

Université de Montréal

La maladie de Parkinson est-elle une maladie auto-immune ?

À la recherche des acteurs moléculaires de la MitAP

Par

Mélanie Guérin

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître

en Biologie Moléculaire, option Biologie des Systèmes

Août 2019

© Mélanie Guérin, 2019

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

La maladie de Parkinson est-elle une maladie auto-immune ?

À la recherche des acteurs moléculaires de la MitAP

Présenté par

Mélanie Guérin

Michel Desjardins

Codirecteur

Pierre Thibault

Codirecteur

Résumé

Le dysfonctionnement mitochondrial est associé à de nombreuses maladies neurodégénératives. En effet, plusieurs protéines impliquées dans ces maladies, telles que les protéines PINK1 et Parkin dans la maladie de Parkinson, interviennent dans le recrutement de protéines nécessaires à l'homéostasie mitochondriale. En absence de ces protéines, un nouveau mécanisme se met en place : la formation de vésicules dérivées des mitochondries (MDVs). Notre équipe a démontré que ce mécanisme est responsable de la présentation antigénique mitochondriale (MitAP) et que les protéines PINK1 et Parkin ont un rôle répresseur sur cette voie et que cette nouvelle voie de présentation était capable d'activer des lymphocytes T CD8+ in vivo. Ces découvertes font entrer le système immunitaire comme nouvel acteur des maladies neurodégénératives. Cependant, les protéines impliquées dans MitAP restent à être identifiées. Deux projets ont été initiés afin de pouvoir mieux caractériser MitAP. La première a consisté à mettre au point un protocole d'isolation mitochondrial afin d'identifier de nouveaux partenaires moléculaires à la formation des MDVs au niveau des mitochondries. Le deuxième projet initie l'étude de l'immunopeptidome de cellules présentatrices d'antigène afin d'identifier les peptides mitochondriaux présentés à la surface des cellules. L'identification de protéines par l'isolation des mitochondries et celles générant les peptides mitochondriaux présentés à la surface des cellules sont essentielles pour comprendre le mécanisme des MDVs et le fonctionnement de la MitAP impliquée dans la maladie de Parkinson. Les protéines partenaires de cette voie moléculaire pourraient avoir un rôle dans les maladies neurodégénératives et être des cibles thérapeutiques ou des biomarqueurs.

Mots-clés : Maladie de Parkinson, Système immunitaire, Mitochondrie, Présentation antigénique mitochondriale, immunopeptidome.

Abstract

Mitochondrial dysfunction is associated with many neurodegenerative diseases. Indeed, several proteins involved in these diseases, such as PINK1 and Parkin proteins in Parkinson's disease, are involved in the protein recruitment required for mitochondrial homeostasis. In the absence of these proteins, a new mechanism is set up: the formation of vesicles derived from mitochondria (MDVs). Our team has demonstrated that this mechanism is responsible for the mitochondrial antigen presentation (MitAP) and that the PINK1 and Parkin proteins play a repressor role on this pathway and that this new presentation pathway is capable of activating CD8 + T cells in vivo. These discoveries bring the immune system as a new player in neurodegenerative diseases. However, the proteins involved in MitAP remain to be identified. Two projects have been initiated to better characterize MitAP. The first was to develop a mitochondrial isolation protocol to identify new molecular partners for MDV formation at the mitochondrial level. The second project initiates the study of the immunopeptidome of antigen presenting cells to identify the mitochondrial peptides presented on the cell surface. The identification of these proteins is essential to understand the mechanism of MDVs and the functioning of MitAP involved in Parkinson's disease. The protein partners of this molecular pathway may have a role in neurodegenerative diseases and may be therapeutic targets or biomarkers.

Keywords: Parkinson's Disease, Immune System, Mitochondria, Mitochondrial Antigen Presentation, Immunopeptidome.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des figures	8
Liste des sigles et abréviations	9
Remerciements	12
1 Introduction.....	14
1.1 Maladie de Parkinson.....	14
1.1.1 Description et Étiologie de la maladie de Parkinson	14
1.1.2 Modèle de « mort autonome » du neurone dopaminergique : les agrégats α -synucléines et la mitophagie par PINK1 et Parkin	16
1.1.3 Modèle de « mort non autonome » du neurone dopaminergique : Implication du système immunitaire.....	20
1.2 Le rôle de la présentation antigénique mitochondriale dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson	22
1.2.1 La présentation antigénique et l'autophagie.....	22
1.2.2 La présentation antigénique mitochondriale (MitAP)	23
1.2.3 Bases moléculaires de MitAP : les MDVs	25
1.2.4 Base cellulaire de MitAP et phénomène in vivo	27
2 Objectifs de recherches.....	30

2.1	Caractérisation moléculaire des MDVs.....	30
2.2	Identification de l'immuno-peptidome de la MitAP	33
3	Matériels et Méthodes.....	36
3.1	Modèle d'étude : cellules et induction de la formation des MDVs	36
3.1.1	Macrophage RAW	36
3.1.2	Culture primaire de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse	36
3.2	Isolation mitochondriale	36
3.2.1	Immunoisolation	36
3.2.2	Protocole de centrifugation successive	37
3.2.3	Protocole de Gradient de sucrose discontinu	37
3.2.4	Protocole d'isolation finale	37
3.3	Western Blot	38
3.4	Microscopie électronique	38
3.5	Test de Présentation antigénique	38
3.6	Conception de shRNA et Knockdown.....	39
3.7	BMDC (culture primaire)	40
3.8	FACS.....	40
3.9	Immuno-peptidome	40
3.9.1	Élution acide moyenne.....	40
3.9.2	Immunoisolation des CMH.....	41
3.10	Spectrométrie de Masse	41
4	Résultats	42
4.1	Caractérisation du mécanisme régulant la MitAP : les MDVs	42
4.1.1	Isolation de la mitochondrie	42

4.1.1.1	Protocole d'isolation des mitochondries.....	42
4.1.1.2	Vérification de la pureté des échantillons.....	43
4.1.2	Induction de MitAP.....	47
4.1.3	Réalisation des échantillons pour la spectrométrie de masse.....	49
4.1.4	Exemple de validation de protéine potentiellement impliquée dans MDVs et MitAP : le cas de DJ1.....	50
4.2	Identification des peptides mitochondriaux lors de la formation des MDVs.....	52
4.2.1	Technique d'isolation de l'immunopeptidome.....	52
4.2.2	Choix du modèle cellulaire.....	55
5	Discussion.....	57
6	Conclusion et Perspectives.....	62
	Références bibliographiques.....	64

Liste des figures

Figure 1. – Mécanisme de mitophagie.....	19
Figure 2. – Modèle cellulaire de MitAP dépendant des MDVs et régulé par PINK1 et Parkin(51)	27
Figure 3. – Comparaison du protéome mitochondrial lors de la formation des MDVs	31
Figure 4. – Stratégie de travail de l'identification des protéines impliquées dans la formation des MDVs	33
Figure 5. – Stratégie de travail de l'identification des peptides mitochondriaux présentés par les MDVs	35
Figure 6. – Test de présentation antigénique pour mesure MitAP.	39
Figure 7. – Optimisation de trois protocoles d'isolation des mitochondries.	43
Figure 8. – Vérification de la pureté par Western Blot des échantillons finaux issus des trois protocoles d'isolation des mitochondries.....	44
Figure 9. – Vérification de la morphologie des mitochondries par microscopie électronique des échantillons finaux issus des trois méthodes d'isolation des mitochondries.	45
Figure 10. – Protocole final d'isolation des mitochondries.....	46
Figure 11. – Études des stress pour l'induction de MitAP	48
Figure 12. – Vérification de la pureté des triplicas pour l'analyse par spectrométrie de masse.	50
Figure 13. – Étude de l'impact de DJ1 sur MitAP	52
Figure 14. – Stratégie d'isolation des peptides de CMH de classe I (adapté de Schumacher F. et al, 2017)	53
Figure 15. – Stratégies d'isolation des peptides de CMH de classe I	55
Figure 16. – Modèles cellulaires pour l'isolation des peptides de CMH de classe I.....	56

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APC : Cellules Présentatrices d'Antigène

ATP : Adénosine-TriphosPhate

CMH : Complexe Major d'Histocompatibilité

DAMP : partenaires moléculaires associés à un agent danger (Damage Associated Molecular Pattern)

DC : Cellules Dendritiques

EPEC : E. Coli EntéroPathogénique

gB : glycoprotéine B

HS : choc thermique (heat stress)

HSV : Virus de l'Herpès Simplex 1

iPSC : cellules souches pluripotentes induites

KO : Knock-Out

LPS : Lipopolysaccharide

MAE : Élution Acide Moyenne

MDVs : Vésicules Dérivées des Mitochondries

MitAP : Présentation Antigénique Mitochondriale

MPTP : 1-Méthyl-4-Phényl-1,2,3,6-TétrahydroPyridine

OGDH : 2-oxoglutarate déshydrogénase

PAMP : partenaires moléculaires associés à un agent pathogène (Pathogen Associated Molecular Pattern)

PNS : Surnageant post-nucléaire (Post-Nucleus Supernatant)

RNS : Agent réactif d'azote (Reactive Nitrogen Species)

ROS : Agent réactif d'oxygène (Reactive Oxygen Species)

TCL : Lyse cellulaire totale (Total Cell Lysis)

TH : Hydroxylase Tyrosine

WT : Type Sauvage (Wild Type)

À ma mère Monique, qui m'a appris à aller toujours plus loin.
À mon père Luc, qui a toujours été fier de moi.
À mon compagnon Noël, qui m'a encouragé à être qui je veux.

Remerciements

Je tiens à remercier Pierre THIBAUT et Michel DESJARDINS pour m'avoir permis d'effectuer cette maîtrise au sein de leurs laboratoires et leurs conseils chacun dans leur domaine d'expertise. Même si initialement j'ai commencé un doctorat et que je finis prématurément avec une maîtrise, mes années au sein de leurs laboratoires m'ont permis d'en apprendre beaucoup d'un point de vue professionnel notamment de nouvelles techniques, de nouvelles connaissances ainsi que sur la gestion de projet, mais également d'un point de vue personnel, par la gestion du stress, la communication et mon implication dans mon travail.

Je remercie également les membres de l'équipe de Pierre THIBAUT qui m'ont formée et ont partagé leur expertise en spectrométrie de masse notamment lors des réunions hebdomadaires. Je remercie en particulier Joël LANOIX pour le temps qu'il a consacré pour me former ainsi que pour son expertise sur l'isolation qui a été très importante dans les deux projets.

Je tiens également à témoigner ma reconnaissance aux personnes suivantes qui ont été présentes à des moments différents de mon parcours au sein du laboratoire de Michel DESJARDINS :

Diana MATHEOUD, qui m'a transmis ses connaissances aux débuts de ce projet et m'a formée sur les techniques de base du laboratoire. Je la remercie d'avoir continué à me conseiller et à répondre à mes questions tout au long de mon parcours, même après son départ ;

Ahmed FAHMI, qui m'a formée à de nouvelles techniques lors de son arrivée au laboratoire. Ce fut très intéressant et enrichissant de discuter sur les recherches du laboratoire avec lui;

Annie LAPLANTE, pour son aide au laboratoire, sa gentillesse et nos discussions le midi ;

Christiane RONDEAU, pour son accueil au laboratoire et pour m'avoir transmis son expertise pour réaliser les échantillons pour la microscopie électronique ;

Je remercie également le personnel du département de Pathologie pour leur gentillesse et leur aide. Je tiens à remercier particulièrement Diane GINGRAS pour sa formation à l'utilisation du microscope électronique, pour tous ses conseils et nos discussions.

Je remercie également Roger LIPPE ainsi que les membres du laboratoire que j'ai côtoyé durant ces trois années ; notamment Hugo, Mayerline, Élisabeth, Bitia, Kendra, Mackenzie, Catherine et Johanne avec qui nous avons pu discuter de nos travaux au laboratoire et qui ont participé à la bonne ambiance au jour le jour au sein du bureau étudiant.

Je remercie également mes amis, Audrey, Thomas, Rébecca, Jack et Mélanie, étudiants au sein de l'IRIC, pour leurs écoutes attentives et leurs conseils ; ainsi que Julie MONTOVANI, responsable des affaires académiques de l'IRIC, pour les réponses à mes questions lors de mon transfert de doctorat en maîtrise.

Je remercie également mon compagnon Noël, qui m'a soutenue chaque jour et qui m'a écoutée et conseillée afin de gérer au mieux l'équilibre entre mon travail et ma vie. Je remercie aussi Françoise qui a pris de son temps pour la correction orthographique de mon mémoire. Enfin, je remercie mon père et le reste de ma famille qui, malgré la distance, m'ont soutenue dans mes choix et m'ont énormément encouragée.

1 Introduction

1.1 Maladie de Parkinson

1.1.1 Description et Étiologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson a été présentée d'un point de vue médical pour la première fois par James Parkinson en 1817(1). Appuyés 50 ans plus tard par les observations de Charcot, les symptômes principalement décrits ont été les tremblements, la rigidité des membres ainsi que la lenteur et l'imprécision des mouvements (2). Par la suite, d'autres symptômes, notamment non moteurs comme les troubles cognitifs et les problèmes psychologiques, ont été ajoutés pour décrire la maladie (3). Avec une prévalence de 0,3 % de la population totale dans les pays industrialisés, la maladie touche majoritairement des personnes de plus de 60 ans (4).

Classée en tant que maladie neurodégénérative, comme la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson est causée par la mort spécifique des neurones dopaminergiques présents dans la substance noire du cerveau. Ce sont ces neurones qui sont responsables de la transmission des informations du cerveau aux muscles afin de permettre les mouvements. La diffusion de ces informations est permise par la synthèse et le relâchement de dopamine par les neurones.

Même si aujourd'hui la maladie de Parkinson est très connue, la cause de la dégénérescence des neurones dopaminergiques reste encore à être élucidée. L'identification de facteurs associés au déclenchement de la maladie a permis de mieux comprendre la cause de cette mort cellulaire. Un des facteurs les plus forts est l'âge des patients. La maladie est assez rare avant l'âge de 50 ans. Dans une étude menée par Alves et collab. en 2009, seulement 3 % des patients d'une cohorte de 265 patients sont âgés de moins de 50 ans (5). L'âge moyen d'apparition de la maladie a été rapporté vers 70 ans (6). L'ensemble des études montre que l'âge a un fort impact sur le déclenchement de la maladie et que le vieillissement biologique participerait à la mort des neurones (7). La perte en cellule dans le système nerveux central est de 7 % par décennie au cours de la vie normale (7). Cependant, cette perte de cellules n'est pas

suffisante pour induire la maladie puisque la grande majorité de la population ne développe jamais cette pathologie malgré ce vieillissement du cerveau. L'âge ne peut donc pas à lui seul induire la dégénérescence neuronale (8).

Un autre élément qui a été identifié comme étant impliqué dans la maladie de Parkinson est les facteurs environnementaux (4). Par exemple, en 1982, une intoxication par un composé chimique, le 1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine (MPTP), présent dans l'héroïne de synthèse utilisée par des toxicomanes hospitalisés en urgence en Californie, a entraîné l'apparition de symptômes associés à la maladie de Parkinson (9). Un autre élément qui a permis de faire progresser la compréhension de la maladie est l'identification de mutations génétiques au sein de la population parkinsonienne.

Même si la majorité des cas de la maladie sont sporadiques (non-associés à une mutation connue), de 10 à 15 % des patients souffrant de la maladie de Parkinson possèdent des antécédents familiaux et ont des mutations génétiques qui se transmettent entre générations. Les différentes mutations génétiques identifiées chez les patients parkinsoniens sont des indices sur les voies impliquées dans la pathologie. La plupart de ces mutations ont lieu sur des gènes autosomiques et peuvent être de deux types: dominants ou récessifs (9). Les mutations dominantes peuvent être présentes sur un seul allèle d'un gène et avoir un impact sur l'expression de la protéine malgré la présence d'un allèle intacte. À l'inverse, la mutation doit être présente sur les deux allèles d'un gène pour interférer avec l'expression de la protéine ; il s'agit alors d'une mutation récessive.

Les mutations dominantes impliquées dans la maladie sont retrouvées sur une dizaine de gènes. La première des mutations à être identifiée et associée à la maladie est sur le gène SNCA qui code pour l' α -synucléine (10). Une autre mutation touche le gène codant pour une kinase enrichie en leucine, LRRK2, impliquée notamment dans le trafic membranaire, l'autophagie, la morphologie des synapses et la croissance des neurites (11). Cette mutation est l'une des plus prévalentes chez les patients parkinsoniens (12). Les autres mutations sont localisées sur des gènes qui codent pour les protéines PARK3, UCHL1, GIGYF2, HTRA2, VPS35, EIF4G1, TMEM230, CHCHD2 et RIC3 qui ont des fonctions diverses dans la cellule (9).

Les mutations récessives se retrouvent sur neuf gènes et induisent l'apparition de la maladie de façon plus précoce que les mutations dominantes (13). Quatre protéines codées par ces gènes, Parkin, PINK1, DJ-1 et VPS13C, sont impliquées dans l'homéostasie et la fonction de la mitochondrie. Les autres gènes codent pour les protéines ATP13a2, PLA2G6, FBOXJ, DnaJ et SYNJ1 qui sont impliquées dans l'endocytose et la dégradation des protéines (9).

1.1.2 Modèle de « mort autonome » du neurone dopaminergique : les agrégats α -synucléines et la mitophagie par PINK1 et Parkin

L'identification de l'ensemble de ces mutations a permis de mettre en évidence des mécanismes cellulaires altérés chez les patients parkinsoniens qui pourraient être la cause de la mort des neurones dopaminergiques. Ces mécanismes suggèrent que la mort cellulaire est causée par des anomalies directement associées aux neurones dopaminergiques touchés. Ce modèle est dit de « mort autonome » du neurone dopaminergique.

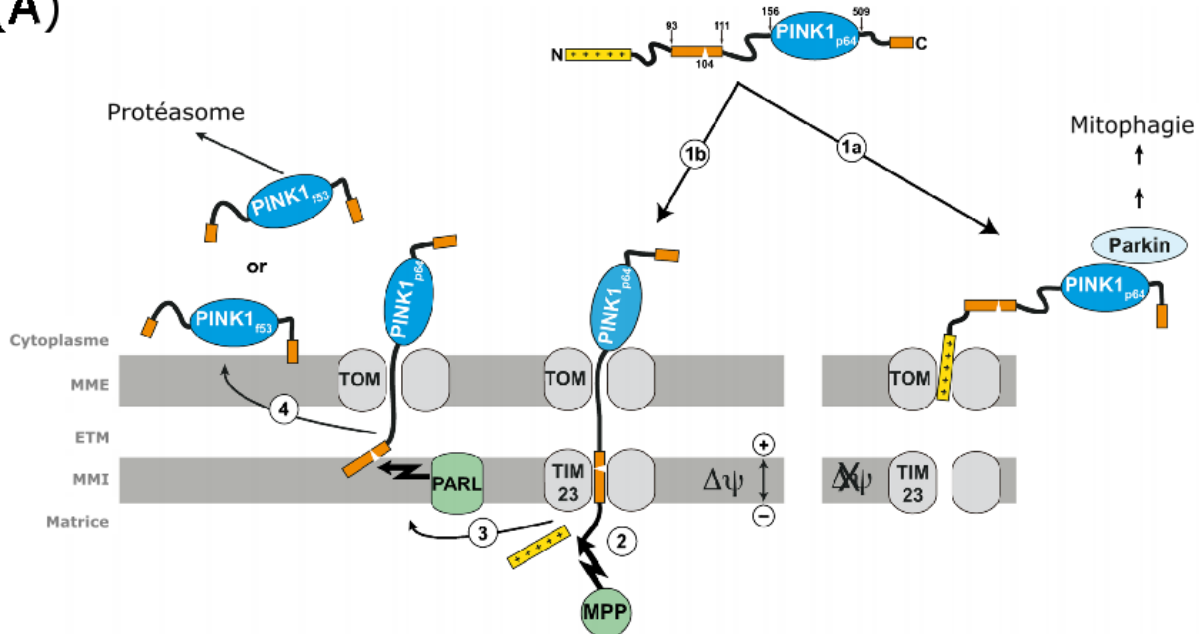
L'un des premiers éléments identifiés qui soutiennent ce modèle de « mort autonome » est la présence de corps de Lewy dans les cellules de patients parkinsoniens (10,14). Les corps de Lewy sont causés par l'accumulation dans le cytoplasme de l' α -synucléine qui s'oligomère dû à des mutations sur le gène SNCA (15). Au total, six mutations différentes (p. A53T, p. A30P, p. E46K, p. H50Q, p. G51D et p. A53E) ainsi que des multiplications du locus sur le gène SNCA ont été identifiées chez les patients parkinsoniens (16). Ces modifications entraînent l'augmentation du niveau d'expression ou de synthèse de l' α -synucléine sous une forme insoluble (10,16). L'accumulation des corps de Lewy inhiberait la transmission synaptique entre les neurones (17). D'autres études mettent en évidence l'effet neurotoxique de ces agrégats, suggérant que l'accumulation de corps de Lewy induirait directement la mort des neurones (18).

Un autre processus envisagé pour expliquer les mécanismes moléculaires responsables de la dégénérescence neuronale lors de la maladie de Parkinson est basé sur le rôle des protéines PINK1 et Parkin lors de la mitophagie (19,20). La mitophagie est le mécanisme par lequel les cellules recyclent et dégradent les mitochondries endommagées et non fonctionnelles. C'est donc une forme sélective d'autophagie qui permet d'éviter un stress cellulaire associé à l'accumulation de mitochondries défectueuses. Les neurones

dopaminergiques utilisent de grandes quantités d'ATP pour leur fonctionnement et sollicitent donc beaucoup la mitochondrie qui synthétise cette molécule. Ceci pourrait conduire à l'accumulation de mitochondries endommagées. La mitophagie, initiée par la tyrosine sérine kinase PINK1 et la ligase E3 Parkin, va permettre d'éliminer ces mitochondries.

Dans une mitochondrie saine, PINK1 est transloqué de la membrane externe à la membrane interne par des complexes protéiques TOM et TIM. Par la suite, la protéine PINK1 est dégradée constitutivement par des protéases telles que MMP et PARL. Dans les mitochondries stressées ou endommagées, la translocation de PINK1 est interrompue par le blocage du transporteur TIM. Ainsi PINK1 reste dans la membrane externe et interagit avec le complexe TOM (*Figure 1*). PINK1 possède une activité sérine thréonine kinase qui va phosphoryler Parkin cytoplasmique sur la sérine 65, ce qui induit son recrutement à la mitochondrie. Parkin, possédant une activité E3 liguase, va ubiquitiner différentes protéines cibles mitochondriales (19,20). Ces modifications post-traductionnelles permettent le recrutement de protéines adaptatrices et de la protéine autophagique LC3 au niveau de la mitochondrie. L'arrivée de ces protéines entraîne la formation d'une membrane qui isole la mitochondrie endommagée et forme ainsi un autophagosome. L'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome ce qui induit la dégradation de son contenu par les enzymes lysosomales (21).

(A)



(B)

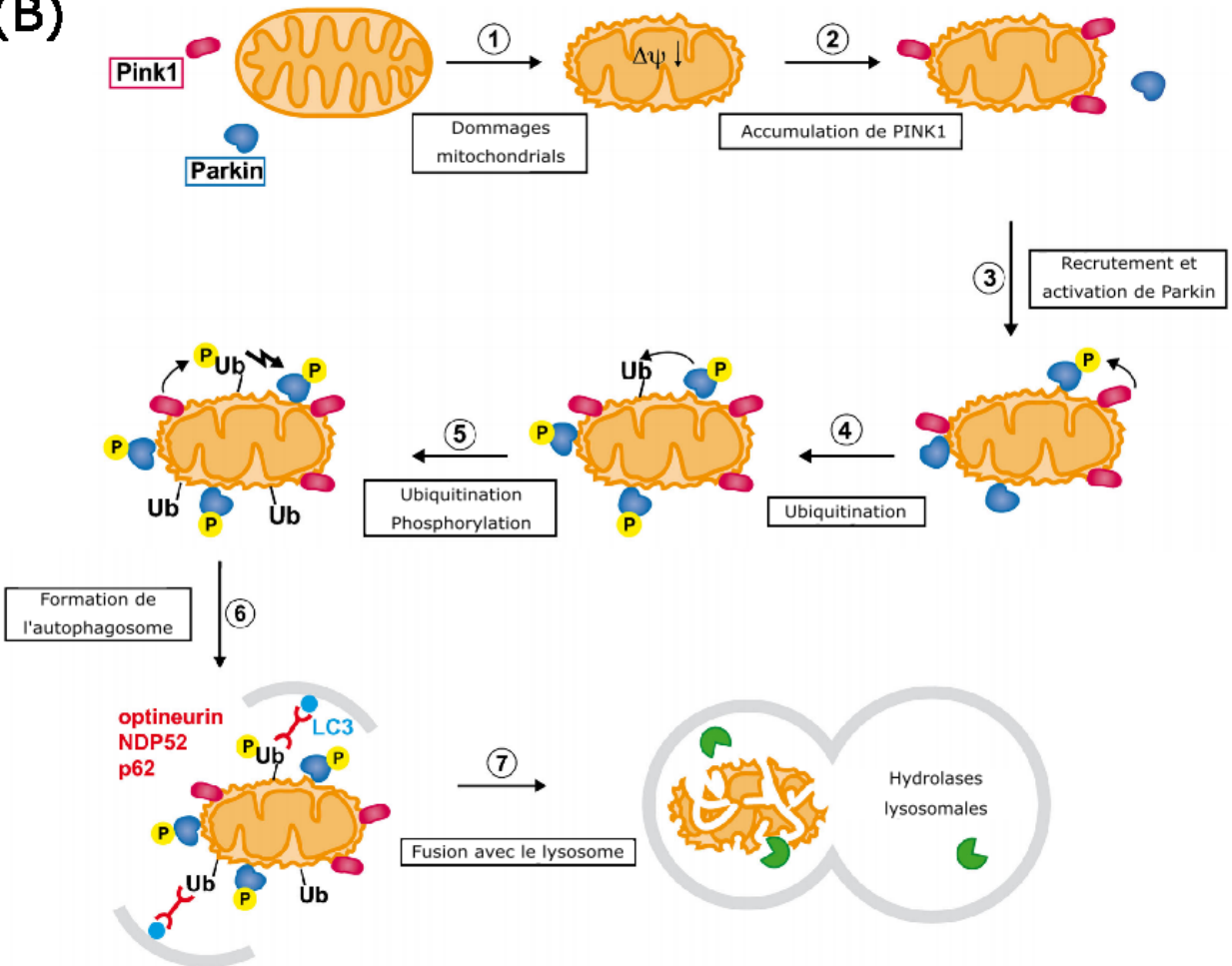


Figure 1. – Mécanisme de mitophagie

Figure adaptée de Rüb C. et collab., 2016(21)

(A) Mécanisme de recrutement de PINK1 à la mitochondrie : PINK1 est continuellement ciblé vers la mitochondrie. Dans une mitochondrie saine [1 b] avec la présence d'un potentiel d'action ($\Delta\psi$), PINK1 est transloqué par le complexe TOM/TIM [2] puis dégradé constitutivement par les protéases MPP et PARL [3] pour ensuite être éliminé par le protéasome ou être maintenu à la mitochondrie sous forme inactive [4]. Dans une mitochondrie endommagée [1a] avec l'absence d'un potentiel d'action, PINK1 est maintenue à la membrane externe (MME) dans le complexe TOM et permet le recrutement de Parkin actif au niveau de la mitochondrie et la mise en place de la mitophagie.

(B) Déroulement de la formation de la mitophagie : Lorsqu'une mitochondrie est endommagée [1], PINK1 est accumulé à la membrane externe mitochondriale [2] et permet le recrutement et l'activation de Parkin [3]. Va suivre une série d'ubiquitination et de phosphorylation de certaines protéines mitochondriales [4 et 5] qui permet le recrutement de protéines adaptatrices (en rouge) et de LC3 [6]. Cela entraîne la création d'une membrane d'isolement et la formation d'un autophagosome [6] qui fusionne ensuite avec le lysosome afin de dégrader le contenu autosomale par des hydrolases lysosomales [7].

PINK1 et Parkin sont des éléments clés du mécanisme moléculaire de la mitophagie. Il est donc proposé qu'en l'absence de l'une ou l'autre de ces protéines, l'inhibition de la mitophagie mène à l'accumulation de mitochondries non fonctionnelles et toxiques dans les neurones dopaminergiques. La toxicité est induite notamment par l'accumulation d'ADN mitochondrial mutée et le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, provoquant une augmentation du stress oxydatif mitochondrial par la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS pour reactive oxygen species). Cette toxicité entraînerait la mort des neurones dopaminergiques chez les patients parkinsoniens (20) Fait à noter, les souris Parkin et PINK1-KO sont viables et ne présentent pas de symptômes de la maladie de Parkinson (22). Ceci suggère que la présence de mutations dans PINK1 et Parkin ne suffit pas à déclencher la maladie et à induire la mort des neurones dopaminergiques. D'autres éléments doivent donc être impliqués en parallèle de ces mutations dans le déclenchement de la pathologie.

1.1.3 Modèle de « mort non autonome » du neurone dopaminergique : Implication du système immunitaire

En opposition aux mécanismes dits de « mort autonome », d'autres données tendent à démontrer que la mort des neurones serait « non-autonome ». Cela signifie que des éléments extérieurs aux neurones jouent un rôle dans la mort de ces cellules chez les patients parkinsoniens. Le modèle le plus connu et envisagé est l'implication du système immunitaire dans la dégénérescence neuronale.

En effet, de nombreux processus immunologiques se produisent au sein du cerveau. Par exemple, les cellules gliales de la microglie, qui forment l'environnement cellulaire autour des neurones dans le cerveau (23), ont une fonction similaire aux macrophages. Ces cellules, grâce à leurs nombreux récepteurs, dont les récepteurs Toll-like, vont être activées par la reconnaissance de partenaires moléculaires associés à un agent pathogène (Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP) ou associés au danger (Damage-Associated Molecular Pattern, DAMP) (24). Une fois activées, ces cellules prolifèrent, changent de morphologie et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (25,26). La microglie participe ainsi directement à l'établissement de la neuroinflammation qui a pour but principal de protéger le cerveau des blessures ou des infections (27,28).

Dans le contexte de la maladie de Parkinson, une neuroinflammation chronique a été observée chez de nombreux patients principalement due à une activation importante de la microglie (29). En plus des pathogènes, il s'est avéré que les agrégats d' α -synucléines et le vieillissement augmentaient de façon importante l'activation de la microglie (30). De plus, un lien entre LRRK2 et l'augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par la microglie renforce l'idée de son implication dans la pathologie (24). Cette suractivation de la microglie provoquerait un état inflammatoire exacerbé néfaste pour le cerveau (27). Finalement, l'activation de la microglie entraîne l'expression des ROS et les espèces réactives d'azote (RNS pour reactive nitrogen species) qui peuvent aussi être délétères pour le cerveau (25).

Les cellules immunitaires au sein du cerveau ne sont pas les seuls éléments immunitaires dérégulés dans la maladie de Parkinson. Le système immunitaire adaptatif en périphérie est différent chez les patients parkinsoniens, car le profil leucocytaire est affecté. Les leucocytes sont notamment constitués des lymphocytes T qui sont les cellules principales de la défense de l'organisme contre l'infection virale et l'élimination de cellules infectées. Les deux principaux types de lymphocytes T sont les T auxiliaires qui sont CD4+, et les T cytotoxiques qui sont CD8+. Le ratio de lymphocytes T CD4+ et CD8+ est différent chez les patients parkinsoniens (31). De plus, des infiltrations lymphocytaires CD4+ et CD8+ ont été observées sur des sites de lésions neuronales chez la souris (25,31). La protection par la déplétion en lymphocytes T et B chez des souris avec une dégénérescence neuronale induite par la toxine MPTP ainsi que l'infiltration dans le cerveau de lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans un modèle murin traité au MPTP et chez des patients parkinsoniens (32) suggèrent que les lymphocytes jouent un rôle dans la maladie de Parkinson (33). Plus récemment, Sommer et collab. ont démontré que des lymphocytes Th17, lymphocytes T CD4+ spécialisés dans la production d'IL17, étaient en mesure de tuer des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) provenant de patients atteints de la maladie de Parkinson et que la proportion de Th17 est importante chez les patients parkinsoniens comparés aux patients sains (34). Ces faits sont corrélés par l'impact de la présence de lymphocytes T régulateurs dans un modèle parkinsonien. En effet, les lymphocytes T régulateurs sont des cellules qui peuvent diminuer l'activité des lymphocytes T. Leur transfert adoptif dans un modèle murin traité au MPTP et donc leur capacité à inhiber les lymphocytes T, induit un effet protecteur sur les neurones dopaminergiques de ces souris (35).

En plus de la réponse adaptative par les lymphocytes, la réponse humorale semble également être impliquée dans la maladie. Le taux d'immunoglobulines spécifiques à des auto-antigènes est plus élevé dans le sang périphérique et le liquide céphalo-rachidien des patients parkinsoniens (36). Au fil des années, de nombreux auto-anticorps ont été identifiés tels que des anticorps dirigés contre la mélanine, l' α -synucléine et la ganglioside GM1 (37,38). L'injection d'anticorps IgG dérivés de patients parkinsoniens chez des rats adultes induit une diminution importante des neurones positifs à la tyrosine hydroxylase (TH), c'est-à-dire les

neurones dopaminergiques, sans affecter les neurones positifs à la choline acétyltransférase, qui sont les neurones cholinergiques (39). L'injection de ces anticorps a également un effet inflammatoire au sein du cerveau. Vu les fluctuations importantes du système immunitaire et l'identification de ces auto-anticorps, l'idée que le système immunitaire contribue activement à la maladie de Parkinson est une piste de plus en plus intéressante pour comprendre l'induction de la dégénérescence neuronale.

1.2 Le rôle de la présentation antigénique mitochondriale dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson

Ces dernières années, le laboratoire du Dr Desjardins a étudié l'implication de l'autophagie dans la présentation antigénique, notamment avec la présentation de peptides viraux via l'autophagie de la membrane nucléaire (40). Cette découverte ainsi que l'implication de l'autophagie dans l'établissement de la tolérance immunitaire (41) montrent que l'autophagie peut participer au processus de la présentation d'antigènes. La mitophagie étant un phénomène d'autophagie au niveau de la mitochondrie, le laboratoire du Dr Desjardins a cherché à savoir si la mitophagie pouvait avoir un rôle inducteur dans la présentation antigénique mitochondriale (MitAP pour Mitochondrial antigenic presentation). L'implication de la mitophagie dans ce processus de présentation antigénique mettrait en évidence un nouveau lien entre la maladie de Parkinson et le système immunitaire.

1.2.1 La présentation antigénique et l'autophagie

Le système immunitaire inné est une voie de défense de l'organisme qui permet de distinguer les cellules « saines » des cellules aberrantes, dues à une infection virale ou lors de processus pathologiques comme le cancer. La détection des cellules aberrantes est permise par la présentation de peptides sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité à la surface cellulaire. Ces peptides sont issus d'un ensemble de protéines provenant de la cellule et ils informent le système immunitaire de l'état de « santé » de la cellule et induisent son élimination si nécessaire. Deux grandes voies de présentation ont été caractérisées. Les peptides provenant de protéines endogènes, incluant les protéines virales exprimées lors

d'infections, sont présentés sur des molécules du CMH de classe I (41). Leur reconnaissance mène à l'activation de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les peptides provenant de protéines exogènes, internalisées par endocytose et phagocytose, sont présentés sur des CMH de classe II. La présentation de ces peptides active des lymphocytes T CD4+ qui épaulent la production d'anticorps par les lymphocytes B (41). Depuis la caractérisation de ces voies de présentations dites « classiques », il a été montré que des peptides de protéines exogènes présentes dans les endosomes et phagosomes peuvent être présentés sur des CMH de classe I par une voie dite de présentation croisée (42). De même, des peptides issus de protéines endogènes peuvent être présentés sur des CMH de classe II. C'est le cas, par exemple, pour des protéines capturées par autophagie, transférées vers la voie lysosomale via la fusion autophagosome-lysosome (43). Ainsi, les peptides issus des protéines présentes dans la voie de dégradation endolysosomale peuvent être présentés sur des CMH I et II.

La contribution des diverses voies de capture de protéines par autophagie dans la présentation antigénique est encore mal définie. Dans le but d'étudier ce processus, nous avons développé un système où la glycoprotéine B (gB) du virus Herpes simplex I est exprimée dans divers organites de la cellule RAW 264.7 (une lignée cellulaire de type macrophage), incluant le cytoplasme, la membrane nucléaire et la mitochondrie. Pour ce faire, nous avons modifié la séquence ADN originale, qui code pour la gB exprimée au niveau de la membrane nucléaire, en tronquant la partie transmembranaire pour exprimer la protéine dans le cytoplasme ou en la remplaçant par une séquence d'adressage vers la matrice de la mitochondrie. Ceci a permis l'utilisation d'un hybridome de cellule T CD8+ spécifique pour le peptide SSIEFARL de la gB présenté sur les CMH I, pour mesurer les niveaux de présentation de ce marqueur mitochondrial dans diverses conditions de stress cellulaire. Ce système a permis de montrer que l'autophagie promeut la présentation antigénique de la gB exprimée au niveau de la membrane nucléaire (40).

1.2.2 La présentation antigénique mitochondriale (MitAP)

L'implication de l'autophagie dans la présentation antigénique de protéines issues de la membrane nucléaire a encouragé l'équipe à étudier l'application de l'autophagie dans la

présentation peptide issue de protéines provenant d'autres organites telles que la mitochondrie. En effet, les protéines mitochondriales peuvent se retrouver présentées à la surface des cellules et cet évènement est connu pour être pathogénique. MitAP est impliquée dans la cirrhose biliaire primitive (44) une maladie auto-immune qui touche le foie, causée entre autre par la présentation de peptides de la 2-oxoglutarate déshydrogénase (OGDH), une enzyme mitochondriale qui participe au cycle de Krebs (45). Malgré cela, peu de choses sur ce mécanisme de présentation sont connues d'un point de vue moléculaire. L'hypothèse de départ est que la mitophagie favorise la dégradation et présentation des protéines mitochondriales. Pour cela, le système avec la gB localisée dans la matrice mitochondriale a été utilisé.

De façon surprenante, il a été observé que l'inhibition de la mitophagie par un traitement à la 3-méthyladénine et/ou par l'inhibition d'une protéine impliquée dans l'autophagie, la protéine ATG5, entraîne une augmentation de la présentation de la gB mitochondriale. Cette présentation est effectuée de façon indépendante à la fragmentation mitochondriale, car l'inhibition de DRP1, protéine impliquée dans la fragmentation mitochondriale, n'affecte pas MitAP. Ces premières informations semblent montrer que la mitophagie ne favorise pas la présentation antigénique mitochondriale.

Ces observations ont été corrélées avec l'étude des protéines PINK1 et Parkin dans le même système cellulaire. L'inhibition de la protéine PINK1 qui entraîne l'augmentation de la présentation de gB mitochondriale. Le niveau de Parkin étant assez faible dans les cellules RAW, l'expérience inverse avec une surexpression de la protéine a été réalisée et a induit une diminution forte de la présentation de gB mitochondriale. Ces dernières expériences impliquent que la mitophagie notamment par le rôle de PINK1 et Parkin a un rôle régulateur négatif sur MitAP. Sachant que les mutations des gènes codant pour les protéines PINK1 et Parkin entraînent une perte de fonction de ces protéines chez les patients parkinsoniens (46), leurs absences induiraient l'augmentation de MitAP et donc peut-être l'implication de cette voie de présentation dans la maladie de Parkinson.

1.2.3 Bases moléculaires de MitAP : les MDVs

Un traitement à la bafilomycine, un inhibiteur de la pompe à protons vacuolaires, entraîne une diminution de MitAP dans les cellules RAW 264.7, indiquant que cette voie de présentation s'effectue via les endosomes et/ou lysosomes. Or, si la mitophagie n'est pas impliquée dans MitAP, par quelle voie les protéines mitochondriales sont-elles apprêtées et présentées ? En plus de la mitophagie, la mitochondrie possède une seconde voie de contrôle de qualité pour diriger les protéines endommagées vers les lysosomes. Cette voie découverte par Soubannier et collab. en 2012, implique la formation de petites vésicules (MDVs, pour Mitochondria-derived vesicles) constituées d'une simple ou double membrane d'un diamètre allant de 80 à 150 nm, qui se forment au niveau des mitochondries indépendamment de DRP1 (47). La formation des MDVs permet de sélectionner une cargaison de protéines afin de la transporter vers les endosomes tardifs/lysosomes pour être dégradées. Ce processus est amplifié par l'oxydation des protéines mitochondriales lors de la génération de réactifs dérivés de l'oxygène (ROS) au sein de la mitochondrie (48).

L'implication des MDVs dans MitAP a pu être observée dans le système cellulaire exprimant la gB au niveau de la mitochondrie. L'induction de MitAP a entraîné la formation de MDVs au niveau de la mitochondrie qui a pu être observée par microscopie électronique et une étude par immunofluorescence a permis de montrer un changement de localisation de gB. En effet, des protéines gB se sont délocalisées de la mitochondrie ainsi qu'une proximité de gB au lysosome lors de l'induction de MitAP qui indique que la gB mitochondriale a été transportée de la mitochondrie au lysosome potentiellement par les MDVs. Pour fortifier cette hypothèse, des protéines souvent impliquées dans la formation et la fusion de vésicules avec d'autres compartiments, les petites GTPases, ont été testées pour voir leur rôle dans la délocalisation de gB et l'induction de MitAP. Il s'est avéré que la petite GTPase Rab9 est essentielle pour la délocalisation de gB des mitochondries et donc de la formation des MDVs. À l'inverse, l'inhibition de la petite GTPase Rab7 n'empêche pas la formation des MDVs, mais entraîne une accumulation de gB dans le cytoplasme. Cela indique que Rab7 est important dans la fusion des MDVs avec les lysosomes. En plus de ces deux protéines, la protéine Sorting Nexin 9 (Snx9) a également été testée. Snx9 est connue pour avoir un rôle dans la formation de vésicules lors de

l'endocytose clathrine-dépendante et le trafic membranaire intracellulaire (49) ainsi que pour avoir un impact sur la morphologie mitochondriale (50). Tout comme Rab9, l'inhibition de Snx9 a bloqué la délocalisation de gB et MitAP ce qui induit qu'au même titre que Rab9, Snx9 participe à la formation des MDVs.

Ayant identifié un mécanisme moléculaire et des protéines impliquées dans MitAP, l'équipe a cherché si la fonction répresseur de MitAP des protéines PINK1 et Parkin est permise par une action des deux protéines sur la voie de formation des MDVs. Il s'est avéré que la surexpression de Parkin dans les cellules bloque le recrutement de Snx9 à la mitochondrie et entraîne sa dégradation dépendant du protéasome. Grâce à l'utilisation de mutant pour l'activité kinase de Parkin, il a été déterminé que c'est sa fonction de kinase qui permet à Parkin d'éliminer Snx9 et donc d'inhiber la formation des MDVs et de MitAP.

Toutes ces informations ont permis de mettre au point un modèle cellulaire de MitAP (*Figure 2*). Dans le cas de cellules normales spécialisées dans la présentation antigénique (APC pour antigenic presentation cell) telles que les macrophages RAW, un stress cellulaire va induire le recrutement des protéines PINK1 et Parkin au niveau de la mitochondrie et ainsi induire la mitophagie pour éliminer les mitochondries endommagées par ce stress. Dans le cas où les APC possèdent un faible niveau de PINK1 et Parkin qui serait similaire aux mutations, qui induisent la perte de fonction de PINK1 et Parkin, retrouvées chez certains patients parkinsoniens, le stress cellulaire va induire le recrutement et le maintien de Snx9 et Rab9 à la surface des mitochondries. Ainsi, des MDVs se sont formées et ont transporté des protéines mitochondriales jusqu'au lysosome/endosome tardif pour qu'elles soient dégradées. Cette dégradation va générer des peptides mitochondriaux qui vont être présentés sur des MHC de classe I. Ces peptides seront reconnus par des lymphocytes T CD8+ et induiront leur activation. Ces lymphocytes T activés, en se déplaçant dans l'organisme, vont pouvoir s'infiltrer dans le cerveau. Cette infiltration provoquera la rencontre des lymphocytes T activés et des neurones. Si des neurones présentent également des peptides mitochondriaux dus à un stress, les lymphocytes vont tuer ces cellules. Ce modèle cellulaire implique l'idée que la maladie de Parkinson serait une maladie auto-immune.

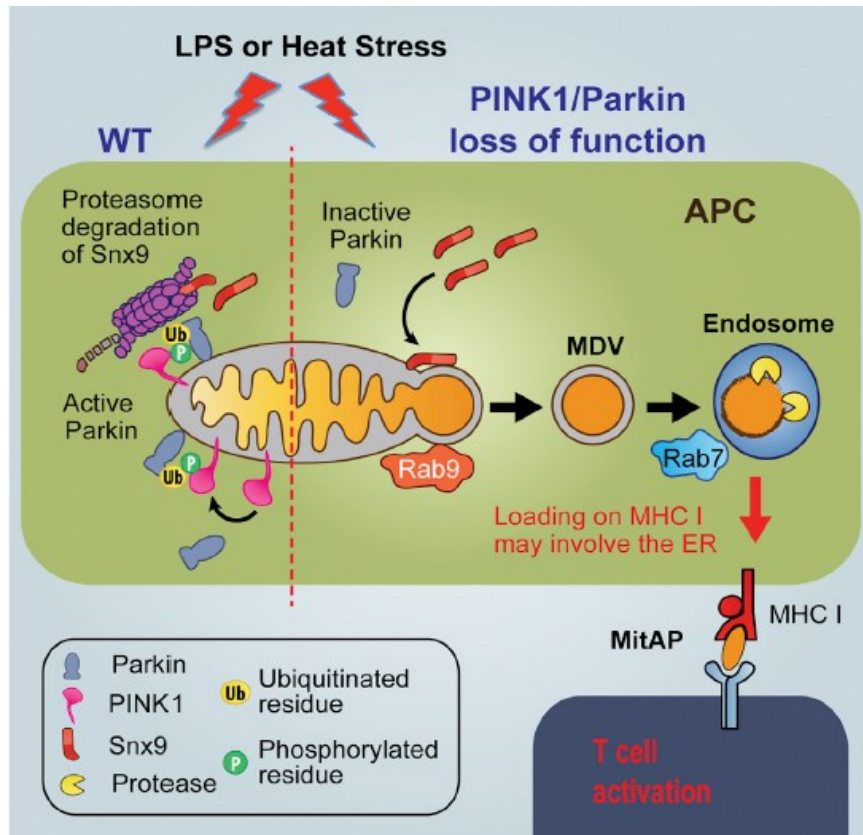


Figure 2. – Modèle cellulaire de MitAP dépendant des MDVs et régulé par PINK1 et Parkin(51)

Schéma récapitulatif de l'élimination des protéines endommagées mitochondriales suite à un stress (liposaccharide [LPS] ou choc thermique [HS]) dans une cellule présentatrice d'antigène (APC). En condition normale (WT), PINK1 et Parkin sont recrutés aux mitochondries et permettent la mitophagie. En l'absence de ces protéines (PINK1/Parkin loss of function), les MDVs sont formées de façon dépendante de Snx9 et Rab9 et vont fusionner avec les endosomes de façon Rab7 dépendante. Cela entraîne la présentation de peptides mitochondriaux sur le CMHI et ces peptides peuvent activer des lymphocytes T.

1.2.4 Base cellulaire de MitAP et phénomène in vivo

Ce modèle cellulaire doit être confirmé et très récemment de nouveaux éléments ont été découverts par l'équipe qui renforce la validité de ce modèle (52). Tout d'abord, un nouveau stress a été identifié comme inducteur de MitAP dépendant des MDVs : l'infection par des bactéries Gram négatives telles que l'E. coli entéropathogénique (EPEC). En effet le traitement

des cellules avec EPEC a entraîné une augmentation de MitAP qui est inhibée en absence de Snx9 ou avec la surexpression de Parkin. Ce stress entraîne exactement les mêmes phénomènes cellulaires que les conditions où les MDVs ont été identifiées comme participant à MitAP.

L'identification de ce stress bactérien a permis par la suite d'effectuer des expériences in vivo pour valider le modèle cellulaire, car il s'agit de bactéries qui entraînent de l'inflammation intestinale et elles sont donc un stress plus physiologique que l'injection de LPS. Dans l'idée de vérifier que MitAP a bien lieu in vivo, des souris WT et n'exprimant pas PINK1 (PINK1 KO) ont été infectées par la bactérie Gram-négative *Citrobacter rodentium*, similaire à l'infection par l'EPEC dans le modèle cellulaire, ou non. Seules les souris PINK1 KO infectées possèdent des cellules dendritiques qui présentent des peptides mitochondriaux antigéniques ainsi que des lymphocytes T CD8+ spécifiques à la protéine mitochondriale OGDH. En parallèle, des tests de motricités ont été effectués sur des souris WT et PINK1 KO infectées ou non afin de déterminer s'il y avait apparition de troubles moteurs associés à la maladie de Parkinson. Chez les souris PINK1 KO infectées, le temps total de déplacement, la distance totale parcourue ainsi que les épisodes de mouvements verticaux sont réduites. La motricité des souris est plus faible chez les souris PINK1 KO que chez les souris WT et cette perte de motricité a été associée à une perte de dopamine. La perte de motricité a été contrée par l'injection d'un précurseur de la dopamine, L-DOPA, ce qui permet aux souris PINK1 KO de retrouver une motricité similaire aux souris WT. Cela prouve que les souris PINK1 KO infectées ont bien eu une perte de dopamine.

Des analyses des cerveaux des souris ont été faites par la suite afin d'observer la morphologie des neurones dopaminergiques grâce à un marquage du TH par immunofluorescence. Le nombre de neurones dopaminergiques dans le cerveau est la même dans les différentes conditions, mais les terminaisons axonales ont diminué chez les souris PINK1 KO infectées. Tous ces phénotypes sont réversibles plusieurs mois après l'arrêt des infections chez les souris. Cela indique qu'il y a une étape de dégradation des axones dopaminergiques avant la mort des neurones. La présence de cette étape avant la mort des neurones offre de nouvelles perspectives pour empêcher le développement de la maladie avant la perte définitive des neurones dopaminergiques.

En plus des cerveaux, le système immunitaire de ces souris a été étudié chez ces souris pour déterminer si la maladie de Parkinson serait une maladie auto-immune. Pour cela, l'infiltration des lymphocytes T dans le cerveau et leur capacité à reconnaître des antigènes mitochondriaux a été examinée in vivo. Une infiltration des lymphocytes T dans le cerveau a été observée au sein des souris WT et des souris PINK1 infectées au *C. rodentium*. Ce résultat peut être expliqué par le fait que *C. rodentium* est connue pour avoir un impact sur le microbiome, or le microbiome interagit avec le système nerveux central notamment au niveau de la barrière hématoencéphalique (53). Ainsi, que PINK1 soit présent ou non, il semble que l'infection bactérienne permet l'infiltration des cellules T dans le cerveau. PINK1 va avoir un rôle pour favoriser à l'établissement de lymphocytes T CD8+ spécifique aux antigènes mitochondriaux comme nous le montre l'augmentation de lymphocytes T CD8+ spécifique à la détection d'OGDH dans les souris PINK1 KO infectées. En plus de ces lymphocytes T CD8+ spécifiques à des antigènes mitochondriaux, les neurones provenant des souris PINK1 KO possèdent à leur surface des peptides OGDH et la présence de ce peptide est capable d'entraîner leur mort par des lymphocytes T CD8+ spécifiques à OGDH. De plus, la mort induite par les lymphocytes ne touche que les neurones dopaminergiques qui sont TH positif.

L'ensemble de ces travaux soulignent l'existence d'une population de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques apte à reconnaître des peptides mitochondriaux, comme ceux dérivés de l'OGDH. Ces lymphocytes T CD8+ vont reconnaître et attaquer les neurones présentant des peptides mitochondriaux chez des souris PINK1 KO infectées. En plus de renforcer le modèle cellulaire RAW 264.7 proposé précédemment (51), ces découvertes appuient l'hypothèse que la maladie de Parkinson est causée par des phénomènes auto-immuns comme la présentation de peptide du soi et la reconnaissance de ces peptides par les lymphocytes T. La mort des neurones par les lymphocytes T identifiés dans la dernière étude du laboratoire (52) est en accord avec les autres phénomènes observés, tels que les infiltrations de lymphocytes T CD8+ dans le cerveau des patients (35) et l'effet protecteur des lymphocytes T régulateurs dans la pathologie (32). Cependant, même si d'autres types de lymphocytes sont connus pour cibler et tuer les neurones dopaminergiques comme les lymphocytes T CD4+ TH17 (34), il n'est pas encore établi que leur action soit due à la reconnaissance de peptides mitochondriaux.

2 Objectifs de recherches

Toutes ces recherches impliquent de MitAP dans l'établissement de la maladie de Parkinson par l'activation du système immunitaire qui va cibler les neurones dopaminergiques. Néanmoins, le mécanisme moléculaire est encore peu décrit et seuls les peptides issus de l'OGDH sont identifiés comme peptides mitochondriaux induisant l'activation du système immunitaire dans un modèle de Parkinson. De plus, il n'existe aucun lien entre le phénomène de MitAP et les autres éléments identifiés dans la pathologie, comme les agrégats d' α synucléines ou les autres protéines mutées telles que LRRK2. Une corrélation entre ces anomalies cellulaires associées à la maladie de Parkinson avec MitAP permettrait de confirmer le lien entre MitAP et la maladie de Parkinson.

Pour déterminer si les anomalies cellulaires associées à la maladie de Parkinson serait liées à MitAP, nous avons émis l'hypothèse qu'il existe d'autres protéines essentielles à la voie MitAP impliquées dans le développement de la maladie de Parkinson. Ces protéines peuvent être aussi bien des partenaires moléculaires impliqués dans la formation des MDVs, que des protéines fournissant des peptides mitochondriaux présentés à la surface des cellules qui seraient par la suite reconnus par des lymphocytes. L'identification de ces protéines et peptides est essentielle à la compréhension des mécanismes auto-immuns potentiellement impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson. Pour tester l'hypothèse que des protéines de la voie MitAP sont impliquées dans le développement de la maladie de Parkinson, l'identification des molécules participant à MitAP est importante. Pour identifier ces molécules, nous avons défini deux objectifs : [1] la caractérisation moléculaire des MDVs et [2] l'identification de l'immuno-peptidome mitochondrial en absence de PINK1 et/ou Parkin.

2.1 Caractérisation moléculaire des MDVs

Comme mentionné précédemment, le processus de MitAP reste encore peu connu au niveau des protéines impliquées dans ce mécanisme. Les MDVs induisant MitAP, l'identification des acteurs de MitAP va être effectué principalement en caractérisant les protéines participant à la formation des MDVs. Cette caractérisation peut être faite par l'identification ses protéines

composantes et des partenaires moléculaires des MDVs. Ayant très peu d'information sur la composition des MDVs et ne pouvant les différencier des vésicules issues des autres organites de la cellule lors d'une isolation par gradient, l'identification des composants des MDVs ne semble pas envisageable pour le moment. En ce qui concerne la biogenèse des MDVs, il est possible de définir trois étapes clés dans le processus des MDVs : [1] la formation des MDVs au niveau de la mitochondrie [2] le transport des MDVs des mitochondries aux endosomes puis [3] la fusion des MDVs avec les endosomes. Les mitochondries étant des éléments clés dans la pathologie de Parkinson, j'ai décidé de commencer par identifier les partenaires moléculaires impliqués lors de la formation des MDVs au niveau des mitochondries.

La stratégie consiste à comparer le protéome de mitochondrie en absence et en présence de la formation des de MDVs. En comparant qualitativement et quantitativement les protéines de ces deux protéomes, il sera possible de définir trois profils protéiques. Le premier profil possible serait que les protéines ne changent pas entre les conditions et cela indiquerait que ces protéines n'auraient pas de rôle dans ce processus. Si les protéines sont régulées positivement, il s'agirait de protéines qui pourraient favoriser la formation des MDVs. À l'inverse, les protéines régulées négativement pourraient être des protéines qui inhibent la formation des MDVs ou qui se retrouveraient dans les MDVs une fois séparées des mitochondries (*Figure 3*).

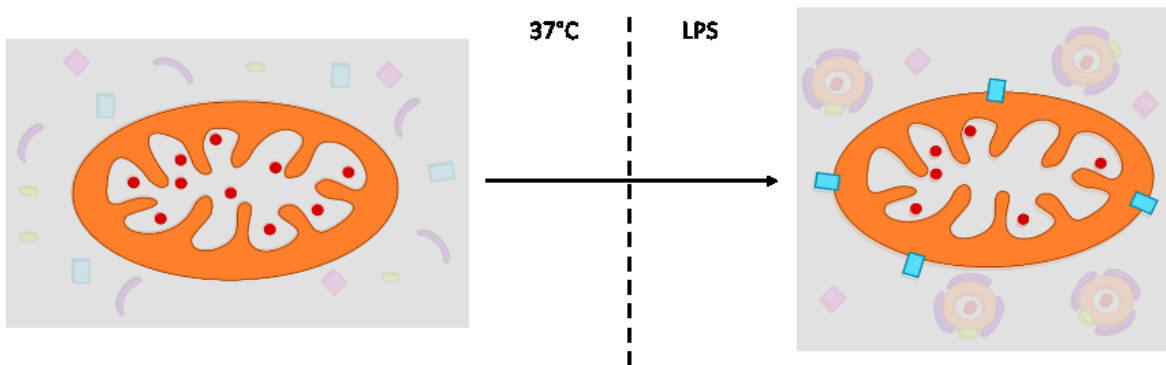


Figure 3. – Comparaison du protéome mitochondrial lors de la formation des MDVs

Illustration de changements de la composition protéiques des mitochondries avant (37 °C) et après (LPS) la formation des MDVs . La formation des MDVs pourrait entraîner le recrutement de protéines au niveau de la mitochondrie nécessaire à leur formation, ou alors l'élimination de

protéines qui pourraient être soit des régulateurs négatifs de la formation des MDVs soit présente dans le cargo des MDVs.

Afin de réaliser cette étude, une stratégie de travail en trois parties a été définie : [1] l'isolation des mitochondries, [2] l'analyse par spectrométrie de masse et l'identification des protéines potentiellement impliquées dans la formation des MDVs, pour finir avec [3] la vérification et la validation du rôle de ces protéines dans MitAP (*Figure 4*). Pour l'isolation des mitochondries, nous voulons optimiser un protocole permettant de récupérer des mitochondries des macrophages RAW 264.7 possédant la gB au niveau des mitochondries, soit le même modèle cellulaire qui a permis d'identifier MitAP (51). En particulier, nous cherchons à augmenter l'enrichissement mitochondrial en éliminant les contaminants issus d'autres organites. La pureté et de l'enrichissement des échantillons seront vérifiés par Western Blot et par microscopie électronique. Par la suite, il sera possible de réaliser des échantillons de mitochondries avec des cellules traitées ou non pour induire la formation des MDVs. Ces échantillons seront digérés et injectés dans un spectromètre de masse Orbitrap Q-Exactive HF afin de pouvoir identifier et quantifier les protéines présentes dans ces échantillons grâce à une base de données de souris (Uniprot). La comparaison va permettre de déterminer les variations pour chaque protéine et déterminer les protéines qui auraient potentiellement un rôle dans la formation des MDVs. La dernière étape va consister à vérifier, toujours dans le modèle des macrophages RAW, si ces protéines sont impliquées dans la formation des MDVs et dans MitAP. Pour cela, des tests de présentation antigénique des peptides mitochondriaux et l'observation des MDVs par immunofluorescences seront effectuées après déplétion des protéines par ARN-sh.

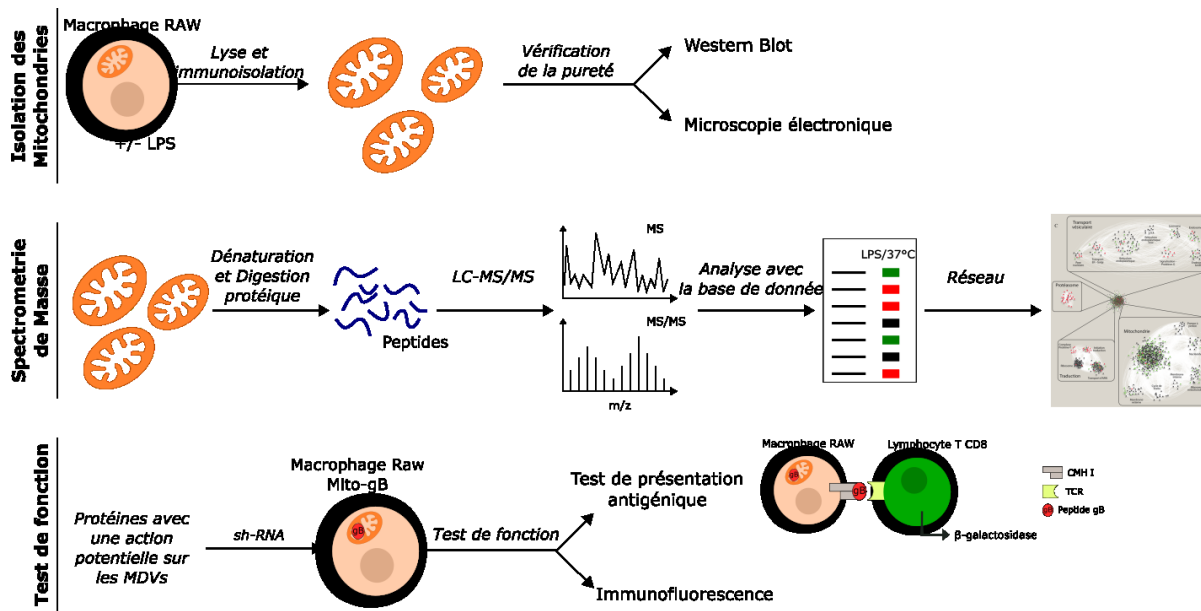


Figure 4. – Stratégie de travail de l'identification des protéines impliquées dans la formation des MDVs

Mon travail est divisé en trois parties. La première consiste à optimiser l'isolation des mitochondries afin d'obtenir des échantillons enrichis en mitochondries avec le moins de contaminants pour ensuite passer à la deuxième partie qui va consister à analyser ces échantillons par spectrométrie de masse. Les protéines identifiées dans cette analyse qui pourraient avoir un rôle dans la formation des MDVs sont vérifiées avec la troisième étape pour s'assurer de la fonction spécifique de la protéine dans son mécanisme.

2.2 Identification de l'immunopeptidome de la MitAP

Récemment, la détection d'auto-anticorps chez les patients parkinsoniens (37,38) et la découverte du lien entre MitAP et la maladie de Parkinson associent cette dernière à une maladie auto-immune. Cependant, seul OGDH a été identifié comme peptide endogène mitochondrial capable d'être présenté sur les neurones et reconnu par des lymphocytes T spécifiques. L'identification d'autres peptides mitochondriaux permettrait mieux caractériser la maladie de Parkinson comme une maladie auto-immune. Au plus long terme, il serait peut-être possible de développer une nouvelle stratégie thérapeutique en ciblant avec des tétramères de CMH de classe I (54) présentant des peptides mitochondriaux, la totalité de la population T spécifique aux antigènes mitochondriaux.

Depuis quelques années, l'étude des peptides antigénique associée à des maladies impliquant le système immunitaire s'est intensifiée grâce au développement de la spectrométrie de masse (55). En effet, de nombreuses études ont analysé par spectrométrie de masse les peptides présentés à la surface de cellules dans le cas de pathologie comme le cancer (56). Même si des peptides mitochondriaux tels que le peptide issu d'OGDH pour la PBC sont connus (45), d'autres peptides mitochondriaux pourraient se retrouver présentés à la surface des cellules en absence de PINK1 et Parkin et pourraient être des peptides plus spécifiques de la maladie de Parkinson. Pour pouvoir identifier ces peptides mitochondriaux dans notre modèle, une comparaison de l'immunopeptidome en absence et en présence de la formation des MDVs par spectrométrie de masse pourra être faite. Ainsi, il sera possible d'identifier les peptides qui sont nouvellement présentés par la formation des MDVs et donc de MitAP.

Pour cet objectif, ma stratégie de travail se divise en trois parties : [1] l'optimisation de l'isolation des peptides du CMH de classe I, [2] l'analyse par spectrométrie de masse de l'immunopeptidome et [3] la confirmation de la présentation des peptides mitochondriaux identifiés dépendants de la formation des MDVs (*Figure 5*). Une bonne isolation des peptides du CMHI est très importante pour pouvoir détecter un maximum de peptides. Cela nécessite d'avoir une quantité suffisante de matériel et le moins de contaminants possible. Pour cela, il est nécessaire d'optimiser le protocole d'isolation des peptides et de définir la quantité de cellules à utiliser pour avoir le plus de peptides possibles. Une fois que le protocole d'isolation sera défini, l'isolation des CMH I sera effectuée sur des cellules formant ou non des MDVs, et les peptides récupérés sur ces CMH I seront injectés dans le spectromètre de masse. En comparant les immunopeptidomes et en utilisant une base de données de protéines mitochondriales, il sera possible d'identifier les peptides mitochondriaux présentés à la surface des cellules suite à la formation des MDVs. La dernière partie consistera à vérifier que ces peptides se retrouvent bien présentés à la surface des cellules, que leur présentation est spécifique à la formation des MDVs et qu'ils permettent d'induire l'activation de lymphocytes T CD8+. Pour cela, il sera possible d'utiliser des lymphocytes de souris modélisant la maladie de Parkinson, telles que les souris PINK1 KO infectées plusieurs fois par la bactérie *C. rodentium*, et de déterminer si les lymphocytes de ces souris peuvent être activés par un peptide synthétique identifié dans la

seconde partie. De plus, il serait intéressant de voir par immunofluorescence si ces protéines se retrouvent bien dans les MDVs comme les gB.

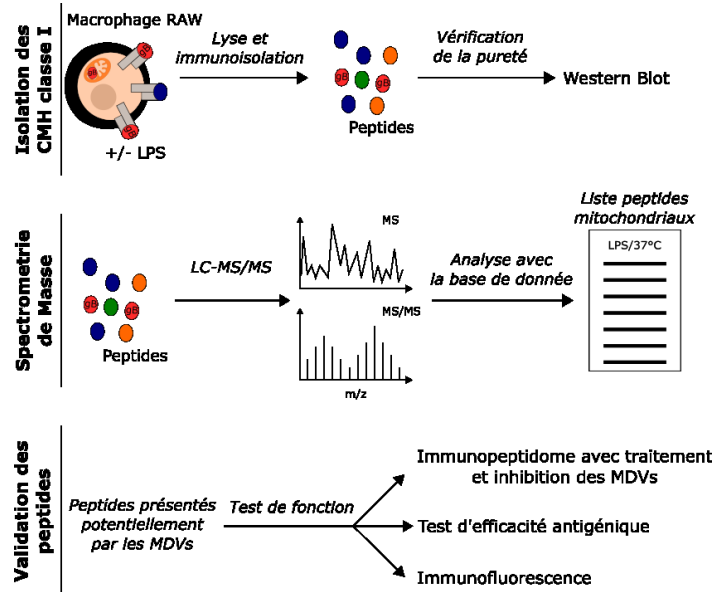


Figure 5. – Stratégie de travail de l'identification des peptides mitochondriaux présentés par les MDVs

Cette stratégie est divisée en trois parties : [1] l'isolation des peptides du CMH de classe I suivie de [2] l'analyse des peptides par spectrométrie de masse. Ensuite, les peptides identifiés seront [3] vérifiés de leur pouvoir antigénique ainsi que leur origine dépendant des MDVs.

3 Matériels et Méthodes

3.1 Modèle d'étude : cellules et induction de la formation des MDVs

3.1.1 Macrophage RAW

Les cellules utilisées sont issues d'une lignée cellulaire murine de macrophage RAW 264.7 qui ont été transfectées pour exprimer la glycoprotéine B (gB) du virus de l'herpès simplex 1 (HSV) localisé dans la matrice mitochondriale. La croissance de ces cellules se fait dans le milieu DMEM avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline à 100 unités/mL à 37 °C et 5 % CO₂.

3.1.2 Culture primaire de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse

Cette culture primaire a été faite à partir de la moelle osseuse du tibia et du fémur de souris BALB/c. Les globules rouges de la moelle osseuse ont été éliminés avec du ACK pendant 5 min puis les cellules restantes ont été mises en culture dans du milieu DMEM avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline à 100 unités/mL et 5 % de GM-CSF à 37 °C et 5 % CO₂ pendant huit jours.

3.2 Isolation mitochondriale

L'ensemble des approches testées ont été réalisées avec 200 millions de macrophages RAW. Les échantillons prélevés et finaux des différents protocoles ont été resuspendus dans une solution de Leamml et conservé à -20 °C pour le Western Blot ou fixés dans de la glutaraldehyde 0,5 % CaCo 0.1M à 4 °C pour la microscopie électronique.

3.2.1 Immunoisolation

Les mitochondries ont été purifiées par l'utilisation du kit d'isolation de Mitochondrie de la compagnie Miltenyi Biotec. Les cellules ont été lysées dans 1 mL de la solution du kit, complétées à 10 mL avec la solution de séparation du kit puis ont été centrifugées 15 min à 1500 rpm. Le surnageant a été récupéré et 50 µL de l'anticorps anti-Tomm 22 couplé à des billes magnétiques ont été ajoutées et mis 1 h à 4 °C sous agitation. Par la suite, la solution a été passée sur une colonne magnétique nettoyée par la solution de séparation avant et après la solution contenant les mitochondries. La colonne est ensuite démagnétisée et les mitochondries

sont récupérées dans 1 mL de solution de séparation. Les mitochondries sont centrifugées 5 min à 13 500 rpm et se retrouvent en culot.

3.2.2 Protocole de centrifugation successive

La lyse des cellules a été réalisée par une cavitation au nitrogène à 300 psi pendant 5 min dans un buffer 10 mM Tris, 250 mM Sucrose, pH 7.4. L'échantillon a ensuite subi une centrifugation de 3 min à 1300 g. Le surnageant a été conservé et une seconde centrifugation a été faite pendant 10 min à 10 000 g. seuls le culot a été conservé comme échantillon final.

3.2.3 Protocole de Gradient de sucrose discontinu

La réalisation de protocole consiste tout d'abord à traiter les échantillons avec le protocole de centrifugation successive. Le culot final est ensuite mélangé avec du sucrose 2 M. Un gradient de sucrose discontinu est réalisé avec les niveaux suivants : 0.5M, 1M, 1.5M, 1.7M et l'échantillon aux 2 M de sucrose. Le gradient a subi une ultracentrifugation à 100 000 g toute une nuit. L'interface entre 1,5 et 1,7 M a été récupéré, resuspendu dans un buffer 10 mM Tris, 250 mM Sucrose puis centrifugé 10 min à 17 000 g. Le culot a été à nouveau resuspendu dans un buffer 10 mM Tris, 250 mM Sucrose et centrifugé 10 min à 7 000 g. Le culot de cette dernière centrifugation correspond à l'échantillon final de mitochondries.

3.2.4 Protocole d'isolation finale

Les cellules ont été lysées pendant 30 min dans le buffer 10 mM Tris, 250 mM Sucrose, pH 7.4. L'échantillon a ensuite subi une centrifugation de 3 min à 1300 g. Le surnageant a été conservé et une seconde centrifugation a été faite pendant 10 min à 10 000 g. Le culot de cette dernière centrifugation a été resuspendu dans le buffer 10 mM Tris, 250 mM Sucrose, pH 7.4, 50 µL de l'anticorps anti-Tomm 22 couplé à des billes magnétiques ont été ajoutées et mis 1 h à 4 °C sous agitation. Par la suite, l'échantillon a été passé sur une colonne magnétique nettoyée par le même buffer avant et après l'échantillon contenant les mitochondries. La colonne est ensuite démagnétisée et les mitochondries sont récupérées dans 1 mL du même buffer. Les mitochondries sont centrifugées 5 min à 13 500 rpm et se retrouvent en culot.

3.3 Western Blot

La solution de Leammli est constituée de 60 mM de Tris-Cl, 2 % de SDS, 10 % de glycérol, 5 % de β -mercaptoéthanol et 0,01 % de bleu de bromophénol. Les protéines ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 4-15 % de BioRad et transférées par Western Blot sur des membranes Hybond-ECL de GE Healthcare. Les anticorps ont été dilués au 1/1000 et proviennent de différents fournisseurs : anti-HPS 60 de chez Cell Signaling, anti-Tomm 20 de chez Abcam, anti-Lamp1 de chez DSHB, anti-BiP et anti-GM130 de chez BD. Les anticorps secondaires utilisés anti-lapin, anti-souris et anti-rat sous couplés au HRP et proviennent de chez Jackson Immunoresearch. L'immunodétection a été réalisée par chimiluminescence (GE Healthcare) et analysée par le Chemidoc de Biorad.

3.4 Microscopie électronique

Les échantillons pour la microscopie électronique ont été fixés au moins 24 h dans de la glutaraldehyde 0,5 % CaCo 0.1M à 4 °C. Après lavage au CaCo 1M, les échantillons sont colorés avec OsO₄ 1 % CaCo 0.1M Ferricyanide 1,5 % pendant une 1 h à 4 °C. Ils ont ensuite été lavés au CaCo 1 M puis incubés dans de l'uranyle acétate 2 % maléate 0.125M pendant une nuit à 4 °C sous agitation. Le lendemain, ils ont été lavés avec du maléate-NaOH 0.05M pH 6 avant de subir une déshydratation des incubations successives de 70 %, 90 % et 100 % d'éthanol. Puis les échantillons ont été enrobés dans l'épon (Luft J., 1961). Pour finir les échantillons ont été coupés à l'aide d'un microtome Reichert ultracut et placés sur des grilles de nickel nues. Les échantillons ont été observés sur un microscope électronique à transmission Philips CM100 et des images des observations ont été prises avec un appareil photo numérique à dispositif à couplage de charge AMT XR80.

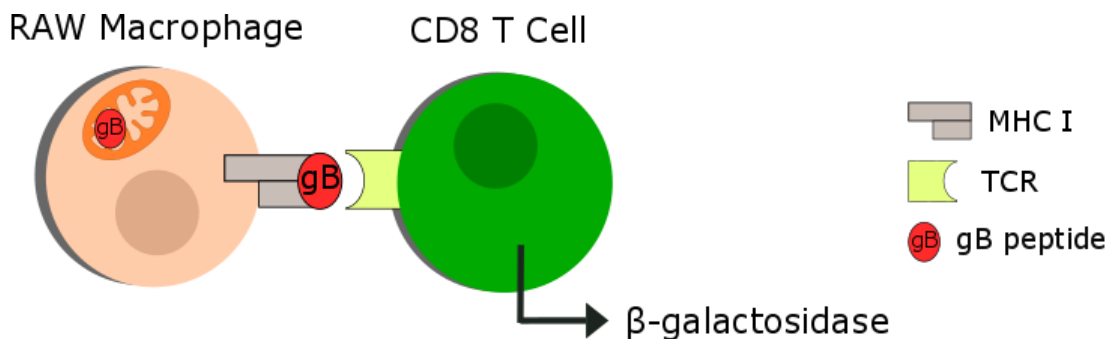
3.5 Test de Présentation antigénique

Le test (Figure 6) est réalisé avec 2x10⁵ des macrophages RAW 264.7 exprimant la glycoprotéine gB de glycoprotéine B (gB) du virus l'Herpès simplex I localisée spécifique dans la mitochondrie. Les cellules sont cultivées et traitées ou non soit par un choc thermique (HS) de 42 °C dans un bain-marie pendant 45 min et remis à 37 °C soit par l'ajout de 1 ng/uL de liposaccharide (LPS) à

37 °C. 8 h après le début du traitement, les cellules sont fixées avec 1 % de PFA pendant 10 min à RT et lavées plusieurs fois avec du milieu RPMI complété avec 10 % de FBS et 0,1 M de glycine. Enfin, l'hybridome 2E2 est ajouté pendant 16 h et l'activité de la β -galactosidase générée est mesurée à 595 nm après l'ajout du substrat CPRG. L'hybridome utilisé est le 2E2 qui possède un gène rapporteur β -galactosidase qui sera exprimé uniquement si le TCR de l'hybridome reconnaît la protéine gB présentée sur un CMH-I (fourni par F. Carbone Université de Melbourne). Cet hybridome est cultivé dans du milieu RPMI-1640 complété avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline à 100 unité/mL. En parallèle, pour chaque condition testée, des cellules RAW sont incubées avec l'hybridome 2E2 ainsi que le peptide synthétique SSIEFARL qui correspond à une séquence de la protéine gB. Cette étape permet de contrôler la capacité de l'hybridome à reconnaître le peptide gB et à s'activer ainsi que vérifier que les cellules RAW sont capables de présenter le peptide gB à l'hybridome.

Figure 6. – Test de présentation antigénique pour mesure MitAP.

Lignée macrophage murin RAW 264.7 qui exprime au niveau mitochondrial la protéine



glycoprotéine B (gB). Suite à un stress, des peptides de gB se retrouvent présentés sur une molécule histocompatibilité de classe I (MHC-I). Ce peptide sera reconnu spécifiquement par le récepteur TCR d'un hybridome T CD8+ qui va être activé. L'activation de l'hybridome est couplée à un gène rapport de la β galactosidase qui pourra être mesurée par la suite pour mesurer la MitAP(51).

3.6 Conception de shRNA et Knockdown

Le shARN spécifique à DJ1 (sh-DJ1) et son contrôle non ciblés (sh-Scr DJ1) ont été conçus à partir des séquences du site Web Sigma-Aldrich MISSION-RNA. Des oligonucléotides avant et arrières en épingle à cheveux ont été clonés dans un vecteur pLKO.1-TRC1.5 modifié, dans lequel le gène

de résistance à la puromycine a été remplacé par mAmétrine. Des particules lentivirales ont été préparées en cotransfectant des cellules HEK293T avec le vecteur pLKO-mAM contenant shRNA avec pMD2-VSVG, pMDLg/pREE et pRSV-REV. Les surnageants viraux ont été utilisés pour la transduction et les cellules ont été triées par fluorescence à la mététrine. La validation du knockdown a été effectuée par des analyses de qPCR et de Western blot en temps réel.

3.7 BMDC (culture primaire)

La culture primaire de cellule dendritique a été réalisée à partir de la récupération de la moelle osseuse de tibias et fémurs de 6 souris par échantillons. Après élimination des globules rouges par traitement ACK de 5 min, les cellules sont mises en culture dans DMEM avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline à 100 unités/mL à 37 °C et 5 % CO₂ avec 5 % de GM-CSF pendant 8 jours.

3.8 FACS

Le marquage des cellules a été réalisé avec un anticorps anti-CD11C couplé à un fluorochrome PE de la compagnie BD. Les cellules ont été marquées pendant 20 min sous agitation à 4 °C puis fixer au PFA 4%. La lecture du marquage a été réalisée et analysée le lendemain avec le FACS Canto II et le logiciel FlowJo.

3.9 Immunopeptidome

L'isolation d'immunopeptidome ont été réalisées à partir de 200 millions de cellules pour chaque échantillon.

3.9.1 Élué acide moyenne

Les cellules ont été lavées plusieurs fois avec du PBS puis une solution de citrate à pH 3.3 a été ajoutée sur les cellules. Les cellules ont été suspendues par pipetage pendant 1 min avant d'être centrifugées et le surnageant contenant les peptides a été récupéré. Ensuite, les sels ont été éliminés par un tips de 10 disques de ouate préalablement équilibrés avec 1 mL de méthanol, puis d'ACN 50 %/FA 1 % (v/v) et finalement du FA 1 %. Les peptides sont ensuite ajoutés à la colonne, dessalés avec 1 mL de FA 1 %, élués dans d'ACN50 %/FA 1 % (v/v) et séchés avec la centrifugeuse SpeedVac (Thermo Fisher) à RT et conservés à -20 °C.

3.9.2 Immunoisolation des CMH

Les cellules ont été lavées plusieurs fois avec du PBS puis lysées avec une solution 2% CHAPS, 2% Triton X-100, PIC 1.2 X pendant 1h à 4 °C sous agitation. L'anticorps utilisé est un anti-pan H2 de chez BioXcell qui a été couplé avec des billes de GammaBind Plus Sepharose de chez Sigma. L'anticorps couplé aux billes a été incubé avec le lysat cellulaire pendant 3h sous agitation à 4 °C puis les billes ont été nettoyées plusieurs fois avec du PBS. Les peptides ont été élués avec 0.2% acide formique et la solution est passée dans un tube Spin-X. Ensuite, les sels ont été éliminés par un tips de 10 disques de ouate préalablement équilibrés avec 1 mL de méthanol, puis d'ACN 50 %/FA 1 % (v/v) et finalement du FA 1 %. Les peptides sont ensuite ajoutés à la colonne, dessalés avec 1 mL de FA 1 %, élués dans d'ACN50 %/FA 1 % (v/v) et séchés avec la centrifugeuse SpeedVac (Thermo Fisher) à RT et conservés à -20 °C.

3.10 Spectrométrie de Masse

Les peptides ont ensuite été resuspendus dans du FA 1 % et 2 µg de peptides ont été injectés dans le spectromètre de masse Orbitrap Q-Exactive HF (Thermo Fisher). Les résultats ont ensuite été analysés par le moteur de recherche Peaks en utilisant la banque de données de souris d'Uniprot. Les analyses bio-informatiques ont été réalisées avec Excel et Prims.

4 Résultats

4.1 Caractérisation du mécanisme régulant la MitAP : les MDVs

4.1.1 Isolation de la mitochondrie

4.1.1.1 Protocole d'isolation des mitochondries

L'isolation de la mitochondrie est la première étape pour l'identification de partenaires moléculaires impliqués dans la formation des MDVs. L'enrichissement et la pureté des mitochondries sont essentiels pour permettre l'identification la plus complète des protéines associées aux mitochondries. Pour cela, un protocole doit être défini pour l'isolation des mitochondries dans les macrophages RAW du modèle cellulaire (51) et différentes techniques sont testées pour choisir le meilleur protocole d'isolation.

Trois techniques de purification ont été testées. Il s'agit de [1] l'immunoisolation, [2] de centrifugation différentielle et [3] de centrifugation sur gradient de sucrose discontinu (*Figure 7*). Pour l'immunoisolation, nous utiliserons des anticorps ciblés contre TOMM22, une protéine de la membrane externe des mitochondries, couplés à des billes magnétiques afin de séparer les mitochondries du reste des organites (*Figure 7A*). Nous utiliserons aussi une méthode de centrifugation différentielle consistant à effectuer des centrifugations à différentes vitesses à la suite de la lyse des cellules afin d'éliminer les composants cellulaires en fonction de leur poids (*Figure 7B*). L'utilisation d'un gradient de sucrose permettra d'isoler les mitochondries, selon leur densité (*Figure 7C*). Ces trois méthodes seront réalisées avec les cellules RAW sans aucun traitement. Les échantillons finaux ainsi que des échantillons d'étapes intermédiaires seront analysés par Western Blot ainsi que par microscopie électronique afin de vérifier la pureté et la morphologie des mitochondries (*Figure 8 et 9*).

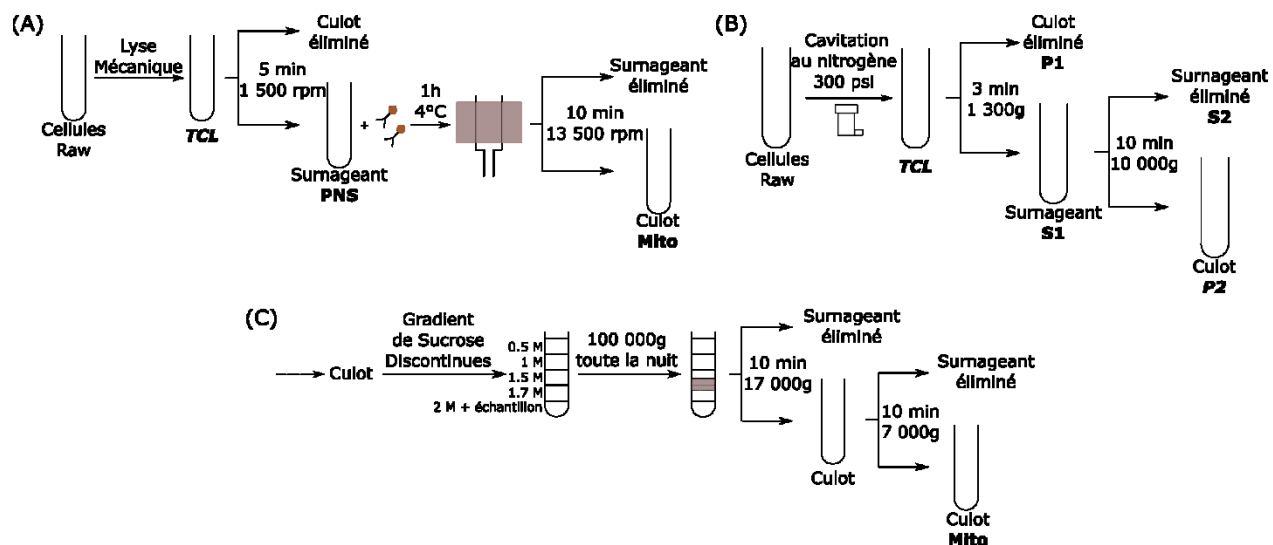


Figure 7. – Optimisation de trois protocoles d'isolation des mitochondries.

Le protocole (A) est basé sur l'immunoisolation des mitochondries avec une lyse mécanique des cellules et l'utilisation d'un anticorps anti-Tom22 couplé à des billes magnétiques. Le protocole (B) est un protocole utilisant deux centrifugations à 1300 g et 10 000 g suite à une lyse cellulaire par cavitation à l'azote à 300 psi. Le dernier protocole (C) est le protocole (B) suivi par un gradient de sucrose discontinu centrifugé à 100 000 g toute la nuit. Les mitochondries sont récupérées à l'interface entre 1,5 M et 1,7 M de sucrose puis centrifugées plusieurs fois afin d'éliminer le sucrose.

4.1.1.2 Vérification de la pureté des échantillons

Les marqueurs mitochondriaux, Tom20 et HSP60, montrent un très bon enrichissement mitochondrial avec l'immunoisolation et le gradient de sucrose discontinu (Figure 8A et C). Concernant les contaminants comme le noyau et le Golgi, réciproquement montrés par la protéine histone H3 et GM 130, ils diminuent pour l'ensemble des techniques (Figure 8A, B et C). Cependant, seul le gradient de sucrose discontinu induit l'élimination du réticulum endoplasmique, montré par la protéine BiP (Figure 8C). Le lysosome, illustré par le marqueur LAMP1, n'est pas éliminé dans les échantillons finaux des trois techniques testées. Suite à ce western blot, le gradient de sucrose discontinu semble être la meilleure technique pour éliminer le plus de contaminants cellulaires.

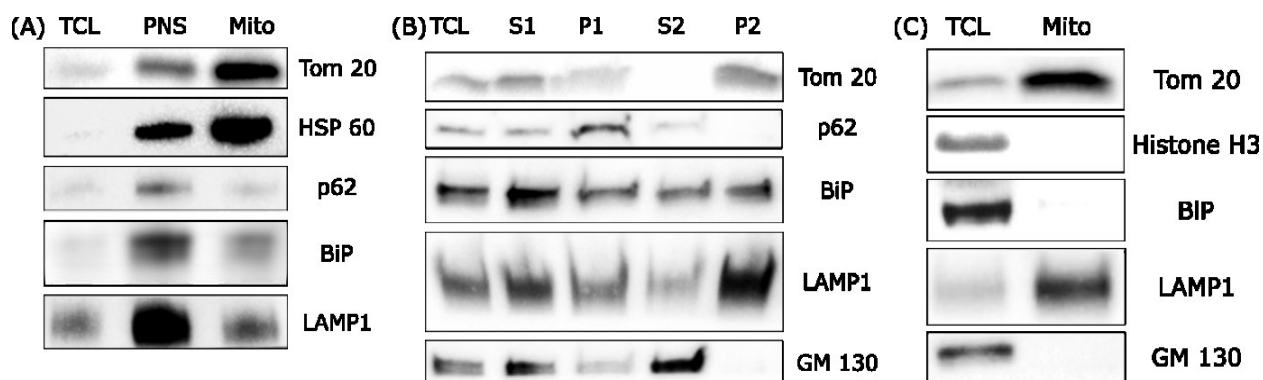


Figure 8. – Vérification de la pureté par Western Blot des échantillons finaux issus des trois protocoles d'isolation des mitochondries

Les images A, B et C correspondent respectivement au protocole d'immunoisolation (Figure 7A), au protocole de centrifugation différentielle (Figure 7B) et au protocole utilisant un gradient de sucrose discontinu (Figure 7C). Tom20 et HPS60 correspondent à des marqueurs mitochondriaux. BiP, LAMP1, H3 et GM130 sont respectivement des marqueurs du réticulum endoplasmique, du lysosome, du noyau et du Golgi. TCL, PNS, S1, P1, S2 et P2 et Mito correspondent aux échantillons prélevés à différent moment du protocole (voir Figure 7 pour chaque protocole).

En parallèle, les échantillons ont été observés par microscopie électronique afin de vérifier la morphologie des mitochondries (Figure 9). La microscopie électronique a montré que l'échantillon issu du gradient de sucrose discontinu était constitué uniquement de fragments doubles membranaires et non de mitochondries entières (Figure 9C). La matrice et les crêtes des mitochondries ne sont plus visibles. Donc, même si l'échantillon semble le plus pur, les mitochondries ne sont pas en bon état. L'état des mitochondries issues de l'immunoisolation et des centrifugations est similaire, les crêtes des mitochondries sont bien visibles dans les structures doubles membranaires (Figure 9A et B). Finalement, suite aux observations faites avec la microscopie électronique, nous concluons que le protocole utilisant le gradient de sucrose discontinu n'est pas approprié pour ce projet.

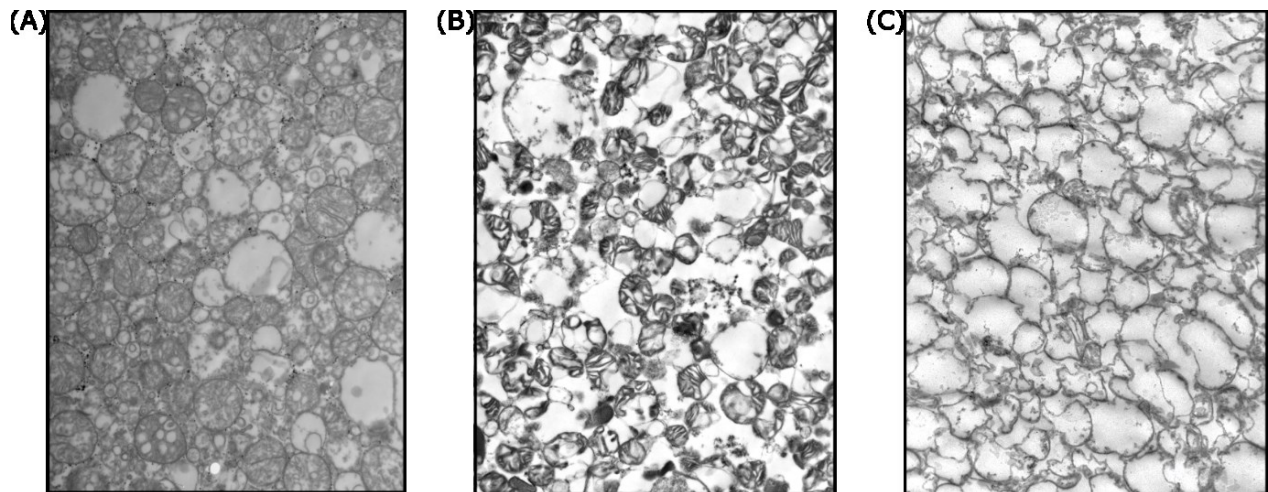


Figure 9. – Vérification de la morphologie des mitochondries par microscopie électronique des échantillons finaux issus des trois méthodes d'isolation des mitochondries.

Les images A, B et C correspondent respectivement au protocole d'immunoisolation (Figure 7A), au protocole de centrifugation différentielle (Figure 7B) et au protocole utilisant un gradient de sucrose discontinu (Figure 7C).

Comme l'enrichissement des mitochondries est supérieur avec l'immunoisolation et que l'élimination du noyau est plus efficace avec la centrifugation différentielle, nous avons développé un nouveau protocole d'isolation qui combine les deux techniques (Figure 10A). Le Western Blot des échantillons issus de ce nouveau protocole a révélé un très bon enrichissement des mitochondries avec une élimination du noyau et du Golgi efficace. Toutefois, les échantillons montrent toujours la présence du réticulum endoplasmique et du lysosome (Figure 10B). En microscopie électronique, nous observons des mitochondries entières avec leur membrane double et la présence de crêtes intactes (Figure 10C). Ce protocole d'isolation a été conservé pour la suite du projet.

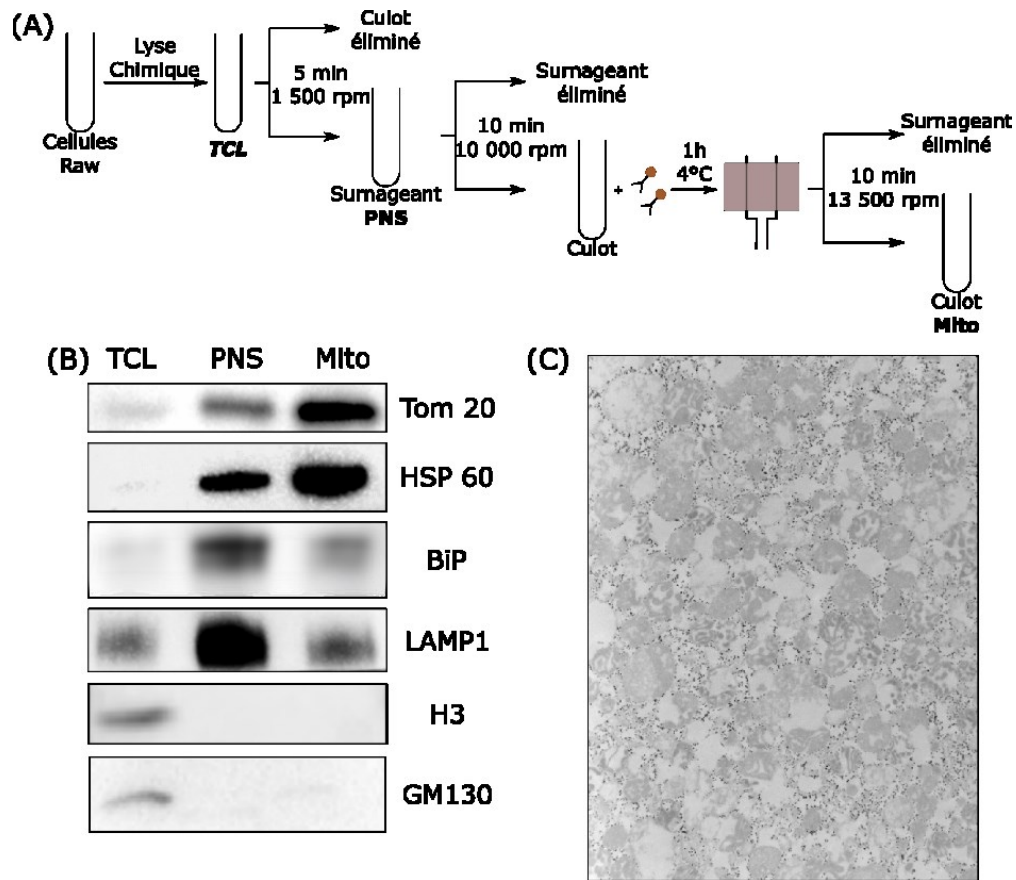


Figure 10. – Protocole final d'isolation des mitochondries

(A) Le protocole d'isolation des mitochondries est constitué d'une lyse chimique suivie de deux centrifugations de 1500 rpm et 10 000 rpm. L'échantillon est ensuite incubé avec un anticorps anti-Tom22 couplé à des billes magnétiques afin d'isoler grâce une colonne magnétique les mitochondries (Mito)

(B) Vérification de la pureté des mitochondries par Western Blot des échantillons finaux issus des trois protocoles d'isolation des mitochondries. Tom20 et HPS60 correspondent à des marqueurs mitochondriaux. BiP, LAMP1, H3 et GM130 sont respectivement des marqueurs du réticulum endoplasmique, du lysosome, du noyau et du Golgi. TCL, PNS et Mito correspondent aux échantillons prélevés à différent moment du protocole (voir Figure 10A)

(C) Vérification de la morphologie des mitochondries par microscopie électronique des échantillons finaux issus des trois protocoles d'isolation des mitochondries.

4.1.2 Induction de MitAP

Le projet a été poursuivi par une vérification des traitements utilisés sur les cellules pour induire MitAP. Pour pouvoir mesurer si MitAP a bien lieu ou non dans les cellules, j'ai utilisé un test de présentation antigénique (*Figure 6 – Matériel et Méthode*). Pour induire MitAP, différents traitements sont utilisés au sein du laboratoire : le choc thermique (HS : heat shock), le traitement par lipopolysaccharide (LPS) et, très récemment, l'infection par EPEC(57). L'infection par EPEC n'étant pas encore optimisée pendant la réalisation de ce projet, j'ai testé le HS ainsi que le LPS. Le traitement par HS induit une plus forte présentation antigénique que le traitement par LPS (*Figure 11A*). Donc le HS est le meilleur traitement pour induire un fort taux de MitAP et donc potentiellement un grand nombre de MDVs.

Cependant, en parallèle du test de présentation antigénique, une condition contrôle a été réalisée afin de vérifier le bon fonctionnement du test de présentation. Cette vérification est permise par l'ajout d'un peptide synthétique de gB afin de vérifier que l'hybridome est bien capable de reconnaître le peptide gB et de s'activer ; et également que les cellules RAW utilisées sont bien capables de présenter le peptide gB à l'hybridome. On peut constater que pour les cellules traitées au HS, le niveau de présentation du peptide synthétique est inférieur à celui des non traitées (*Figure 11B*). Le contrôle des cellules traitées au LPS est identique au contrôle des cellules non traitées. L'hybridome utilisé étant le même entre les différentes conditions, cette différence dans le traitement HS vient probablement de la présentation du peptide par cellules RAW. Comme les cellules RAW utilisées sont issues de la même culture entre les différents traitements, mon hypothèse est que cette diminution de présentation dans le contrôle est due à un effet du HS sur les cellules RAW. Pour vérifier si le HS a un impact sur la viabilité des cellules, j'ai effectué un test MTT (*Figure 11C*). Il s'agit d'un test utilisant un réactif, le MTT, qui va être réduit par une enzyme mitochondriale uniquement dans les cellules vivantes. Le produit de cette réaction donne un précipité coloré qui sera ensuite mesuré afin de déterminer le têt de viabilité de l'échantillon. Il a été constaté par ce test, dont le traitement par HS induit la mort des cellules RAW. Ce qui n'est pas le cas des cellules traitées au LPS. Le traitement par LPS a donc été conservé pour la suite du projet.

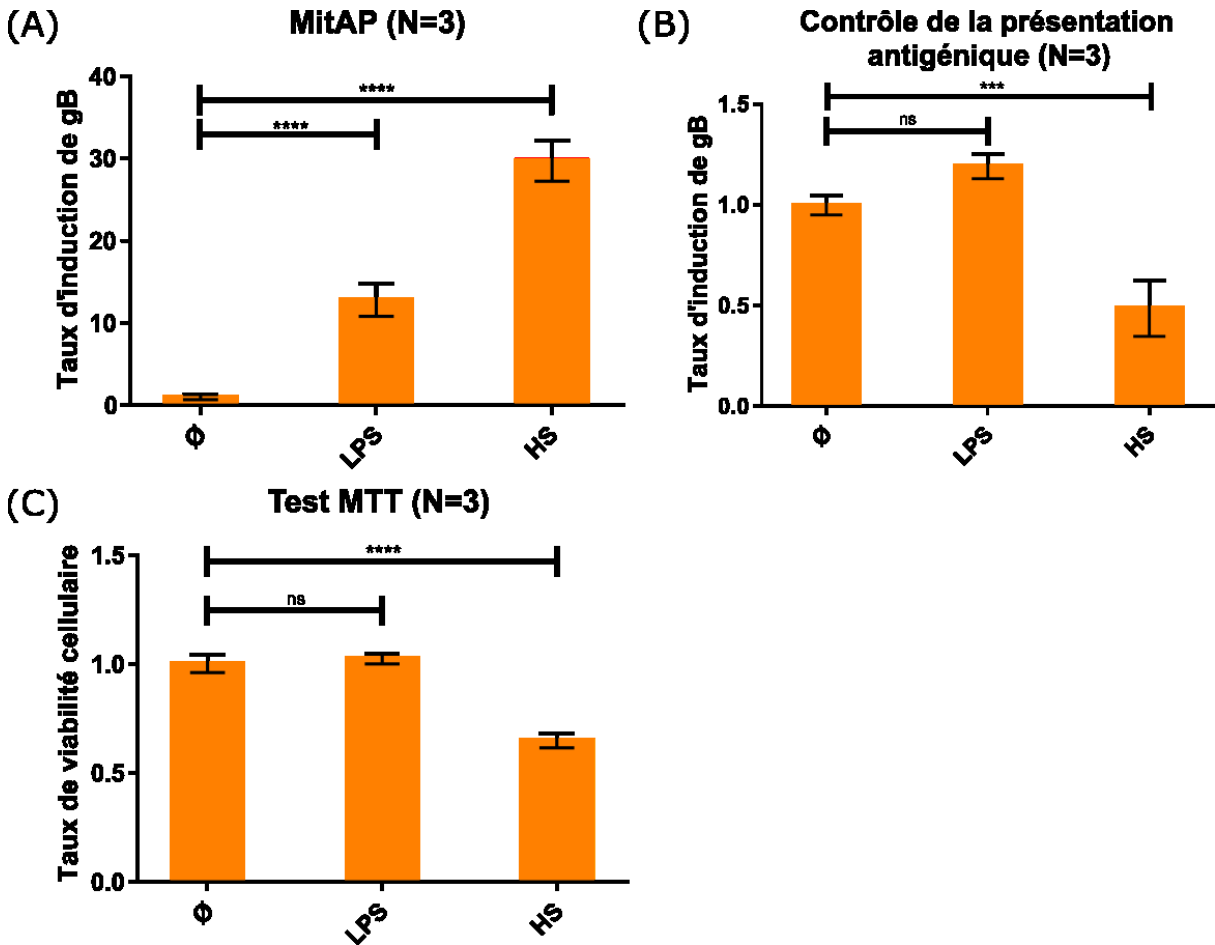


Figure 11. – Études des stress pour l'induction de MitAP

(A) Test de présentation antigénique du peptide gB dans des macrophages RAW. Les cellules ont été non traitées (∅), traitées au LPS (LPS) ou traitées avec choc thermique (HS).

(B) Expérience contrôle de test de présentation antigénique avec l'utilisation d'un peptide gB synthétique.

(C) Test MTT afin de mesurer la viabilité cellulaire des cellules suite aux différents traitements.

Les écarts types ont été calculés et un test T a été réalisé. « **** » signifie que la p-value est inférieure à 0,000 1 et elle est considérée comme significative. « *** » signifie que la p-value est supérieur à 0,003 et elle n'est pas considérée comme significative. « ns » signifie que la p-value est supérieur à 0,05 et elle n'est pas considérée comme significative.

4.1.3 Réalisation des échantillons pour la spectrométrie de masse

Mes travaux ont permis de mettre au point un protocole d'isolation des mitochondries efficaces et de choisir un traitement cellulaire adéquat pour induire MitAP. La suite du projet a donc consisté à la réalisation des échantillons pour l'analyse par spectromètre de masse. Pour s'assurer que nos échantillons sont adaptés à l'analyse, nous avons utilisé la même approche par Western Blot que la validation du protocole pour évaluer le niveau de contamination par diverses organites des échantillons. Cette étape permet de vérifier la variabilité des échantillons de la même condition et détermine si l'échantillon est conservé ou non pour l'analyse.

L'isolation des échantillons pour les deux premiers réplicas a bien fonctionné (*Figure 12A*). Les mitochondries sont enrichies dans les échantillons et le noyau a bien été éliminé. Le réticulum et le lysosome sont présents, mais à faible niveau. À la réalisation du dernier triplicas, l'enrichissement mitochondrial est toujours présent, mais l'échantillon possède du noyau et plus de réticulum et de lysosome que les deux premiers échantillons (*Figure 12 B*). L'échantillon a été refait plusieurs fois, mais des résultats similaires ont été obtenus à chaque fois. Aucune raison particulière n'a pu être mise en évidence pour expliquer cette variabilité avec les deux premiers échantillons : les mêmes cellules et solutions ont été utilisées. Même si deux échantillons ont été validés pour l'étude, ils ne suffisent pas pour pouvoir faire l'analyse. Il est important d'avoir au moins trois échantillons minimum afin d'éviter la présence de vrais négatifs et de faux positifs dans l'analyse. Pour le moment, aucune solution n'a pu être trouvée pour obtenir des échantillons avec le même niveau de pureté que les deux premiers échantillons.

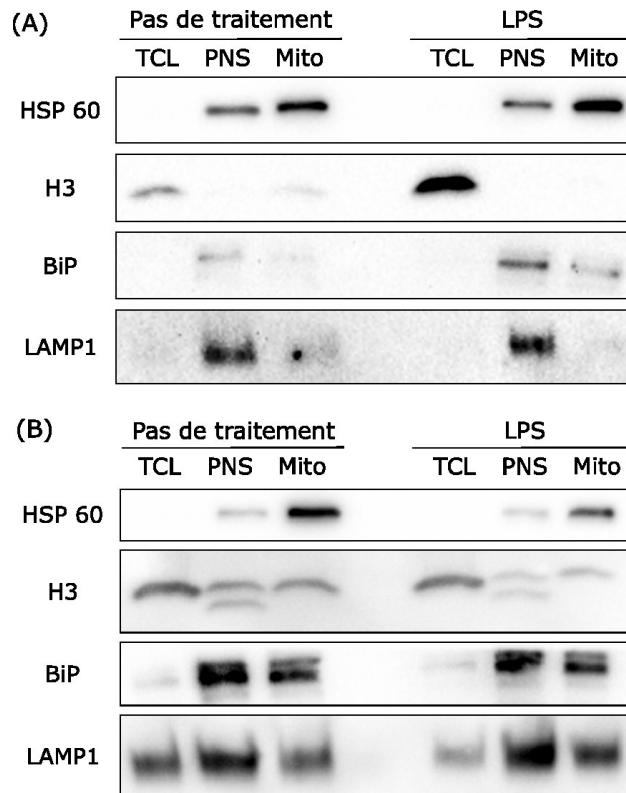


Figure 12. – Vérification de la pureté des triplicats pour l'analyse par spectrométrie de masse
 Western Blot des échantillons issus du protocole optimisé pour l'isolation des mitochondries (Figure 10A) pour les cellules non traitées (pas de traitement) et les cellules traitées au LPS (LPS). TCL, PNS et Mito correspondent aux échantillons prélevés à différent moment du protocole (voir Figure 10A). Tom20 et HPS60 correspondent à des marqueurs mitochondriaux. H3, BiP, et LAMP1 sont respectivement des marqueurs du noyau, du réticulum endoplasmique et du lysosome.

(A) Western Blot correspondant aux deux premiers réplicas.

(B) Western Blot correspondant aux troisièmes réplicas.

4.1.4 Exemple de validation de protéine potentiellement impliquée dans MDVs et MitAP : le cas de DJ1

En absence de données protéomiques, j'ai poursuivi mes travaux sur le rôle potentiel de protéines mitochondriales dans la régulation de MitAP en sélectionnant une protéine associée à la mitochondrie et impliquée dans la maladie de Parkinson. Cette protéine, DJ1, a diverses fonctions (58). Une de ces fonctions est de se lier à la protéine Nrf2 lors d'un stress oxydatif.

Cette interaction permet le recrutement de Nrf2 au noyau et l'activation de la traduction de gènes impliqués dans la diminution du stress oxydatif (59). De plus, DJ1 participe à la synthèse de la dopamine dans les neurones via l'activation du gène de la tyrosine hydrolase (TH) (60). Le gène codant pour DJ1 a été retrouvé muté chez certains patients parkinsoniens et cette mutation est récessive (61). Son rôle dans la pathologie de Parkinson est soutenu par l'effet protecteur de la surexpression de DJ1 dans des souris exposées au MPTP, du notamment à la diminution de ROS au niveau des mitochondries (62). L'ensemble de ces éléments soutient le fait que DJ1 pourrait avoir un lien avec MitAP.

Afin de vérifier cette hypothèse, une étude de MitAP dans les macrophages RAW avec l'expression de gB au niveau de la mitochondrie (Raw Mito-GB) en présence (sh-Scr DJ1) ou en l'absence de DJ1 (sh-DJ1) a été réalisée. L'inhibition de DJ1 a été effectuée par ARN-sh et le niveau d'expression a été vérifié par qPCR (résultats non montrés). Le traitement par LPS a bien entraîné la présentation du peptide gB dans les cellules contrôles de souche sauvage (RAW Mito-gB sh-Scr DJ1). Le niveau de présentation est très fortement diminué avec l'inhibition de la protéine DJ1 (RAW Mito-gB sh-DJ1) (*Figure 13A*). La condition contrôle, qui permet de vérifier que l'hybridome est bien capable de reconnaître le peptide gB, de s'activer et que les cellules RAW utilisés sont bien capables de présenter le peptide gB à l'hybridome, est correcte et confirme que la diminution observée lors de l'absence de DJ1 correspond bien à l'effet de DJ1 sur MitAP.

Afin de vérifier si l'absence de DJ1 affecte uniquement MitAP, le même test a été réalisé, mais cette fois-ci avec les macrophages RAW qui expriment la protéine gB au niveau du cytoplasme (RAW Cyto-gB). Nous avons observé que l'absence de DJ1 n'affecte pas le taux de présentation du peptide gB situé dans le cytoplasme. Nous concluons donc que la fonction de DJ1 dans la présentation antigénique est spécifique à MitAP.

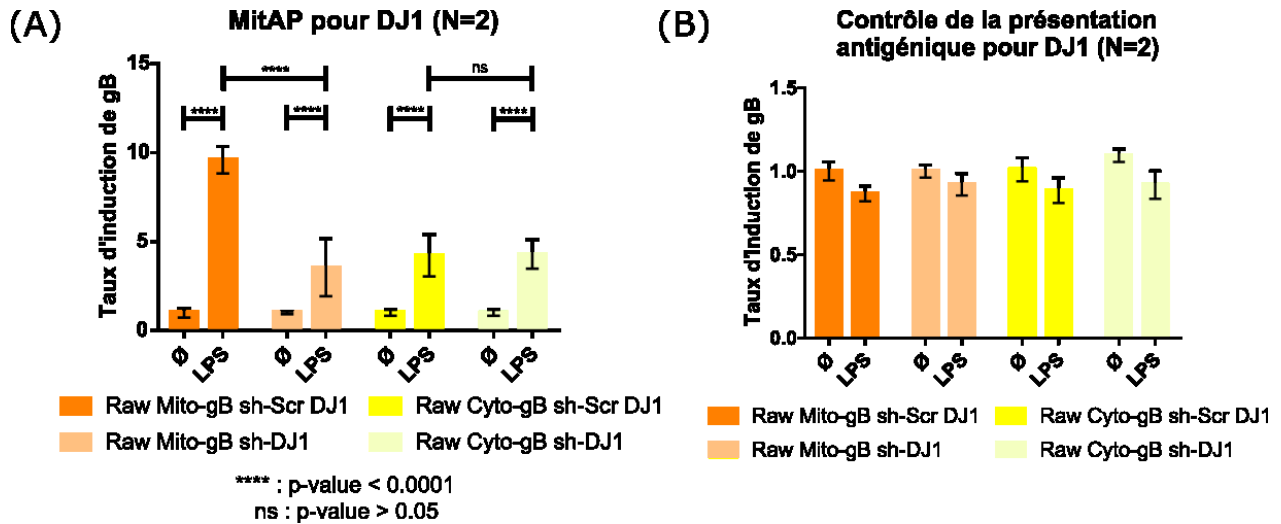


Figure 13. – Étude de l'impact de DJ1 sur MitAP

(A) Test de présentation antigénique mitochondriale (Mito-gB) et cytoplasmique (Cyto-gB) de la protéine gB dans des cellules RAW en présence (sh-Scr DJ1) ou absence (sh-DJ1) de DJ1. Les cellules ont été traitées (LPS) ou non (∅) au LPS pendant 8 h.

(B) Expérience contrôle de test de présentation antigénique avec l'utilisation d'un peptide gB synthétique.

Les écarts types ont été calculés et un test T a été réalisé. « **** » Signifie que la p-value est inférieur à 0,0001 et est considéré comme significatif. « ns » signifie que la p-value est supérieure à 0,05 et n'est pas considérée comme significative.

4.2 Identification des peptides mitochondriaux lors de la formation des MDVs

4.2.1 Technique d'isolation de l'immunopeptidome

Afin d'identifier les peptides provenant de protéines mitochondriales présentés à la surface cellulaire (immunopeptidome) en réponse à des conditions de stress menant à l'activation de MitAP, nous avons développé une approche pour isoler les peptides liés aux CMH de surface. Deux techniques ont été testées : [1] l'éluion acide moyenne (MAE) et [2] l'immunoisolation du CMH.

La MAE pour élution acide moyenne consiste à mettre les cellules dans un milieu acide afin de casser l'interaction entre le peptide et le CMH et permettre la libération du CMH dans le surnageant. Ce dernier est par la suite traité et filtré pour récupérer les peptides (*Figure 14A*). Les avantages de cette technique sont qu'elle peut être répétée plusieurs fois sur la même population. Il est donc possible de faire une cinétique de présentation avec les mêmes cellules. De plus, cette technique est peu coûteuse. Par contre, des contaminants sont récupérés et il y a également des pertes de peptides lors du traitement. De plus, elle ne peut être réalisée sur des cellules congelées ou des tissus solides (63).

La deuxième technique consiste, comme son nom l'indique, à utiliser des anticorps pour isoler le complexe CMH — peptide. Les cellules sont lysées et le lysat est incubé avec un anticorps anti-CMH couplé à des billes de sépharose. La présence de ces billes permet de récupérer les complexes CMH — peptide par centrifugation. Par la suite, les peptides sont décrochés du CMH et injectés dans le spectromètre de masse (*Figure 14B*). L'immunoisolation peut être utilisée avec des anticorps contre les CMH de classe I ou classe II. Cette technique peut également être réalisée sur plusieurs modèles cellulaires, qu'ils soient congelés ou issus d'un tissu. Cependant, cette technique est très coûteuse et le rendement est assez faible (63).

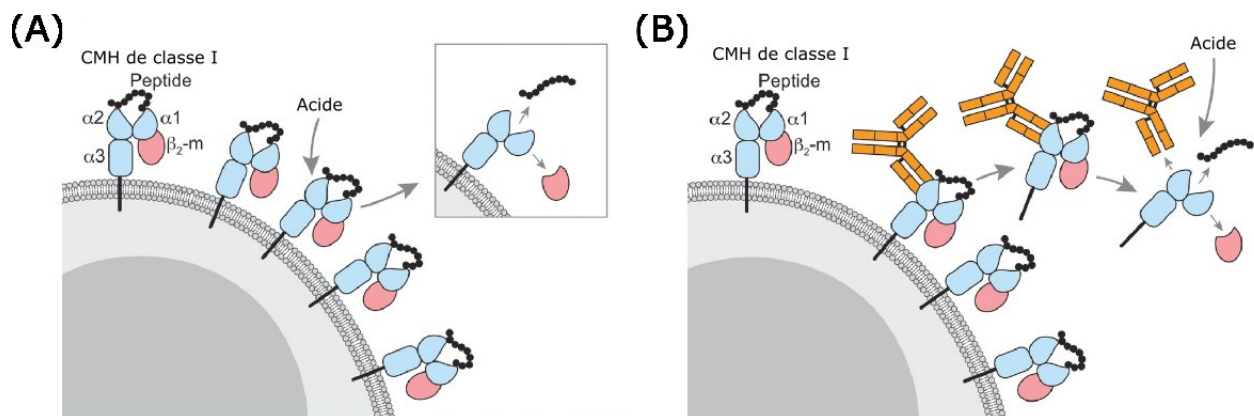


Figure 14. – Stratégie d'isolation des peptides de CMH de classe I (adapté de Schumacher F. et al, 2017)

(A) Technique d'isolation des peptides de CMH de classe I par élution acide moyenne (MAE). Le traitement acide va décrocher le peptide du CMH de classe I.

(B) Technique d'isolation des peptides de CMH de classe I par immunoisolation du CMH. L'anticorps va reconnaître le CMH avec son peptide. Une fois les anticorps récupérés, un traitement acide sera fait pour dissocier le peptide du CMH.

Afin de choisir la meilleure technique pour les échantillons, les deux techniques ont été testées sur des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont des cellules spécialisées dans la présentation antigénique (64). Le laboratoire du Dr Desjardins a montré, en parallèle avec des macrophages RAW, que des cellules dendritiques issues de la moelle osseuse de souris sont aptes à effectuer MitAP, notamment en présentant le peptide OGDH (51). La culture primaire a été réalisée à partir des cellules de moelle osseuse de souris différenciées en cellules dendritiques avec du GM-CSF pendant 8 jours. Le taux de différenciation a été étudié par FACS avec le marquage CD11c. 65,2 % des cellules issues de la moelle osseuse de souris sont différenciées en cellules dendritiques CD11c+ (Figure 15A). Aucun traitement n'a été effectué sur ces cellules afin d'étudier uniquement le rendement et la pureté des deux protocoles d'isolation par spectrométrie de masse. L'immunoisolation a été faite avec un anticorps anti-panH2 qui réagit avec l'ensemble des CMH de classe I présent sur les cellules.

Les peptides récupérés ont été injectés dans le spectromètre de masse et une analyse du nombre de peptides a été réalisée. Un plus grand nombre de peptides a été détecté par la MAE (3851 pour MAE contre 2883 pour l'immunoisolation) (Figure 15B). Cependant, si on applique des critères spécifiques aux peptides de CMH de classe I, comme la taille du peptide et le facteur d'interaction peptide-CMH (65), seuls 2,5 % des peptides détectés dans l'échantillon de la MAE sont des peptides de CMH de classe I. 20,3 % des peptides issus de l'immunoisolation respectent les critères attribuables aux peptides de CMH de classe I (Figure 15B). La répartition des peptides en fonction de leur taille en acides aminés (Figure 15C et D) isolés par MAE montre qu'un grand nombre de peptides est supérieur à 15 acides aminés, ce qui est considéré comme la taille maximale d'un peptide de CMH de classe I. Le grand nombre de peptides non-CMH nuit à la détection des peptides de CMH de classe I dans l'échantillon. Même si le ratio de peptides de CMH de classe I est assez faible pour l'immunoisolation (20,3 %), cette technique est bien adaptée pour l'étude que l'on souhaite faire.

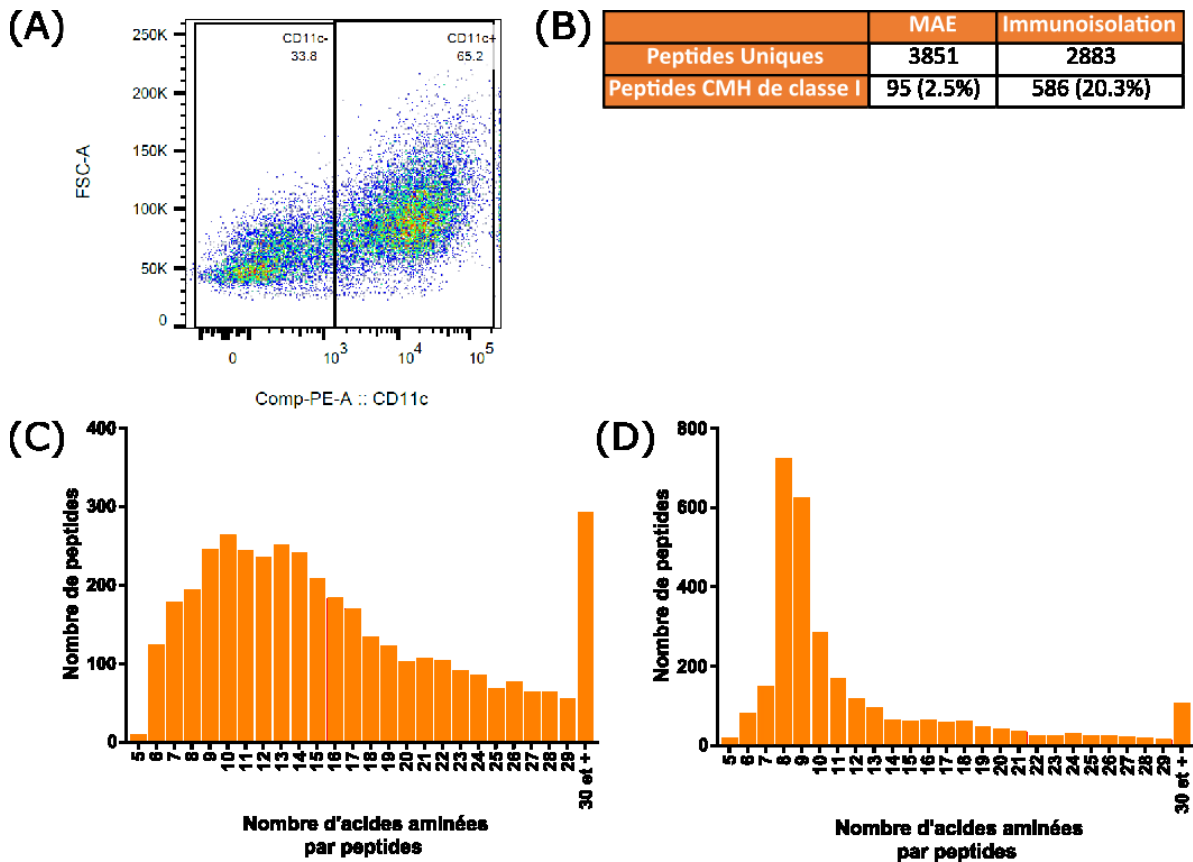


Figure 15. – Stratégies d'isolation des peptides de CMH de classe I

(A) Marquage de CD11c par FACS suite à la différenciation des cellules de la moelle osseuse de souris en cellules dendritiques.

(B) Nombres de peptides détectés et de peptides CMH de classe I pour les échantillons d'élution acide moyenne (MAE) et d'immunoisolation identifiée par spectrométrie de masse

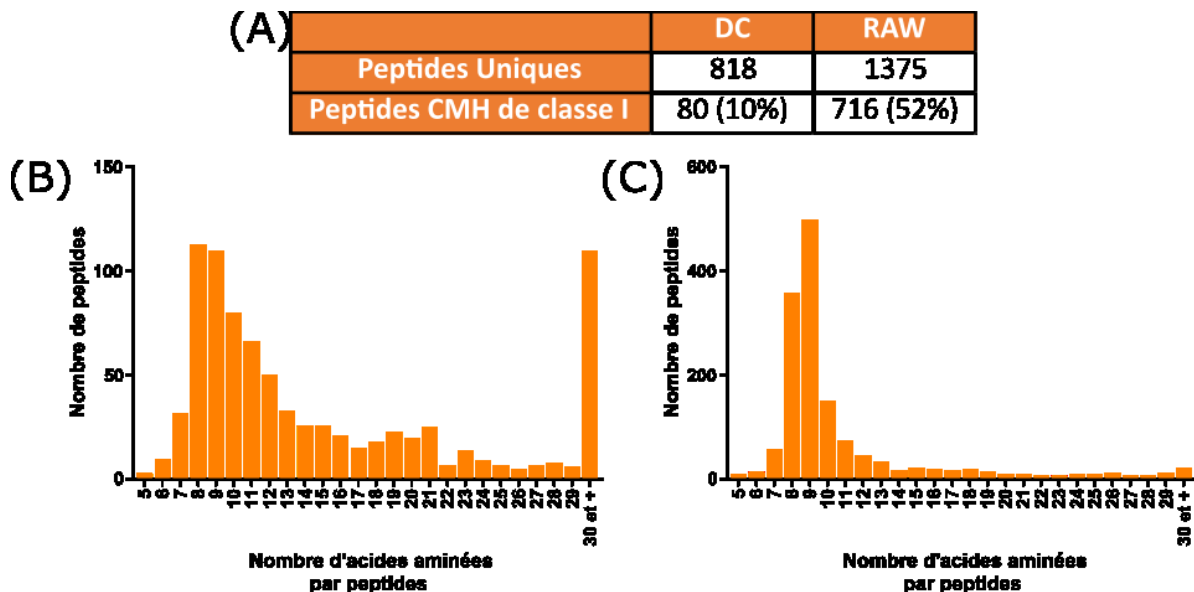
(C) et (D) Nombre de peptides en fonction du nombre d'acides aminés par peptides pour les échantillons d'élution acide moyenne (MAE) (C) et d'immunoisolation (D).

4.2.2 Choix du modèle cellulaire

Suite à ce premier essai, la question du meilleur choix de modèle cellulaire s'est posée. En effet, même si les cellules dendritiques sont de très bonnes cellules spécialisées en présentation antigénique, les macrophages ont également ce statut (64). J'ai donc voulu comparer le rendement de peptide de CMH de classe I obtenu par immunoisolation entre la culture primaire de cellules dendritiques et les macrophages RAW.

Étonnamment, l'immunoisolation sur les cellules dendritiques a donné moins de peptides que les macrophages RAW (818 contre 1375) et le pourcentage de peptides de CMH de classe I est également plus faible chez les cellules dendritiques (10 % contre 52 %) (Figure 16A). Si on regarde plus en détail la taille des peptides, on constate que l'échantillon de peptides issu des cellules dendritiques possède un plus grand nombre de peptides supérieurs à la taille des peptides CMH de classe I (Figure 16B et C). Donc, le modèle des macrophages RAW semble être meilleur pour ce type d'étude grâce au grand nombre de peptides de CMH de classe I détectés.

Le protocole d'isolation des peptides mitochondriaux liés aux CMH de classe I que j'ai développé pourra être utilisé dans des études subséquentes pour identifier des peptides présentés spécifiquement, ou en plus grande abondance, à la surface des cellules dans des conditions qui stimulent MitAP. Ce type d'analyses pourrait identifier des peptides dominants



liés à la réponse autoimmune au cours de la maladie de Parkinson.

Figure 16. – Modèles cellulaires pour l'isolation des peptides de CMH de classe I

(A) Nombre de peptides détectés et de peptides CMH de classe I pour les échantillons de cellules dendritiques (DC) et de macrophages RAW (RAW) par spectrométrie de masse

(B) et (C) Nombre de peptides en fonction du nombre d'acides aminés par peptides pour les échantillons cellules dendritiques (DC) (B) et de macrophages RAW (RAW) (C).

5 Discussion

Les avancées du laboratoire ont mis en évidence un nouveau mécanisme auto-immun qui pourrait avoir un rôle dans la maladie de Parkinson. En effet, le rôle répresseur de deux protéines associées à la pathologie, PINK1 et Parkin, sur la présentation d'antigènes issus de la mitochondrie a permis d'impliquer de cette nouvelle voie de présentation dans cette maladie neurodégénérative. La caractérisation de la voie de MitAP a également permis de mettre en évidence la contribution des MDVs dans le processus de présentation des antigènes mitochondriaux. Puisque cette nouvelle fonction des MDVs a été identifiée récemment (51), les mécanismes moléculaires qui la régulent sont encore très peu caractérisés. De plus, même si certains peptides mitochondriaux ont été, associés à d'autres pathologies comme la PBC, l'augmentation de la présentation mitochondriale en l'absence de PINK1 et Parkin pourrait entraîner la présentation de nouveaux peptides issus de cet organe. L'avancé sur ces deux axes de recherches permettraient de mieux comprendre l'ensemble des mécanismes moléculaires associés à la maladie de Parkinson et donc d'obtenir des biomarqueurs ou des cibles thérapeutiques qui permettraient de mieux suivre et d'enrayer l'évolution de la maladie. Mon projet de maîtrise a donc consisté à initier la caractérisation moléculaire des mécanismes cellulaires et moléculaires régulant MitAP et l'identification des peptides mitochondriaux qui pourraient contribuer au développement de la maladie.

Le projet de caractérisation des mécanismes régulant MitAP a consisté principalement à créer un protocole permettant l'isolation des mitochondries afin d'identifier des variations protéiques associées à la maladie, par spectrométrie de masse. Trois approches différentes ont été comparées afin de développer un protocole d'isolation mitochondriale efficace : l'immunoisolation, l'utilisation de centrifugations successives et le gradient de sucrose discontinu. La qualité de l'échantillon a été évaluée par l'enrichissement des mitochondries, leur état morphologique, ainsi que l'absence de contaminants par d'autres organites cellulaires. Les trois approches entraînent une pureté et un enrichissement mitochondrial différents, mais les résultats indiquent que l'utilisation d'un gradient de sucrose discontinu permet un enrichissement mitochondrial supérieur, tout en minimisant avec le moins de contaminants des

trois protocoles (*Figure 9*). Cependant, l'étude par microscopie électronique a révélé que le gradient cause un stress qui induit la rupture de certaines mitochondries (*Figure 10*). Le stress exercé sur les mitochondries a induit une modification du contenu en protéines des mitochondries. L'étude de cet échantillon, malgré sa bonne pureté, ne reflèterait pas le profil protéique mitochondriale lors de la formation des MDVs donc l'utilisation du gradient discontinu n'est pas adaptée à l'étude.

La combinaison du protocole d'immunoisolation et des centrifugations successives a permis un enrichissement mitochondrial avec l'élimination d'organites telle que le noyau, mais sans éliminer pour autant le réticulum endoplasmique et les lysosomes de l'échantillon final (*Figure 11*). La présence de ces organites pourrait cependant être expliquée par leur interaction avec la mitochondrie. En effet, des études ont montré que la protéine LAMP1 du lysosome et la protéine TOM20 de la mitochondrie peuvent être colocalisées (66). Le réticulum endoplasmique est connu quant à lui pour former des structures appelées MAM, pour membrane associée aux mitochondries, qui sont essentielles dans la régulation du calcium cellulaire (67). La dissociation de ces interactions pour éliminer le lysosome et le réticulum est difficilement envisageable sans altérer les mitochondries. De ce fait, les analyses protéiques des échantillons par spectrométrie de masse devront prendre en compte la présence de ces organites.

Le choix du protocole d'isolation permet de passer à l'étape suivante de ce projet qui consiste à définir le traitement pour induire la formation des MDVs et donc MitAP. Les deux traitements testés, le LPS et le HS, induisent tous les deux MitAP (*Figure 12A*). L'étude de viabilité cellulaire a toutefois montré que le HS entraîne de la mort des cellules Raw (*Figure 12B et C*). Le traitement HS ayant pour but d'induire un stress engendrant des dommages à la mitochondrie, une grande quantité de dommages mitochondriaux pourrait entraîner l'activation de l'apoptose via la voie intrinsèque (68). Si c'est le cas, le profil mitochondrial serait différent de celui de mitochondries formant des MDVs, notamment avec le recrutement de protéines associées à l'apoptose. Même si l'hypothèse de l'implication de l'apoptose dans la mort cellulaire médiée par le HS doit être vérifiée, la possibilité que des protéines impliquées dans un autre mécanisme que la formation des MDVs soient présentes au niveau de la mitochondrie interfère dans l'identification de protéines impliquées spécifiquement dans la

formation des MDVs. Le HS n'est donc pas le traitement le plus adapté pour étudier la formation des MDVs. Le LPS a donc été choisi comme traitement qui induit MitAP sans induire la mort cellulaire.

Le protocole d'isolation mitochondrial et le traitement pour MitAP étant définis, la réalisation des triplics pour chaque condition, avec et sans traitement, pour l'analyse par spectrométrie de masse a été faite. Même si deux réplicas pour chaque condition ont pu être réalisés et validés, un problème de reproductibilité a empêché d'avoir suffisamment de réplicas pour l'analyse par spectrométrie de masse (*Figure 13*). En effet, les réplicas obtenus par la suite ont un profil protéique différent des deux premiers échantillons. Même si les échantillons ont été réalisés avec le même protocole et les mêmes cellules, la différence dans le profil protéique observé par Western Blot ne permet pas d'analyser les échantillons d'une même condition ensemble. L'analyse des réplicas entraînerait l'identification de protéines comme l'histone H3 ou d'une très grande quantité de BiP dans certains réplicas non traités (*Figures 13B*) alors que l'histone H3 n'est pas présente dans les deux premiers réplicas et que la quantité de BiP est plus faible également dans ces réplicas (*Figures 13A*). Cette différence ne permet pas de déterminer si l'histone H3 doit être présente ou non dans la condition contrôle et donc si sont identifiées dans la condition où la formation des MDVs est dû à la formation des MDVs ou non. Aucune hypothèse n'a pu être émise pour comprendre cette différence entre les réplicas d'une même condition. Ces difficultés ont fait que l'analyse des échantillons n'a pas été poursuivie.

Même si l'analyse par spectrométrie de masse des mitochondries n'a pas pu être réalisée, l'étude de protéines associées dans la maladie de Parkinson, potentiellement impliquées dans MitAP, peut être vérifiée avec un test de présentation antigénique. C'est le cas de la protéine DJ1. L'inhibition de DJ1 a entraîné une inhibition de MitAP mais pas de la présentation de peptides issus du cytoplasme (*Figure 14*). Ce résultat suggère que DJ1 est impliquée spécifiquement dans MitAP. DJ1 étant connu pour être muté chez des patients parkinsoniens (13,61), son rôle répresseur envers MitAP associe une nouvelle fois cette voie de présentation à la maladie de Parkinson. Toutefois, d'autres expérimentations doivent être faites afin de définir l'action de DJ1 dans la formation des MDVs. Pour cela, une étude par immunofluorescence de la localisation de DJ1 dans la cellule lors de la formation des MDVs ainsi

que l'étude des MDVs lors de l'inhibition de DJ1 pourraient apporter des réponses à cette question. L'analyse en immunofluorescence ainsi que le test de présentation antigénique utilisé pour DJ1 auraient été réalisés sur les protéines issues de l'analyse par spectrométrie de masse du protéome mitochondriale si nous avions été en mesure de poursuivre nos analyses.

Les études de MitAP dans son implication dans la maladie de Parkinson ont été réalisées grâce à un système où la glycoprotéine B (gB) du virus Herpes simplex I est exprimée au niveau de la mitochondrie de la cellule RAW 264.7. Le traitement des cellules par notamment le LPS entraîne la présentation à la surface de peptide de la glycoprotéine B. Déjà connu pour être impliquée dans la cirrhose biliaire primitive (44), la 2-oxoglutarate déshydrogénase (OGDH) a également été identifiée comme étant présentée à la surface des cellules dans notre modèle cellulaire. La gB mitochondriale et l'OGDH sont toutefois les deux seules protéines mitochondriales connues pour générer des peptides présentés sur des molécules de CMH de classe I et qui peuvent activer des lymphocytes T. L'identification d'autres protéines mitochondriales fournissant des peptides antigéniques permettrait de définir les peptides pathogènes de la maladie de Parkinson et potentiellement de cibler la population de lymphocytes spécifiques à ces peptides qui sont responsables de la mort des neurones. L'étude de l'immunopeptidome mitochondrial dans le modèle de cellule RAW 264.7 permettrait d'identifier *in vitro* ces peptides qui pourront par la suite potentiellement être associés à la maladie de Parkinson.

L'étude des peptides mitochondriaux a consisté également à trouver les meilleures conditions d'isolation des peptides afin d'optimiser la détection des peptides mitochondriaux qui sont de faibles niveaux comparés à l'ensemble de l'immunoprotéome d'une cellule. Le test des deux techniques les plus utilisées pour l'isolation de l'immunopeptidome, c'est-à-dire l'élution acide moyenne et l'immunoisolation des CMH, a permis de déterminer que l'immunoisolation des CMH était plus efficace pour récupérer les peptides de CMH I sur une lignée primaire de cellules dendritiques (*Figure 15*). Cette technique a déjà été prouvée pour être plus efficace que l'élution acide avec d'autres types cellulaires donc le résultat obtenu était attendu (55). Toutefois, la portion de peptides CMH de classe I par rapport à l'ensemble des peptides récupérés est assez faible. Le problème avec cette faible proportion est que la

présence de ces peptides ne provenant pas de CMH de classe I empêche la détection des peptides de CMH de classe I qui sont en faible quantité. En effet, dans une analyse par spectrométrie de masse, plus l'échantillon est complexe, moins il sera possible de détecter les peptides en faible abondance. Les peptides mitochondriaux étant faiblement présentés à la surface, la complexité d'échantillons pourrait être un problème dans leur détection.

La culture primaire de cellules dendritiques a été choisie initialement, car les cellules dendritiques sont considérées comme les meilleures cellules présentatrices d'antigène de l'organisme (69). Mais ayant obtenu un taux faible de peptides de CMH de classe I, la question du choix des cellules s'est posée. Utilisant les macrophages RAW comme modèle d'étude pour MitAP, l'immunoisolation a été testée avec cette lignée cellulaire. Étonnamment, un meilleur taux de peptides de CMH de classe I a pu être récupéré avec les macrophages que les cellules dendritiques (*Figure 16*). Cette différence est peut-être due à la réalisation de la lignée primaire de cellules dendritiques. En effet ces cellules sont obtenues par la différenciation de cellules issues de la moelle osseuse de souris et le taux de cellules différenciées en cellules dendritiques n'atteint que 65 % (*Figure 16A*). La présence d'autres cellules non différenciées en cellules dendritiques pourrait altérer l'isolation des peptides de CMH. Ces résultats restent du moins à être répliqués pour confirmer l'utilisation des macrophages dans l'immunoisolation des peptides de CMH de classe I. Par la suite, les échantillons de cellules traitées au LPS pour induire MitAP devront être réalisés afin de comparer l'immuno-peptidome et identifier les peptides mitochondriaux qui sont nouvellement présentés et qui pourraient être impliqués dans la maladie de Parkinson.

6 Conclusion et Perspectives

Les deux projets avaient pour but d'obtenir plus d'informations sur la voie moléculaire de MitAP et de voir si de nouvelles associations avec la maladie de Parkinson pouvaient être faites. Même si des pistes ont pu être initiées, par exemple la protéine DJ1, les deux projets n'ont pas pu être aboutis lors de ma maîtrise. L'étude du protéome mitochondriale lors de la formation a connu des limitations techniques au niveau de la reproductibilité dans le temps des échantillons qui n'a pu être réglé. Quant au projet d'identification de l'immunoprotéome mitochondriale, des expériences doivent être encore réalisées pour pouvoir poursuivre l'étude. Néanmoins, ce travail a permis de mettre en lumière des points essentiels dans l'étude de MitAP tels que le choix du traitement pour induire MitAP ou encore l'impact du modèle cellulaire pour l'étude de l'immunopeptidome.

Mais si le protocole d'isolation des mitochondries a été suspendu à cause de la reproductivité du protocole, d'autres moyens d'isoler les mitochondries pourraient être envisagés. Tout d'abord, il serait possible de changer de lignée cellulaire. En effet, le laboratoire de Michel Desjardins possède d'autres cellules comme une lignée de fibroblaste embryonnaire de souris qui a été démontré comme étant capable d'effectuer MitAP (51). Peut-être que l'isolation des mitochondries dans cette lignée serait plus stable et donc permettrait de pouvoir réaliser le nombre de triplicatas suffisant.

Une autre alternative consisterait à utiliser des macrophages RAW exprimant gB au niveau de la mitochondrie, mais couplé également à une GFP. La présence de GFP à gB permettrait d'obtenir des mitochondries GFP positives et ainsi permettrait d'envisager une isolation des mitochondries par FACS (70). De plus, il est possible qu'avec cette construction les MDVs issues des mitochondries GFP positives deviennent également GFP positives. Ainsi, en prenant en compte leur taille, il serait peut-être possible d'isoler ces vésicules GFP positives par FACS et ainsi étudier directement la composition des MDVs.

Enfin une troisième expérimentation pourrait être envisagée : il s'agit de l'utilisation de la Bio-ID (71). La Bio-ID consiste à associer une enzyme biotinyante à la protéine étudiée afin de marquer par biotine toutes les protéines qui interagissent avec cette protéine. L'association de

cette enzyme avec gB permettrait de biotyniler toutes les protéines à proximité de gB dans la mitochondrie et lors de son recrutement dans les MDVs. De plus, étant une technique pouvant étudier des systèmes dynamiques dans le temps (72), il serait également possible de marquer les protéines interagissant avec gB à différents moments du mécanisme moléculaire : la formation des MDVs, leur transport ainsi que le moment de fusion avec le lysosome.

Concernant le projet d'identification des peptides mitochondriaux, le protocole doit être encore d'approfondir afin d'optimiser la détection des peptides mitochondriaux. Une fois les peptides mitochondriaux identifiés, il serait intéressant de vérifier leur présence par immunofluorescence dans les MDVs. De plus, afin de vérifier que les peptides mitochondriaux identifiés se retrouvent présentés uniquement par les MDVs, une nouvelle étude de l'immunopeptidome pourrait être faite avec l'inhibition de la formation des MDVs. La validation dans le modèle in vivo de la présence des peptides mitochondriaux sur les cellules ainsi que la capacité des lymphocytes à reconnaître ces peptides seraient une étape cruciale pour valider l'implication des peptides mitochondriaux dans l'activation du système immunitaire.

L'étude des peptides mitochondriaux permettra potentiellement d'identifier d'autres protéines impliquées dans MitAP. Les peptides offrent également la possibilité d'élaborer des nouvelles pistes thérapeutiques. En effet, comme les lymphocytes détectent spécifiquement un peptide, il existe potentiellement une population de lymphocytes spécifiques aux peptides mitochondriaux qui pourraient être ciblés avec un tétramère (73) afin d'être éliminée et ainsi empêcher leur migration dans le cerveau et la mort des neurones qui présenteraient ces peptides mitochondriaux.

Références bibliographiques

1. Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1 mai 2002;14(2):223-36.
2. Goetz CG. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 9 janv 2011;1(1):a008862.
3. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*. 1 mars 2006;5(3):235-45.
4. Lonneke ML, Breteler M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. Juin 2016;5(6):525-35.
5. Alves G, Müller B, Herlofson K, HogenEsch I, Telstad W, Aarsland D, et al. Incidence of Parkinson's disease in Norway: the Norwegian ParkWest study | *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;(80):851-7.
6. Linder J, Stenlund H, Forsgren L. Incidence of Parkinson's disease and parkinsonism in northern Sweden: A population-based study - Linder - 2010 - *Movement Disorders* - Wiley Online Library. *Mouv Disord*. 24 févr 2010;23(3):341-8.
7. Stark AK, Pakkenberg B. Histological changes of the dopaminergic nigrostriatal system in aging. *Cell Tissue Res*. oct 2004;318(1):81-92.
8. Tysnes O-B, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2017;124(8):901-5.
9. Deng H, Wang P, Jankovic J. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res Rev*. 1 mars 2018;42:72-85.
10. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*. 27 juin 1997;276(5321):2045-7.
11. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, et al. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *The Lancet*. 29 janv 2005;365(9457):415-6.
12. Martin I, Kim JW, Dawson VL, Dawson TM. LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2014;131(5):554-65.
13. Hernandez DG, Reed X, Singleton AB. Genetics in Parkinson disease: Mendelian vs. non-Mendelian inheritance. *J Neurochem*. oct 2016;139(Suppl 1):59-74.

14. Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 1 mars 2003;24(2):197-211.
15. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*. août 1997;388(6645):839.
16. Deng H, Yuan L. Genetic variants and animal models in SNCA and Parkinson disease. *Ageing Res Rev*. 1 mai 2014;15:161-76.
17. Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, et al. Increased Expression of α -Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering after Endocytosis. *Neuron*. 14 janv 2010;65(1):66-79.
18. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, et al. In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 mars 2011;108(10):4194-9.
19. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*. janv 2013;20(1):31-42.
20. Pickrell AM, Youle RJ. The Roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron*. 21 janv 2015;85(2):257-73.
21. Rüb C, Wilkening A, Voos W. Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell Tissue Res*. janv 2017;367(1):111-23.
22. Kitada T, Pisani A, Karouani M, Haburcak M, Martella G, Tscherter A, et al. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of parkin-/- mice. *J Neurochem*. juill 2009;110(2):613-21.
23. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*. 27 mai 2005;308(5726):1314-8.
24. Su X, Federoff HJ. Immune Responses in Parkinson's Disease: Interplay between Central and Peripheral Immune Systems. *BioMed Res Int [Internet]*. 2014 [cité 22 avr 2019];2014. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005076/>
25. Stone DK, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE. Innate and Adaptive Immunity for the Pathobiology of Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal*. sept 2009;11(9):2151-66.
26. Joshi N, Singh S. Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology. *J Neurosci Res*. 2018;96(3):379-90.
27. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*. 1 mars 2010;37(3):510-8.

28. Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL. Basic Neurochemistry [Internet]. 8e éd. Elsevier; 2012 [cité 17 juin 2019]. 1120 p. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C2009000066X>
29. Doty KR, Guillot-Sestier M-V, Town T. The role of the immune system in neurodegenerative disorders: adaptive or maladaptive? *Brain Res.* 18 août 2015;1617:155-73.
30. Sanchez-Guajardo V, Tentillier N, Romero-Ramos M. The relation between α -synuclein and microglia in Parkinson's disease: Recent developments. *Neuroscience.* 27 août 2015;302:47-58.
31. Hisanaga K, Asagi M, Itoyama Y, Iwasaki Y. Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+ T cells in Parkinson disease. *Arch Neurol.* oct 2001;58(10):1580-3.
32. Benner EJ, Mosley RL, Destache CJ, Lewis TB, Jackson-Lewis V, Gorantla S, et al. Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci.* 22 juin 2004;101(25):9435-40.
33. Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, et al. Infiltration of CD4⁺ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest.* 5 janv 2009;119(1):182-92.
34. Sommer A, Marxreiter F, Krach F, Fadler T, Grosch J, Maroni M, et al. Th17 Lymphocytes Induce Neuronal Cell Death in a Human iPSC-Based Model of Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell.* 5 juill 2018;23(1):123-131.e6.
35. Reynolds AD, Banerjee R, Liu J, Gendelman HE, Mosley RL. Neuroprotective activities of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J Leukoc Biol.* 2007;82(5):1083-94.
36. Benkler M, Agmon-Levin N, Hassin-Baer S, Cohen OS, Ortega-Hernandez O-D, Levy A, et al. Immunology, Autoimmunity, and Autoantibodies in Parkinson's Disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 1 avr 2012;42(2):164-71.
37. Papachroni KK, Ninkina N, Papapanagiotou A, Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Papadimitriou A, et al. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2007;101(3):749-56.
38. Zappia M, Crescibene L, Bosco D, Arabia G, Nicoletti G, Bagalà A, et al. Anti-GM1 ganglioside antibodies in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2002;106(1):54-7.
39. Chen S, Le WD, Xie WJ, Alexianu ME, Engelhardt JI, Siklós L, et al. Experimental Destruction of Substantia Nigra Initiated by Parkinson Disease Immunoglobulins. *Arch Neurol.* 1 août 1998;55(8):1075-80.

40. English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol.* mai 2009;10(5):480-7.
41. Neefjes J, Jongasma MLM, Bakke O, Paul P. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* déc 2011;11(12):nri3084.
42. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med.* 1 mai 1976;143(5):1283-8.
43. Deretic V. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 1 oct 2005;26(10):523-8.
44. Hirschfield GM, Gershwin ME. The Immunobiology and Pathophysiology of Primary Biliary Cirrhosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 24 janv 2013;8(1):303-30.
45. Björkland A, Mendel-Hartvig I, Nelson BD, Tötterman TH. Primary Biliary Cirrhosis (PBC): Characterization of a Monoclonal Antibody (PBC-MoAb) having Specificity Identical with Disease-Associated Auto-antibodies. *Scand J Immunol.* 1991;33(6):749-53.
46. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature.* juin 2006;441(7097):1157.
47. Sugiura A, McLelland G-L, Fon EA, McBride HM. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J.* 1 oct 2014;33(19):2142-56.
48. McLelland G-L, Soubannier V, Chen CX, McBride HM, Fon EA. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J.* 18 févr 2014;33(4):282-95.
49. Lundmark R, Carlsson SR. SNX9 – a prelude to vesicle release. *J Cell Sci.* 1 janv 2009;122(1):5-11.
50. Norton M, Ng AC-H, Baird S, Dumoulin A, Shutt T, Mah N, et al. ROMO1 Is an Essential Redox-Dependent Regulator of Mitochondrial Dynamics. *Sci Signal.* 28 janv 2014;7(310):ra10-ra10.
51. Matheoud D, Sugiura A, Bellemare-Pelletier A, Laplante A, Rondeau C, Chemali M, et al. Parkinson's Disease-Related Proteins PINK1 and Parkin Repress Mitochondrial Antigen Presentation. *Cell.* 14 juill 2016;166(2):314-27.
52. Mathéoud D, Cannon T, Voisin A, Penttinen A-M, Ramet L, Fahmy A, et al. Intestinal infection in Pink1 knockout mice triggers mitochondrial autoimmunity and Parkinson's disease-like symptoms. *Nature.* 2019;

53. Logsdon AF, Erickson MA, Rhea EM, Salameh TS, Banks WA. Gut reactions: How the blood–brain barrier connects the microbiome and the brain. *Exp Biol Med.* 1 janv 2018;243(2):159-65.
54. Sims S, Willberg C, Klenerman P. MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells. *Expert Rev Vaccines.* juill 2010;9(7):765-74.
55. Lanoix J, Durette C, Courcelles M, Cossette É, Comtois-Marotte S, Hardy M-P, et al. Comparison of the MHC I Immunopeptidome Repertoire of B-Cell Lymphoblasts Using Two Isolation Methods. *PROTEOMICS.* 2018;18(12):1700251.
56. Laumont CM, Vincent K, Hesnard L, Audemard É, Bonneil É, Laverdure J-P, et al. Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci Transl Med.* 5 déc 2018;10(470):eaau5516.
57. Matheoud D, Cannon T, Voisin A, Penttinen A-M, Ramet L, Fahmy AM, et al. Intestinal infection triggers Parkinson’s disease-like symptoms in Pink1-/- mice. *Nature.* 2019;571(7766):565-9.
58. Takahashi-Niki K, Niki T, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. Transcriptional Regulation of DJ-1. In: Ariga H, Iguchi-Ariga SMM, éditeurs. *DJ-1/PARK7 Protein: Parkinson’s Disease, Cancer and Oxidative Stress-Induced Diseases* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2017 [cité 4 juill 2019]. p. 89-95. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_7
59. Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JP-Y. DJ-1, a cancer- and Parkinson’s disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci.* 10 oct 2006;103(41):15091-6.
60. Ishikawa S, Taira T, Takahashi-Niki K, Niki T, Ariga H, Iguchi-Ariga SMM. Human DJ-1-specific Transcriptional Activation of Tyrosine Hydroxylase Gene. *J Biol Chem.* 17 déc 2010;285(51):39718-31.
61. Bonifati V, Rizzu P, Baren MJ van, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science.* 10 janv 2003;299(5604):256-9.
62. Perier C, Bové J, Dehay B, Jackson-Lewis V, Rabinovitch PS, Przedborski S, et al. Apoptosis-inducing factor deficiency sensitizes dopaminergic neurons to parkinsonian neurotoxins. *Ann Neurol.* août 2010;68(2):184-92.
63. Schumacher F-R, Delamarre L, Jhunjhunwala S, Modrusan Z, Phung QT, Elias JE, et al. Building proteomic tool boxes to monitor MHC class I and class II peptides. *PROTEOMICS.* 2017;17(1-2):1600061.

64. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. mars 2002;2(3):151.
65. Maffei A, Harris PE. Peptides Bound to Major Histocompatibility Complex Molecules. *Peptides*. 1 janv 1998;19(1):179-98.
66. Wong YC, Ysselstein D, Krainc D. Mitochondria–lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. *Nature*. févr 2018;554(7692):382-6.
67. Hattori N, Arano T, Hatano T, Mori A, Imai Y. Mitochondrial-Associated Membranes in Parkinson’s Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2017;997:157-69.
68. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J-L, Mignotte B. The Mitochondrial Pathways of Apoptosis. In: Scatena R, Bottoni P, Giardina B, éditeurs. *Advances in Mitochondrial Medicine* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012 [cité 19 août 2019]. p. 157-83. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_7
69. Mellman I. Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunol Res*. 1 sept 2013;1(3):145-9.
70. Satori CP, Kostal V, Arriaga EA. Review on Recent Advances in the Analysis of Isolated Organelles. *Anal Chim Acta*. 13 nov 2012;753:8-18.
71. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*. 19 mars 2012;196(6):801-10.
72. Savitski MM, Zinn N, Faeltsh-Savitski M, Poeckel D, Gade S, Becher I, et al. Multiplexed Proteome Dynamics Profiling Reveals Mechanisms Controlling Protein Homeostasis. *Cell*. 22 2018;173(1):260-274.e25.
73. Xu X-N, Screaton GR. MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function. *J Immunol Methods*. 1 oct 2002;268(1):21-8.