller, O., et al., *Role of non-conventional natural killer cells in resistance against syngeneic tumour cells in vivo*. Nature, 1977. **270**(5638): p. 609-11.
273. Hamerman, J.A., K. Ogasawara, and L.L. Lanier, *NK cells in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(1): p. 29-35.
274. Dorfman, J.R. and D.H. Raulet, *Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance*. Eur J Immunol, 1996. **26**(1): p. 151-5.
275. Petersen, J.L., C.R. Morris, and J.C. Solheim, *Virus evasion of MHC class I molecule presentation*. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950), 2003. **171**(9): p. 4473-4478.
276. Bubenik, J., *MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review)*. Int J Oncol, 2004. **25**(2): p. 487-91.
277. Lee, N., et al., *HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5199-204.
278. Anfossi, N., et al., *Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 331-42.
279. Stitt, J.T., *Passage of immunomodulators across the blood-brain barrier*. Yale J Biol Med, 1990. **63**(2): p. 121-31.
280. Niederkorn, J.Y., J.A. Shadduck, and J.W. Streilein, *Immunogenetic basis for immunologic privilege in the anterior chamber of the eye*. Immunogenetics, 1981. **13**(3): p. 227-36.
281. Pardridge, W.M., J.D. Connor, and I.L. Crawford, *Permeability changes in the blood-brain barrier: causes and consequences*. CRC Crit Rev Toxicol, 1975. **3**(2): p. 159-99.
282. Lang, K.S., et al., *Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2456-63.
283. Crispe, I.N., et al., *Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance*. Immunol Rev, 2006. **213**: p. 101-18.
284. Bertolino, P. and L.E. Holz, *Toll-like receptor-3 and the regulation of intrahepatic immunity: implications for interferon-alpha therapy*. Hepatology, 2007. **45**(1): p. 250-1.
285. Mura, C., et al., *Transcriptional regulation of the human HFE gene indicates high liver expression and erythropoiesis coregulation*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2004. **18**(15): p. 1922-1924.
286. Pollanen, P., et al., *Ontogeny of immunosuppressive activity, MHC antigens and leukocytes in the rat testis*. J Reprod Immunol, 1992. **21**(3): p. 257-74.
287. Martins, R., et al., *Differential HFE gene expression is regulated by alternative splicing in human tissues*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17542.
288. Martins, R., *Post-transcriptional regulation of HFE gene expression*. Ph.D Thesis, 2010.
289. Jeffrey, G.P., et al., *Alternate Splicing Produces a Soluble Form of the Hereditary Hemochromatosis Protein Hfe*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 1999. **25**: p. 61-67.

290. Ohnishi, K., et al., *Detection of soluble HFE associated with soluble transferrin receptor in human serum*. International journal of molecular medicine, 2011. **27**(3): p. 435-439.
291. Ristic, S., et al., *Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and multiple sclerosis*. Neurosci Lett, 2005. **383**(3): p. 301-4.
292. Bettencourt, A., et al., *Molecular genetic studies of multiple sclerosis in the portuguese population*. Acta médica portuguesa, 2012. **25**(4): p. 224-230.
293. Bettencourt, A., et al., *HFE gene polymorphisms and severity in Portuguese patients with multiple sclerosis*. Eur J Neurol, 2011. **18**(4): p. 663-6.
294. Schimanski, L.M., et al., *In vitro binding of HFE to the cation-independent mannose-6 phosphate receptor*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2009. **43**(2): p. 180-193.
295. Oates, A.J., et al., *The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **47**(3): p. 269-81.
296. DaCosta, S.A., L.M. Schumaker, and M.J. Ellis, *Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor, a bona fide tumor suppressor gene or just a promising candidate?* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(1): p. 85-94.
297. Braulke, T., *Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein*. Horm Metab Res, 1999. **31**(2-3): p. 242-6.
298. O'Brien, D.A., et al., *Mannose 6-phosphate receptors: potential mediators of germ cell-Sertoli cell interactions*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **637**: p. 327-39.
299. Kim, J.J., L.J. Olson, and N.M. Dahms, *Carbohydrate recognition by the mannose-6-phosphate receptors*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(5): p. 534-42.
300. Dahms, N.M., L.J. Olson, and J.J. Kim, *Strategies for carbohydrate recognition by the mannose 6-phosphate receptors*. Glycobiology, 2008. **18**(9): p. 664-78.
301. Maxfield, F.R. and T.E. McGraw, *Endocytic recycling*. Nature reviews Molecular cell biology, 2004. **5**(2): p. 121-132.
302. El-Shewy, H.M., et al., *The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26150-7.
303. English, L., et al., *Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection*. Nature Immunology, 2009. **10**(5): p. 480-487.
304. Reits, E.A., et al., *The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 774-778.
305. Wearsch, P.A. and P. Cresswell, *Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer*. Nature Immunology, 2007. **8**(8): p. 873-881.
306. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
307. Fortier, M.-H., et al., *The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome*. The Journal of experimental medicine, 2008. **205**(3): p. 595-610.
308. Hunt, D.F., et al., *Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry*. Science, 1992. **255**(5049): p. 1261-3.
309. Munro, S. and H. Pelham, *A C-Terminal Signal Prevents Secretion of Luminal ER Proteins*. Cell, 1987. **48**: p. 899-907.

310. Aridor, M., et al., *Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport*. The Journal of Cell Biology, 1995. **131**(4): p. 875-893.
311. Stephens, D.J., et al., *COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites*. Journal of cell science, 2000. **113** (Pt 12): p. 2177-2185.
312. Leclerc, D., et al., *Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells*. Journal of virology, 2007. **81**(3): p. 1319-1326.
313. Hanafi, L.-A., et al., *Two distinct chimeric potexviruses share antigenic cross-presentation properties of MHC class I epitopes*. Vaccine, 2010. **28**(34): p. 5617-5626.
314. Denis, J., et al., *Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization*. Virology, 2007. **363**(1): p. 59-68.
315. Lapointe, R., et al., *CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells*. Cancer Research, 2003. **63**(11): p. 2836-2843.
316. Clarke, S.R., et al., *Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(2): p. 110-7.
317. Kataoka, T. and T. Tokunaga, *Transplantable sarcomas induced by 3-methylcholanthrene in inbred guinea pigs of JY-1 and Hartley/F strains*. Gann, 1976. **67**(1): p. 25-31.
318. Le Gac, G., et al., *Homozygous deletion of HFE produces a phenotype similar to the HFE p.C282Y/p.C282Y genotype*. Blood, 2008. **112**(13): p. 5238-40.
319. Constantinescu, C.S., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1079-106.
320. Rubio, J.P., et al., *Extended haplotype analysis in the HLA complex reveals an increased frequency of the HFE-C282Y mutation in individuals with multiple sclerosis*. Hum Genet, 2004. **114**(6): p. 573-80.
321. Ferrara, J.L. and H.J. Deeg, *Graft-versus-host disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(10): p. 667-74.
322. Krensky, A.M., et al., *T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection*. N Engl J Med, 1990. **322**(8): p. 510-7.
323. Laham, N., et al., *Transferrin [corrected] receptor association and endosomal localization of soluble HFE are not sufficient for regulation of cellular iron homeostasis*. Journal of cellular biochemistry, 2004. **91**(6): p. 1130-1145.
324. Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian, *T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases*. Nature, 2004. **427**(6970): p. 154-159.
325. Vinay, D.S. and B.S. Kwon, *Role of 4-1BB in immune responses*. Seminars in immunology, 1998. **10**(6): p. 481-489.

6. Autorisations

6. Autorisations

-Figure 5 (p. 13)

Drakesmith, H. and A. Prentice, *Viral infection and iron metabolism*. Nature reviews Microbiology, 2008. 6(7): p. 541-552.

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Nature Publishing Group has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful.

Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below: <http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=0bf790c7-67c6-48c4-ae5b-75caf3b7044c>

Licensee: Alexandre Reuben

License Date: Jun 6, 2014

License Number: 3403100116535

Publication: Nature Reviews Microbiology

Title: Viral infection and iron metabolism

Type Of Use: reuse in a dissertation / thesis

-Manuscrit I (p. 51 à 93)

Reuben, A., et al., *The WT hemochromatosis protein HFE inhibits CD8 T-lymphocyte activation*. Eur J Immunol, 2014.

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. John Wiley and Sons has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful.

Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below: <http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=b42d9651-e129-4823-a244-6b7d19d11c37>

Licensee: Alexandre Reuben

License Date: Mar 27, 2014

License Number: 3357221160938

Publication: European Journal of Immunology

Title: The WT hemochromatosis protein HFE inhibits CD8 T-lymphocyte activation

Type Of Use: Dissertation/Thesis

-Figure 48 (p. 163)

Martins, R., et al., *Differential HFE gene expression is regulated by alternative splicing in human tissues*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17542.

Selon les règles du journal PLoS One, aucune permission requise.

