

Université de Montréal

**La modulation du métabolisme cellulaire par l'E3 Ubiquitine Ligase
MARCH-1**

Par Antoine Sabourin

Département d'infectiologie, microbiologie et d'immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade *Magister Scientiae* (M.Sc) en microbiologie et immunologie.

Septembre 2015

© Antoine Sabourin, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire s'intitule :
**La modulation du métabolisme cellulaire par l'E3 Ubiquitine Ligase
MARCH-1**

Présenté par Antoine Sabourin

Directeur de recherche : Dr. Jacques Thibodeau

Septembre 2015

© Antoine Sabourin, 2015

Résumé

La relocalisation et la dégradation médiée par ubiquitination sont utilisées par la cellule pour contrôler la localisation et l'expression de ses protéines. L'E3 ubiquitine ligase MARCH1 est impliqué dans la régulation post-traductionnelle de CMH-II et de CD86.

Dans ce mémoire, on propose un rôle additionnel à MARCH1. Nos résultats expérimentaux nous portent à croire que MARCH1 pourrait moduler le métabolisme cellulaire en favorisant la relocalisation et la dégradation d'enzymes impliquées dans la glycolyse.

La grande majorité des cellules utilise la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP en présence d'oxygène. Dans un environnement hypoxique, cette dernière est non fonctionnelle et la cellule doit utiliser la glycolyse anaérobique pour produire son ATP.

Une cellule cancéreuse a des besoins énergétiques supérieurs en raison de l'augmentation de sa biomasse et de sa prolifération incontrôlée. Pour subvenir à ces besoins, elle maximise sa production d'énergie en modifiant son métabolisme; c'est l'effet Warburg. On retrouve dans les cellules immunitaires des modifications similaires au métabolisme cellulaire suite à un signal d'activation.

Ici, nous montrons que la respiration mitochondriale maximale, la réserve respiratoire et la glycolyse maximale sont diminuées dans les cellules présentatrice d'antigènes qui expriment MARCH1. Nous avons montré que MARCH1 était localisable au niveau de la mitochondrie, ce qui lui permet d'interagir avec les enzymes de la glycolyse. Finalement, nous avons quantifié l'expression de Eno1 et de LDHB par *Western Blot*, pour montrer une augmentation de l'expression de ces enzymes en absence de MARCH1.

À la lumière de ces résultats, nous discutons des avantages que procure la diminution de l'expression de MARCH1 dans un contexte inflammatoire, suite à l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. Ce phénomène permettrait une présentation antigénique plus efficace, une augmentation de la production d'énergie et une meilleure résistance aux ROS produits lors de la réponse inflammatoire.

Mots clés : Métabolisme, MARCH1, Ubiquitine ligase, Présentation antigénique, Glycolyse, Phosphorylation oxydative, Effet Warburg.

Abstract

Relocation and degradation mediated by ubiquitination are used by the cell to control the localization and the expression of proteins. E3 ubiquitin ligase MARCH1 is known to be involved in post-translational regulation of MHC-II and CD86. In this thesis, we suggest an additional role to MARCH1. Our experimental results lead us to believe that MARCH1 may modulate cellular metabolism by promoting the relocation and degradation of enzymes involved in glycolysis.

The vast majority of cells generate ATP from oxidative phosphorylation in presence of oxygen. In a hypoxic environment, the latter is non-functional and the cell must use the anaerobic glycolysis to produce ATP.

A cancerous cell requires more energy due to increased biomass and its uncontrolled proliferation. To meet these needs, it maximizes its energy production regardless of oxygen concentrations. Many studies have shown that aerobic glycolysis is preferred to oxidative phosphorylation in cancer cells, even if the two pathway are used simultaneously; it is described as the Warburg effect. Similar modification of the cellular metabolism is also found in immune cells after an activation signal to fulfill the cell functions.

Here we show that the maximal mitochondrial respiration, the respiratory reserves and the maximal glycolysis are reduced in antigen-presenting cells that express MARCH1. Furthermore, we showed that MARCH1 can be localized on the mitochondria to interact with its target. Finally, we quantified the expression of Eno1 and LDHB by Western blot to show an increased expression of these enzymes in the absence of MARCH1.

Thus, we discuss the benefits of the expression reduction of MARCH1 in an inflammatory context, following the activation of antigen presenting cells. This phenomenon would allow a better antigen presentation, an increased energy production and a greater resistance to ROS, produced during the inflammatory response.

Key words : Metabolism, MARCH1, Ubiquitine ligase, Antigen presentation, Glycolysis, oxydative phosphorylation, Warburg effet.

Table des matières

Résumé

Abstract

Mots-clés

Table des matières

Listes des figures

Abréviations

Chapitre 1 : Revue de littérature

1.0 Le métabolisme et la réponse immunitaire

1.1 La présentation antigénique et sa régulation par l'ubiquitine ligase MARCH1

1.1.1 La présentation antigénique par le complexe d'histocompatibilité de la classe II

1.1.2 La modulation de la présentation antigénique par ubiquitination

1.1.3 La famille de l'E3 ubiquitine ligase MARCH1

1.1.4 Les différentes cibles connues de MARCH1

1.2 La modulation de l'expression de MARCH1

1.2.1 L'expression constitutive de MARCH1 est spécifique aux cellules présentatrices d'antigènes

1.2.2 L'induction de MARCH1 par l'Interleukine-10

1.2.3 L'effet de la stimulation des TLRs sur l'expression de MARCH1

1.2.4 Forcer l'expression transitoire de MARCH1 dans une lignée cellulaire par transfection

1.3 La souris MARCH1 KO

1.3.1 Obtention de la souris

1.3.2 Phénotype de la souris

1.3.3 La souris MHC-II KI

1.3.4 Utilisation des splénocytes et des cellules dérivées de la moelle osseuse

1.3.5 Les cellules B, les DCs immatures et les macrophages expriment MARCH1

1.3.6 La macropinocytose pour purifier les cellules dendritiques immatures (iDCs)

1.4 La modulation du métabolisme cellulaire

1.4.1 Le métabolisme cellulaire basal

1.4.2 La phosphorylation oxydative et la chaîne de transport d'électron de la membrane mitochondriale

1.4.3 La glycolyse anaérobie

1.4.4 Le métabolisme des cellules immunitaires

1.4.5 L'effet Warburg

1.4.6 La quantification de l'utilisation des différentes voies métaboliques par analyse de flux extracellulaires

1.4.7 Le taux de consommation d'oxygène pour quantifier la phosphorylation oxydative

1.4.8 L'acidification du milieu extracellulaire pour quantifier la glycolyse

1.5 Mise au point concernant l'utilisation de GM-CSF pour différencier les progéniteurs de la moelle osseuse

1.6 Hypothèses et objectifs

Chapitre 2 Matériels et méthodes

2.1 Anticorps

2.2 Souris

2.3 Plasmides

2.4 Culture cellulaire et transfections

2.5 Cellules dérivées de la moelle osseuse

2.6 Isolation des cellules par macropinocytose

2.7 Préparation des splénocytes

2.8 qPCR en temps réel

2.8 Microscopie confocale

2.9 Coloration spécifique des mitochondries

2.10 Western Blot

2.11 Analyseur de flux extracellulaire

2.12 Quantification de la consommation de glucose et production de lactate

Chapitre 3 Résultats

3.1 MARCH1 diminue la glycolyse et la respiration mitochondriale maximale lorsqu'elle est surexprimée dans une lignée cellulaire

3.2 MARCH1 diminue la respiration maximale et la réserve respiratoire dans les cellules primaires

3.3 MARCH1 diminue la respiration maximale et la réserve respiratoire dans les BMDCs immatures

3.4 Le nombre de mitochondries n'est pas influencé par MARCH1 dans les cellules présentatrices d'antigènes

3.5 La production de lactate et la consommation de glucose sont influencées par l'expression de MARCH1

3.6 MARCH1 peut être localisé aux mitochondries

3.7 L'expression de certaines enzymes de la glycolyse est diminuée en présence de MARCH1

Chapitre 4 Discussion

Chapitre 5 Conclusion

Chapitre 6 Références

Liste des figures

Figure 1.1 Synthèse du complexe peptide-CMH-II et présentation antigénique

Figure 1.2 La dégradation du CMH-II médiée par ubiquitination dans les cellules présentatrices d'antigènes

Figure 1.3 Mécanisme d'ubiquitination

Figure 1.4 Représentation des événements qui mènent à la régulation de MARCH1 dans une CPA

Figure 1.5 Quantification relative du nombre de copies de MARCH1 dans différentes populations cellulaires

Figure 1.6 Représentation de la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas

Figure 1.7 Représentation schématique de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative via la chaîne de transport d'électrons

Figure 1.8 L'effet Warburg

Figure 1.9 Représentation schématique du métabolisme lié à la production d'ATP

Figure 1.10 Profil de caractérisation de la respiration mitochondriale

Figure 1.11 Profil de caractérisation de la glycolyse

Figure 3.1 L'expression transitoire de MARCH1 diminue la glycolyse et la respiration maximale

Figure 3.2 MARCH1 diminue la respiration maximale dans les splénocytes et les BMDMs

Figure 3.3 La respiration maximale et la glycolyse maximale sont diminuées dans les cellules C57BL/6 CD11c⁺ Dextran^{élevé}

Figure 3.4 Le nombre de mitochondrie n'est pas influencé par MARCH1 dans les cellules présentatrices d'antigènes

Figure 3.5 Consommation de glucose et production de lactate dans différentes cellules présentatrices d'antigènes, en absence et en présence de MARCH1

Figure 3.6 Patron de localisation cellulaire visualisé en microscopie confocale montrant la localisation partielle de MARCH1 aux mitochondries

Figure 3.7 L'expression des enzymes LDHB et Eno1 semble être augmentée dans les cellules qui n'expriment pas MARCH1

Abréviations

ATP - Adénosine triphosphate
BCR - Récepteur de cellules B
BMDM - Macrophages dérivée de la moelle osseuse
BMDC - Cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse
cDC - Cellule dendritique conventionnelle
CDP - Cellule dendritique commune
CMH-II - Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA - Cellules présentatrices d'antigènes
CIITA- CMH-II trans-activateur
DEN - Diethylnitrosamine
ECAR - Taux d'acidification du milieu extracellulaire
Eno1 - Enolase 1
ETC - Chaîne de transport d'électrons
FBS - Sérum de veaux foetal
FCCP - Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
HIF-1 - Facteur d'hypoxie inductible
HNE - 4-hydroxynonanal
iDC - Cellule dendritique immature
Ii - Chaîne invariante
IL-10 - Interleukine -10
LDHB - Lactate déhydrogénase B
MARCH1 - *Membrane-associated Ring-CH 1*
MITOL - Ubiquitine ligase mitochondriale
M1-YFP - MARCH1-YFP
M1-KO - MARCH1-KO
NO - Oxyde nitrique
OCR - Taux de consommation d'oxygène
OXPHOS - Phosphorylation oxydative
PAMPs - Patrons moléculaires associés aux pathogènes
p-CMH-II - peptide-Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
PKM2 - Pyruvate kinase 2
RE - Réticulum endoplasmique
TCR - Récepteur de cellules T
Treg - Cellule T régulatrice
TfR - Récepteur à transferrine
2-DG - 2-Deoxyglucose

Chapitre 1 Revue de littérature

Un métabolisme cellulaire adéquat est nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. La notion de métabolisme est très vaste. Ce terme décrit l'ensemble des réactions cataboliques et anaboliques au sein de la cellule qui mènent, parmi tant d'autres, à la production d'adénosine triphosphate (ATP), la synthèse de protéines, la dégradation de lipides et de glucides et la synthèse d'acides aminés et d'acides gras. De plus en plus d'évidences montrent un lien étroit entre le développement de multiples pathologies et différentes altérations du métabolisme. Parmi les principales pathologies associées à ces troubles métaboliques, on retrouve l'obésité, le diabète et le cancer, chacune affichant des altérations métaboliques spécifiques^{1, 2}. La pathologie qui a certainement été la plus décrite et documentée dans les dernières années est le cancer. Les travaux d'Otto Warburg, biochimiste allemand et lauréat du prix Nobel de physiologie et médecine en 1931, sont les premiers à sous-entendre des modifications du métabolisme cellulaire chez la cellule cancéreuse.

À l'état de repos et en présence d'oxygène, la grande majorité des cellules utilisent la phosphorylation oxydative (OXPHOS) aux dépens de la glycolyse pour produire de l'énergie. Cette réaction se fait dans la mitochondrie, et ce, uniquement en présence d'oxygène, nécessaire au fonctionnement de cette voie métabolique. En condition hypoxique, à défaut de produire de l'ATP dans la mitochondrie, la cellule utilise la glycolyse anaérobie; une réaction moins catabolique que la première, mais capable de maintenir la production d'ATP dans la cellule.

Warburg, dont les travaux ont été poursuivis plus tard par de nombreux scientifiques, avait suggéré que les cellules cancéreuses pouvaient utiliser la glycolyse, simultanément ou indépendamment de la phosphorylation oxydative, et ce même en présence d'oxygène. Il suggérait que les cellules pouvaient faire une glycolyse aérobie³.

Quoique moins efficace en terme de molécules de glucose utilisées par ATP produits, la production d'énergie par glycolyse est beaucoup plus rapide. Lorsque la réserve en glucose n'est pas limitée, il est avantageux pour une cellule aux besoins énergétiques importants d'utiliser cette voie métabolique. La cellule cancéreuse, en prolifération constante, a besoin de cet apport énergétique plus élevé afin de subvenir aux besoins associés à une division incontrôlée. Il en est de

même pour une cellule immunitaire activée, qui doit se différencier, se diviser ou simplement remplir ses fonctions.

L'environnement autour d'une tumeur n'est pas le même que dans un tissu sain; il ressemble plutôt à un tissu inflammé. Les ressources essentielles comme le glucose, la glutamine et l'oxygène se retrouvent en quantité limitée ou à des concentrations qui ne sont pas constantes^{4, 5}. Ces carences et ces variations en nutriments forcent les cellules immunitaires à s'acclimater à l'environnement^{6, 7}, ce qui explique certaines ressemblances métaboliques entre une cellule cancéreuse et une cellule immunitaire activée.

1.0 Le métabolisme et la réponse immunitaire

De plus en plus de publications décrivent le lien étroit entre l'activation et la fonction de différentes cellules immunitaires et les changements métaboliques qui en découlent. Afin de subvenir aux besoins énergétiques que vont nécessiter la prolifération, la différenciation et les diverses fonctions spécifiques, ces cellules vont moduler leur métabolisme afin de maximiser la production d'énergie.

L'ATP, le principal carburant de la cellule, est généré par phosphorylation oxydative et par glycolyse anaérobie. Lorsque les besoins énergétiques de la cellule sont plus importants, la production d'ATP doit être augmentée, et ce, généralement en préférant l'une de ces voies de productions à l'autre³. L'incapacité de subvenir adéquatement aux besoins métaboliques peut se traduire par des irrégularités au sein de la cellule qui peuvent aussi affecter l'ensemble de l'organisme. Un métabolisme trop faible entraîne une réponse inefficace, avec des cellules incapables de remplir leurs fonctions effectrices ou incapables de répondre aux signaux de survie. Dans le cas contraire, une activité métabolique trop élevée peut entraîner une inflammation soutenue et de l'auto-immunité, résultant d'une hyperactivité du système immunitaire⁸. L'impact que ces défauts métaboliques ont sur l'organisme met en évidence l'importance de contrôler et de moduler adéquatement le métabolisme cellulaire.

Notre laboratoire se consacre à l'étude des molécules de présentation antigénique et de leur régulation. Toutefois, des résultats expérimentaux suggèrent des similarités dans la régulation de l'expression des molécules de présentation et des enzymes impliquées dans le métabolisme.

1.1 La présentation antigénique et sa régulation par l'ubiquitine ligase MARCH1

1.1.1 La présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

L'activation des cellules T CD4⁺ spécifiques à un antigène donné nécessite trois signaux d'activation afin d'enclencher la machinerie nécessaire à l'élaboration d'une réponse immunitaire adaptative. Ils sont : 1) la présentation d'un peptide dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) reconnu spécifiquement par le récepteur de cellule T (TCR), 2) une costimulation efficace par les protéines de surface B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) et 3) un contexte inflammatoire induit par des cytokines et des messagers sécrétés au site d'inflammation et en périphérie⁹. Chez l'homme, la présentation antigénique aux cellules T CD4⁺ nécessite l'expression des molécules de présentation dites classiques, que l'on retrouve sous la forme de trois isotypes, HLA-DR, DP et DQ. De plus, l'expression des molécules de présentation dites non-classiques HLA-DM et HLA-DO sont nécessaires à la mise en place du peptide dans la niche peptidique et à la formation du complexe peptide-CMH-II (pCMH-II)¹⁰. Le locus HLA (*Human Leucocyte Antigen*) est une région hautement variable qui se trouve sur le bras court du 6^e chromosome et qui code pour les molécules de classes I, II et III. Les molécules de classe I sont exprimées constitutivement sur toutes les cellules somatiques nucléées contrairement aux molécules de classe II, restreintes aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les molécules de classe III ne sont pas impliquées dans la présentation antigénique, mais codent pour d'autres protéines essentielles à la réponse, dont des protéines du complément¹⁰. Chez la souris, les homologues de ces molécules de présentation de classe II se trouvent sur le locus H2 (*Histocompatibility-2*) et sont nommés H2-IE (homologue à HLA -DR) et H2-IA (HLA-DQ) ainsi que H2-DM et D2-DO¹¹.

L'induction du CMH-II est contrôlée par l'expression du CMH II trans-activateur (CIITA), tout comme l'induction de la chaîne invariante (Ii)¹². CIITA est exprimé constitutivement dans les CPAs uniquement, mais peut être induit par l'INF- γ ¹⁰. L'assemblage du CMH-II se fait au niveau du réticulum endoplasmique (RE) par la combinaison d'une chaîne lourde α et d'une chaîne légère β . Pour quitter le RE, chaque CMH-II $\alpha\beta$ se lie de façon non covalente avec la chaîne invariante Ii, une glycoprotéine qui va masquer le motif de rétention au RE. Cette liaison se fait au niveau de la région CLIP de Ii et de la niche peptidique du CMH-II et permet la sortie des CMH-II vers les endosomes, pour qu'un peptide y soit monté, ou vers la surface de la cellule (Figure 1.1). Une fois aux endosomes, la chaîne invariante est clivée par des protéases, pour ne laisser que la région CLIP dans de la niche peptidique. Dans les endosomes tardifs, le chaperon HLA-DM, régulé par HLA-DO, catalyse l'échange du CLIP avec le peptide qui sera présenté par le CMH-II. HLA-DM possède la capacité d'éditer le répertoire d'antigènes présentés en facilitant l'ancrage des peptides de plus forte affinité dans la niche peptidique¹³⁻¹⁶.

Chacune des cellules présentatrices d'antigènes possède sa propre façon de capturer un antigène pour l'apprêter et le présenter aux cellules T. Une cellule dendritique sera portée à faire un échantillonnage de l'environnement en internalisant de grandes quantités de milieux extracellulaires, par macropinocytose, à la recherche d'une variété de peptides conservés à travers les pathogènes¹⁷. Ces peptides seront dégradés et apprêtés pour ensuite être présentés aux cellules T CD4⁺ par le CMH-II ou aux cellules T CD8⁺ par cross-présentation via le CMH-I^{18, 19}. Évidemment, le type d'interaction a une influence sur le type de réponse immunitaire. Une activation des cellules T CD8⁺ entrainera une réponse effectrice cytotoxique tandis que l'activation d'une cellule T CD4⁺ permettra entre autres l'activation de cellules B spécifiques et une sécrétion d'immunoglobulines spécifiques à l'antigène reconnu.

Contrairement aux DCs, les cellules B sont beaucoup plus spécifiques pour les antigènes qu'ils vont internaliser et dégrader. Les cellules B expriment à leur surface des immunoglobulines spécifiques pour un seul épitope, issues d'un réarrangement de gènes complexe et aléatoire. L'antigène exprimant le peptide spécifique sera reconnu par le clone qui possède l'immunoglobuline de surface capable de reconnaître le peptide. Cette endocytose est dite

médiée par un récepteur de surface, plus précisément par une immunoglobuline ancrée à la membrane²⁰. L'antigène sera ensuite dégradé et présenté aux cellules T CD4. La présentation antigénique par les cellules B est 1000 fois plus efficace lorsque le BCR est spécifique à l'antigène²⁰. Parmi les récepteurs capables de médier l'endocytose d'antigènes, on retrouve aussi les récepteurs Fc²¹.

La phagocytose est aussi un mécanisme d'internalisation d'antigènes que l'on retrouve principalement chez les macrophages et chez les DCs²². Le microorganisme est internalisé dans des phagosomes pour être dégradé suite la fusion des phagosomes tardifs avec les lysosomes. Peut importe la façon d'internaliser l'antigène ou de l'apprêter, la présentation antigénique aux cellules T CD4+ se fait via le complexe pCMH-II.

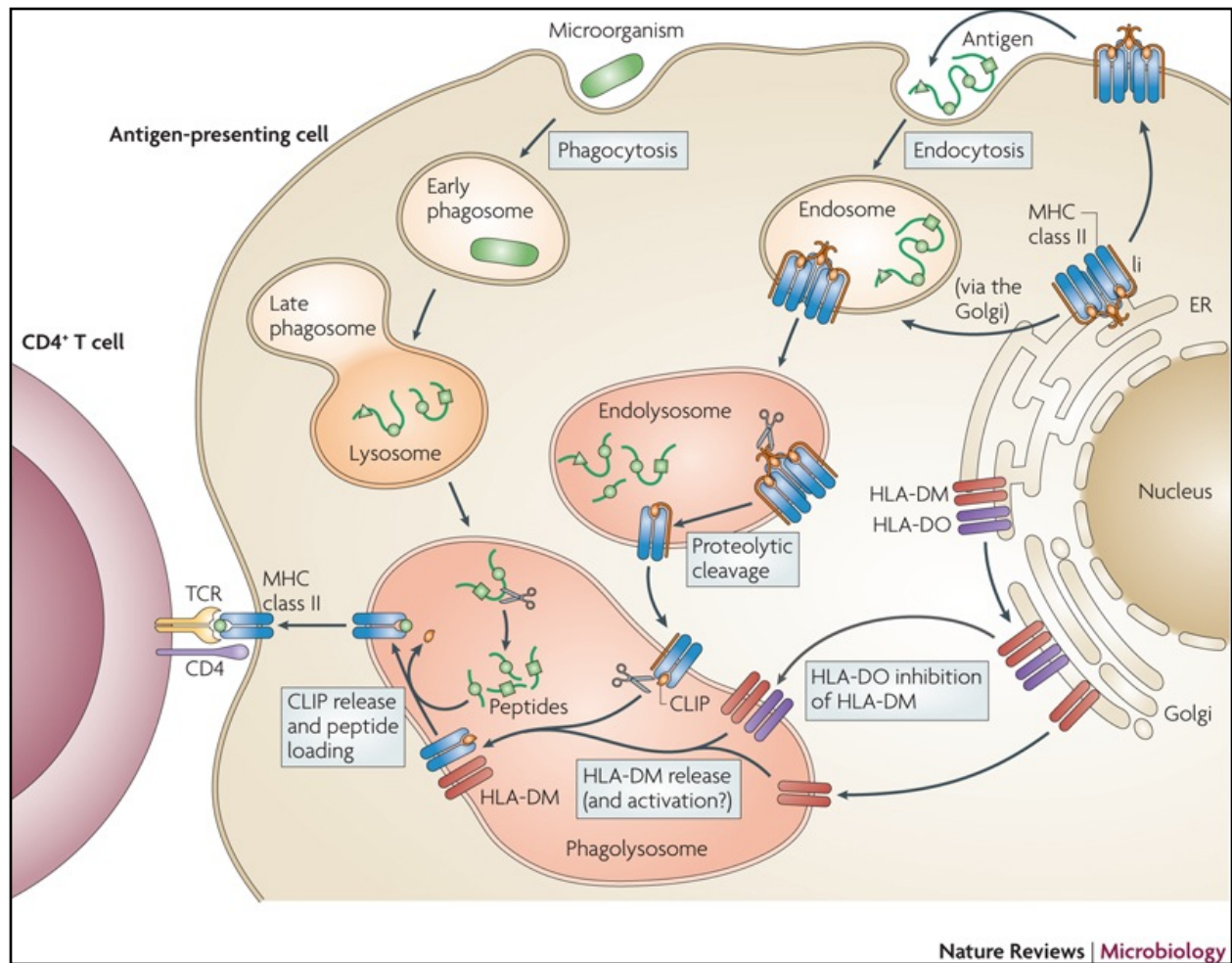


Figure 1.1 Synthèse du complexe peptide-CMH-II et présentation antigénique

L'assemblage du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) a lieu au niveau du réticulum endoplasmique (RE) à partir des chaînes α et β . Le CMH-II $\alpha\beta$ se lie avec la chaîne invariante Ii dans la niche peptidique via le CLIP. Cet hétérotrimère va ensuite s'associer avec 2 autres hétérotrimères, ce qui va permettre le masquage du motif de rétention au RE et la sortie du nonamère vers la membrane cellulaire ou vers les endosomes tardifs via le Golgi. Des protéases présentes dans les endosomes vont cliver une partie de Ii pour ne laisser qu'uniquement la région CLIP dans la niche peptidique. Pour enlever le CLIP de sa niche peptidique, le CMH-II possède un chaperon, HLA-DM (H2-DM chez la souris) qui va catalyser l'échange du CLIP pour un peptide du Soi ou un peptide étranger. HLA-DM possède son propre chaperon, HLA-DO (H2-DO), capable d'inhiber son activité. Lorsqu'un antigène est endocytosé ou phagocyté, il est dégradé par des protéases lysosomales en petits peptides, qui seront échangés avec le CLIP. Une fois le complexe peptide-CMH-II assemblé, il est acheminé en surface pour présenter le peptide aux TCR des cellules T CD4+.

Réimprimée avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology (Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. *Nature Reviews Microbiology* 2010, **8**(4): 296-307.), copyright (2010).

1.1.2 La modulation de la présentation antigénique par ubiquitination

Dans un tissu sain, il n'est pas nécessaire d'avoir de hauts niveaux d'expression de CMH-II en surface des CPA. Mais dans un contexte inflammatoire, une augmentation de l'expression du CMH-II et des molécules de co-stimulation à la surface de la cellule favorise une meilleure efficacité de présentation des antigènes et permet une meilleure réponse adaptative. Cette accumulation de molécules de présentation est déclenchée par la reconnaissance de patrons moléculaires spécifiques conservés chez les pathogènes (PAMPs) ou par une sécrétion de cytokines par l'hôte (IFN- γ)²³.

La régulation de l'expression du CMH-II en surface est contrôlée au niveau transcriptionnel, sous le contrôle de CIITA et au niveau post-traductionnel. Les niveaux d'ARNm codant pour le CMH-II et l'expression de la protéine dépendent de la cellule présentatrice d'antigène et de son état d'activation. Suite à l'activation des cellules B et des cellules dendritiques conventionnelles (cDCs), l'expression de CMH-II augmente via la biosynthèse de nouvelles protéines. Cependant, celle-ci s'arrête assez rapidement après l'activation cellulaire. Il a été démontré que 24h après l'activation, il n'y a plus de nouvelle synthèse de CMH-II²⁴. Ce phénomène s'explique par la

nécessité de pouvoir présenter une multitude de peptides durant la maturation de la cellule pour ensuite restreindre les peptides présentés une fois la maturation terminée. Ainsi, la CPA continue de présenter les peptides de forte affinité, spécifiques aux pathogènes via le recyclage des molécules de CMH-II²⁵. De plus, ce recyclage s'avère essentiel pour permettre la présentation de peptides uniquement générés dans les endosomes par protéolyse²⁶.

Parmi les mécanismes de régulation post-traductionnel, il a été démontré dans les iDCs dérivées de la moelle osseuse que le CMH-II en excès était entreposé dans les compartiments endosomaux ou dégradé dans les lysosomes^{24, 27, 28}. Ces iDCs sont en constante synthèse de CMH-II. En absence de signal de maturation, ces molécules sont ubiquitinées et la grande majorité est dégradée dans les protéasomes²⁹. L'ubiquitination de ces molécules perdure jusqu'au moment de la maturation des DCs, où la perte d'ubiquitination combinée à l'augmentation de la transcription par CIITA, permet l'accumulation de ces molécules en surface. Aussi, la stabilité des CMH-II est fortement augmentée suite à l'activation; l'internalisation de ces molécules est diminuée et la demi-vie du CMH-II est prolongée jusqu'à 100h^{27, 29}.

L'ubiquitination est un mécanisme de régulation post-traductionnel qui permet, entre autres, de réguler l'expression, la translocation et la localisation de certaines protéines dans la cellule. Dans des cas moins classiques, on lui attribue aussi un rôle de réparation de l'ADN et de transduction de signal. Le transfert d'ubiquitine sur une protéine est une réaction réversible qui affecte la stabilité, la localisation et l'activité de celle-ci^{30, 31}. Cette liaison covalente se fait habituellement entre l'ubiquitine et une lysine, mais peut aussi être faite avec une serine, une méthionine, une cystéine ou une thréonine, de façon moins efficace^{32, 33}. Un substrat peut être mono-ubiquitiné ou poly-ubiquitiné et la longueur de la chaîne d'ubiquitination influence la distribution intracellulaire de la protéine ubiquitinée³⁴.

Il était déjà reconnu que l'expression du CMH-II en surface était régulé via une ubiquitination et une relocalisation dans des compartiments endosomaux^{35, 36}, mais jusqu'à récemment, les mécanismes d'ubiquitination du CMH-II restaient encore inconnus. Deux publications distinctes ont finalement permis d'identifier MARCH1 comme la protéine responsable de l'ubiquitination du CMH-II dans les cellules B et dans les cellules dendritiques^{37, 38}.

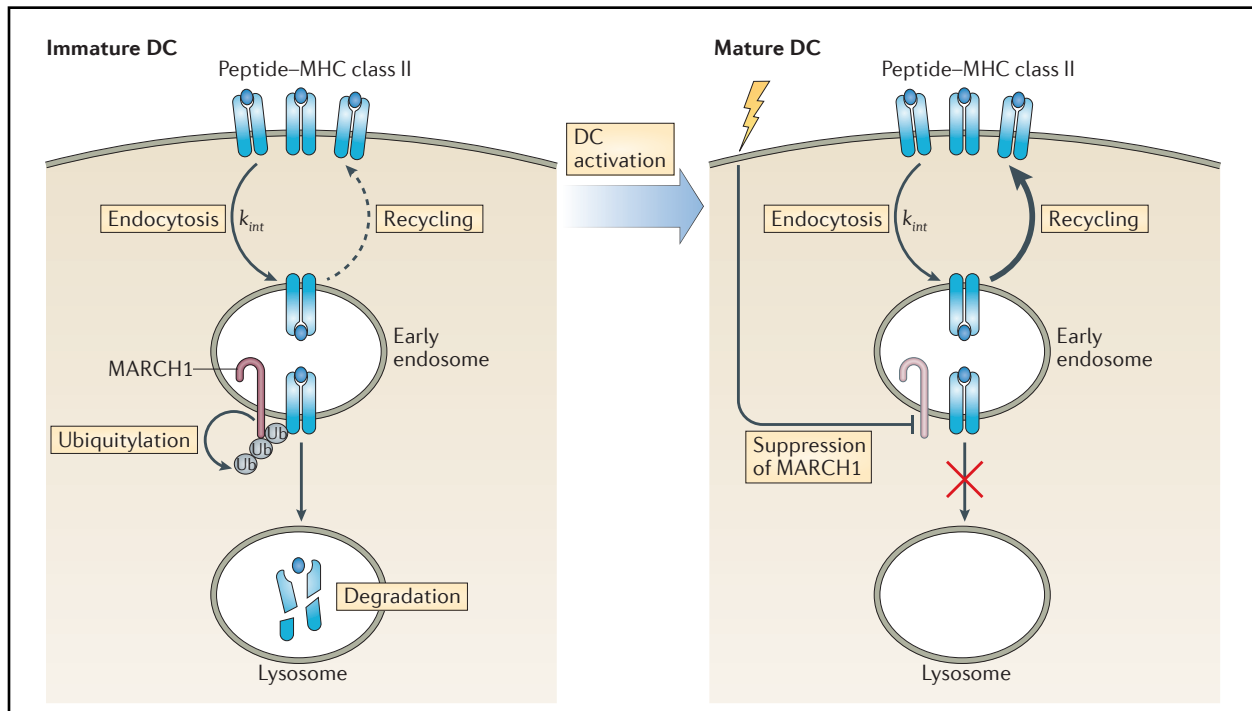


Figure 1.2 La dégradation du CMH-II médiée par ubiquitination dans les cellules présentatrices d'antigènes

Dans une cellule dendritique immature, les complexes peptide-CMH-II ont une demi-vie assez courte. Ces complexes sont rapidement endocytosés et se retrouvent dans les endosomes, en attente de perdre leur ubiquitination, ou bien se retrouvent dans les lysosomes, où ils seront dégradés. La biosynthèse de CMH-II dans les DCs immatures est importante et se traduit par une tout aussi importante dégradation des complexes déjà en surface. Cette nouvelle biosynthèse permet un vaste roulement aléatoire des peptides présentés en surface. L'endocytose des molécules de CMH-II est médiée par l'E3 ubiquitine ligase MARCH1, exprimée constitutivement dans les CPAs. Elle catalyse le transfert d'ubiquitine sur des cibles spécifiques, ce qui résulte en la dégradation ou la relocalisation de celles-ci. Suite à une stimulation qui provoque la maturation de la cellule dendritique, l'expression de MARCH1 est rapidement diminuée, ce qui empêche l'ubiquitination des CMH-II et leur dégradation, favorisant le recyclage des celles-ci.

Réimprimée avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology (Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology* 2015, **15**(4): 203-216.), copyright (2015).

1.1.3 La famille de l'E3 ubiquitine ligase MARCH1

Identifiée comme un des homologues humains des ubiquitines ligases virales K3 et K5, encodées par l'Herpesvirus associé au sarcome de Kaposi (*KSHV*), « *Membrane-associated Really Interesting New Gene-CH-1* » (MARCH1) est une E3 ubiquitine ligase appartenant à la classe des *RING-CH*³⁰. La famille des MARCHs compte 11 membres, qui possèdent tous des cibles, des rôles et des localisations cellulaires différentes, mais dont certains partagent malgré tout quelques similarités. C'est le cas de MARCH1 et de MARCH8, tous deux capables d'ubiquitiner CD86 et CMH-II^{37, 38}. Les différents membres ne sont pas exprimés constitutivement dans toutes les populations cellulaires. Cette expression spécifique dans les différents types cellulaires dépend fortement du rôle qu'ils jouent dans la cellule. En parallèle, la spécificité des protéines ciblées fait en sorte que la localisation dans la cellule n'est pas la même pour tous les membres. Certains se retrouvent aux membranes cellulaires ou dans les endosomes (i.e MARCH1, MARCH8) tandis que d'autres se retrouvent aux membranes mitochondriales (i.e MARCH5). Malgré des localisations parfois différentes, il a été démontré que certains membres sont capables de former des hétérodimères avec d'autres membres, que ce soit pour en moduler l'expression ou pour partager des localisations et des fonctions³⁹.

Le mécanisme d'ubiquitination nécessite une cascade de 3 étapes, impliquant 3 enzymes différentes. L'enzyme E1 active l'ubiquitine en hydrolysant l'ATP, ce qui permet la formation d'un lien tri-ester entre la E1 et l'ubiquitine activée. Celle-ci est alors transférée vers l'enzyme E2 puis rapidement sur un substrat spécifique à l'aide de l'enzyme E3 ligase, qui catalyse le transfert de l'ubiquitine sur la protéine ciblée via son site actif *RING-CH*³⁰. Les membres de famille MARCH sont impliqués dans la dernière étape d'ubiquitination d'une protéine; ils procurent une spécificité lors du mécanisme de transfert d'ubiquitines, ciblant uniquement des protéines spécifiques, propres à chacun des différents membres.

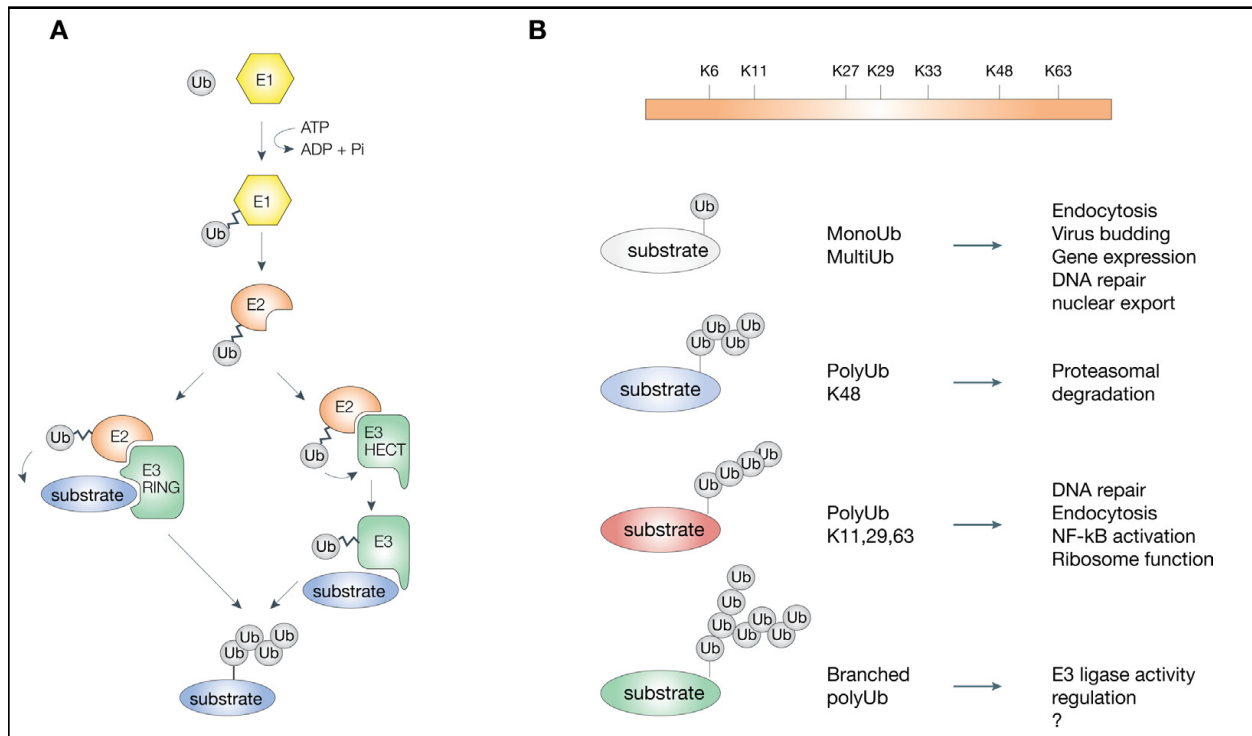


Figure 1.3 Mécanismes d'ubiquitination

A) L'ubiquitination d'un substrat nécessite 3 étapes, qui impliquent 3 enzymes; E1, E2 et E3. L'enzyme E1 active l'ubiquitine via une réaction ATP-dépendante, permettant la formation d'un lien tri-ester entre l'enzyme et l'ubiquitine. L'ubiquitine activée est transférée vers l'enzyme E2 et est fixée sur un substrat spécifique à l'aide de la E3 ligase. Dans le cas de la famille MARCH, le transfert est catalysé via la portion RING-CH, le site actif de l'enzyme E3. B) Différents types d'ubiquitination sont possibles. La longueur de la chaîne d'ubiquitination et le type d'ubiquitination influence la distribution et la fonction de la protéine ubiquitinée. Figure tirée de Woelk *et al*, Cell Division 2007 2:11.

1.1.4 Les différentes cibles connues de MARCH1

Malgré des homologies conservées entre les séquences des 11 différents membres et une fonction similaire, ils ne partagent pas les mêmes cibles. MARCH4 et MARCH9 sont reconnus pour réguler le CMH de classe I^{40, 41}, tandis que MARCH3 cible principalement le récepteur de la transferrine (TfR)⁴². On retrouve aussi des membres au niveau des membranes mitochondriales, dont MARCH5, aussi connu comme l'ubiquitine ligase mitochondriale (MITOL)⁴³. Elle est essentielle au maintien de la structure mitochondriale et cible des protéines impliquées dans la fusion et la division mitochondriale. Les membres MARCH1 et MARCH8

possèdent plusieurs cibles en commun, parmi lesquelles on retrouve, le CMH-II (HLA-DM, DR et DO), CD86, Tfr et Fas (CD95)^{38, 44-48}. Malgré certaines similitudes à travers les cibles, les patrons d'expression de ces 2 membres demeurent bien différents, ce qui leur confère une activité qui leur est propre. Alors que MARCH8 est exprimé au niveau des poumons et du pancréas⁴¹, MARCH1 est fortement exprimée dans les organes lymphoïdes secondaires⁴¹. Combiné à son rôle de régulation du CMH-II et de CD86, cette dernière possède un fort potentiel de régulation de la réponse immunitaire^{45, 48}.

1.2 La modulation de l'expression de MARCH1

1.2.1 L'expression constitutive de MARCH1 est spécifique aux cellules présentatrices d'antigènes.

On retrouve de faibles niveaux de MARCH1 dans plusieurs tissus, mais la protéine est fortement exprimée dans les cellules B folliculaires, les macrophages, les cellules dendritiques et les monocytes^{46, 47, 50, 51}. Ayant pour cible les molécules de CMH de classe II (HLA-DR, DM et DO) et CD86, il n'est pas étonnant que l'expression constitutive de MARCH1 soit restreinte aux CPAs. Comme il l'a été mentionné plus tôt, son expression est en étroite relation avec le niveau d'activation de la cellule. Au repos, MARCH1 permet d'entretenir un niveau intermédiaire de ces molécules pro-inflammatoires à la surface de la cellule. Elle est capable de réguler sa propre expression par auto-ubiquitination et sa demi-vie est d'environ 30 minutes³¹; au repos, elle se renouvelle constamment. Un signal qui stimule l'activation d'une cellule dendritique module la stabilité de MARCH1 et réduit son expression, ce qui permet l'accumulation en surface des molécules nécessaires à la présentation antigénique. Par exemple, une stimulation des récepteur de type Toll (TLRs) par des PAMPS engendre une accumulation des molécules de présentation et de co-stimulation en surface de la cellule⁴⁷.

Le maintien du fort niveau d'expression de CMH-II et de CD86 en surface n'est pas entièrement dépendant de l'augmentation de la synthèse de CMH-II^{52, 53} étant donné que la transcription de CIITA est arrêtée après 24h. Il a été démontré que le facteur qui permet de soutenir cette

expression est la diminution de l'expression de MARCH1, régulée négativement très rapidement après l'activation de la cellule^{47, 54}.

1.2.2 L'induction de MARCH1 par l'Interleukine-10

Si MARCH1 régule négativement les molécules de présentation, induire une augmentation de son expression permettrait de réduire la présentation antigénique. En effet, il a été démontré que l'Interleukine-10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire, induisait l'expression de MARCH1 dans les DCs et les monocytes, augmentant ainsi l'ubiquitination du CMH II^{51, 55}.

Plus de 1600 gènes sont exprimés suite au signal induit par l'IL-10, principalement via la phosphorylation de STAT3⁵⁶. Cette cytokine anti-inflammatoire a d'abord été décrite comme une cytokine restreinte aux cellules Th2. Il était décrit qu'elle bloquait la production d'IL-2, d'IL-3, d'INF- γ ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires et chimiokines sécrétées par les cellules Th1⁵⁷. Il a par la suite été démontré que la production d'IL-10 s'étendait aussi aux cellules B, aux macrophages, aux cellules dendritiques, aux monocytes ainsi que certaines sous-populations de cellules T^{58, 59}. Par son action autocrine et paracrine ainsi que les multiples cellules qui la sécrètent, l'IL-10 est au cœur de la réponse anti-inflammatoire. Elle est capable de moduler la réponse innée et adaptative en limitant l'activation des cellules T, en réduisant l'inflammation et en empêchant la migration de certaines cellules présentatrices d'antigènes vers les ganglions lymphatiques⁵⁸. La production d'IL-10 survient après la vague de sécrétions pro-inflammatoires, pour étouffer la réponse immunitaire une fois la menace sous contrôle^{57, 58}.

Les premières observations qui liaient l'IL-10 à une diminution de l'expression de CMH-II en surface ont été faites par le groupe de Koppelman *et al.* sans toutefois pouvoir expliquer le mécanisme derrière ce phénomène. Il était seulement démontré que le mécanisme n'était pas transcriptionnel et ne dépendait pas de la synthèse protéique⁵⁹.

L'induction de l'expression de MARCH1 dans les monocytes du sang chez l'humain par l'IL-10 a été démontré par Thibodeau *et al.*, ce qui augmentait l'ubiquitination du MHC II⁵¹. Cette même observation a été faite dans les DCs de la souris par Tze *et al.* En parallèle, il a été démontré que

l'IL-10 ne changeait pas les niveaux d'expression du CMH II dans les cellules déficientes pour MARCH1⁵⁵ ce qui renforce l'idée que la diminution d'expression du CMH II, médiée par l'IL-10, dépend de l'ubiquitination de celui-ci par MARCH1 dans les DCs et les monocytes. L'IL-10 influence donc le développement de la réponse adaptative, puisqu'en réduisant l'expression des molécules de présentation et de co-stimulation, elle empêche l'activation des cellules T CD4⁺ et tout ce qui en découle.

Jusqu'à aujourd'hui, seul l'IL-10 est capable d'induire l'expression de MARCH1. Elle signale via le récepteur à l'IL-10, un dimère transmembranaire, résultant de l'interaction des deux sous-unités, IL-10R1 et IL-10R2. Contrairement à IL-10R1 qui est exprimé par les cellules immunitaires à faible niveau, IL-10R2 est exprimé de façon constitutive dans tous les tissus^{61, 62}. L'effet de l'IL-10 sur l'expression de MARCH1 n'est pas le même dans toutes les populations cellulaires. Il a été démontré que MARCH1 est exprimé constitutivement dans toutes les sous-populations de cellules B, mais de façon beaucoup plus importante dans les cellules B folliculaires matures^{50, 63}. Contrairement à l'effet immunosuppresseur que l'IL-10 a sur les monocytes/macrophages et les DCs, elle stimule la survie des cellules B et l'expression de CMH-II à la surface de celles-ci. Il a été démontré par notre laboratoire que l'IL-10 diminuait l'expression de MARCH1 dans les cellules B, tout comme le lipopolysaccharide (LPS) et le CD40L le feraient, permettant ainsi une augmentation de l'expression de CMH II⁵⁰. On peut déduire que la transduction de signal de l'IL-10, menant à l'induction de MARCH1, est modulée différemment dans cette population cellulaire.

1.2.3 L'effet de la stimulation des TLRs sur l'expression de MARCH1

La stimulation des TLRs par un PAMPs entraîne l'activation des cellules de la réponse immunitaire innée, permettant la mise en fonction de la machinerie nécessaire à la digestion d'antigènes et à la présentation efficace de ceux-ci aux cellules T CD4⁺. Une augmentation de CMH-II et de CD86 est observée suite à la stimulation du TLR4 par le LPS⁴⁷. En parallèle, les

niveaux d'expression de MARCH1 sont diminués, de façon pré-transcriptionnelle et post-traductionnelle, afin de bloquer l'ubiquitination de ces molécules et permettre leur accumulation en surface. Le LPS, signalant via MyD88 et NF- κ B, provoque l'arrêt de la transcription de MARCH1. La demi-vie de MARCH1 étant de 30 minutes³¹, cette diminution se fait rapidement. Ceci permettra une meilleure présentation antigénique et une co-stimulation par CD86 plus efficace.

Une fois la menace évacuée, il est nécessaire de résorber l'inflammation pour éviter un choc toxique dû à une production exagérée de cytokines ou un endommagement des tissus en périphérie de l'inflammation. Notre laboratoire a démontré que la souris MARCH1-KO est plus susceptible au choc toxique induit par injection létale de LPS, comparativement à une souris C57BL/6 (Galbas, Non publié). Il est impératif d'augmenter les niveaux d'expression de MARCH1 pour moduler l'expression du MHC-II et de CD86, via entre autres, la sécrétion de cytokine anti-inflammatoire qui survient après l'inflammation.

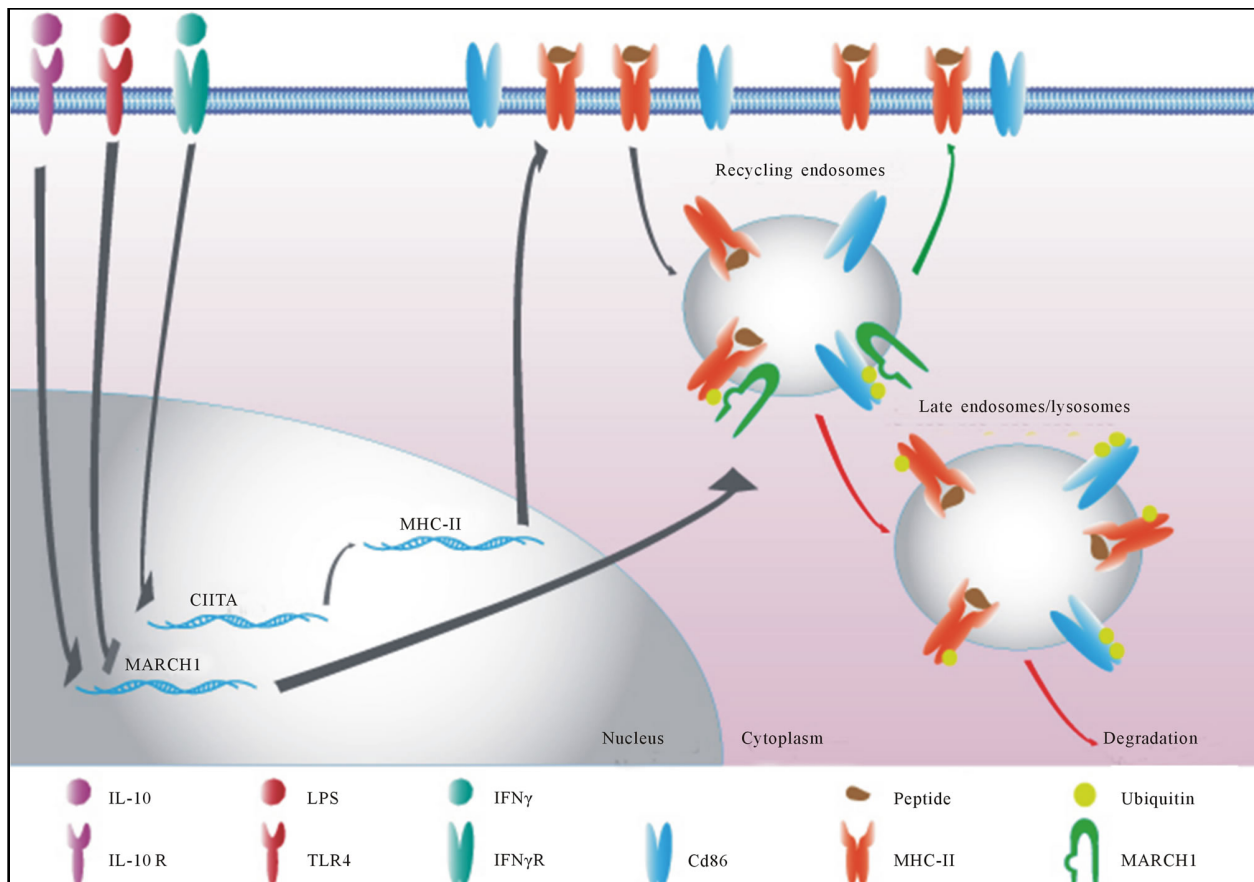


Figure 1.4 Représentation des événements qui mènent à la régulation de MARCH1 dans une CPA.

La biosynthèse du CMH-II peut être induite par l'INF- γ , stimulant la transcription de CIITA. Dans les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages, la signalisation de l'IL-10 via son récepteur IL-10R induit l'expression de MARCH1. L'IL-10 stimule l'ubiquitination du CMH-II, ce qui provoque son entreposage dans les endosomes tardifs ou bien à sa dégradation dans lysosomes. À l'opposé, un signal d'activation via les TLRs bloque la transcription de MARCH1, ce qui mène à une diminution rapide de son expression, favorisant une accumulation de CMH-II à la surface de la cellule et le recyclage de ces molécules de présentation dans les endosomes de recyclage. La régulation de CD86, nécessaire à la co-stimulation, est pensée similaire. Dans les cellules B, la signalisation via le récepteur à l'IL-10 agit à l'opposé. Elle réduit l'expression de MARCH1, exprimée constitutivement, et permet l'accumulation du CMH-II en surface. Figure tirée de Galbas *et. al*, 2012.

1.2.4 Forcer l'expression transitoire de MARCH1 dans une lignée cellulaire par transfection

Étant donné que l'expression de MARCH1 est restreinte à certains types cellulaires et que les niveaux d'expressions varient en fonction de l'activation de la cellule, travailler avec des lignées cellulaires qui surexpriment transitoirement la protéine est utile pour assurer de l'expression de la protéine. Les premières expériences de ce mémoire ont été réalisées dans des lignées cellulaires, soit des HEK293xt, dans lesquelles nous avons surexprimé de façon transitoire MARCH1-YFP (M1-YFP). Les cellules HEK293xt (Lenti-X 293T) sont issus d'une lignée cellulaire qui a été sous-clonée à partir de cellules immortalisées de cellules de rein embryonnaire humain. Elles ont été transformées et sélectionnées pour faciliter la transfection d'ADN étrangers et pour supporter un haut niveau d'expression de protéines exogènes. Elles permettent d'étudier la surexpression de protéines d'intérêts dans une cellule. On utilise de l'ADN circulaire, que l'on introduit par transfection, afin de permettre l'expression transitoire de haut niveau de MARCH1. Étant fusionnée à une molécule fluorescente (YFP), on peut visualiser par cytométrie en flux l'expression de la protéine, sans toutefois affecter sa localisation cellulaire et sa fonction³⁹.

Cette méthode nous permet de quantifier l'efficacité de la transfection et de trier les cellules qui ont acquis le vecteur. On utilise en contrôle un vecteur qui contient uniquement la protéine fluorescente YFP, ce qui permet d'enlever l'effet de la transfection sur le phénotype que l'on observe.

Ce modèle permet de surexprimer la protéine de façon transitoire, mais stable durant 24 à 48 heures, indépendamment des signaux d'activations qui engendreraient normalement sa dégradation. Évidemment, la surexpression d'une protéine à des niveaux non biologique peut influencer les résultats; ceux-ci doivent être interprétés par conséquent et répétés dans des cellules primaires de souris, en comparant la C57BL/6 à la MARCH1-KO (M1-KO).

1.3 La souris MARCH1 KO

1.3.1 Obtention de la souris

Le souris MARCH1 KO sur fond C57BL/6 a été produite et gracieusement donnée par le laboratoire du Dr. Ishido, de l'institut national de santé publique du Japon. Une insertion du gène de résistance à la néomycine dans le gène de MARCH1 au niveau de l'exon 6, soit la région codante pour la portion RING-CH, empêche la synthèse de la protéine fonctionnelle et permet un phénotype « *Knock-Out* » (KO) complet, dans tous les tissus.

1.3.2 Phénotype de la souris

L'absence de la MARCH1 chez la souris ne provoque pas de différences phénotypiques ou un retard de développement majeurs lorsqu'on la compare à la souris C57BL/6. Dans une animalerie stérile conforme, on n'observe aucun signe de développement spontané de pathologie ou d'infection. Cependant, quelques défauts dans certaines populations cellulaires ont été décrits. En plus d'exprimer des niveaux surélevés de CMH-II et de CD86 à la surface des CPAs comparativement à celles de la C57BL/6, il a été démontré que les cDCs répondaient moins bien à une stimulation. En comparant les cDCs de la souris M1-KO avec celles de la C57BL/6, le groupe de Shin *et al.* a montré que les cellules M1-KO exprimaient des niveaux plus faibles des glycoprotéines de surface CD4 et de CD8 que les cellules contrôles. Leurs travaux ont aussi montrés que les capacités à présenter des antigènes étrangers et à sécréter des cytokines après activation étaient plus faibles dans les cDCs de la souris M1-KO. En utilisant la souris MARCH1 positif et CMH-II KI, chez qui les CMH-II sont non-ubiquitinables, ils ont pu démontrer que le manque d'ubiquitination du CMH-II en absence de MARCH1 était responsable du défaut fonctionnel dans les cDCs⁴⁹.

Il a aussi été démontré que le nombre de cellules T régulatrices dérivées du thymus (Treg) était beaucoup moins important dans la souris déficiente pour MARCH1. Les Treg sont une sous-population de cellules T CD4⁺ au caractère immunosuppressif¹⁵⁴. Malgré le fort potentiel de

présentation antigénique que procure l'accumulation de molécules de présentation et de co-stimulation en surface, les souris déficientes en MARCH1 ainsi que les souris exprimant le CMH-II non ubiquitinable ne sont pas capables de générer des Treg⁶⁴. Le mécanisme demeure toujours inconnu.

1.3.3 La souris MHC-II KI

Les deux derniers papiers cités ont eu recours à la souris MHC-II KI pour démontrer le rôle de l'ubiquitination du CMH-II dans le défaut de production de Treg et le défaut de fonction des cDCs. Dans la souris MHC-II KI, la chaîne β de l'isotype H2-IA a été remplacée par une chaîne β mutante. La mutation permet de changer la lysine K225 pour une arginine (R225), ce qui empêche l'ubiquitination de la chaîne β par MARCH1⁴⁹. Cette souris permet d'étudier un système où l'ubiquitination de toutes les autres cibles de MARCH1 est possible, tout en ayant un niveau d'expression du CMH-II en surface similaire à celui retrouvé dans les cellules M1-KO. Ce contrôle nous permet de déduire si les différences observées dans les cellules M1-KO sont dépendantes ou non de l'augmentation de l'expression du CMH-II en surface de la cellule et/ou de son ubiquitination.

1.3.4 Utilisation des splénocytes et des cellules dérivées de la moelle osseuse

Les cellules primaires de C57BL/6 utilisées dans les expériences décrites dans ce mémoire doivent exprimer de façon constitutive MARCH1. Ces mêmes populations cellulaires sont purifiées chez la souris MARCH1 KO, afin d'y être comparées expérimentalement. L'expression constitutive de MARCH-1 étant restreinte aux CPAs, nous utiliserons les macrophages, les iDCs et les cellules B comme objets de notre étude.

Les cellules B se trouvant en grand nombre dans la rate, l'utilisation de splénocytes totaux ou la purification de cellules B sur colonne par sélection négative est simple et rapide. On ne peut pas en dire autant des iDCs et des macrophages, beaucoup plus rares dans les tissus. La technique la plus efficace et la plus couramment utilisée pour obtenir des DCs et des macrophages en grande

quantité consiste à utiliser les progéniteurs présents dans la moelle osseuse et de les différencier en utilisant des facteurs de croissance spécifiques aux cellules désirées^{66, 67, 68, 69, 71}.

Les macrophages résidents dans les tissus, dont les cellules de Kupfer et de Langherhans, sont issus de précurseurs embryoniques et se régénère par eux-mêmes dans les différents tissus⁶⁵. En contraste, les populations de DCs et de monocytes sont constamment régénérées respectivement à partir des CDPs (*Common DC Progenitors*)^{67, 68} et des cMOPs (*Common monocyte precursor*)⁷⁰ présents dans la moelle osseuse. On retrouve aussi dans l'organisme des DCs et des macrophages dérivées des monocytes, cellules nommées DCs et macrophages dérivés des monocytes^{72, 73, 75}. Récemment, en raison de certaines similitudes et de questionnements sur la véritable identité et la fonction de ces cellules, elles sont décrites comme des cellules dérivées de monocytes (MCs)⁷⁴. Nous reviendrons sur ce point un peu plus bas.

Pour nos expériences, nous avons utilisé la moelle osseuse afin de générer nos cellules. Les cellules obtenues sont traditionnellement appelées cellules dendritiques et macrophages dérivées de la moelle osseuse (respectivement BMDCs et BMDMs)⁶⁶. Pour obtenir des BMDCs, la moelle osseuse est traitée au GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*)⁶⁶ tandis que pour obtenir des BMDMs, la moelle est traitée au M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*)⁷⁶. L'utilisation de la moelle osseuse est un concept développé et utilisé depuis plusieurs années; de nombreux papiers ont été publiés en utilisant ce système de production de macrophages et de DCs dérivées de la moelle.

1.3.4 Les cellules B, les DCs immatures et les macrophages expriment MARCH1

Afin d'étudier l'effet de MARCH1 sur le phénotype, il est important d'étudier un système qui exprime la protéine à des niveaux assez importants pour avoir un impact sur le phénotype de la cellule. On peut ensuite comparer ces cellules avec leurs homologues de la souris M1-KO, déficientes en MARCH1.

La surexpression d'une protéine dans un système de lignée cellulaire est intéressante, mais il est nécessaire de reproduire les résultats obtenus dans un système similaire à celui rencontré dans l'organisme. Les expériences de ce mémoire ont été faites majoritairement sur les CPAs qui

expriment MARCH1, soit des cellules B matures, des BMDMs et des BMDCs immatures (fig. 1.5).

Les cellules B folliculaires matures présentent les plus hauts niveaux de MARCH1⁶³. Ces cellules sont capables de reconnaître un antigène via leur BCR, l'internaliser, l'apprêter et le présenter aux cellules T CD4+ pour permettre la génération de plasmocytes⁷⁷. Les cellules B des centres germinatifs et des zones marginales expriment aussi MARCH1^{63, 50}, ce qui permet d'utiliser les splénocytes totaux ou les cellules B totales de la rate comme système d'étude de MARCH1.

Les macrophages n'expriment pas des niveaux très élevés de MARCH1, mais assez pour observer une modulation de l'expression du CMH-II et de CD86 en surface. De plus, il a été démontré que l'on peut induire MARCH1 dans ces cellules avec de l'IL-10⁷⁸. Les BMDMs obtenues en M-CSF sont généralement homogènes⁷⁶ et toutes expriment MARCH1.

Une iDC exprime des niveaux intermédiaires de CMH II et de CD86, par la régulation de ces molécules en surface. En réponse à une rencontre avec un antigène, une maturation s'en suit et les niveaux d'expressions de MARCH1 diminuent pour permettre une augmentation d'expression de CMH II et de CD86⁴⁷. Dans un puits traité au GM-CSF durant 7 jours, on retrouve 3 patrons d'expression de CD86 et de CMH II. Ils correspondent 1) aux cellules non différenciées ou autres (doubles négatives), 2) aux cellules immatures (CMH-II^{int} et CD86^{int}) et 3) aux cellules matures (CMH II^{élevé} et CD86^{élevé})⁶⁶. En raison du mélange hétérogène que l'on retrouve, il est nécessaire dans le cadre de notre projet d'utiliser uniquement les cellules immatures.

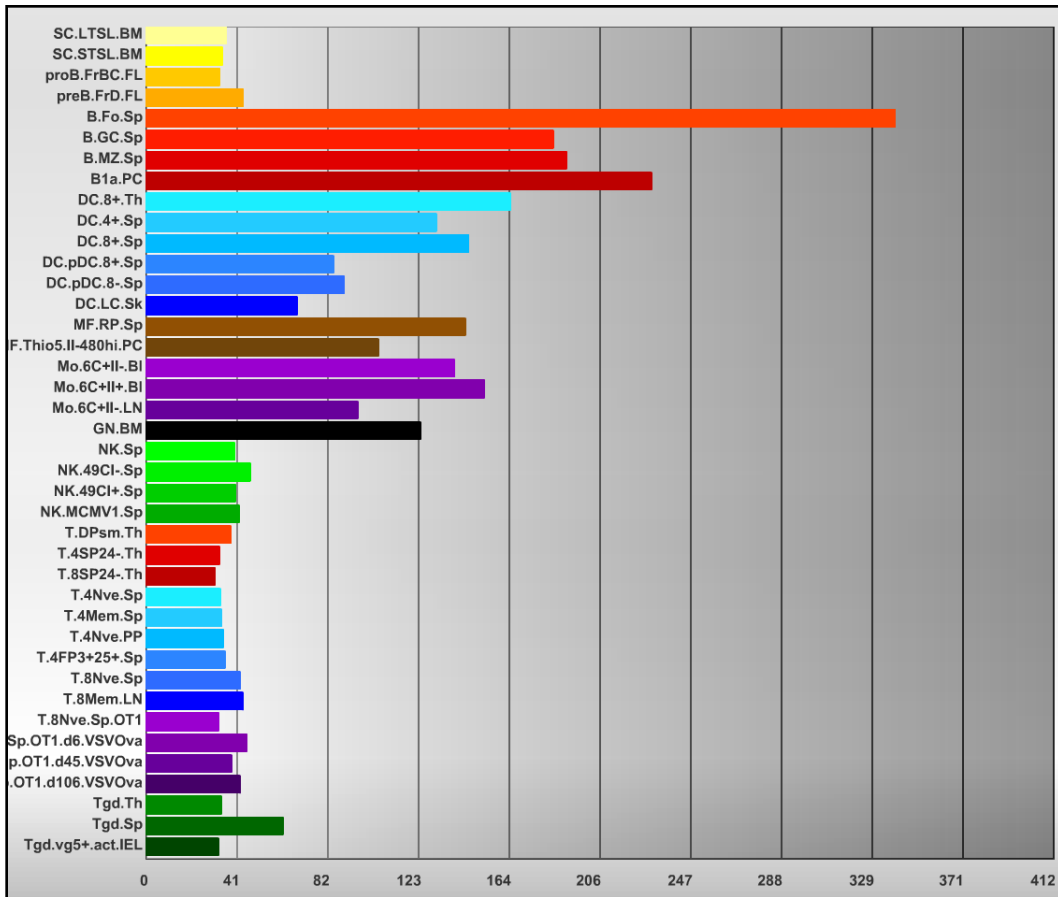


Figure 1.5 Quantification relative du nombre de copies d'ARNm de MARCH1 dans différentes populations cellulaires.

Quantification du nombre de copies d'ARNm de MARCH1 dans chacun des types cellulaires représentés. Les cellules B sont en dégradé de rouge, les cellules dendritiques en bleu, les macrophages en brun et les monocytes en mauve. Ce sont les 4 populations qui expriment le plus de copies de MARCH1. Capture d'écran du site internet ImmGen en date du 10 août 2015.

1.3.5 La macropinocytose pour purifier les cellules dendritiques immatures

Sallusto et ses collègues ont été les premiers à montrer que des iDCs avaient une capacité supérieure à échantillonner le milieu extracellulaire qui les entoure⁸⁰. Elles utilisent la macropinocytose de façon beaucoup plus efficace qu'un DC qui aurait reçu un signal d'activation et de maturation (i.e stimulation des TLRs par du LPS, stimulation à l'IL-1)⁷⁹⁻⁸¹. La macropinocytose permet l'internalisation d'antigènes à l'aide de macropinosomes, plus grands

que les vésicules de clathrines, en accumulant de grands volumes de liquide extracellulaire dans la cellule. Les iDCs possèdent des aquaporines⁸², des transporteurs d'eau de haute efficacité, qui permettent l'évacuation de ces grands volumes de liquides une fois filtrés⁸³. L'expression de ces aquaporines est fortement réduite lors de la maturation des DCs, ce qui bloque considérablement la macropinocytose dans les DCs matures⁸². L'une des méthodes utilisées pour mesurer la macropinocytose est l'internalisation du dextran, une molécule de polysaccharide, marquée avec un fluorochrome⁸⁴. Plus la cellule est capable d'internaliser de grande quantité de liquide extracellulaire, plus la cellule sera fluorescente. Il est ensuite facile, en utilisant des marqueurs de cellules dendritiques comme CD11c ou CMH-II⁶⁶, de trier par FACS les populations fortement positives pour le dextran intracellulaire et positive pour les marqueurs de DCs⁶⁶. Cette méthode nous permet de purifier, sur une base fonctionnelle et phénotypique, une population homogène de iDCs à partir d'un puits traité au GM-CSF.

1.4 Métabolisme et activation cellulaire

1.4.1 Le métabolisme cellulaire basal

L'ATP est le principal carburant de la cellule et est impliqué dans la grande majorité des transferts d'énergie et des réactions biochimiques. La cellule est en constante production d'ATP pour subvenir à ses besoins et cette production se fait via différentes cascades enzymatiques. Parmi les multiples besoins énergétiques reliés aux fonctions immunitaires spécifiques, on retrouve la migration cellulaire, la phagocytose, la préparation et la présentation antigénique, la transduction de signal, la prolifération, la synthèse d'anticorps, la production de cytokines, les mécanismes de cytotoxicité et bien d'autres⁸⁵.

Les deux chaînes de réaction métabolique les plus utilisées par la cellule pour la production d'ATP sont la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et la glycolyse anaérobique. Le glucose est transformé en pyruvate par une cascade de 10 réactions enzymatiques, qui consomme 2 molécules d'ATP, mais qui en redonne 4, pour un gain net de 2 ATP et de 2 pyruvates par molécule de glucose (Figure 1.6). En présence d'oxygène, le pyruvate est importé dans la

mitochondrie et oxydé dans le cycle de Krebs (ou cycle du citrate, TCA). Dans le cas contraire, il est transformé en lactate dans le cytoplasme par la lactate déhydrogénase B (LDHB).

Les acides gras et les acides aminés peuvent aussi être transformés en acétyl-CoA et en d'autres substrats utilisés par le cycle de Krebs pour permettre une production d'ATP, indépendante du glucose⁸⁶. On retrouve aussi d'autres voies métabolisant le glucose, utilisées à d'autres fins que la production d'ATP, comme la synthèse d'ARN et d'ADN via la voie pentose-phosphate⁸⁷.

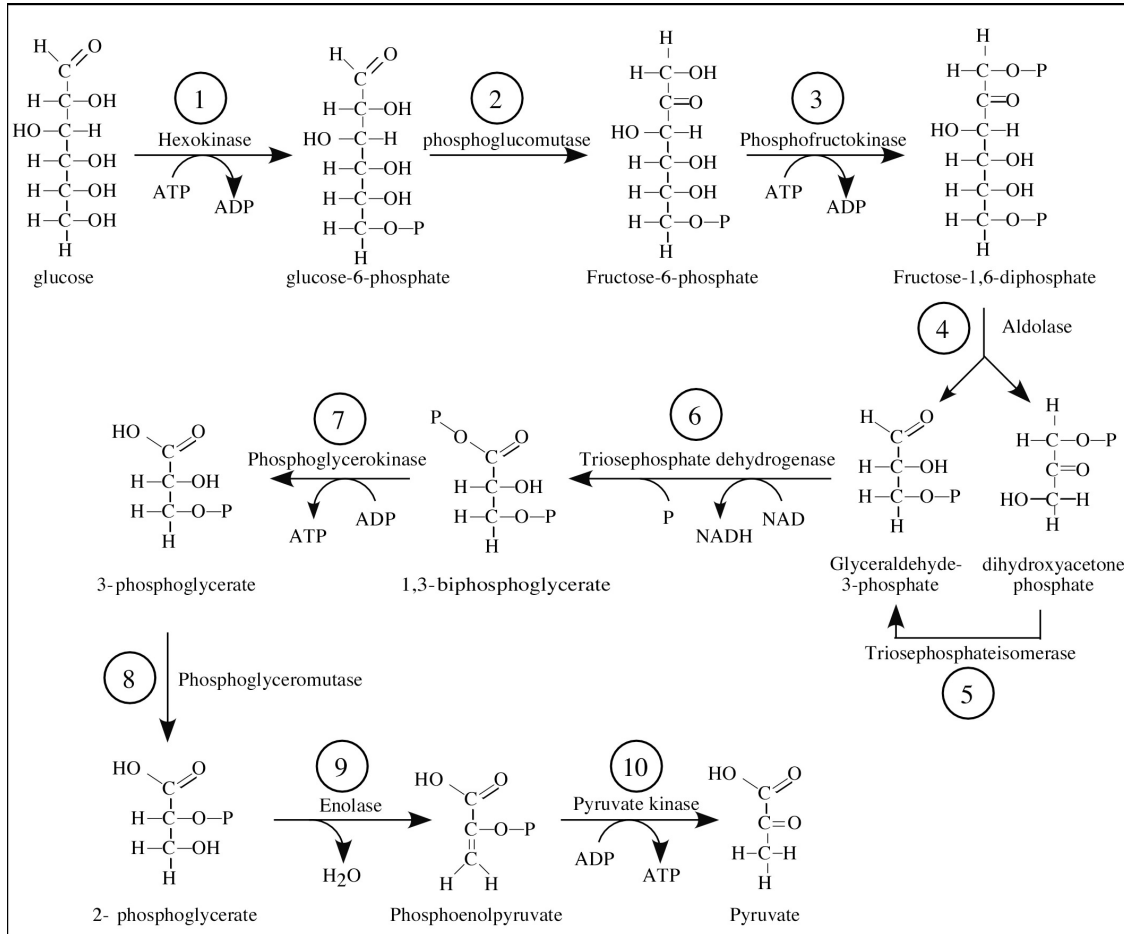


Figure 1.6 Représentation de la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas

Schématisation de la cascade des 10 réactions enzymatiques menant à la production de deux molécules de pyruvate à partir d'une molécule de glucose. Les étapes 1 et 3 nécessitent l'investissement de 1 molécule d'ATP. L'aldolase permet le clivage de Fructose-1,6-diphosphate en glyceraldehyde-3-phosphate et dihydroacéton phosphate. Ce dernier est transformé en glyceraldehyde-3-phosphate par la triosephosphateisomérase. Les étapes 6 à 10 sont alors faites sur chacune de ces 2 glyceraldehyde-3-phosphates pour permettre la production de 2 molécules de pyruvate. Les étapes 7 et 10 permettent un gain de 2 ATP, soit 4 ATP produits pour 2 ATP

investis. Le gain net de cette cascade enzymatique est de 2 ATP. Les étapes 1, 3 et 10 sont irréversibles.

<https://biocuriousone.files.wordpress.com/2014/03/glycolysis-compl.jpg>, consulté de 25 août 2015.

1.4.2 La phosphorylation oxydative et la chaîne de transport d'électron de la membrane mitochondriale

La phosphorylation oxydative se déroule en présence d'oxygène au niveau de la mitochondrie. Le pyruvate ainsi que certains acides gras et acides aminés sont importés dans la mitochondrie et vont servir de substrat pour le cycle du Krebs. Ce dernier permet la production de NADH et FADH, toutes deux fortement énergétiques grâce à leur fort potentiel de transfert d'électrons⁸⁶. Elles permettent l'entrée d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale (ETC). Cette chaîne de transport est composée de 4 complexes, qui s'échangent un à un les électrons en transport. Les électrons entrent via les complexes 1 et 3 et leur déplacement dans la membrane via des co-facteurs fournit l'énergie nécessaire pour sortir des protons (H⁺) de la lumière de la mitochondrie et permettre leur l'accumulation dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie⁸⁸⁻⁹⁰.

Cette chaîne de transport est accompagnée d'un 5^e complexe, l'ATP synthase. L'accumulation de protons crée un gradient de concentration dans l'espace intermembranaire, ce qui permet la production d'ATP, par force proton motrice, via l'ATP synthase. Pour chaque ATP produit, 4 protons doivent transiter de l'espace intermembranaire vers la lumière de la mitochondrie via l'ATP synthase⁹⁰.

La production d'ATP par OXPHOS est issue d'une cascade de réactions des plus catabolique; pour chaque molécule de glucose utilisée par la cellule, entre 30 et 36 ATP sont produits ^{91, 92}. Cependant, cette réaction est dépendante de l'oxygène, qui agit comme l'accepteur final d'électrons au complexe IV. Une fois passés à travers les 4 premiers complexes de la membrane, les électrons s'accumulent au niveau du complexe 4. L'oxygène, en acceptant un électron à la fois, produit 1 molécule d'eau (H₂O) et 1 molécule de dioxyde de carbone (CO₂) par réaction. En absence d'oxygène, la chaîne de transport se sature en électron, ce qui bloque la respiration

mitochondriale. La cellule dépend alors de la glycolyse anaérobie pour produire l'énergie nécessaire à l'ensemble de ses besoins.

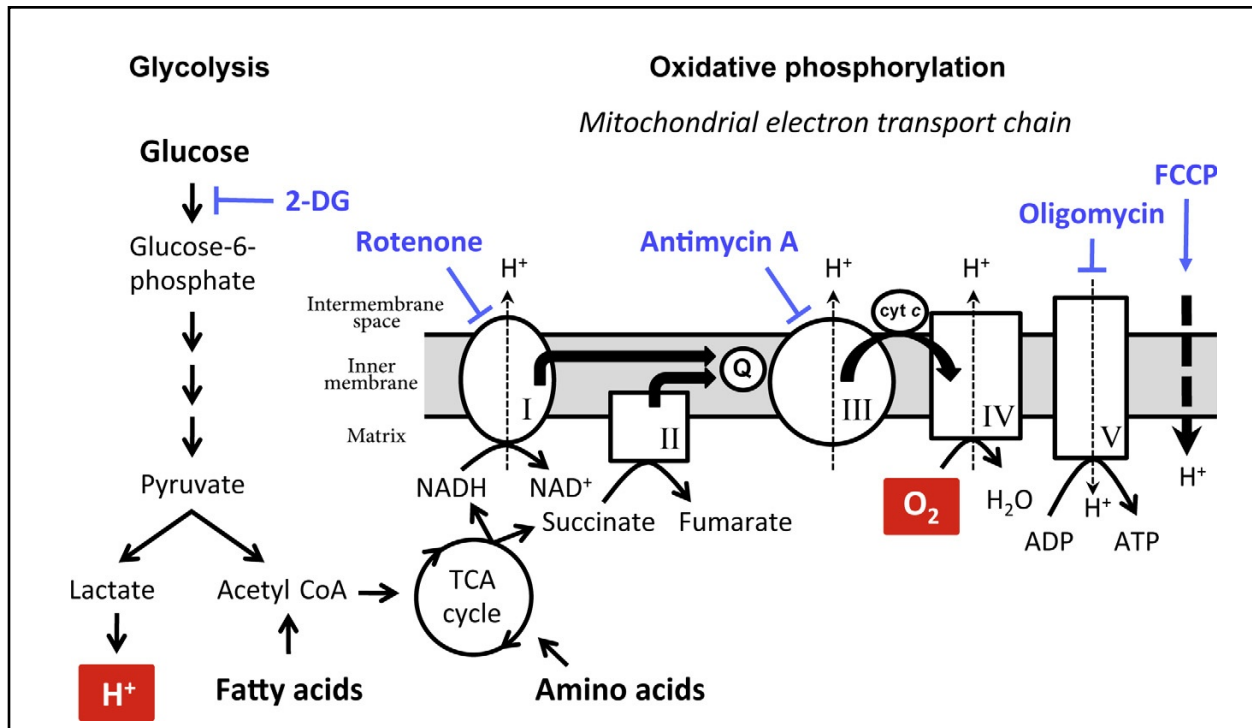


Figure 1.7 Représentation schématique de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative via la chaîne de transport d'électrons.

Légende : ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; Q, coenzyme Q; cyt c, cytochrome c; H⁺, proton; TCA, Acide Tricarboxylique; ETC, chaîne de transport d'électron; acetyl CoA, acetyl coenzyme A; 2-DG, 2-deoxyglucose; complexe I, NADH déshydrogénase; complexe II, succinate déshydrogénase; complexe III, coenzyme Q : cytochrome-c oxydoreductase; complexe IV, cytochrome-c oxydase; complexe V, ATP synthase; FCCP, trifluorocarbonyl cyanide phenylhydrazone.

Le glucose qui entre dans la cellule est transformé en deux molécules de pyruvate pour un gain net de 2 ATP. En absence d'oxygène, le pyruvate reste dans le cytoplasme pour être transformé en lactate par la LDHB. En condition aérobie, le pyruvate est acheminé dans les mitochondries via des transporteurs, où il est transformé en Acétyl-CoA, que l'on peut aussi former à partir d'acides gras. Celui-ci agit comme substrat dans le cycle de Krebs pour générer la production de NADH et de FADH. Certains acides aminés peuvent aussi servir de substrat dans le cycle. Ces molécules au fort potentiel de transfert d'électrons vont permettre l'entrée de 2 électrons chacune dans la chaîne de transport d'électrons via les complexes I et III respectivement. En utilisant les différents co-facteurs présents, le cheminement des électrons jusqu'au complexe IV va permettre

l'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire. Graduellement, un gradient de concentration s'installe et force les protons à utiliser l'ATP synthase (ou complexe V) pour retourner dans la lumière de la mitochondrie. La molécule d'ATP est produite par force proton motrice.

Il est possible de bloquer la glycolyse et la chaîne de transport d'électrons en utilisant des inhibiteurs. L'oligomycine bloque l'ATP synthase et force la cellule à produire de l'ATP via la glycolyse. Le FCCP agit comme un port à protons à diffusion facilitée. En créant des ports au niveau de la membrane interne, il empêche la formation du gradient de concentration et force la mitochondrie à maximiser le transport d'électron et donc sa consommation d'oxygène. La roténone inhibe le complexe I et combiné à l'antimycine A qui agit sur le complexe III, plus aucun électron ne peut être introduit dans la chaîne de transport. Le 2-DG, un analogue du glucose, ne peut être transformé en glucose-6-phosphate par les enzymes impliquées dans la glycolyse et bloque complètement celle-ci en saturant les enzymes.

Légende traduite de Pelletier *et al.*, 2014. Figure tirée de *Methods in Enzymology*, 542, Pelletier *et al.*, Extracellular flux analysis to monitor glycolytic rates and mitochondrial oxygen consumption, 125-149, 2014 avec la permission de Elsevier.

1.4.3 La glycolyse anaérobie

En absence d'oxygène, le pyruvate est directement transformé en lactate par la LDH permettant une production nette de 4 ATP par molécule de glucose. Le lactate et le proton issu de cette réaction sont relâchés dans le milieu extracellulaire, et entraînent son acidification. Dans cette réaction, la molécule de glucose n'est pas utilisée à son plein potentiel énergétique lorsqu'on la compare avec l'OXPPOS. Elle est cependant près de 30 fois plus rapide. Ainsi, pour un même laps de temps, une cellule qui utilise la glycolyse anaérobie produira plus d'ATP, mais aura une consommation de glucose plus élevée. Cette production rapide d'énergie est l'une des raisons pour laquelle les cellules en prolifération ou qui subissent une activation cellulaire utilisent préférentiellement la glycolyse au dépend de l'OXPPOS. En plus de l'énergie dépensée pour la réplication du contenu génétique, une grande partie de l'énergie produite est investie dans la synthèse de nouvelles protéines. La production d'énergie doit nécessairement être augmentée pour subvenir rapidement à ces besoins.

1.4.4 Le métabolisme des cellules immunitaires

La branche myéloïde du système immunitaire compte principalement sur la glycolyse anaérobie pour produire son énergie. Les neutrophiles et macrophages qui se trouvent généralement dans un environnement hostile et inflammé n'ont pas accès à des réserves importantes d'oxygène et sont souvent confinés à un environnement hypoxique⁹⁵⁻⁹⁹. Les monocytes arrivent directement du sang au site d'inflammation. Ils passent donc d'un environnement très oxygéné, où ils utilisent l'OXPPOS, à un environnement pauvre en oxygène. Leur adaptation au nouvel environnement doit être rapide et dépend du facteur d'hypoxie inductible 1 (HIF-1)^{93, 94}. Il a été démontré que les BMDCs utilisent principalement les acides gras pour alimenter l'OXPPOS. Ces cellules consomment tout de même du glucose, mais il n'a pas encore été démontré s'il était utilisé pour la production d'ATP ou à d'autres fins métaboliques¹⁰⁰.

La branche lymphoïde du système immunitaire produit son énergie via la phosphorylation oxydative en utilisant le glucose, les acides aminés et les acides gras pour alimenter le cycle de Krebs. Une cellule T dégrade ces transporteurs de glucose en absence de signal de survie, ce qui contribue à la mort de la cellule par apoptose, étant incapable de produire suffisamment d'énergie pour maintenir sa survie¹⁰³.

1.4.5 L'effet Warburg

Dans un tissu différencié et dans la majorité des cellules immunitaires au repos, la production d'ATP se fait via la phosphorylation oxydative. Cette réaction, beaucoup plus catabolique que la glycolyse permet d'utiliser la molécule de glucose à son plein potentiel énergétique. Otto Warburg fut l'un des premiers scientifiques à proposer que le métabolisme des cellules cancéreuses était aberrant. En fait, il décrivait cette aberration comme l'inverse de l'effet Pasteur, qui stipulait que la présence d'oxygène inhibait la fermentation lactique. Ainsi, il proposait que les cellules cancéreuses produisaient du lactate à partir du glucose, et ce, malgré la présence d'oxygène¹⁰⁸. Cette proposition fut démontrée et qualifiée d'effet Warburg¹⁰⁷.

O. Warburg remarqua aussi que le métabolisme des cellules cancéreuses était anormalement élevé. Il démontra avec ses collègues que la cellule cancéreuse consommait plus d'oxygène qu'une cellule saine, malgré l'utilisation de la glycolyse en condition non hypoxique¹⁰⁹. Cet effet est donc caractérisé par une utilisation de la glycolyse, privilégiée sur l'OXPPOS, même en présence d'oxygène. Depuis quelques années, de nombreuses publications montrent que ce phénomène n'est pas seulement restreint aux cellules cancéreuses. Ces nouvelles découvertes montrent une étroite relation entre la modification du métabolisme cellulaire et l'activation des cellules immunitaires.

Il a été démontré que les macrophages et les DCs étaient capables de modifier leur métabolisme suivant un signal d'activation^{105, 106, 131}. Le groupe de Krawczyk et al. a montré que la stimulation des TLRs permettait ce genre de modifications métaboliques, similaire à l'effet Warburg que l'on retrouve généralement dans les tumeurs¹⁰⁶. Chez les DCs, la production d'oxyde nitrique (NO) bloque la respiration mitochondriale pour laisser la place à la glycolyse aérobie¹⁰⁰. Il a aussi été proposé que la sécrétion de ces radicaux durant l'infection pouvait agir sur les cellules avoisinantes pour favoriser la glycolyse malgré la présence d'oxygène. L'utilisation de la glycolyse est essentielle à la survie et à la fonction des DCs activées en présence d'oxyde nitrique¹⁰¹. En raison de l'effet de l'IL-10 sur l'induction de MARCH1, il est important de noter que ce changement de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse est bloqué par l'IL-10¹⁰⁰.

Il a été démontré que les lymphocytes T et B utilisent la glycolyse après une stimulation de leur TCR et BCR respectivement, pour subvenir au besoin métabolique nécessaire durant l'expansion clonale¹⁰⁴.

Malgré les similitudes que l'on retrouve entre le métabolisme des cellules cancéreuses et celui des cellules saines qui utilisent la glycolyse aérobie à des fins fonctionnelles, il existe une différence majeure qui différencie les deux. Une cellule saine, même en présence de facteur de croissance ou de stimulations, va développer des mécanismes de régulation et de rétroaction pour conserver un état de quiescence en cas d'absence de nutriments. La cellule cancéreuse, elle, ne fera pas distinction du manque de nutriments et continuera d'intégrer dans sa biomasse tout ce

qui lui passe sous la main. En continuant d'accumuler cette biomasse pour se diviser, la cellule cancéreuse n'est plus capable de compter uniquement sur la glycolyse pour subvenir à ses besoins. Des acides gras sont alors utilisés par la cellule pour continuer la production d'énergie via la phosphorylation oxydative, ce qui explique une consommation d'oxygène importante malgré l'utilisation de la glycolyse aérobie⁸⁶.

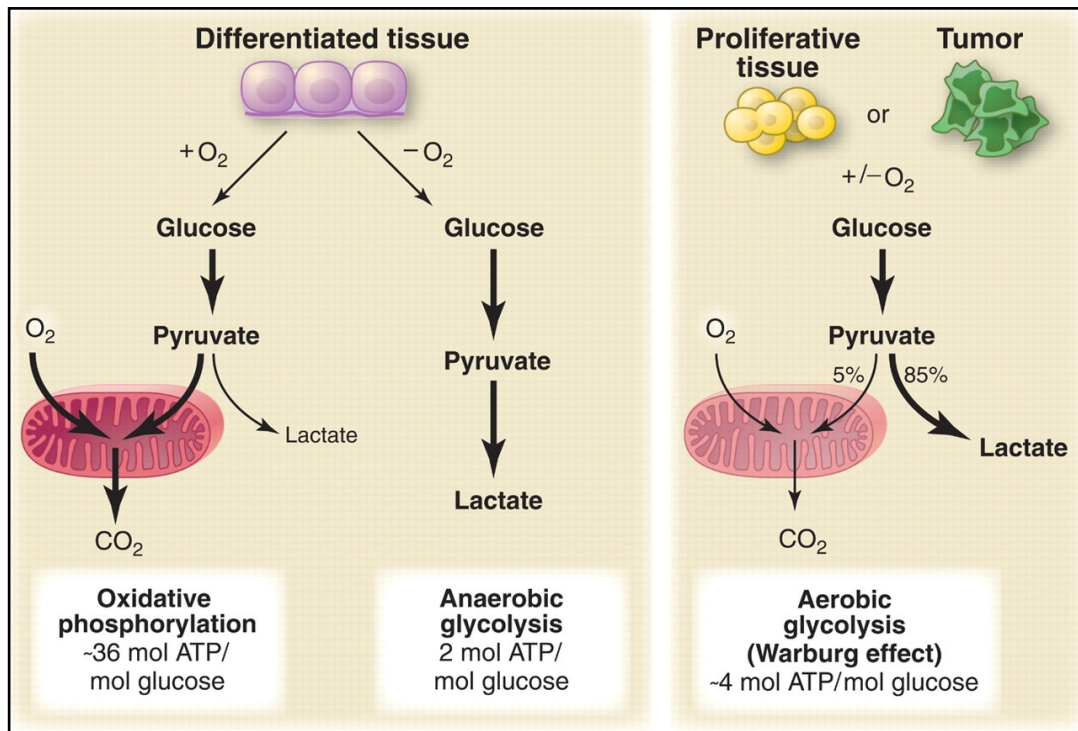


Figure 1.8 L'effet Warburg

Représentation schématique qui montre la respiration mitochondriale et de la glycolyse anaérobie dans un tissu différencié, comparé au métabolisme cellulaire dans un tissu en différenciation ou dans une tumeur. Dans un tissu différencié, le glucose est transformé en pyruvate. En présence d'oxygène, il est importé dans les mitochondries pour alimenter le cycle de Krebs. Dans le cas contraire, il est transformé en lactate par la LDH. Dans un tissu en prolifération ou dans une tumeur, la demande énergétique est augmentée. Parce que la réaction de transformation de pyruvate en lactate est beaucoup plus rapide et moins catabolique, elle est plus apte à subvenir aux besoins énergétiques plus élevés. La phosphorylation oxydative est alors fortement diminuée, même en présence d'oxygène, libérant tout le pyruvate pour la glycolyse aérobie. Environ 10% du glucose est utilisé via d'autres voies métaboliques, comme la voie pentose phosphate, à des fins de biosynthèse.

Figure tirée de Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science* 2009, **324**(5930): 1029-1033. Réimprimée avec la permission de AAAS.

1.4.6 La quantification de l'utilisation des différentes voies métaboliques par analyse de flux extracellulaires

Diverses méthodes sont utilisées pour quantifier l'activité des différentes voies métaboliques. On peut étudier la relâche de certains métabolites dans le milieu extracellulaire comme le lactate. La consommation d'un nutriment dans le milieu peut aussi être quantifiée, par exemple le glucose, consommé à travers le temps dans différentes conditions expérimentales. Il existe différentes méthodes colorimétriques et fluorométriques pour l'étude d'un vaste choix de métabolites et de nutriments, dont l'ATP, le glucose et le lactate. L'un des désavantages de ces techniques est la prise de mesure, qui se fait à un temps précis. Même si l'on trouve des valeurs de concentration similaire, il se peut que les cinétiques de relâche ou d'internalisation de ces métabolites soient différentes.

Des techniques de marquage radioactif, comme le carbone 13, marquent les molécules de glucose et permettent de retracer la redistribution des carbones dans les différents métabolites du cycle Krebs, d'étudier leur accumulation et le nombre de passages dans le cycle^{110, 111, 112}.

Des techniques plus avancées utilisent la spectrométrie de masse à grande échelle et permettent de visualiser une vaste diversité de métabolites, de les quantifier et de les retracer à travers les différentes voies métaboliques. Combinées à un séquençage d'ARNm, ces techniques de métabolomique sont un outil très puissant pour comparer l'ensemble du métabolisme cellulaire entre deux conditions ou deux souris¹¹³.

Depuis quelques années, un nouveau système de quantification du métabolisme s'est installé dans les laboratoires. Il s'agit d'un analyseur de flux extracellulaire en temps réel qui permet de quantifier l'oxygène consommé et la relâche de proton H⁺ par les cellules dans un puits. Le nombre de publications utilisant l'analyseur de flux extracellulaire Seahorse de *Bioscience* est passé de 5 en 2009 à plus de 550 en 2014. Cet appareil combine 2 électrodes, utilisées depuis déjà des années, soit une électrode à oxygène de type Clark à haute résolution¹¹⁴ et un pH-mètre. Il permet de quantifier en temps réel les plus petites variations dans la concentration d'oxygène et dans le pH du milieu extracellulaire suite à divers traitements.

À noter qu'il est nécessaire que le nombre de cellules dans chaque puits soit identique et que celles-ci soient placées de manière à former un tapis cellulaire dans le fond du puits pour éviter des erreurs de lecture par les sondes.

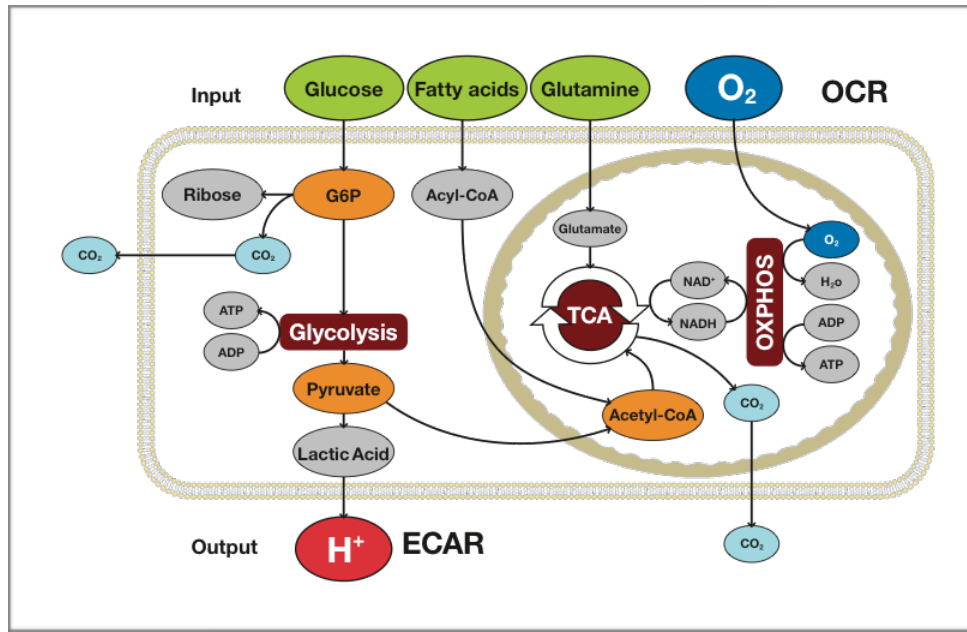


Figure 1.9 Représentation schématique du métabolisme lié à la production d'ATP.

L'analyseur de flux extracellulaire mesure en temps réel la consommation d'oxygène et l'acidification du milieu pour quantifier l'utilisation de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse. L'oxygène agit comme accepteur final d'électron dans la chaîne de transport d'électron et sa consommation est proportionnelle à l'activité mitochondriale. En absence d'oxygène, la LDH transforme le pyruvate en lactate. Cette transformation libère un proton, qui est éliminé dans le milieu extracellulaire. L'acidification du milieu est étroitement liée à cette réaction. Ainsi, les deux lectures en temps réel faites par l'appareil sont 1) la variation de la concentration d'oxygène et 2) du pH extracellulaire.

<http://www.seahorsebio.com/learning/image-library.php>

1.4.7 Le taux de consommation d'oxygène pour quantifier la phosphorylation oxydative

L'oxygène agit comme l'accepteur final d'électron au niveau de la chaîne de respiration mitochondriale^{88, 89}. La quantification de la consommation d'oxygène dans le milieu extracellulaire par les cellules permet de quantifier l'OXPPOS à travers différentes conditions de stimulation (i.e TLRs, cytokines) ou d'inhibition (i.e oligomycine, roténone).

Il est possible de décortiquer la respiration mitochondriale en utilisant différents inhibiteurs¹¹⁵, qui ont pour cible les différents complexes de la chaîne de transport d'électrons et la membrane mitochondriale (figure 1.8).

En inhibant l'ATP synthase (le complexe V), l'oligomycine empêche les protons accumulés dans l'espace intermembranaire de revenir dans la mitochondrie et générer la force proton motrice nécessaire à la production d'ATP. L'accumulation de protons bloque la respiration mitochondriale puisque le gradient de protons qui se crée dans l'espace intermembranaire devient trop important. La consommation d'oxygène diminue, ce qui permet de quantifier la consommation d'oxygène nécessaire à la production d'ATP, en faisant la différence entre la consommation basale et consommation résiduelle après l'inhibition de l'ATP synthase^{88, 89, 113}.

On peut ensuite quantifier la capacité maximale de cette respiration en utilisant le trifluorocarbonylcyanide phenylhydrazone (FCCP). Ce composé agit comme un port transmembranaire qui permet la diffusion facilitée des protons de l'espace intermembranaire vers la lumière de la mitochondrie. Le FCCP empêche la formation du gradient de protons et force la mitochondrie à augmenter l'activité de sa chaîne de transport d'électrons au maximum de ses capacités pour combler la perte du gradient. La différence entre la consommation d'oxygène basale et celle obtenue en présence de FCCP représente la capacité maximale à produire de l'ATP, utile en cas d'un besoin énergétique soudain¹¹³. La réserve respiratoire représente la différence entre le taux de consommation d'oxygène basal et maximal.

Une certaine quantité d'oxygène peut être consommée par la cellule pour autre chose que la production d'ATP (i.e production d'oxyde nitrique, dérivé réactif de l'oxygène)¹¹³. Pour faire la distinction entre la consommation pour la production d'ATP et le reste, on utilise la roténone et l'antimycine A, qui sont respectivement des inhibiteurs des complexes 1 et 3¹¹⁵. Ces inhibiteurs

empêchent l'entrée d'électrons dans la chaîne de transport ce qui bloque complètement l'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire. La respiration mitochondriale est alors bloquée, ce qui permet de quantifier la consommation d'oxygène qui n'est pas relative à la production d'énergie par la mitochondrie. La différence entre la consommation d'oxygène en présence d'oligomycine et celle en présence de roténone et d'antimycine A représente l'oxygène nécessaire pour combler la fuite de protons de l'espace intermembranaire vers la lumière de la mitochondrie, qui n'utilise pas la force proton motrice^{113, 115}.

Cette caractérisation nous donne des informations importantes sur la consommation d'oxygène basale, la consommation nécessaire à la production d'ATP, la respiration maximale et la réserve respiratoire, les quatre paramètres qui seront comparés en présence et en absence de MARCH1 dans les différentes populations cellulaires.

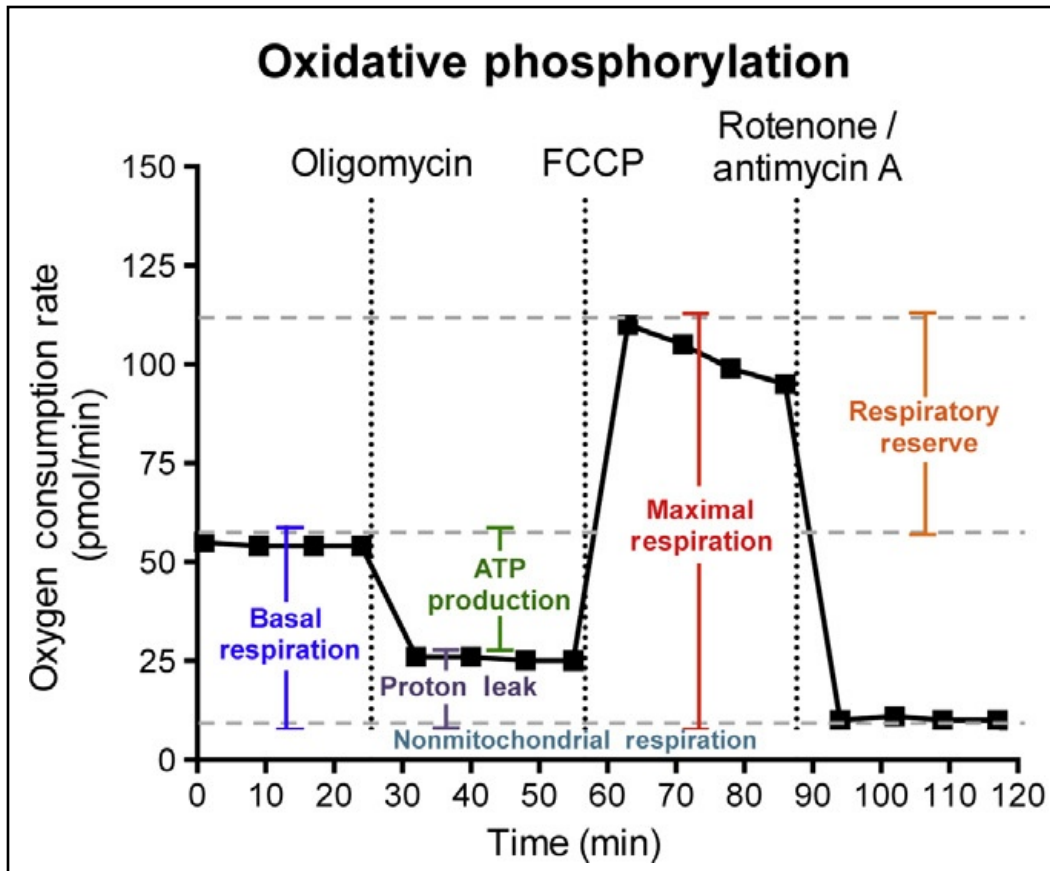


Figure 1.10 Profil de caractérisation de la respiration mitochondriale

L'injection d'inhibiteurs et de composés qui altèrent le fonctionnement normal de la mitochondrie nous permet d'établir le profil de la respiration mitochondriale et de quantifier cinq paramètres de cette respiration. On représente la consommation par le taux d'oxygène consommé (OCR) en picomole par minutes. La respiration basale représente la consommation d'oxygène à l'état de repos ou dans une condition expérimentale précise. L'ajout d'oligomycine, qui bloque l'ATP synthase, permet de quantifier la consommation d'oxygène nécessaire à la production d'ATP de la cellule dans les conditions expérimentales où elle se trouve. Le FCCP favorise le transport facilité des protons à travers la membrane. Il permet de quantifier la respiration maximale des cellules et la différence entre cette valeur et la respiration basale représente la réserve respiratoire. Le mélange d'antimycine A et de roténone inhibe complètement la respiration et permet de quantifier la consommation d'oxygène indépendante de la respiration mitochondriale. La différence entre celle-ci et la respiration après l'ajout d'oligomycine permet de quantifier la consommation nécessaire pour combler la fuite de protons de l'espace intermembranaire vers la lumière mitochondriale.

Figure tirée de *Methods in Enzymology*, 542, Pelletier *et al.*, Extracellular flux analysis to monitor glycolytic rates and mitochondrial oxygen consumption, 125-149, 2014 avec la permission de Elsevier.

1.4.7 L'acidification du milieu extracellulaire pour quantifier la glycolyse

De la même façon que pour la respiration mitochondriale, on peut décortiquer la glycolyse en utilisant des inhibiteurs propres à cette voie métabolique et des composés analogues au glucose (Figure 1.9).

En plaçant les cellules dans un milieu sans glucose, les premières lectures permettent de quantifier l'acidification du milieu extracellulaire qui n'est pas dû à la transformation de pyruvate en lactate, et donc, indépendante de la glycolyse.

L'ajout de glucose permet de quantifier la glycolyse basale de la cellule, en présence d'oxygène, dans des conditions de respiration mitochondriale fonctionnelle. À l'état de repos, dans une cellule immunitaire saine, sauf exception (i.e neutrophiles)¹¹³, cette voie métabolique n'est pas la plus active. Des stimulants, capables de délivrer un signal d'activation, de prolifération ou de maturation peuvent aussi être utilisés et leurs effets sur la glycolyse peuvent être quantifiés.

L'utilisation d'oligomycine empêche la production d'ATP par OXPHOS et force la cellule à dépendre uniquement de la glycolyse pour générer de l'ATP¹¹⁴. Cet inhibiteur permet de quantifier la glycolyse maximale sur laquelle dépend la cellule lorsque l'OXPHOS n'est pas en fonction (i.e absence d'oxygène, activation de la cellule). La différence entre la glycolyse basale et la glycolyse maximale permet de quantifier la réserve glycolytique de la cellule ¹¹³, ce qui reflète la capacité à répondre à une forte demande énergétique.

Le 2-deoxyglucose (2-DG) est un analogue du glucose que la cellule est incapable de métaboliser. Il bloque complètement la glycolyse dans la cellule au niveau de l'hexokinase (étape 1 de la glycolyse). La relâche de proton quantifiée à partir de ce moment résulte de l'acidification résiduelle du milieu extracellulaire, indépendante de la transformation du pyruvate en lactate.

Cette caractérisation nous donne des informations importantes sur la glycolyse basale et la réserve glycolytique, les deux paramètres qui seront comparés entre les souris dans les différentes populations cellulaires.

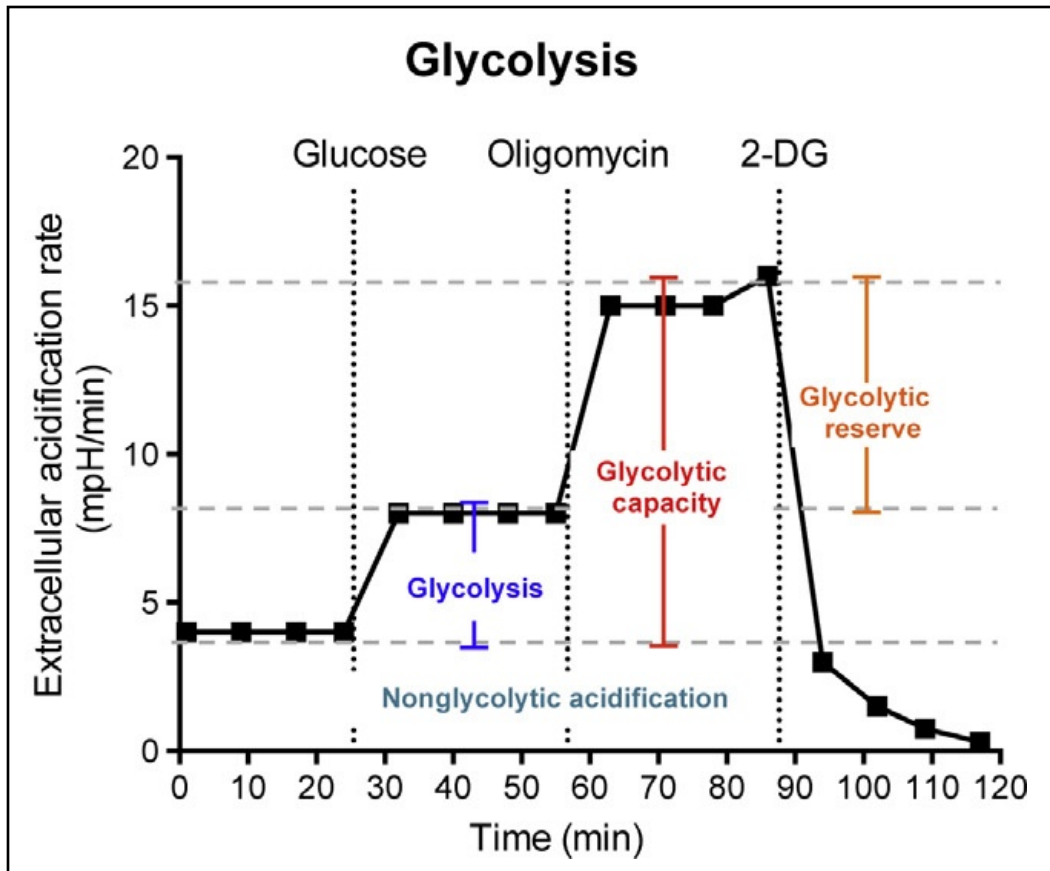


Figure 1.11 Profil de caractérisation de la glycolyse

Il est possible d'établir le profil de la glycolyse afin de quantifier les différents paramètres de celle-ci. Dans un milieu sans glucose, l'acidification du milieu est indépendante de la glycolyse. Après l'ajout de glucose dans le milieu extracellulaire, on peut quantifier la glycolyse basale dans les conditions expérimentales où se trouve la cellule. L'oligomycine, en bloquant la production d'ATP dans la mitochondrie, force la cellule à maximiser la glycolyse pour subvenir aux besoins de la cellule. Cet inhibiteur nous permet de quantifier la relâche maximale de proton dans le milieu et d'y associer la transformation de pyruvate en lactate. Le 2-DG est un analogue du glucose. Une fois dans la cellule, il est incapable d'être transformé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase. Par conséquent, il sature cette enzyme, bloquant le catabolisme du glucose et du même coup, la production de pyruvate.

Figure tirée de *Methods in Enzymology*, 542, Pelletier *et al.*, Extracellular flux analysis to monitor glycolytic rates and mitochondrial oxygen consumption, 125-149, 2014 avec la permission de Elsevier.

1.5 Mise au point concernant l'utilisation de GM-CSF pour différencier les progéniteurs de la moelle osseuse

Une publication récente (Helft *et al.*, juin 2015) sur l'utilisation du GM-CSF pour différencier les progéniteurs de moelle osseuse nous force à être prudents sur l'interprétation de résultats obtenus avec les BMDCs immatures. Une cellule dendritique est généralement décrite comme un leucocyte dont les fonctions principales sont la mobilité et la capacité à échantillonner un environnement et de présenter des antigènes aux lymphocytes T. Ces cellules sont généralement caractérisées par l'expression de l'intégrine CD11c et par la présence de CMH de classe II en surface. Pour concentrer les DCs après différenciation de 7 jours de la moelle osseuse, il est décrit que l'on peut trier les cellules flottantes et faiblement adhérentes qui expriment CD11c⁶⁶.

On peut admettre que les caractéristiques énoncées précédemment peuvent aussi être associées aux macrophages lorsque l'on rassemble différentes études. Il a d'ailleurs été démontré que ceux-ci exprimaient, dans certaines circonstances, CD11c et MHC-II¹¹⁶. Il a alors été proposé de séparer ces populations en fonction de leur ontogénie⁷⁴ puisque la différenciation de ces cellules est différente^{74, 117-119}. Contrairement aux macrophages résidents, issus de sac vitellin à partir de progéniteurs embryonnaires^{65, 119, 120}, les cellules dendritiques sont issues des précurseurs de cellules dendritiques communes (CDPs)^{67, 68}. Ces cellules sont communément appelées cellules dendritiques conventionnelles.

En plus de ces populations déjà existantes, il est possible de dériver des macrophages et des cellules dendritiques à partir de monocytes et de précurseurs présents dans la moelle osseuse comme il l'a été décrit plus tôt.

L'étude des cellules dérivées de la moelle osseuse s'est avérée l'alternative la plus efficace et économique pour étudier les cellules dendritiques, rares dans les tissus et difficiles à purifier à partir de ceux-ci. Ainsi, plusieurs des études concernant les DCs ont été faites sur les cellules obtenues à partir de progéniteurs mis en présence de facteurs de croissance. L'utilisation de GM-CSF sur la moelle osseuse est une technique utilisée depuis plus de 20 ans pour générer une population CD11c+ et MHC-II+, similaires aux DCs résidentes dans le tissu⁶⁶. Après environ 7

jours de différenciation en présence de facteur de croissance, on retrouve des cellules adhérentes et des cellules flottantes, résultant d'un mélange hétérogène.

Il est décrit que l'on peut concentrer les DCs en récoltant uniquement les cellules flottantes et faiblement adhérentes; les cellules ressemblant à des « macrophages » étant fortement adhérentes au fond du puits⁶⁶. De plus, un tri cellulaire par cytométrie de flux pour l'expression de CD11c était reconnu pour obtenir une population pure de DCs, contenant un mélange de DCs immatures et matures, ce qui expliquait la signature génétique hétérogène de cette population^{121, 122}. Une DC immature étant ici une cellule CD11c positive qui exprime du CMH-II et des molécules de costimulation (CD86 et CD40) à des niveaux faibles ou intermédiaires, comparativement à une DC matures, qui exprime fortement ces molécules de surface⁴⁷.

Les travaux du laboratoire de E. Sousa montrent que la population CD11c+ obtenue après un traitement de GM-CSF sur la moelle osseuse est en fait deux populations distinctes, d'ontogénie et d'expression de gènes différents. En étudiant les marqueurs de surface des populations de DCs matures et immatures, E. Sousa montre que les cellules « matures », expriment CD135 (récepteur pour Flt3L), CCR7 et CD117, généralement reconnus pour être des marqueurs de cellules dendritiques¹²³⁻¹²⁵. Parallèlement, il montre que les cellules qui ont un profil « immature » expriment CD64, CD115 (récepteur pour M-CSF) et CD14, généralement reconnus pour être des marqueurs de macrophages¹²⁶. Pour confirmer ces observations, ce laboratoire a séparé ces populations pour étudier l'expression des gènes *Zbtb46* et *MerTK*, exprimés respectivement par les DCs et les macrophages^{117, 118, 127, 128}. Les résultats montrent que la population « immature » exprime uniquement et fortement *MerTK* tandis que la population « mature » exprime *Zbtb46*. Ces observations appuient fortement l'idée d'une population hétérogène de cellules CD11c+, comprenant une population de macrophages et une de DCs.

Contrairement à la croyance qui indiquait que l'on pouvait séparer ces populations par leur propriété d'adhésion, ces travaux montrent que ça ne semble pas être le cas ¹²⁹. Le laboratoire E. Sousa propose donc un autre moyen d'isoler les DCs, en se basant sur l'expression de CD11b, CD11c, CMH-II, CD115 et CD135. La première séparation se fait en isolant les populations CD11c+ et CMH-II+ tels que c'est fait traditionnellement. En utilisant un marquage de CD11b+

et CMH-II+, on peut ensuite isoler 2 populations; 1) CD11b+ élevé et MHC-II intermédiaire et 2) CD11b+ intermédiaire et MHC-II élevé.

La première population est doublement positive pour CD115 et MerTK, ce qui permet de qualifier ces cellules de macrophages (ou GM-Macs comme il l'est écrit dans le papier) tandis que la deuxième population présente 3 patrons d'expression après un marquage de CD115 et de CD135. On y retrouve des DCs (ou GM-DCs) qui sont CD135 positives, des doubles négatives CD115- et CD135- (GM-DNs) et une population non identifiée CD115+ et CD135-¹²⁹.

Les monocytes sont issus des précurseurs communs de monocytes (cMoPs), eux-mêmes issus des progéniteurs de DC et macrophages (MDPs) tout comme les CDPs. Ces travaux montrent que les « vraies » DCs sont uniquement faites à partir de CDPs tandis que les macrophages obtenus en présence de GM-SCF peuvent être originaires des cMoPs et des MDPs lorsqu'on se base sur l'expression de CD135 et CD115. L'article conclut finalement que les DCs triées en utilisant le marquage de CD135 ressemblent fortement aux DCs migratoires tandis que les macrophages, eux, ne ressemblent pas vraiment à des populations déjà décrites¹²⁹.

Ces travaux révolutionnent l'utilisation des cellules dérivées de la moelle osseuse, mais surtout remettent en question une majorité des articles publiés depuis plus de 20 ans. Selon Helft *et al.*, les DCs « immatures » sont en fait des GM-Macs et les DCs « matures » sont en fait des DCs immatures, capable de répondre au LPS sans toute fois montrer une augmentation d'expression de CMH-II en surface¹²⁹, contredisant ainsi pas mal de croyances^{130, 131}. Une analyse de la signature génétique de chacune de ses populations a confirmé qu'il y avait un enrichissement de l'expression de gènes associés aux macrophages et aux DCs dans les populations de GM-Macs et de GM-DCs respectivement¹²⁹. N'utilisant pas d'IL-4 pour nos cultures, il est important de noter qu'elle n'empêche pas le développement des macrophages dérivés des monocytes¹²⁹.

Ces résultats sont à prendre en considération lors de nos futures expériences puisqu'ils suggèrent que la population que l'on cherche à purifier n'est pas celle que l'on pense. Compte tenu de l'importance que cet article peut avoir sur nos résultats expérimentaux et sur l'utilisation de GM-CSF sur la moelle osseuse, il était pertinent d'y réserver une section.

1.6 Hypothèses et objectifs

Compte tenu du rôle d'ubiquitine ligase de MARCH1, nous proposons que l'ubiquitination d'enzymes impliqués dans la glycolyse puisse mener à leur dégradation ou leur relocalisation. En réduisant l'expression de ces enzymes, MARCH1 pourrait ainsi moduler l'activité enzymatique menant à la production de pyruvate et de lactate. Ces substrats étant directement liés à la production d'énergie, on propose à MARCH1 un rôle de modulation de la production d'énergie dans la cellule.

Hypothèse 1 : L'expression de MARCH1 influence l'activité de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse aérobie dans la lignée cellulaire transfectée et les CPAs

Objectif 1 : Nous allons analyser les flux extracellulaires de différentes populations exprimant MARCH1, en comparaison avec ces mêmes populations, déficientes pour MARCH1.

Hypothèse 2 : MARCH1 n'influence pas le nombre ou la taille des mitochondries dans la cellule.

Objectif 2 : En utilisant un colorant spécifique pour les mitochondries, quantifiables en cytométrie de flux, nous allons comparer le nombre de mitochondries dans les CPAs avec et sans l'expression de MARCH1.

Hypothèse 3 : En absence de MARCH1, la production de lactate et la consommation de glucose sont augmentées.

Objectif 3 : En utilisant des réactions colorimétriques, nous allons quantifier la concentration de glucose et de lactate dans le milieu extracellulaire, suite à des stimuli au LPS et à l'IL-10 sur des cellules C57BL/6 et M1-KO.

Hypothèse 4 : MARCH1 est localisée aux mitochondries

Objectif 4 : Par microscopies confocales, nous allons démontrer la colocalisation de YFP-MARCH1 avec les mitochondries dans une lignée cellulaire transfectée.

Hypothèse 5 : Par sa capacité à transférer des ubiquitines sur des substrats et induire leur relocalisation ou leur dégradation, on suggère que l'expression de la LDHB et de Eno1 sera diminuée en présence de MARCH1.

Objectif 5 : Par Western Blot, nous allons quantifier l'expression de ces enzymes, relative à l'expression de l'actine, dans différentes populations cellulaires.

Chapitre 2 Procédures expérimentales

2.1 Anticorps

Les anticorps anti-souris utilisés dans pour les analyses de cytométrie en flux et pour le tri cellulaire ont été acheté chez BioLegend (sauf si spécifié autrement). Ils sont : CD11c conjugué à PE/Cy5 (clone HL3) ou conjugué à PE/Cy7 (clone HL3), MHC-II conjugué à BV510 (clone M5/114.5), CD86 conjugué à APC (clone GL-1), CD11b conjugué à APC (clone AF6-88.5) ou conjugué à FITC (clone M1/70), CD19 conjugué à APC/Cy7 (clone 6D5), CD3 conjugué à APC (clone 145-2C11), F4/80 conjugué à BV421 (clone BM8), Ly6C conjugué à APC/Cy7 (clone AL-21). Les lectures de cytométrie de flux sont faites sur un FACS Canto II et les analyses sur FlowJo et Kaluza.

2.2 Souris

Les colonies et les couples de reproductions des mutants MARCH1-KO et CMH-II-KI, sur fond C57BL/6, qui sont utilisés dans ce mémoire se trouvent dans l'animalerie stérile du G-520 à l'Université de Montréal. Les souris sont entreposées dans un environnement exempt de pathogène, conforme aux normes du Conseil canadien de protection des animaux. Les souris C57BL/6, utilisées en contrôle, ont été achetées chez Jackson Laboratory (#000664). L'utilisation des animaux fut conforme aux règlements et aux exigences imposées par le comité de déontologie sur l'expérimentation animale de l'Université de Montréal. Les souris de même sexe et de même âge ont été utilisées pour les expériences comparant un mutant à la souris contrôle. Les animaux avaient entre 6 et 14 semaines d'âge.

2.3 Plasmides

Le cDNA murin de MARCH1 est une gracieuseté de Satoshi Ishido et a été cloné en aval du cDNA codant pour la protéine fluorescente YFP dans le vecteur pcDNA3.1-YFP, obtenu du

laboratoire de Daniel Lamarre de l'Institut Armand-Frappier. Ce clonage est réalisé en utilisant les sites de restriction BamH1 et Xho1 du site de clonage multiple en aval de la séquence codant pour YFP, pour obtenir le plasmide YFP-M1. Le plasmide YFP-M5 nous a gentiment été donné par le laboratoire de Richard Youle du NIH.

2.4 Culture cellulaire et transfections

Les lignées cellulaires utilisées sont les HEK293xt, obtenues du laboratoire de Viktor Steimle de l'Université de Sherbrooke, sont cultivées dans du DMEM (Wisent), auquel on a ajouté du sérum de veau foetal (FBS) de Wisent à 5% de concentration final, du pyruvate de sodium (10 mM), de la pénicilline et streptomycine (50 µg/ml) et de l'hepes (25 mM).

Les cellules sont mises sur un pétri de 10 cm de diamètre pour adhésion, au nombre de $1,5 \times 10^6$ cellules par pétri. La transfection au polyethylneimine (PEI) en utilisant 3 µg de PEI par µg de cDNA, se fait 24h après l'adhérence des cellules. Les cellules sont récupérées 36 à 48h après la transfection pour les expériences.

La lignée cellulaire de X63, pour la production de GM-CSF, a été obtenue du laboratoire de Mariela Segura et la lignée de L929 utilisées pour la production de M-CSF a été obtenue du laboratoire de Sylvie Lesage. Une fois confluentes, les cellules sont approvisionnées en milieu frais RPMI 10% FBS graduellement jusqu'à un volume de 100 ml. Les surnageants sont ensuite recueillis puis filtrés, pour être mélangé aux milieux utilisés pour dériver les cellules de la moelle osseuse.

2.5 Cellules dérivées de la moelle osseuse

Pour la production des cellules dérivées de la moelle osseuse, les fémurs et les tibias des souris sont vidés de leur moelle. Les érythrocytes ont été lysés par un traitement au NH_4Cl 0,83% de 5 minutes sur glace. Les cellules restantes sont ensuite centrifugées à 400g durant 5 minutes et misent en plaque au nombre de $1,5 \times 10^6$ cellules par puits (plaque de 6 puits).

Pour l'obtention de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse, les cellules sont cultivées dans 3ml de milieu RPMI 10% FBS complet supplémenté à 10% de surnageant de X63 contenant du GM-CSF, de pyruvate de sodium (10 mM), de pénicilline et streptomycine (50 µg/ml) et d'HEPES (25 mM). Les X63 sont une lignée cellulaire stable issus d'un myélome, transfectée avec le cDNA codant pour le gène du GM-CSF, permettant la sécrétion de GM-CSF dans le surnageant. Les macrophages dérivées de la moelle osseuse sont cultivés dans 3 ml de milieu DMEM 10% FBS complet supplémenté à 10% de surnageant de L929 contenant du M-CSF, de pyruvate de sodium (10 mM), de pénicilline et streptomycine (50 µg/ml) et d'hepes (25 mM). Les L929 sont des fibroblastes de souris qui sécrètent du M-CSF. Après 3 jours de culture, un ajout de 3 ml du même milieu est fait pour chaque culture. Les cellules sont récoltées au 6ème ou au 7ème jour, dépendamment des expériences. Pour les BMDCs, seules les cellules flottantes et faiblement adhérentes sont récoltées, contrairement au BMDMs, où seules les cellules fortement adhérentes sont récoltées, par traitement à la trypsine (Wisent).

2.6 Isolation des cellules par macropinocytose

Les BMDCs sont récoltées après 7 jours de croissance en présence de GM-CSF et sont incubé 45 minutes à 37°C en présence de Dextran (20 mM) conjugué avec du FITC (Sigma). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois au PBS, bloquées avec du sérum de rat (Sigma) 10 minutes à 4°C et marquées avec un anti-CMH-II conjugué de l'APC (M5/114.5) et un anti-CD11c conjugué a du PE-Cy7 (HL3) durant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont triées positivement selon l'expression des 3 marqueurs par FACS ARIA (BD).

2.7 Préparation des splénocytes

La rate des souris est prélevée et écrasée dans un pétri pour recueillir les cellules de la pulpe. Les érythrocytes sont lysés par un traitement au NH₄Cl 0,83% de 5 minutes sur glace. Les cellules restantes sont centrifugées à 400g durant 5 minutes et resuspendues dans un milieu RPMI

(Wisent) complet supplémenté à 10% FBS, de pyruvate de sodium (10 mM), de pénicilline et streptomycine (50 µg/ml) et d'HEPES (25 mM).

2.8 qPCR en temps réel

Les cellules ont été resuspendues dans du TRIzol (Sigma) et le tout est congelé à -20°C. Une fois les échantillons décongelés, 250 µl de chloroforme est ajouté et les échantillons sont incubés 5 minutes à température pièce. Une centrifugation de 15 minutes, à 4°C et à une vitesse de 1300g permet la formation de 2 phases. La phase aqueuse, du dessus, est récupérée et mélangés à 600 µl d'isopropanol (600 µl par ml de TRIzol). L'incubation est de 10 minutes à température pièce, suivie d'une centrifugation de 15 minutes, à 4°C et 1300g. Le culot est lavé à l'alcool 70% et séché à l'air avant d'être resuspendu dans de l'eau ultra pure sans RNase. Une digestion de de l'ADN par DNase est faite selon le fabricant (Ambion). La quantification de l'ARN est faite par spectrométrie (Nanodrop). Le cDNA est obtenue en utilisant la transcriptase inverse Superscript, utilisé selon le fabricant (Invitrogen) en utilisant 1 µg d'ARN par échantillon. Chaque réaction utilise 1 µg de cDNA, 1,5 µl d'amorce à 5 µM (5' et 3'), 8,5 µl d'eau DEPC et 12,5 µl de *SYBRgreen*® (Roche) pour un volume final de 25µl par échantillon. Le gène pPia, codant pour la peptidylprolyl isomerase A, est utilisé comme gène rapporteur pour quantifier l'expression relative.

Les séquences des deux amorces MARCH1 utilisés sont :

5' CCTTGCGCTTTGTCCACCAGTCCT 3'

5' AATATTTTCCTCCTTTCGCTCGTG 3'

2.8 Microscopie confocale

Les lamelles ont préalablement été traitées à la poly-L-lysine, 2h à 37°C, pour permettre l'adhésion des cellules. Les HEK293 sont déposés sur la lamelle au nombre de 9×10^4 par lamelle dans un volume de 100µl de DMEM 5% FBS, contenant du pyruvate de sodium (10mM), de

la pénicilline et streptomycine (50 µg/ml) et de l'Hepes (25mM). Les cellules sont laissées 2h à 37°C pour l'adhésion. Les cellules sont transfectées avec YFP-M1 ou YFP-M5 durant 36h avant de subir une coloration des mitochondries par *MitoTracker® Red CMXRos* (300nM) de Life Technologies durant 1h à 37°C suivie de 2 lavages et d'une fixation. Le noyau est coloré au DAPI et les lamelles sont monté sur les lames après 2 lavages. L'analyse des 3 couleurs est faite par le microscope LDS700 de Zeiss à l'IRIC et les longueurs d'ondes utilisées pour les lectures sont 488 nm, 555 nm et 633 nm.

2.9 Coloration spécifique des mitochondries

Les cellules sont mis en présence d'un colorant spécifique pour les mitochondries. Le *MitoTracker® Red CMXRos* est utilisé à une concentration de 300 nM, tandis que le *MitoTracker® Green* est utilisé à 100 nM (Life Technologies). Selon le fabricant, une plus grande concentration peut provoquer une coloration non-spécifique d'autres organelles. Les cellules sont incubées 45 minutes à 37° en présence du marqueur et elles sont lavées deux fois avant d'être marquer par des anticorps ou de passer en cytométrie.

2.10 Western Blot

Les cellules ensuite lysé dans un tampon Triton 0.1% durant 30 minutes sur glace et les protéines sont resuspendues dans un tampon Leammli réducteur (6X) après avoir retiré les débris en centrifugeant à 9000g. Les échantillons sont chauffés 5 minutes dans un bain marie à 100°C puis mis sur un gel poly-acrylamide 10% SDS-PAGE. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et la membrane est bloquée avec du lait durant 3h. L'anticorps primaire anti-ENO1 (Thermo Scientific - PA513459), anti-βactine (Cell signaling - #4967) et anti-LDHB (Abcam - Ab53292) sont utilisés à la concentration recommandée par le fournisseur, dans du lait, et incubés avec la membrane toute la nuit à 4°C. Après 3 lavage de 10 minutes au TTBS, les anticorps anti-souris (Jackscon, 111-035-003) ou anti-lapin (Jackscon, 111-035-045) couplés à une peroxydase sont incubés 2 heures à température pièce. La membrane

est lavée 3 fois durant 10 minutes puis révélée. La quantification des densités optiques a été faite avec ImageJ.

2.11 Analyseur de flux extracellulaire

Discerner les petites variations de pH dans le milieu nécessite l'absence d'effet tampon. Les milieux RPMI et DMEM sans glucose en poudre (Sigma - R1382 et D5030) sont reconstitués sans ajout de bicarbonate de sodium (responsable de l'effet tampon) et supplémenté à 10% de FBS (Wisent) et de glucose (4,5 g/L, Wisent), dépendamment des expériences.

Les cellules sont comptées et mises en plaque de 24 puits, spécifiques à l'analyseur de flux. En raison de l'importance d'avoir un tapis cellulaire uniforme qui recouvre toute la surface du puits, le nombre de cellules mises par puits varie selon la taille de celles-ci. Les BMDCs sont récoltées après 7 jours de culture et mises en plaque au nombre de 4×10^4 cellules par puits dans un volume de 100 μl de milieu RPMI sans tampon avant d'être centrifugé 5 minutes à 400g pour accélérer la formation du tapis de cellule. Un volume de 400 μl du même milieu est ajouté pour obtenir un volume final de 500 μl par puits.

Les splénocytes totaux sont mis en plaque au nombre de 1×10^6 par puits. Les étapes suivantes ne diffèrent pas des BMDCs.

Les BMDMs sont récoltées après 6 jours de culture et mis en plaque 4×10^4 cellules par puits dans un volume de 100 μl de DMEM avec tampon. Elles sont laissées adhérentes durant 4h et un volume de 900 μl du même milieu est ajouté pour la nuit. Le lendemain, deux lavages au DMEM sans tampon sont nécessaires pour enlever le milieu contenant le bicarbonate de sodium. Un volume de 500 μl de DMEM sans tampon est ajouté sur les cellules.

Avant d'être mises dans l'analyseur de flux, les cellules sont placées dans un incubateur sans CO_2 à 37°C pour une heure, pour permettre une acclimatation au nouveau milieu.

L'analyseur de flux permet l'injection d'un maximum de 4 composés, à différents temps durant l'expérience. Les composés utilisés dans nos expériences sont l'oligomycine (1 μM , Sigma - O4876), le FCCP (1.5 μM , Sigma - C2920), la roténone (1 μM , Sigma - R8875) mélangée à l'antimycine A (1 μM), du 2-DG (100 mM, Sigma - D6134), du glucose (20 mM), du LPS (500

ng par puits, Sigma - L2880) et de l'IL-10 (100 ng par puits, Peprotech). Chaque injection est suivie d'un mélange de 5 minutes. Toutes les mesures sont faite suite à la répétition des étapes suivantes, soit un mélange de 3 minutes, une attente de 2 minutes, et une mesure de 3 minutes (1 mesure par minute).

2.12 Quantification de la consommation de glucose et production de lactate

Les kits de détection de lactate (Sigma - MAK064) et de glucose (Abcam - Ab65333) sont utilisé selon le fabricant. Les échantillons ont été dilués 25 fois (2 µl dans 48 µl de tampon fourni avec le kit) pour les tests. Pour 50 µl d'échantillons dilué, on ajoute 46 µl de tampon, 2 µl d'enzyme et 2 µl de réactif coloré). L'équation de la courbe standard est utilisé pour calculer la concentration en fonction de l'absorbance à 570 nm. Pour les tests de lactate, un milieu sans sérum est utilisé, en raison de la présence de lactate dans celui-ci.

2.13 Analyses statistiques

Les analyses statistiques des expériences de lactate et de glucose avec ou sans stimulation aux LPS ont été fait en utilisant un test ANOVA à 2 paramètres. ** < p = 0,05.

Chapitre 3 Résultats

Dans le but d'identifier de nouvelles cibles potentielles de MARCH1, le laboratoire du Dr. Thibodeau a réalisé un *pull-down*, une technique qui combine l'immunoprécipitation d'une protéine et de la spectrométrie de masse pour révéler les protéines en interaction avec MARCH1. Parmi les protéines retrouvées, le laboratoire a identifié 3 enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire et plus précisément dans la glycolyse. Elles sont l'énolase 1 (Eno1), la lactate déhydrogénase B (LDHB) et la pyruvate kinase (PKM2). En raison du lien entre le métabolisme et la réponse immunitaire, combiné à l'expression de MARCH1 dans le CPAs, nous avons cherché le lien entre notre protéine d'intérêt et le métabolisme de la CPA.

MARCH1 diminue la glycolyse et la respiration mitochondriale maximale lorsqu'elle est surexprimée dans une lignée cellulaire

À la lumière des résultats indiquant que MARCH1 pourrait interagir avec des enzymes de la glycolyse, nous nous sommes demandé s'il était possible pour MARCH1 de moduler le métabolisme cellulaire. Pour étudier l'effet de MARCH1 sur le métabolisme, nous avons, dans un premier temps, utilisé un système de lignées cellulaires de HEK293xt dans lesquelles nous avons forcé l'expression transitoire de MARCH1-YFP (M1-YFP) par transfection. Les cellules ont été placées dans un analyseur de flux extracellulaire pour étudier leur métabolisme. En ajoutant des inhibiteurs de la respiration mitochondriale, du glucose et des analogues du glucose, on peut caractériser le profil de la respiration mitochondriale et celui de la glycolyse dans ces HEK293xt, en présence ou non de MARCH1.

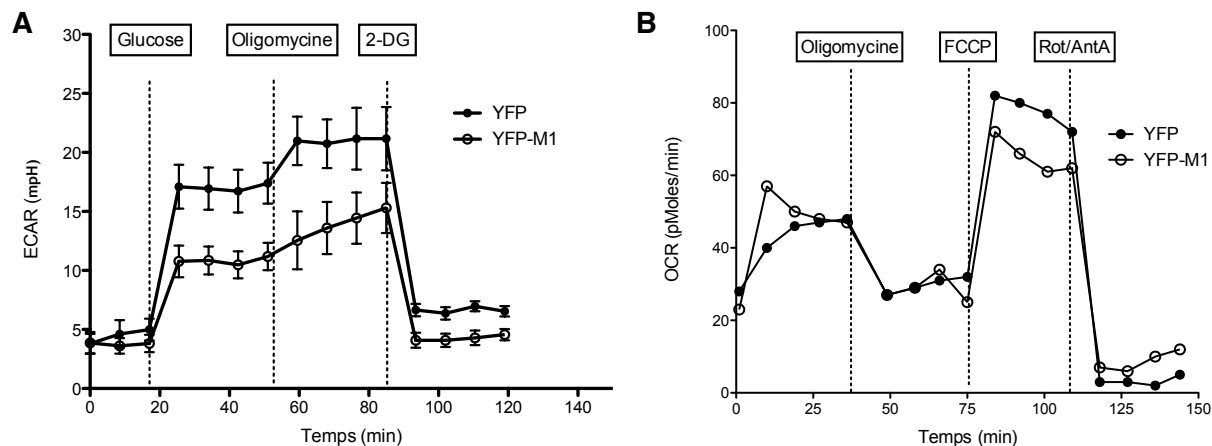


Figure 3.1 L'expression transitoire de MARCH1 diminue la glycolyse et la respiration maximale

Les cellules sont transfectées avec les plasmides codants pour YFP (utilisé en contrôle) et M1-YFP. Elles ont été triées selon l'expression de YFP pour étudier uniquement le métabolisme des cellules transfectées. A) Caractérisation de la glycolyse basale et maximale en mesurant le taux d'acidification du milieu extracellulaire suite aux injections, dans l'ordre, de glucose, de l'oligomycine et du 2-DG. B) Caractérisation de la respiration mitochondriale basale et maximale en mesurant le taux de consommation d'oxygène suite aux injections, dans l'ordre, d'oligomycine, de FCCP et d'un mélange d'antimycine A et de roténone, des inhibiteurs de la respiration mitochondriale. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne (+/- SEM). Représentatif de 2 expériences.

La glycolyse et la respiration mitochondriale maximale semblent être diminuées dans les cellules qui expriment MARCH1. En effet, la glycolyse basale de la cellule, mesurée après l'ajout de glucose, est augmentée de plus de 50% en absence de MARCH1 (fig. 3.1A). Lorsqu'on inhibe la production d'ATP par phosphorylation oxydative, la cellule n'a pas le choix de transformer plus de pyruvate en lactate pour maintenir la production d'ATP et subvenir à ces besoins. L'ajout d'oligomycine provoque donc une augmentation de l'activité glycolytique, qui semble supérieure de près de 60% en absence de MARCH1 (fig. 3.1A). Le FCCP, qui empêche l'accumulation de proton dans l'espace intermembranaire, force la cellule à maximiser sa chaîne de transport d'électrons pour favoriser le flux de proton de la lumière de la mitochondrie vers l'espace

intermembranaire. En regardant la figure 3.1b, on peut affirmer que l'absence de MARCH1 favorise une plus grande activité de la chaîne de transport d'électron et augmente la capacité maximale de respiration de la cellule et sa réserve respiratoire (fig. 3.1B).

Cependant, la surexpression d'une protéine dans un système de lignée cellulaire peut parfois influencer les résultats en raison d'une expression bien supérieure à la normale. L'utilisation d'un système plus naturel est donc essentielle pour confirmer cette observation.

MARCH1 diminue la respiration maximale et la réserve respiratoire dans les cellules primaires

Notre laboratoire détient une souris MARCH1-KO homozygote sur fond C57BL/6, ce qui nous permet d'étudier et de comparer le métabolisme des cellules déficientes en MARCH1 avec celui des cellules C57BL/6. Comme il l'a été décrit dans le premier chapitre, l'expression constitutive de MARCH1 est restreinte aux CPAs. Pour la suite de nos expériences, nous travaillerons principalement avec des splénocytes, des BMDCs immatures et des BMDMs pour démontrer les différences dans le métabolisme. Toujours en utilisant les inhibiteurs de respiration mitochondriale, nous avons décortiqué la respiration mitochondriale en présence ou non de MARCH1.

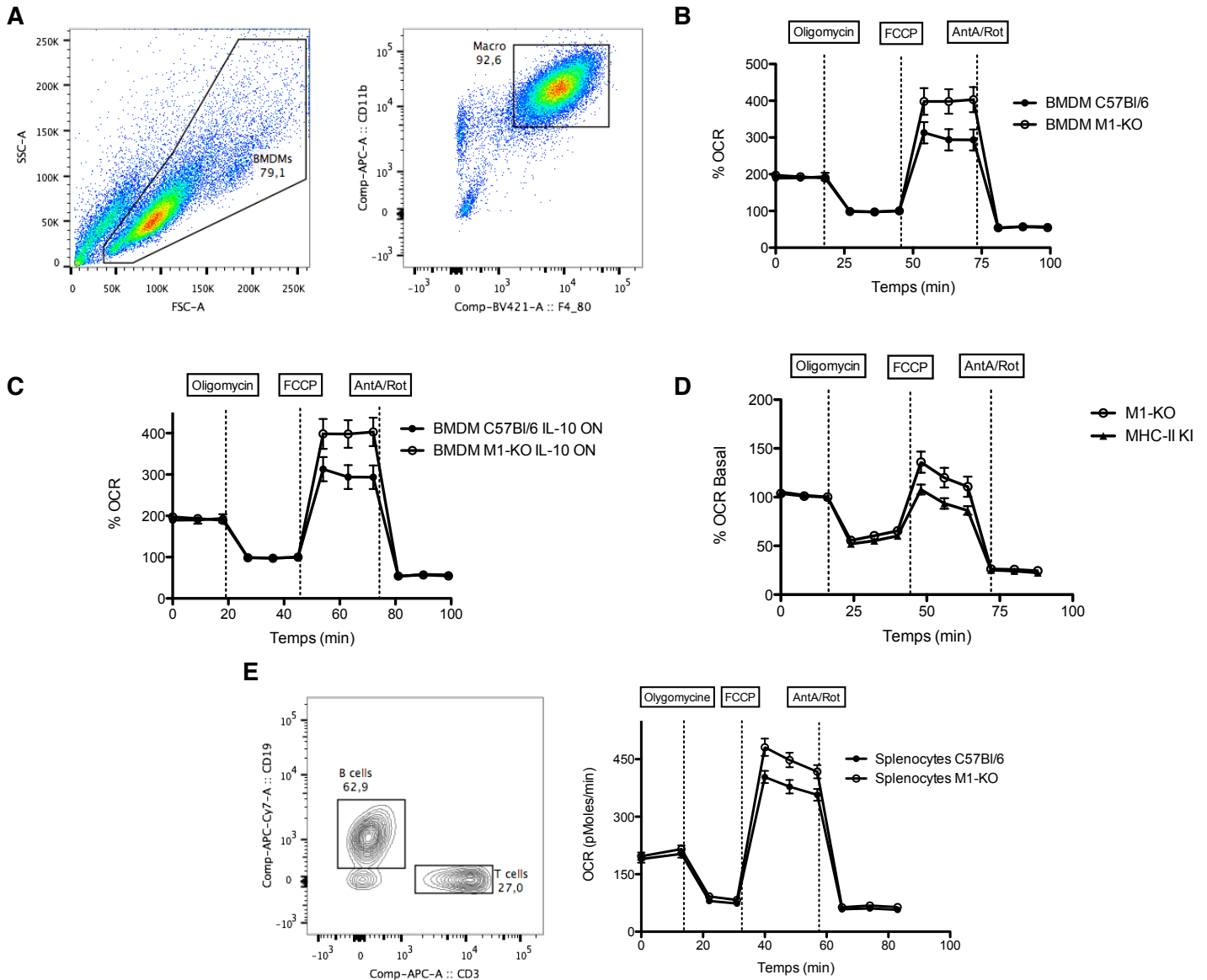


Figure 3.2 MARCH1 diminue la respiration maximale dans les splenocytes et les BMDMs

Caractérisation de la respiration mitochondriale basale et maximale dans les BMDMs et les splenocytes en injectant dans l'ordre de l'oligomycine, du FCCP et un mélange d'antimycine A et de roténone, des inhibiteurs de la respiration mitochondriale. Avant d'être placées dans l'analyseur de flux, les cellules sont passées en cytométrie pour évaluer les proportions des cellules étudiées mises dans le puits. A) Analyse des BMDMs obtenues après 6 jours de croissance en présence de M-CSF, selon l'expression des marqueurs CD11b, Ly6c (non montré) et F4/80. Les proportions de BMDM étant similaires entre les cellules WT et M1-KO, nous

montrons uniquement les résultats pour la WT. Les proportions obtenues pour les cellules M1-KO sont montrées en annexe, figure S1a. B) Pourcentage du taux de consommation d'oxygène BMDMs de C57BL/6 et de M1-KO relatif à la consommation d'oxygène en présence d'oligomycine. C) Pourcentage du taux de consommation d'oxygène de BMDMs de C57BL/6 et de M1-KO préalablement traités à l'IL-10 durant 15h, relatif à la consommation d'oxygène en présence d'oligomycine. D) Pourcentage du taux de consommation d'oxygène BMDMs de MHC-II KI et de M1-KO relatif à la consommation d'oxygène basale. E) Taux de consommation d'oxygène par des splénocytes de C57BL/6 et de M1-KO. Les proportions de cellules B et de cellules T des cellules CD45+ de la rate sont illustrées en dot plot, selon l'expression de CD19 et CD3. Les proportions des différentes populations de lymphocytes obtenues dans les souris WT et M1-KO étant similaires, nous montrons uniquement les résultats pour la WT. Les proportions obtenues pour les cellules M1-KO sont montrées en annexe, figure S1b.

Moyenne faite sur les valeurs de consommation dans 10 puits par lignée de souris, +/- SEM. Représentatif d'au moins 2 expériences.

Nous nous sommes tournés vers un système de cellules primaires de C57BL/6 que l'on compare avec des cellules de M1-KO. La figure 3.2 montre les résultats de la caractérisation de la respiration mitochondriale dans les splénocytes et les BMDMs. Dans la figure 3.2A, on montre que plus de 90% des cellules mises dans l'analyseur de flux sont des cellules positives pour F4/80 et CD11b, après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF. On considère que ces cellules sont des macrophages.

Dans la figure 3.2B et 3.2C, on remarque que la respiration basale et la consommation d'oxygène nécessaire à la production d'ATP représentent le même pourcentage de leur valeur de référence lorsque l'on compare les cellules primaires C57BL/6 et M1-KO et présence ou non d'IL-10. On utilise le pourcentage d'une valeur de référence pour réduire la différence associée à un mauvais comptage cellulaire ou à une mortalité cellulaire plus élevée dans certains puits.

On observe que la respiration maximale est environ 33% plus élevée dans les cellules primaires de M1-KO (fig. 3.2B) suite à l'ajout de FCCP. En présence d'IL-10, cette différence reste la même, soit environ 33% plus élevée que le contrôle (fig. 3.2C). Dans la figure 3.2D, on

remarque que la présence accrue de CMH-II en surface cellulaire n'influence pas la respiration maximale comme le fait l'absence de MARCH1 dans les résultats précédents (fig. 3.2B et 3.2C). La réserve respiratoire reste supérieure dans les BMDMs M1-KO. Ce résultat confirme que l'augmentation de la respiration maximale est indépendante des niveaux d'expression ou de l'ubiquitination du CMH-II.

Ces résultats sont reproduits dans les splénocytes. Notre mélange de splénocytes comprend généralement 60 +/- 5% de lymphocytes B pour environ 30% de cellules T, auxquels s'ajoutent un 5-10% de cellules CD19- et CD3- (fig. 3.2E). Dans la figure 3.2E, la respiration mitochondriale maximale est toujours plus élevée dans les cellules primaires M1-KO que dans les C57BL/6. La réserve respiratoire et la respiration maximale sont plus importantes dans les BMDMs et les splénocytes déficients en MARCH1. L'augmentation de la glycolyse (ECAR) n'a cependant pas pu être reproduite convenablement dans les BMDMs ni dans les splénocytes (données non montrées).

MARCH1 diminue la respiration maximale et la réserve respiratoire dans les BMDCs immatures

Afin d'étudier le métabolisme des cellules dendritiques en présence de MARCH1, il nous faut trouver un moyen d'isoler les iDCs parmi le mélange hétérogène obtenu à partir de la moelle osseuse cultivée en GM-CSF. La figure 3.3A représente un exemple d'isolation classique de BMDCs tel que décrit dans différentes publications⁶⁶. Pour les premières expériences d'analyse de flux extracellulaires que nous avons fait, nous avons isolé par cytométrie en flux les cellules doubles positives pour CD11c et CD11b, après 7 jours de différenciation en présence de GM-CSF. En étudiant parallèlement l'expression de CD86 et CMH-II de cette population double positive, nous avons remarqué qu'on retrouvait 3 populations dans notre culture de BMDCs (Fig. 3.4A et B). Les cellules immatures ne représentent que 45% de notre mélange, ce qui n'est pas suffisant pour montrer des différences significatives dans le métabolisme (données non montrées). En amplifiant le pourcentage de cellules qui expriment MARCH1, on pense accentuer les différences observées.

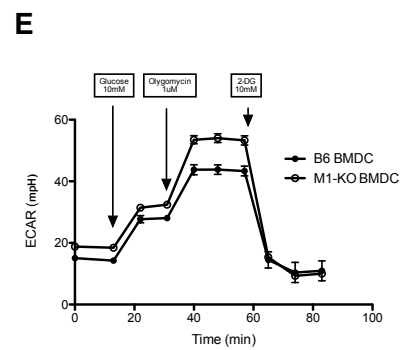
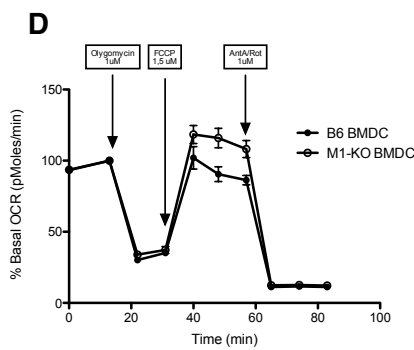
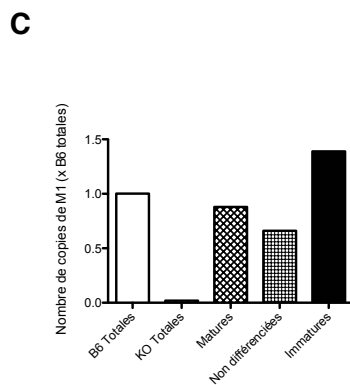
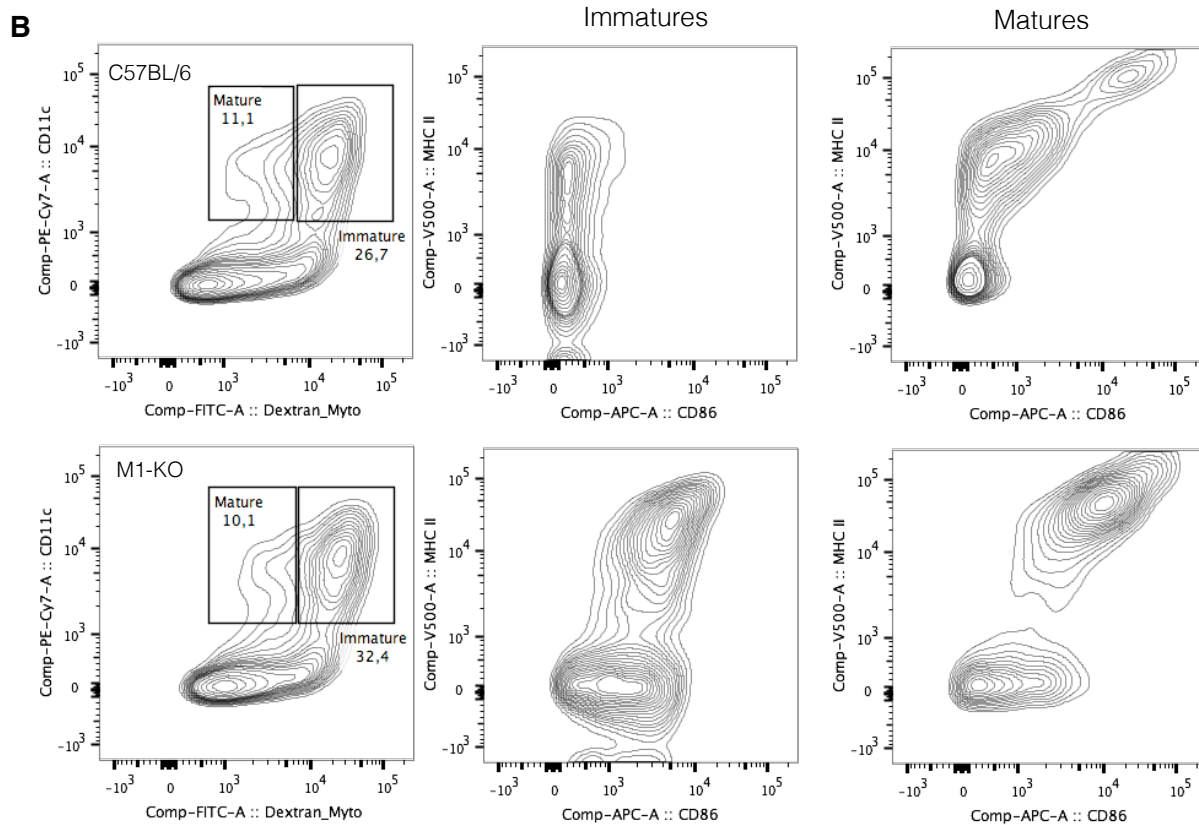
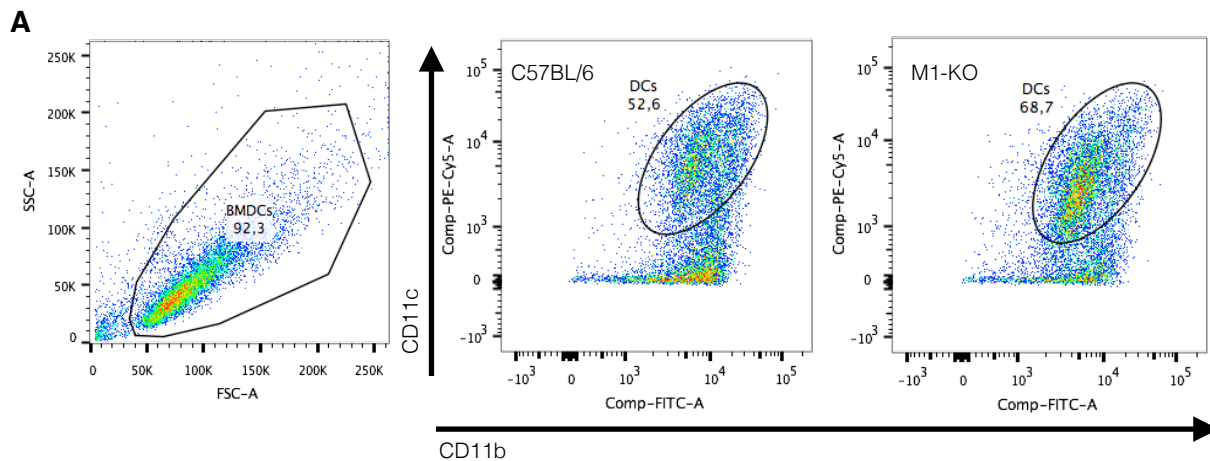


Figure 3.3 La respiration et glycolyse maximales sont diminuées dans les cellules C57BL/6 CD11c+ Dextran^{élevé}.

A) Dot plot montrant le pourcentage de la population CD11c (PE/Cy5) CD11b (FITC) double positive dans les souris C57BL/6 et M1-KO.

Pour les résultats suivants, les BMDCs sont récoltées après 7 jours de différenciation en présence de GM-CSF. Elles sont incubées 45 minutes en présence de dextran-FITC (20mM) à 37°C puis lavées 2 fois. B) Représentation en contour des populations matures et immatures en fonction de l'internalisation du dextran et de l'expression de CD11c. Les marquages de surface sont faits avec : CD11c , CD86 et CMH-II. C) Les cellules ont été triées par FACS en 3 populations, définies selon l'expression de CD11c et de l'internalisation du dextran (FITC). L'ARNm de MARCH1 est quantifié par PCR quantitatif en temps réel directement après le tri cellulaire. Les résultats sont exprimés en fonction de l'expression de MARCH1 dans l'ensemble du mélange hétérogène qui flotte dans le puits après 7 jours de différenciation, dont la valeur d'expression arbitraire est 1. D) Pourcentage du taux de consommation d'oxygène par des BMDCs immatures de C57BL/6 et de M1-KO relatif à la consommation d'oxygène basale. Caractérisation de la respiration mitochondriale basale et maximale en injectant dans l'ordre de l'oligomycine, du FCCP et un mélange d'antimycine A et de roténone. E) Taux d'acidification du milieu extracellulaire des BMDCs immatures de C57BL/6 et de M1-KO qui permet, avec l'injection de glucose, d'oligomycine et de 2-DG, de caractériser la glycolyse basale et maximale.

Représentatif de 3 expériences.

La purification des DCs immatures est faite selon l'expression de CD11c et la capacité de faire un échantillonnage de l'environnement par macropinocytose. En utilisant le dextran couplé à un fluorochrome (FITC), nous avons isolé les cellules CD11c+ ayant incorporé le plus de dextran (fig. 3.3B). Selon l'expression de l'intégrine CD11c et de l'incorporation du dextran, on retrouve le patron d'expression suivant, 1) une population doublement négative, qui représenterait les cellules non différenciées ou autres, 2) une population positive pour CD11c et faiblement positive pour le dextran, que l'on qualifie de DCs mature, et 3) une dernière population positive

pour CD11c et fortement positive pour le dextran, que l'on qualifie de DCs immature. Ces patrons d'expression de CD11c⁺ en fonction de l'incorporation du dextran sont similaires entre la BMDCs de la C57BL/6 et la M1-KO (Fig. 3.3B).

Pour confirmer que la population CD11c⁺ Dextran^{élevé} est bien constituée de cellules immatures, nous avons regardé l'expression de CD86 et de MHC II sur les cellules C57BL/6 par cytométrie en flux. Dans la figure 3.3B, on voit que la population immature de la souris C57BL/6 est positive pour CMH-II, mais n'exprime pas encore la molécule de co-stimulation. Lorsque comparé aux cellules de la souris M1-KO, on remarque que l'expression en surface de ces molécules est plus élevée que dans la C57BL/6, en raison de l'absence de MARCH1.

Pour confirmer cette observation, nous avons comparé l'expression de MARCH1 par qPCR dans les 3 populations définies selon l'expression de CD11c et du dextran. Les mélanges hétérogènes de BMDCs de C57BL/6 et de M1-KO sont utilisés respectivement comme référence (valeur d'expression arbitraire égale à 1) et comme contrôle négatif. Les résultats de la figure 3.3C nous permettent d'affirmer que la population CD11c⁺ Dextran^{élevé} exprime le plus d'ARNm de MARCH1. En effet, cette population exprime environ 1,5 fois plus de MARCH1 que le mélange hétérogène de cellules, tandis que la population dite mature en exprime environ le 2 tiers (fig. 3.3C).

Lorsqu'une DC immature commence sa maturation, elle diminue l'expression de MARCH1 pour permettre l'accumulation en surface du CMH II et de CD86. Dans la population dite mature, on retrouve 2 populations bien distinctes pour les cellules C57BL/6, soit 1) une population CD86^{int} et CMH-II^{int} et 2) une population CD86^{élevé} et CMH-II^{élevé}. Ces 2 populations sont fusionnées dans les cellules de la souris M1-KO lorsque qu'on visualise l'expression de CD86 et du CMH-II (fig. 3.3B). On peut déduire que la population CD86^{int} et CMH-II^{int} expriment MARCH1, mais ne semble pas avoir les mêmes capacités de macropinocytose qu'une population de iDCs.

Lorsque l'on met les cellules CD11c⁺ Dextran^{élevé} dans l'analyseur de flux extracellulaire, on reproduit ce qu'on observe dans les BMDMs et dans les splénocytes, soit une capacité de

respiration maximale supérieure et une plus grande réserve respiratoire dans les cellules qui n'expriment pas MARCH1 (fig. 3.3D). Les résultats sont exprimés cette fois-ci en pourcentage de la consommation d'oxygène basale. La respiration maximale est environ 20% plus élevée en absence de MARCH1 dans les BMDCs immatures (fig. 3.3D). En plus de reproduire ce résultat, on remarque que la glycolyse est elle aussi augmentée dans cette population déficiente pour MARCH1. La glycolyse maximale semble être environ 20% plus élevée (fig. 3.3E). On retrouve ce qu'on avait observé dans la figure 3.1A, soit une capacité glycolytique supérieure en absence de MARCH1 dans les DCs immatures.

Le nombre de mitochondries n'est pas influencé par MARCH1 dans les cellules présentatrices d'antigènes.

La chaîne de transport membranaire de la mitochondrie est le siège de la production d'ATP. Un nombre augmenté de mitochondries pourrait influencer la consommation d'oxygène par la cellule. Il semblait alors nécessaire de comparer le nombre de mitochondries dans la cellule en absence et en présence de MARCH1. En colorant les mitochondries avec le *MitoTracker® Green* (Life technologies), il est possible de quantifier de façon semi-quantitative le nombre de mitochondries par cellules, celui-ci étant proportionnel à la moyenne de fluorescence de la cellule.

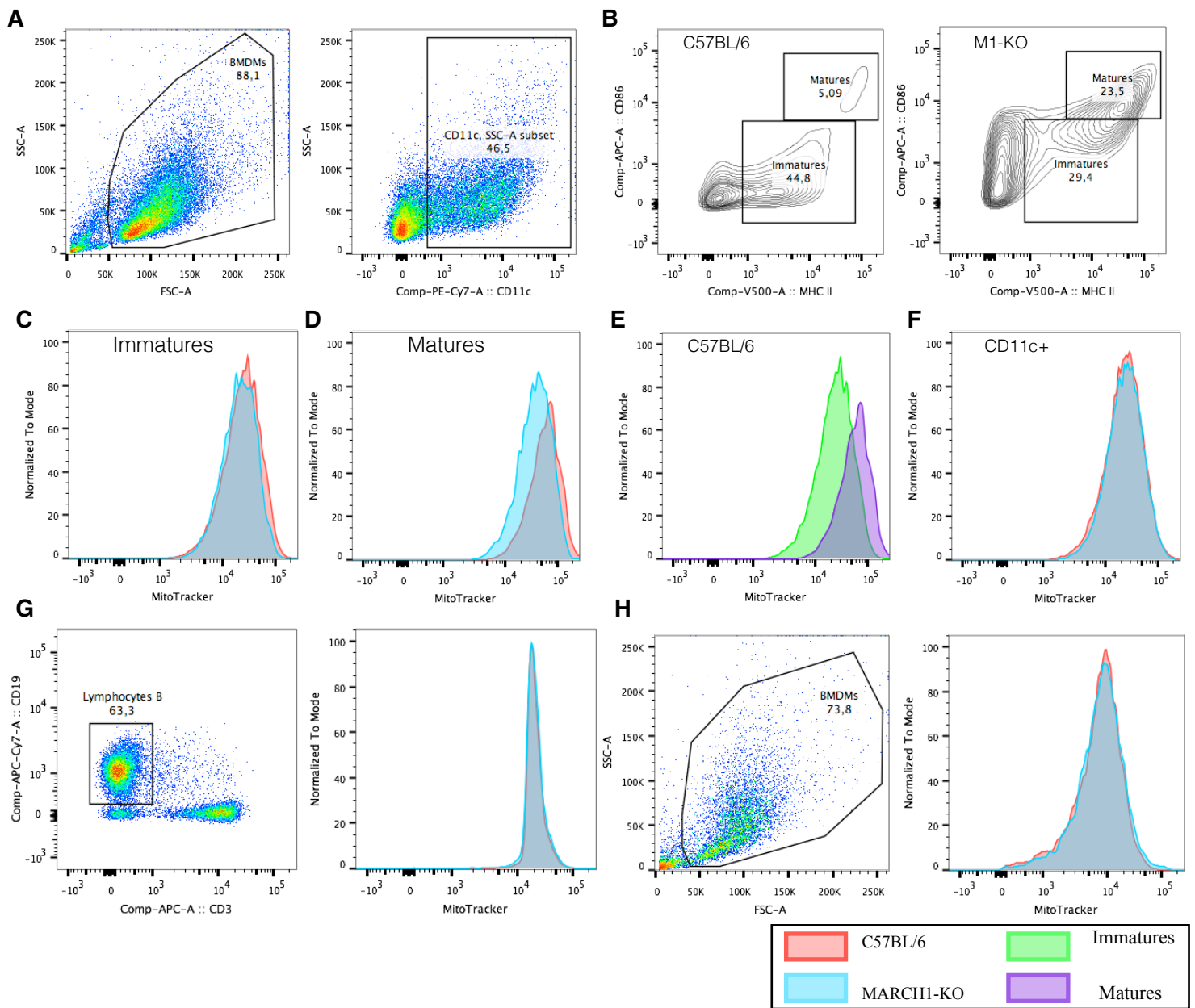


Figure 3.4 Le nombre de mitochondries n'est pas influencé par MARCH1 dans les cellules présentatrices d'antigènes.

A) Dot plot représentant le pourcentage de cellule CD11c+ dans un puits de BMDCs différencier en présence de GM-CSF durant 7 jours. La population CD11c+ est utilisée pour la figure 3.4B.

B) Plot en contour montrant les 3 populations obtenues après un marquage CD86 et CMH-II sur la population CD11c+ de la figure 3.4A, pour des cellules de C57BL/6 comparées aux cellules M1-KO. C) Histogramme montrant la fluorescence des populations immatures de C57BL/6 et de M1-KO de la figure 3.4B après coloration des mitochondries des BMDCs au *MitoTracker*[®] *Green*, 45min à 37°C. D) Histogrammes comparant la fluorescence des populations matures de

C57BL/6 et de M1-KO de la figure 3.4B après coloration des mitochondries des BMDCs au *MitoTracker® Green*. E) Histogrammes comparant la fluorescence de la population immature comparativement à la fluorescence de la population mature des BMDCs de la souris C57BL/6 de la figure 3.4B après coloration des mitochondries des BMDCs au *MitoTracker® Green*. F) Histogrammes comparant la fluorescence des populations CD11c+ de C57BL/6 et de M1-KO de la figure 3.4A après coloration des mitochondries des BMDCs au *MitoTracker® Green*. G) Histogrammes comparant la fluorescence des populations CD19c+ de la rate de souris C57BL/6 et de M1-KO après coloration des mitochondries des splénocytes au *MitoTracker® Green*. H) Histogrammes comparant la fluorescence des BMDMs de C57BL/6 et de M1-KO après coloration des mitochondries au *MitoTracker® Green*.

Représentatif d'au moins 2 expériences.

La moyenne de fluorescence de la cellule est proportionnelle au nombre de mitochondries dans la cellule. La figure 3.4C montre les histogrammes correspondants à la fluorescence de la cellule en présence du *MitoTracker® Green*. Les populations de DCs sont définies selon l'expression de CD11c (fig. 3.4A), de CD86 et de CMH-II (fig. 3.4B). En comparant la moyenne de fluorescence dans les deux populations de BMDCs immatures, on peut affirmer que le nombre de mitochondries est le même en présence ou en absence de MARCH1 (fig. 3.4C). Pour les deux populations matures, on remarque que les pics de fluorescence n'ont pas le même patron (fig. 3.4D). Il semblerait que la population mature de la souris M1-KO ait moins de mitochondries. Il faut cependant garder en tête que ces populations sont définies selon l'expression de CD86 et de CMH-II (fig. 3.4B). La majorité des cellules immatures M1-KO se retrouvent dans la population mature sans toutefois en être réellement au niveau métabolique et fonctionnel. Ces cellules ont une apparence mature, mais continuent de se comporter comme des cellules immatures (fig. 3.3B). Lorsque l'on compare le nombre de mitochondries entre la population mature et la population immature de la C57BL/6, on remarque que le nombre de mitochondries est plus élevé dans les cellules matures que dans les immatures (fig. 3.4C et 3.4D). L'apparence mature de la population M1-KO immature dilue et diminue la moyenne de fluorescence associée aux vraies

cellules matures, donnant l'impression d'un nombre plus important de mitochondries dans les cellules matures C57BL/6, lorsque comparées aux M1-KO (fig. 3.3E).

Pour confirmer ce que l'on avance, nous avons comparé l'ensemble des cellules CD11c positives de la C57BL/6 et de la M1-KO (fig. 3.4F). La moyenne de fluorescence étant la même, on peut affirmer que le nombre de mitochondries n'est pas influencé par MARCH1 dans les BMDCs, matures et immatures.

Nous avons aussi quantifié les mitochondries dans la population CD19+ de la rate, soit les lymphocytes B, normalement positives pour MARCH1. Dans cette population, le patron de fluorescence des cellules de la C57BL/6 est calqué sur celui des M1-KO (fig. 3.4G), comme on l'observe pour les BMDCs. Sans surprise, on retrouve ces résultats dans les BMDMs. Le nombre de mitochondries est le même en absence ou en présence de MARCH1 (fig. 3.4H). La quantification des mitochondries a été faite sur l'ensemble de la population étant donné que plus de 90% des cellules sont CD11b et F4/80 positives après 6 jours de différenciation en présence de M-CSF (fig. 3.2A). On peut affirmer que MARCH1 n'influence pas le nombre de mitochondries dans les cellules présentatrices d'antigènes.

La production de lactate et la consommation de glucose sont influencées par l'expression de MARCH1.

Si les cellules qui n'expriment pas MARCH1 ont une plus grande respiration mitochondriale et une plus grande capacité glycolytique, on propose que la consommation de glucose et la production de lactate soient toutes deux plus élevées. Comme il l'a été mentionné dans l'introduction, il est possible de déterminer la concentration de glucose ou de lactate dans un puits, via des réactions enzymatiques colorimétriques, où l'absorbance est proportionnelle à la quantité de lactate ou de glucose. En utilisant ses réactions enzymatiques, on montre que la production de lactate semble être augmentée dans les lymphocytes B et dans les BMDCs qui déficient pour MARCH1 (Fig. 3.5A et 3.5C). La stimulation au LPS de ces mêmes populations

entraîne une production de lactate plus importante. On remarque que cette différence de production de lactate entre la C57BL/6 et la M1-KO reste similaire à celle observée en absence de LPS (Fig. 3.5A et 3.5C). Les résultats sont significatifs pour les cellules B, purifiées sur colonne à sélection négative. Ce n'est pas le cas pour les BMDCs totales, mais cette expérience reflète une tendance observée plusieurs fois et n'a pas été faite sur une population immature triée.

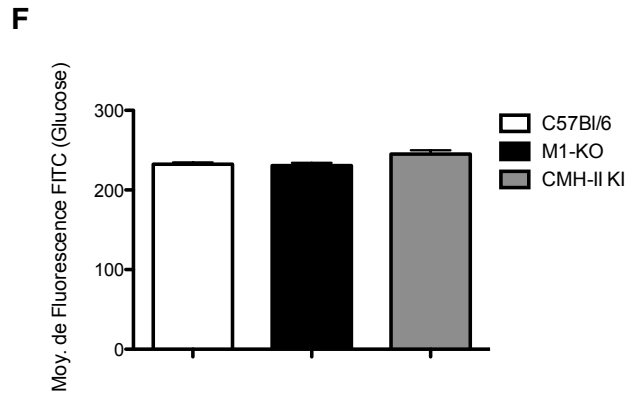
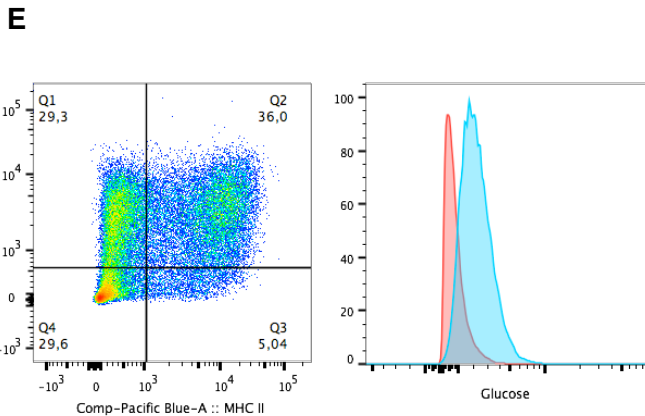
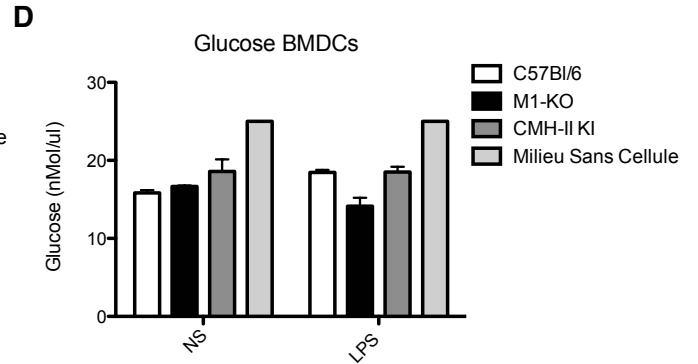
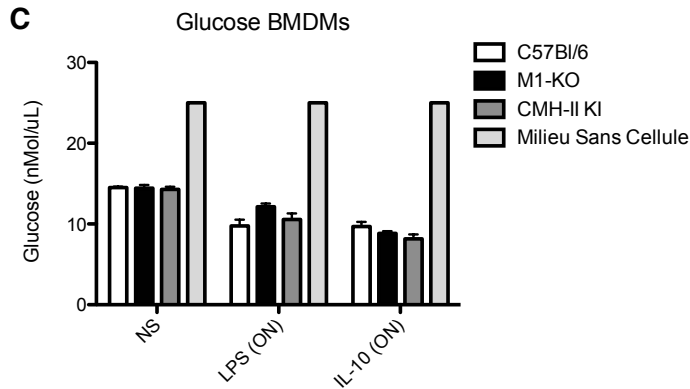
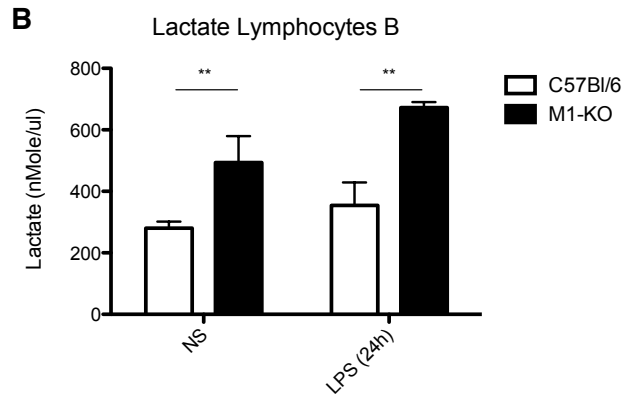
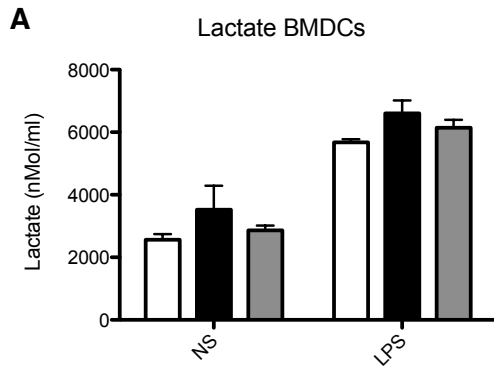


Figure 3.5 Consommation de glucose et production de lactate dans différentes cellules présentatrices d'antigènes, en absence et en présence de MARCH1

A et B) Quantification de la production de lactate dans un puits contenant 1×10^6 cellules en culture dans du milieu RPMI complet sans sérum. La stimulation est de 12h avec 1000 ng/ml de LPS. La quantification se fait par colorimétrie. L'absorbance est faite à 570 nm et l'équation de la courbe standard est : $y = 0,0176x + 0,0261$. C et D) Quantification de la concentration de glucose dans un puits contenant 1×10^6 cellules en culture dans du milieu RPMI complet 10% sérum (Wisent). La stimulation de 12h avec 1000 ng/ml de LPS. La quantification se fait par colorimétrie. L'absorbance est faite à 570nm et l'équation de la courbe standard est : $y = 0,0695x + 0,0243$. E) Exemple d'un histogramme qui montre la consommation de 2-NBDglucose dans la population double positive pour CD11c et CMH-II (Q2). La moyenne de fluorescence obtenue pour chaque échantillon a permis de faire la figure 3.5F. F) Graphique en barres représentant la moyenne de fluorescence des BMDCs en présence de 2-NBDglucose. La moyenne est faite sur 3 échantillons par conditions et les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne. L'analyse statistique est un test ANOVA.

La quantification de la consommation de glucose par des cellules dans un puits peut être faite par une réaction enzymatique, dont le substrat est le glucose résiduel dans le milieu. Ce test permet de détecter la concentration de glucose dans le puits puisque l'absorbance de la réaction colorimétrique est proportionnelle à la concentration de glucose. Ainsi, une condition qui entraîne une plus grande consommation de glucose aura une concentration de glucose plus faible dans le puits, pour un même volume.

Il ne semble pas y avoir de différence dans la consommation de glucose au repos par les BMDCs. Par contre, la stimulation au LPS paraît induire une plus grande consommation de glucose dans les cellules déficientes en MARCH1, comparativement à la C57BL/6 et la MHC-II KI (Fig. 3.5B). Pour les BMDMs, la consommation de glucose semble être la même, au repos entre les différentes souris (Fig. 3.5D). Le LPS et l'IL-10 semblent induire une plus grande consommation, mais celle-ci ne diffère pas entre les différentes souris. On semble remarquer une

diminution de la consommation de glucose en LPS pour les cellules M1-KO (Fig. 3.5D). Ces résultats ne sont toutefois pas significatifs.

Il existe aussi des analogues du glucose qui sont fluorescent, utilisable en cytométrie de flux. Pour nos expériences, nous avons utilisé le 2-NBDglucose (Life Technologies). Cette molécule permet de quantifier par cytométrie en flux les populations qui ont consommé la molécule durant un traitement de 45 minutes à 37°C. On montre dans la figure 3.3E un exemple d'histogramme obtenu en cytométrie de flux pour ce genre d'expérience. En raison de la faible incorporation du glucose, les moyennes de fluorescence ne sont pas très élevées. On peut tout de même faire une moyenne sur trois souris de chaque génotype, pour obtenir le graphique en barres de la figure 3.5F. La consommation de glucose ne semble pas être différente dans la population de BMDMs CD11c⁺ et CMH-II⁺ des différentes souris (fig. 3.5F). Ces résultats suivent ceux obtenus avec les tests commerciaux colorimétriques sur les BMDCs (fig. 3.5D). La même expérience a été faite sur des BMDMs au repos et ne montre aucune différence entre les souris, soit les mêmes résultats qu'obtenus avec le kit (données non montrées).

MARCH1 peut être exprimé aux mitochondries

L'ubiquitine ligase MARCH-5 joue plusieurs rôles au sein de la mitochondrie, mais c'est la capacité de former des hétérodimères avec d'autres membres et sa proximité avec ce qui se retrouve en périphérie des mitochondries qui attirent le plus notre attention. On propose que MARCH1 puisse former un dimère avec MARCH-5, ce qui permettrait une interaction avec les enzymes de la glycolyse, en périphérie des mitochondries.

Par microscopie confocale, nous avons voulu déterminer si MARCH1 pouvait être localisé aux mitochondries, ce qui pourrait démontrer indirectement son interaction avec MARCH-5. Pour avoir une idée du patron que donne la colocalisation entre une protéine couplée à YFP et une mitochondrie colorée au *MitoTracker® Red CMXRos*, nous avons forcé l'expression transitoire de YFP-M5 dans des HEK293xt. MARCH-5 étant constitutivement et uniquement exprimé à la

mitochondrie, le plasmide codant pour YFP-M5 permet d'obtenir un patron de colocalisation entre la protéine et la mitochondrie (fig. 3.6B).

Nous y avons ensuite comparé le patron obtenu avec la transfection de M1-YFP dans la même lignée cellulaire (fig. 3.6A). En comparant les patrons obtenus, on peut affirmer qu'il y a une colocalisation partielle de M1-YFP avec la mitochondrie. Évidemment, MARCH1 est généralement exprimée à la membrane cytoplasmique et dans les endosomes tardifs, ce qui est bien visible sur l'image (fig. 3.6A).

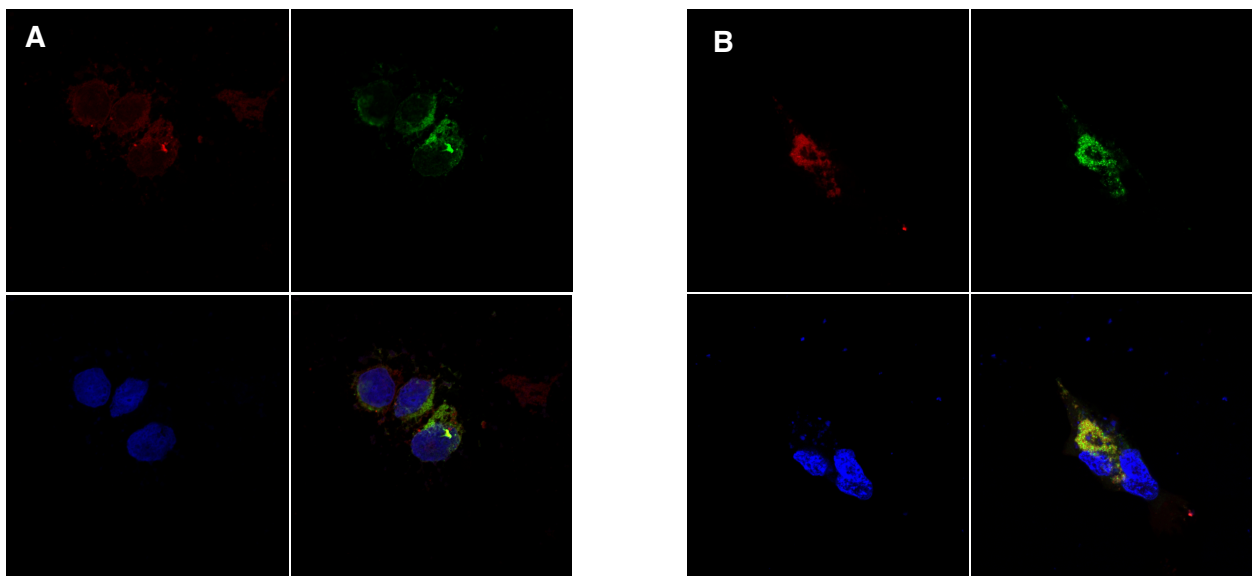


Figure 3.6 Patron de localisation cellulaire visualisé en microscopie à fluorescence montrant la localisation partielle de MARCH1 aux mitochondries

Les HEK293xt sont cultivées sur des lamelles traitées à la poly-L-lysine au nombre de 9×10^4 . Les cellules sont transfectées avec les plasmides codants pour A) M1-YFP et B) M5-YFP. Après 36h, les cellules sont traitées au MitoTracker® Red CMXRos (300nM) durant 45 min à 37°C. Les lamelles sont lavées et les cellules fixées à la PFA 2% et les noyaux sont colorés au DAPI. Les photos ont été prises avec un microscope confocale LSM700 de Zeiss. Les longueurs d'ondes utilisées pour les lectures sont, dans l'ordre décrit, 488nm, 555nm et 633nm.

Cadrant haut gauche : MitoTracker® Red ; quadrant haut droit : M1-YFP/M5-YFP ; quadrant bas gauche : DAPI ; quadrant bas droit : images superposées.

L'expression de certaines enzymes de la glycolyse est diminuée en présence de MARCH1

Pour conclure les expériences de ce mémoire et compte tenu de son rôle d'ubiquitine ligase, nous avons voulu démontrer que l'expression de MARCH1 influençait l'expression des enzymes de la glycolyse avec lesquelles elle pouvait potentiellement interagir. Nous avons donc quantifié par Western Blot deux cibles potentielles de MARCH1, Eno1 et LDHB. L'expression de ces protéines est représentée sous forme de ratio, relative à l'expression de la β -actine. L'actine est utilisée comme une protéine contrôle, qui n'est pas influencée par l'expression de MARCH1 et qui nous permet d'établir la quantité de protéine déposée dans le puits en fonction de la densité optique produite par la bande (OD) (fig. 3.7G). Il est alors possible de faire un ratio entre la densité optique de l'actine et celle obtenue pour Eno1 ou LDHB, pour chaque échantillon.

Dans une lignée cellulaire, la surexpression de MARCH1 diminue fortement l'expression des deux enzymes (fig. 3.7A et 3.7B). Ces résultats, que l'on répète, avaient déjà été produits au laboratoire dans le cadre d'un projet pilote. Lorsque l'on regarde l'expression de ces enzymes dans les cellules primaires, les résultats ne sont pas aussi clairs que pour les cellules transfectées. L'expression de Eno1 est diminuée en présence de MARCH1 dans les BMDCs immatures, avec et sans LPS (fig. 3.7C). On ne peut pas en dire autant pour l'expression de la LDHB dans ce même type cellulaire. L'expression de cette enzyme semble être la même, peu importe l'expression de MARCH1 (fig. 3.7D). On remarque cependant que le LPS affecte fortement la stabilité de cette protéine et semble provoquer sa dégradation (fig. 3.7D). Contrairement à ce que l'on observe dans les BMDCs, MARCH1 ne semble pas affecter l'expression de Eno1 dans les lymphocytes B (fig. 3.7E). On remarque ici aussi que le LPS semble provoquer la dégradation de l'enzyme dans la population de lymphocytes B.

Il semblerait donc que MARCH1 puisse promouvoir la dégradation de ces protéines dans certaines populations de CPAs et peut-être favoriser la relocalisation dans d'autres populations. La capacité d'interaction avec Eno1 et LDHB doit être confirmée avec d'autres techniques.

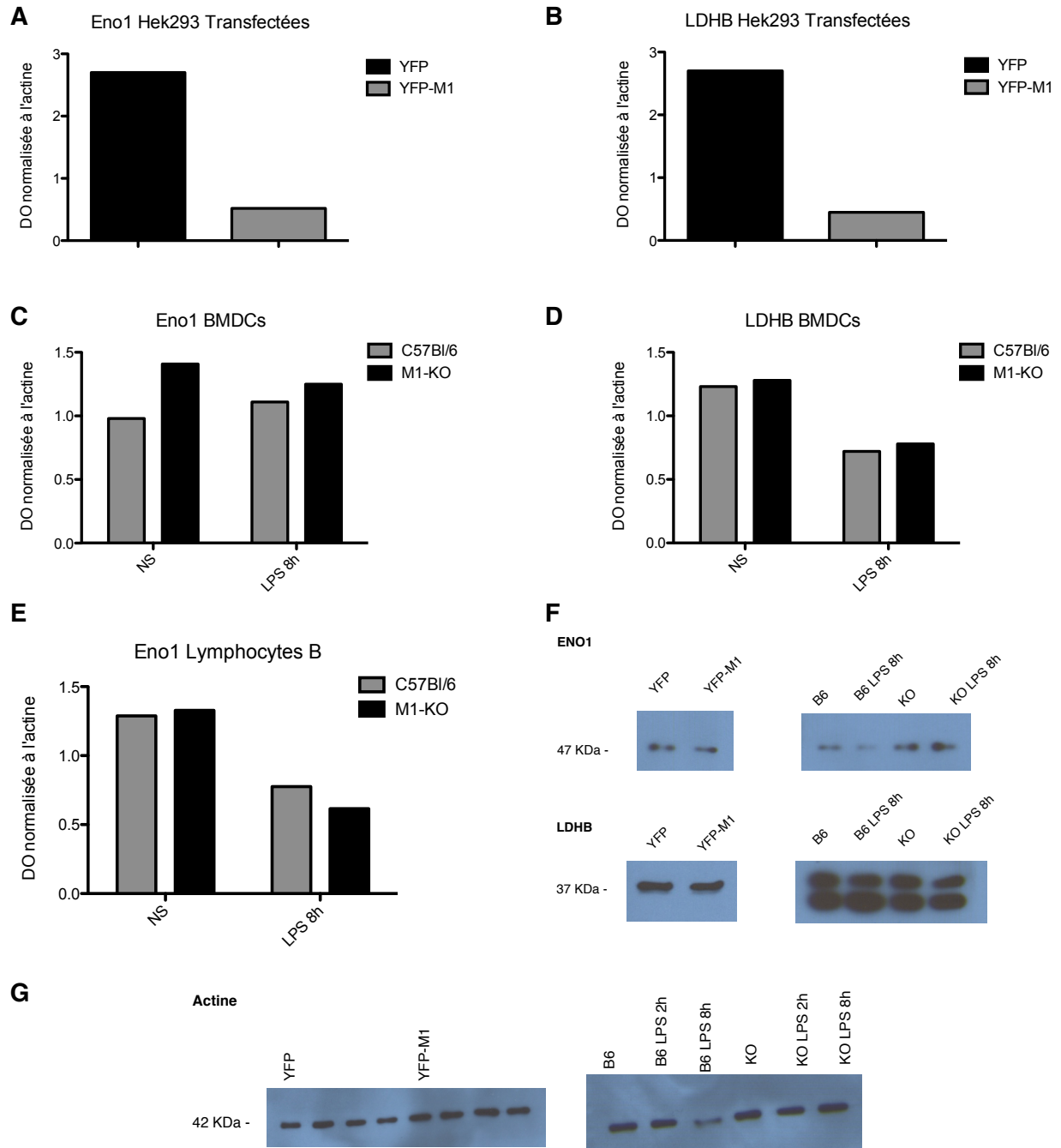


Figure 3.7 L'expression des enzymes LDHB et Eno1 semble être augmentée dans les cellules qui n'expriment pas MARCH1

A et B) Les HEK293xt ont été transfectées avec les plasmides codants pour YFP (utilisé en contrôle) et M1-YFP. On montre l'expression relative de Eno1 et de LDHB dans ces HEK293xt,

triées selon l'expression de YFP pour ne garder que les cellules transfectées. C et D) Expression relative de Eno1 et de LDHB sur des BMDCs immatures, triées par FACS selon l'expression de CD11c et de l'internalisation du dextran (FITC). Seules les cellules CD11c+ Dextran ^{élevé} ont été conservées. E) Expression relative de Eno1 dans des cellules B triées sur colonne à sélection négative. F et G) Exemple de bandes obtenues par WesternBlot et utilisées pour faire les ratios de densité optique. Les résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences.

Chapitre 4 Discussion

Depuis sa découverte, l'E3 ubiquitine ligase MARCH1 a toujours été principalement reconnue pour sa capacité à réguler la présentation antigénique dans les APCs. Parmi les cibles déjà connues de MARCH1 dans les CPAs, on retrouve le CMH-II et CD86, deux molécules indispensables à la stimulation efficace et l'activation des cellules T CD4+. On prend mieux conscience de l'importance de son expression en étudiant les conséquences sa délétion dans la souris M1-KO, notamment sur le développement de Treg, sur la fonction des cDCs et la susceptibilité au choc toxique induit par le LPS. Le rôle de MARCH1 est indéniablement à la réponse adaptative, par sa capacité à réguler la présentation antigénique aux cellules T CD4+, mais aussi à la réponse innée.

Les expériences et les conclusions de ce mémoire proposent un rôle additionnel à MARCH1; la modulation du métabolisme cellulaire. En voulant identifier d'autres cibles potentielles de MARCH1, notre laboratoire a réalisé une immunoprécipitation de MARCH1 pour révéler les protéines avec lesquelles elle pourrait potentiellement interagir. Résultat étonnant, quoique préliminaires, trois enzymes impliquées dans la glycolyse ont été retrouvées par spectrométrie de masse (non publiés). Ce résultat nous a poussés à chercher un lien potentiel entre MARCH1 et le métabolisme cellulaire.

Certes éloignée des rôles plus classiques de présentation antigénique et de la réponse anti-inflammatoire, la modulation du métabolisme est fortement impliquée dans les réponses innée, adaptative et dans la transition de l'une vers l'autre. Un métabolisme cellulaire adapté est nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. La grande majorité des cellules immunitaires sont soumises à des variations environnementales qui les forcent à s'adapter métaboliquement (macrophage dans une zone inflammée où l'oxygène se fait plus rare) ou bien sont soumises à des modifications métaboliques pour subvenir aux besoins énergétiques du moment (lymphocytes T en expansion clonale). Il va de soi qu'un défaut dans le métabolisme cellulaire affecte négativement la réponse immunitaire.

Les enzymes que l'on a retrouvées en interaction avec MARCH1 sont étroitement impliquées dans la production d'énergie. Parmi les différentes voies métaboliques, la glycolyse est la chaîne de réactions chimiques la plus utilisée pour la production d'énergie. Certaines autres voies métaboliques peuvent aussi apporter une contribution énergétique, tandis que d'autres dérivent le glucose pour d'autres besoins, comme la synthèse de nucléotides et d'acides aminés via la voie des pentoses-phosphates⁸⁷. L'énolase 1, la neuvième enzyme impliquée dans la voie d'Embden-Meyeroff-Parnas, catalyse la transformation du 2-phosphoglycerate en phosphoenolpyruvate. Cette enzyme est donc impliquée dans la transformation du glucose en pyruvate, substrat qui peut à la fois servir pour la phosphorylation oxydative et pour la glycolyse anaérobique. La LDHB, elle, catalyse la transformation de pyruvate en lactate et on assume que son effet sur le métabolisme est limité à la glycolyse anaérobique.

En raison de l'implication de ces deux enzymes dans la production d'énergie, nous avons cherché à démontrer que MARCH1 est capable de moduler la glycolyse et la respiration mitochondriale lorsqu'elle est fortement exprimée. En effet, la surexpression transitoire de YFP-M1 dans des HEK293xt diminue la glycolyse et la réserve glycolytique en plus de diminuer la respiration maximale et la réserve respiratoire. On peut affirmer que la respiration basale n'est pas influencée par MARCH1, de même que la consommation d'oxygène nécessaire à la production d'énergie.

Le système d'expression transitoire en HEK293xt est intéressant, mais il faut garder en tête que ces cellules sont immortelles (cellules de rein d'un embryon humain). Le métabolisme basal de ces cellules, y compris la glycolyse et la respiration mitochondriale, est déjà aberrant. De plus, l'expression transitoire de MARCH1 dans ces cellules peut influencer les résultats obtenus en raison d'une trop forte expression et/ou d'une mauvaise localisation. Nous avons donc répété ces expériences dans des cellules primaires. Nos résultats montrent que MARCH1 réduit la respiration maximale dans les splénocytes et les cellules B, à quoi s'ajoute la glycolyse maximale dans les BMDCs (fig. 3.2 et 3.3).

Les résultats de ces figures sont représentés en pourcentage de la consommation d'oxygène après traitement à l'oligomycine et avant traitement au FCCP. On assume, en se basant sur les résultats obtenus précédemment reproductibles, que la respiration basale ainsi que la respiration après traitement à l'oligomycine est la même en présence ou en absence de MARCH1. Cette affirmation nous permet d'utiliser la mesure précédant l'injection de FCCP comme valeur arbitraire correspondant à 1 (ou 100%). Ainsi, toutes les mesures avant et après cette mesure sont exprimées en pourcentage de celle-ci. L'expression relative du taux de consommation d'oxygène permet d'éliminer la différence due à un nombre inégal de cellules par puits et/ou une mortalité cellulaire plus élevée.

Dans les figures 3.2 et 3.3 démontrent la capacité de respiration maximale est supérieure en absence de MARCH1 dans les CPAs et que l'activité glycolytique est influencée par MARCH1 dans les BMDCs immatures. Donc, en absence de MARCH1, la réserve glycolytique est plus importante et permet une plus grande production d'énergie dans la cellule en cas de besoins pressants.

Rôle de MARCH1 dans la régulation du métabolisme chez les cellules dendritiques

L'expression de MARCH1 est très différente dans les cellules dendritiques immatures et matures. La régulation de l'expression de MARCH1, après l'activation, semblerait donc donner un avantage métabolique à la cellule, en plus des avantages de présentation antigénique que nous connaissons. Cet avantage métabolique peut se traduire de plusieurs façons. La sécrétion de cytokine, la différenciation, la migration et tous les autres mécanismes de mise en place de la réponse immunitaire nécessitent tous un apport énergétique supérieur. Une production d'énergie plus rapide pourrait permettre une mise en place de la réponse plus efficace.

Il faut cependant considérer l'article publié par le groupe de E. Sousa en juin 2015 lorsqu'on relate les résultats obtenus sur les BMDCs immatures. D'après E.Sousa, les cellules que nous qualifions de DCs immatures seraient en fait des GM-Mac¹²⁹. Les BMDCs qui ressembleraient le

plus à des cellules dendritiques seraient en fait la population CD86^{élevé} et MHC-II^{élevé} présente dans la population qu'on qualifie de mature après analyse de l'intégration de dextran. Dans nos analyses avec le dextran (fig. 3.3B), on montre que la population CD11c+ Dextran^{élevé} des BMDCs C57BL/6 exprime MARCH1. Cette population, MHC-II^{intermédiaire}, CD86^{faible}, CD11c+ et Dextran^{élevé}, possède les caractéristiques du DC immature⁴⁷. Les marqueurs CMH-II et CD86 auraient pu nous permettre d'isoler les populations matures et immatures dans la C57BL/6, mais étant toutes deux des cibles de MARCH1, il nous est impossible d'isoler la population intermédiaire dans les cellules M1-KO (figure 3.4A.). C'est pour cette raison que nous avons utilisé la capacité d'échantillonner le milieu pour distinguer ces populations.

Toujours selon E.Sousa, la population CD11c+ MHC-II^{intermédiaire}, qui représente en fait toutes les cellules Dextran^{élevé} et une grande partie des cellules Dextran^{faible}, serait en fait une population de GM-Macs à 95%. Notre analyse au dextran montrerait alors une hétérogénéité dans cette population puisqu'on retrouverait une première population avec une forte capacité de macropinocytose et une seconde population avec une faible capacité de macropinocytose. La population de GM-Macs décrite dans l'article serait donc hétérogène du point de vue sa capacité à échantillonner l'environnement.

Toutefois, cette publication est soutenue par de nombreuses analyses génétiques et fonctionnelles, qui montrent que les cellules cultivées en présence de GM-CSF ressemblent fortement à des macrophages et à des cellules dendritiques¹²⁹, nonobstant le caractère hétérogène des résultats obtenues avec le dextran.

A la lumière de ces résultats, nous ne pouvons confirmer exactement le type cellulaire avec lequel nous avons travaillé, mais qu'il soit GM-Macs, iDCs ou GM-DCs, nous avons voulu comparer le métabolisme d'une population cellulaire en présence et en absence de MARCH1. Nous avons donc choisi de comparer le métabolisme des cellules CD11c+ MHC-II^{intermédiaire} Dextran^{élevé} entre les cellules C57BL/6 et M1-KO. On montre dans la figure 3.3B que ce sont ces cellules qui expriment le plus d'ARNm de MARCH1 dans les C57BL/6. Ces observations nous permettent de conclure que les différences métaboliques observées sont corrélées avec l'absence de MARCH1, même si la nature exacte de la population en question est remise en compte. Il est évident qu'il faut réitérer ces résultats, dans une population mieux caractérisée, avant de conclure

de façon définitive concernant les DCs immatures. Il n'en demeure pas moins que les observations sur les BMDMs et les splénocytes restent concluantes; MARCH1 diminue la réserve respiratoire.

Rôle de MARCH1 dans la régulation du métabolisme via une stimulation à l'IL-10?

L'IL-10 induit l'expression de MARCH1 dans les monocytes et dans les macrophages⁵¹. En stimulant les cellules 15h, on souhaite augmenter l'expression de MARCH1 dans les BMDMs de C57BL/6; les BMDMs M1-KO étant incapables d'induire l'expression de la protéine. Ainsi, on propose qu'en présence d'IL-10, on puisse augmenter les différences observées dans la respiration maximale de ces BMDMs et la consommation de glucose. Cependant, on ne semble pas voir cette différence augmenter et la respiration basale ne semble pas être affectée non plus (fig. 3.2C et 3.5D).

En conditions physiologiques, l'IL-10 est induite après la réponse inflammatoire. L'activation cellulaire des CPA lors de l'inflammation réduit les niveaux d'expression de MARCH1 pour permettre une présentation antigénique et une co-stimulation efficace. L'IL-10, induite lors de la vague anti-inflammatoire, permet entre autres de rétablir l'expression de MARCH1 dans la cellule^{51, 55}.

MARCH1 est reconnu pour contrôler sa propre expression par auto-ubiquitination; en cas d'expression trop importante et inadéquate, la protéine régule négativement son expression³¹. Ainsi, on pense qu'une stimulation à l'IL-10 sur des BMDMs qui expriment déjà MARCH1 à un niveau optimal pourrait ne pas influencer l'expression de la protéine. En auto-régulant son expression, son activité n'augmenterait pas, tout comme les différences déjà observées sur les BMDMs non stimulés.

La réserve respiratoire et le stress oxydatif

Les analyses de flux extracellulaires semblent montrer que la respiration mitochondriale et la glycolyse sont influencées par la présence de MARCH1. Étant donné qu'une augmentation de la

consommation d'oxygène pourrait être due à l'augmentation du nombre de mitochondries, nous avons vérifié que la quantité de mitochondries restait inchangée dans les cellules déficientes en MARCH1. Les analyses en cytométrie de flux dans les différentes populations de CPAs nous permettent d'affirmer que le nombre de mitochondries n'est pas influencé par l'absence de MARCH1 (fig. 3.4), ce qui nous porte à croire que l'activité mitochondriale serait probablement supérieure en absence de MARCH1.

La différence entre la respiration basale et maximale représente la réserve respiratoire. Cette réserve représente la capacité à produire rapidement de l'ATP via la respiration mitochondriale, par exemple, pour répondre à un stress et réparer les dommages. Nos résultats démontrent qu'en absence de MARCH1, la cellule est plus apte à produire rapidement de l'ATP par phosphorylation oxydative .

Le métabolisme oxydatif est essentiel à la production d'énergie et à l'augmentation de la biomasse cellulaire. La cellule métabolise plusieurs substrats pour permettre la production d'ATP et fournir les dérivés nécessaires à la biosynthèse ¹³³⁻¹³⁵. Les cellules cancéreuses utilisent ce métabolisme, en plus de la glycolyse aérobie, pour subvenir aux besoins en énergie et à l'augmentation de la biomasse ^{136, 137}. Étant le siège de cette voie métabolique, le nombre et la taille des mitochondries dans la cellule sont influencés par l'environnement et l'expression de certains gènes. Par biogenèse et autophagie, la cellule contrôle l'énergie produite par OXPHOS ¹³⁸.

Lorsque la cellule est confrontée à un stress, la mitochondrie cherche dans ses réserves respiratoires pour subvenir aux besoins nécessaires au maintien de la fonction des différentes organelles, mais surtout, pour fournir l'énergie nécessaire à la réparation et la détoxification de la cellule. Il a été démontré que plusieurs produits dérivés de stress oxydatifs sont détoxifiés par des processus qui demandent de l'énergie. C'est entre autres le cas du 4-hydroxynonanal (HNE), provoquant l'accumulation de lipides oxydés qui peuvent être très dommageables pour la cellule ¹³². Bradford Hill *et al.* ont démontré qu'un traitement à différentes concentrations d'HNE sur des cellules augmentait proportionnellement la respiration cellulaire jusqu'à une concentration qui

cause l'épuisement de la mitochondrie. Ils ont alors émis l'hypothèse que la cellule augmente sa respiration pour réduire le stress causé par cet agent oxydant ¹³².

Dans les tissus cardiovasculaires, l'oxyde nitrique peut à la fois avoir un rôle protecteur et un rôle délétère associé au stress oxydatif, dépendamment de sa concentration. À faible concentration, NO protège contre la mort cellulaire provoquée par le peroxyde d'hydrogène. À plus haute concentration, il augmente la toxicité des ROS, en provoquant l'accumulation de peroxynitrite (ONOO⁻), un agent fortement oxydant^{141, 142}. Les dommages causés par les ROS causent une perte du contrôle bioénergétique dans les tissus. L'interaction de NO avec la mitochondrie se fait avec le cytochrome *c* oxydase, un joueur important dans le transport des protons dans la membrane mitochondriale ^{139, 140}.

Ainsi, une réserve respiratoire diminuée rend la cellule vulnérable au stress, qui provoque une accumulation de protéines endommagées, une perte de fonction des organelles et, ultimement, la mort de la cellule. Dans plusieurs pathologies et au cours du vieillissement des cellules, cette réserve respiratoire est diminuée et empêche la cellule de pouvoir faire face au stress oxydatif que l'on retrouve dans un environnement malsain, généré par l'obésité, l'athérosclérose, un cancer (etc.). Dans un environnement inflammé, le NO et les ROS sont très présents. À haute concentration, ces composés sont toxiques pour la cellule, pouvant endommager les composantes cellulaires en favorisant leur oxydation.

En observant une susceptibilité accrue au stress oxydatif lors de la perte de la réserve respiratoire, un groupe de chercheurs s'est intéressé à la capacité de contrôler les stress oxydatifs en fonction de la réserve respiratoire. À la lumière de leurs résultats, Dranka *et al.* propose que la réserve respiratoire est nécessaire pour répondre aux stress oxydatifs et qu'une diminution de celle-ci augmente la susceptibilité de la cellule à ces stress¹⁴⁴.

Il a été démontré que NO est un inhibiteur de la respiration mitochondriale. Dans les DC en cours de maturation suite à une liaison des TLRs, la production de NO par la NO synthase bloque l'OXPPOS pour favoriser la production d'énergie via la glycolyse¹⁰⁰. Cette inhibition est réversible, ce qui permet de rétablir le métabolisme régulier après l'inflammation.

Une perte de la réserve respiratoire dans la mitochondrie provoquerait une diminution de la réponse face au dérivé oxydatif produit lors de la respiration ou durant l'inflammation. Une exposition à de trop grandes concentrations de NO provoque des dommages, qui à leur tour réduiront la capacité respiratoire de la cellule. Le vieillissement de la cellule favorise alors l'accumulation de dommages à l'ADN mitochondrial, réduisant sa capacité à contrôler les stress oxydatifs, au bénéfice de l'accumulation de dommages supplémentaire^{145, 146} tout comme l'inflammation chronique.

Une réserve respiratoire plus grande protégerait donc la cellule contre les dommages causés par le stress oxydatif. Nous avons montré que la réserve respiratoire en absence de MARCH1 est supérieure à celle en présence de MARCH1 dans les CPAs. Ces cellules se retrouvent, lors d'une inflammation, dans un environnement pauvre en oxygène, riche en ROS et en NO. On propose qu'en augmentant la réserve respiratoire, on favorise la protection des cellules contre les dommages causés par le stress oxydatif. MARCH1 pourrait réguler la respiration maximale de la cellule et suite à l'activation cellulaire dans un contexte inflammatoire, son expression serait réduite et permettrait d'augmenter la réserve respiratoire pour protéger contre les stress oxydatifs. Les cellules seraient alors moins susceptibles aux dommages liés à l'oxydation, et donc plus aptes à répondre à la menace.

Le nombre de mitochondries dans la cellule dépend généralement du rôle de la cellule, de ces besoins énergétiques et du métabolisme qu'elle utilise pour produire son énergie. Un monocyte du sang aura beaucoup plus de mitochondrie qu'un neutrophile, qui n'en a presque pas¹⁴⁷. Aussi, nous avons observé que le nombre de mitochondries dans les cellules CD3⁺ est plus important que dans les cellules CD19⁺ (données non montrées).

On remarque dans la figure 3.4E que la population mature de BMDC compte plus de mitochondrie que la population immature. Il se pourrait que la maturation augmente la biomasse et favorise la production de mitochondrie. Cependant, un DC mature compte sur la glycolyse aérobie pour maximiser sa production d'énergie après maturation. Il se pourrait donc qu'au lieu de voir une augmentation du nombre de mitochondries, nous soyons confrontés à 2 populations différentes de cellules, dont les besoins énergétiques sont différents, ce qui

rejoindrait les travaux du laboratoire E.Sousa, voulant qu'une population hétérogène soit générée sous l'influence de GM-CSF.

La formation d'un hétérodimère entre MARCH1 et MARCH5?

L'ubiquitine ligase mitochondriale MARCH-5 est exprimée constitutivement dans la grande majorité des tissus. On la retrouve au niveau de la membrane externe mitochondriale et son site actif (RING-CH) se trouve face au cytoplasme de la cellule. Comme certains autres membres de la famille MARCH, elle régule sa propre expression par auto-ubiquitination et il a été démontré que son rôle était nécessaire afin d'éviter l'accumulation de fragments de mitochondrie⁴⁶. De plus, MARCH-5 jouerait un lien étroit entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie, empêchant l'accumulation de protéines mal-repliées et de résidus toxiques au niveau de la mitochondrie.

MARCH1 est reconnu pour être localisé dans les endosomes tardifs et sur la membrane cellulaire. Les enzymes de la glycolyse se trouvant en périphérie des mitochondries, elles ne pourraient pas être en interaction avec MARCH1 à moins que celle-ci se retrouve aux mitochondries. Nous proposons que MARCH1 puisse former un hétérodimère avec MARCH-5, ce qui permettrait un contexte spatial pour interagir avec les enzymes de la glycolyse. En regardant les analyses de microscopie confocale obtenues avec YFP-M1, on peut affirmer qu'il y a une colocalisation partielle avec la mitochondrie (fig. 3.6). On propose que l'interaction entre ces membres puisse se produire lorsque les protéines quittent le Golgi ou le RE pour rejoindre leur localisation spécifique; MARCH5 entrainerait alors MARCH1 jusqu'aux mitochondries. L'un pourrait aussi réguler l'expression de l'autre, comme il l'a déjà été démontré pour d'autres membres³⁹.

La microscopie confocale à ces limites et l'utilisation de transfectants peut influencer les résultats en raison d'un encombrement de protéine ou d'une localisation aberrante. Étant donné qu'il n'existe toujours pas d'étude montrant la localisation probable de MARCH1 ailleurs que

dans les endosomes ou à la membrane cellulaire¹⁴⁸, il serait intéressant de confirmer ces observations en utilisant une technique complémentaire.

Pour démontrer la présence de MARCH1 aux mitochondries, nous pourrions isoler celles-ci et analyser le protéome mitochondrial. Encore une fois, cette technique ne démontre pas une interaction avec MARCH-5, mais pourrait être utilisée dans des cellules primaires. Le laboratoire possède des anticorps anti-MARCH1 mais en raison de la très faible expression de MARCH1 en cellule primaire, il ne sont pas facilement utilisables. Nous sommes donc dans l'obligation d'utiliser des transfectants pour détecter MARCH1. En alternative, une immunoprécipitation de YFP-M5 dans des cellules co-transfectées avec M1-Myc ou bien un transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, en utilisant d'autres constructions de MARCH1 et de MARCH-5, pourraient être utilisées pour confirmer l'interaction entre ces deux membres.

MARCH1 régule l'expression des Eno1 et de LDHB

Une enzyme qui suit une cinétique de Michaelis-Menten possède un seul site actif et a une activité qui dépend de la concentration de son substrat. Plus la concentration du substrat augmente, plus l'activité de l'enzyme augmente jusqu'à atteindre une saturation. L'activité de l'enzyme en fonction de la concentration du substrat suit une courbe hyperbolique, marquée par un plateau lorsque l'enzyme est saturée. Par contre, lorsque c'est la concentration de l'enzyme qui est augmentée, son activité augmente proportionnellement à la concentration si le substrat se trouve en quantité non limitante¹⁴⁹.

En combinant les observations sur les dernières expériences, soit une plus grande réserve respiratoire et glycolytique, une plus grande production de lactate et une localisation aux mitochondries, avec le rôle d'ubiquitine ligase de MARCH1, on avance qu'une interaction avec les enzymes de la glycolyse provoquerait une relocalisation ou une dégradation de celles-ci. Une diminution de l'expression de ces enzymes serait accompagnée d'une diminution de leur activité, qui se traduirait par une réduction de pyruvate et de la transformation de celui-ci en lactate. De la même façon, l'accumulation de ces enzymes en absence de MARCH1 permettrait une

accumulation de phosphoenolpyruvate et éventuellement de pyruvate. Ce pyruvate pourrait servir à la fois dans la phosphorylation oxydative et dans la production d'ATP via LDHB, qui serait elle aussi augmentée.

Nous avons montré, par transfection et dans les cellules primaires, que les cellules MARCH1 positives exprimaient moins d'Eno1 et possiblement moins de LDHB (fig. 3.7), ce qui permettrait d'augmenter l'alimentation du cycle de Krebs et de la glycolyse aérobie ou anaérobie.

Afin d'attribuer à MARCH1 le rôle d'ubiquitination de ces deux enzymes, il faudrait compléter ces résultats avec une immunoprécipitation de celles-ci suivie d'un Western Blot pour quantifier l'ubiquitination de ces deux enzymes, en présence et en absence de MARCH1. Si leur dégradation ou relocalisation est médiée par MARCH1, on devrait observer une plus grande ubiquitination en présence de MARCH1.

Établir un lien entre la réponse immunitaire, le métabolisme et MARCH1 n'est pas difficile à imaginer lorsque l'on comprend l'importance du métabolisme dans la réponse immunitaire. Cependant, on peut pousser notre raisonnement plus loin, vers une modulation de l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses par exemple. Il est maintenant bien défini que le métabolisme cellulaire et la production d'énergie sont étroitement liés avec le développement de tumeurs et la division de cellules cancéreuses. Une des questions qui suit les résultats présentés dans ce mémoire réside en la capacité de MARCH1 à moduler le métabolisme d'une cellule potentiellement cancéreuse, à ses tous débuts, en empêchant une production d'énergie élevée. Ce mécanisme pourrait ralentir la division cellulaire en attendant que les cellules immunitaires mettent fin à la menace potentielle. Nous avons au laboratoire un modèle murin d'induction de cancer hépatique par injection de diethylnitrosamine (DEN)^{150, 151}. Une des expériences pilotes de ce projet a montré une incidence accrue et un nombre de tumeurs plus élevé dans le foie des souris M1-KO lorsqu'on les compare avec un contrôle C57BL/6. Le modèle DEN résulte en une inflammation soutenue au niveau des hépatocytes, qui mène à une accumulation d'anomalies

génétiques et au développement de tumeurs. En prenant en compte le rôle de l'IL-10 sur l'induction de MARCH1, nous sommes porté à croire que la vague de sécrétion d'interleukines anti-inflammatoires, suite à une inflammation au niveau d'un tissu, permettrait l'induction de MARCH1 et diminuerait le métabolisme des cellules du tissu, y compris les cellules potentiellement cancéreuses en attendant que les cellules NK ou les cellules T CD8+ éliminent les dangers potentiels. Ce cas de figure permettrait de réduire le nombre de tumeurs et l'incidence de cancer.

Ce projet est présentement en cours dans notre laboratoire. On tente de démontrer la capacité d'induire MARCH1 sur des hépatocytes à l'aide de différentes cytokines de la famille de l'IL-10, en plus de confirmer notre expérience pilote. Si notre raisonnement s'avère exact, MARCH1 pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans un contexte où l'on serait capable d'induire son expression de façon localisée, dans la tumeur, via des cytokines ou des systèmes d'expression exogène, comme un rétrovirus spécifique à celle-ci. On pourrait tout aussi bien cibler des cellules immunitaires hyperactives, responsables de réponses auto-immunes.

Conclusion

Dans ce mémoire, nous proposons un rôle additionnel à MARCH1. Les résultats obtenus pointent vers une diminution du métabolisme cellulaire et de la réserve respiratoire en présence de MARCH1. Compte tenu de sa capacité à moduler l'expression du CMH-II et de CD86 entre autres, on propose que MARCH1 puisse réguler l'expression de Eno1 et LDHB par ubiquitination. En médiant leur relocalisation ou leur dégradation, MARCH1 pourrait moduler l'efficacité de la glycolyse. Les résultats obtenus en analysant les flux extracellulaires montrent une augmentation de la respiration maximale et de la réserve respiratoire dans les CPAs dépourvues de MARCH1. De plus, ces analyses montrent une réduction de la réserve glycolytique dans les BMDCS immatures qui expriment MARCH1. Combiné à une localisation aux mitochondries et une réduction de l'expression de Eno1 et de LDHB dans certaines conditions, ces résultats indiquent une modulation du métabolisme de la CPA par MARCH1.

La respiration mitochondriale et un environnement inflammé augmentent la production de ROS et de NO. Certains étant certes bénéfiques à faible concentration, une accumulation trop importante de ces réactifs provoque des dommages dans la cellule. Certains mécanismes pour diminuer ces réactifs sont dépendant d'ATP. En augmentant la production d'énergie par OXPHOS, l'ATP et certains composés issus du cycle de Krebs permettent de neutraliser les ROS et limiter les dommages cellulaires.

Le rôle de MARCH1 dans un contexte inflammatoire s'insère bien dans ce modèle. Au repos, une faible accumulation de ROS ne nécessite pas une grande utilisation de l'OXPHOS. Par contre, dans un environnement inflammé ou dans un tissu où la production de NO et de ROS est augmentée à cause d'une pathologie, l'expression de MARCH1 serait diminuée. En augmentant ainsi le potentiel de respiration de la cellule, la cellule aurait un meilleur contrôle des ROS et accumulerait moins de dommages. De plus, par sa capacité d'ubiquitiner les enzymes de la glycolyse, on propose qu'une réduction de MARCH1 favoriserait la production de substrat utilisés dans le cycle de Krebs ou dans la production de lactate.

Une cellule immunitaire qui réduirait l'expression de MARCH1 suite à une liaison des TLRs par exemple, aurait un avantage de présentation antigénique, un avantage de production d'énergie et un avantage de protection face à l'accumulation de ROS.

Dans le contexte d'une cellule cancéreuse, il est avantageux de profiter de ces atouts. On propose ici que l'IL-10 produite dans un tissu après l'inflammation puisse induire l'expression de MARCH1 dans les cellules et ainsi réduire les capacités de prolifération et de migration de cellule potentiellement cancéreuse.

Finalement, pour obtenir un portrait global de l'effet de MARCH1 sur le métabolisme cellulaire, l'utilisation de la spectrométrie de masse à grande échelle combinée au séquençage d'ARNm total en parallèle constitue l'une des méthodes les plus complètes et les plus puissantes pour décortiquer les différentes voies métaboliques et quantifier l'accumulation des différents métabolites¹¹³. Il faudra cependant s'assurer d'envoyer une population cellulaire pure et homogène, qui exprimera MARCH1 et dont la nature sera certaine.

Références:

1. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences* 1999, **24**(2): 68-72.
2. Li K-J, Wu C-H, Hsieh S-C, Lu M-C, Tsai C-Y, Yu C-L. Deranged bioenergetics and defective redox capacity in T lymphocytes and neutrophils are related to cellular dysfunction and increased oxidative stress in patients with active systemic lupus erythematosus. *Clinical and Developmental Immunology* 2011, **2012**.
3. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays* 2013, **35**(11): 965-973.
4. Milosevic M, Fyles A, Hedley D, Hill R. The human tumor microenvironment: invasive (needle) measurement of oxygen and interstitial fluid pressure. *Seminars in radiation oncology*; 2004: Elsevier; 2004. p. 249-258.
5. Daşu A, Toma-Daşu I, Karlsson M. Theoretical simulation of tumour oxygenation and results from acute and chronic hypoxia. *Physics in medicine and biology* 2003, **48**(17): 2829.
6. Denko NC, Fontana LA, Hudson KM, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Altman R, *et al.* Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. *Oncogene* 2003, **22**(37): 5907-5914.
7. Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 2001, **93**(4): 266-276.

8. Rathmell JC, Elstrom RL, Cinalli RM, Thompson CB. Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma. *European journal of immunology* 2003, **33**(8): 2223-2232.
9. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999, **285**(5425): 221-227
10. Klein J, Sato A. The HLA system: first of two parts. *The New England journal of medicine* 2000, **343**(10): 702-709.
11. Amadou C, Kumánovics A, Jones EP, Lambracht-Washington D, Yoshino M, Lindahl KF. The mouse major histocompatibility complex: some assembly required. *Immunological reviews* 1999, **167**(1): 211-221.
12. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Reviews Immunology* 2005, **5**(10): 793-806.
13. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995, **82**(1): 155-165.
14. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P. Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* 1997, **278**(5335): 106-109.
15. Van Ham SM, Grüneberg U, Malcherek G, Bröker I, Melms A, Trowsdale J. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *The Journal of experimental medicine* 1996, **184**(5): 2019-2024.

16. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 1998, **9**(3): 377-383.
17. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology* 2011, **89**(8): 836-843.
18. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003, **425**(6956): 397-402.
19. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* 2012, **12**(8): 557-569.
20. Rock KL, Benacerraf B, Abbas AK. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *The Journal of experimental medicine* 1984, **160**(4): 1102-1113.
21. Antoniou AN, Watts C. Antibody modulation of antigen presentation: positive and negative effects on presentation of the tetanus toxin antigen via the murine B cell isoform of FcγRII. *European journal of immunology* 2002, **32**(2): 530-540.
22. Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 2005, **22**(5): 539-550.
23. Steimle V, Siegrist C-A, Mottet A, Lisowska-Groszpiette B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994, **265**(5168): 106-109.

24. Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* 2004, **103**(6): 2187-2195.
25. Villadangos JA, Schnorrer P, Wilson NS. Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunological reviews* 2005, **207**(1): 191-205.
26. Momburg F, Fuchs S, Drexler J, Busch R, Post M, Hämmerling G, *et al.* Epitope-specific enhancement of antigen presentation by invariant chain. *The Journal of experimental medicine* 1993, **178**(4): 1453-1458.
27. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, *et al.* Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997, **388**(6644): 787-792.
28. Ten Broeke T, van Niel G, Wauben MH, Wubbolts R, Stoorvogel W. Endosomally stored MHC class II does not contribute to antigen presentation by dendritic cells at inflammatory conditions. *Traffic* 2011, **12**(8): 1025-1036.
29. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997, **388**(6644): 782-787.
30. Boname JM, Lehner PJ. What has the study of the K3 and K5 viral ubiquitin E3 ligases taught us about ubiquitin-mediated receptor regulation? *Viruses* 2011, **3**(2): 118-131.
31. Jabbour M, Campbell EM, Fares H, Lybarger L. Discrete domains of MARCH1 mediate its localization, functional interactions, and posttranscriptional control of expression. *The Journal of Immunology* 2009, **183**(10): 6500-6512.

32. Cadwell K, Coscoy L. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* 2005, **309**(5731): 127-130.
33. Wang X, Herr RA, Chua W-J, Lybarger L, Wiertz EJ, Hansen TH. Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *The Journal of cell biology* 2007, **177**(4): 613-624.
34. Ma JK, Platt MY, Eastham-Anderson J, Shin J-S, Mellman I. MHC class II distribution in dendritic cells and B cells is determined by ubiquitin chain length. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, **109**(23): 8820-8827.
35. van Niel G, Wubbolts R, ten Broeke T, Buschow SI, Ossendorp FA, Melief CJ, *et al.* Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity* 2006, **25**(6): 885-894.
36. Shin J-S, Ebersold M, Pypaert M, Delamarre L, Hartley A, Mellman I. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 2006, **444**(7115): 115-118.
37. Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Goto E, Aoki M, Mito-Yoshida M, Uematsu M, *et al.* Novel regulation of MHC class II function in B cells. *The EMBO journal* 2007, **26**(3): 846-854.
38. Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Aoki M, Goto E, Mito M, Uematsu M, *et al.* Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. *The Journal of Immunology* 2006, **177**(1): 341-354
39. Bourgeois-Daigneault M-C, Thibodeau J. Autoregulation of MARCH1 expression by dimerization and autoubiquitination. *The Journal of Immunology* 2012, **188**(10): 4959-4970.

40. Bartee E, Mansouri M, Nerenberg BTH, Gouveia K, Früh K. Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins. *Journal of virology* 2004, **78**(3): 1109-1120.
41. Bartee E, McCormack A, Früh K. Quantitative membrane proteomics reveals new cellular targets of viral immune modulators. *PLoS Pathog* 2006, **2**(10): e107.
42. Bartee E, Eyster CA, Viswanathan K, Mansouri M, Donaldson JG, Früh K. Membrane-Associated RING-CH proteins associate with Bap31 and target CD81 and CD44 to lysosomes. *PLoS One* 2010, **5**(12): e15132.
43. Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO reports* 2006, **7**(10): 1019-1022.
44. Früh K, Bartee E, Gouveia K, Mansouri M. Immune evasion by a novel family of viral PHD/LAP-finger proteins of gamma-2 herpesviruses and poxviruses. *Virus research* 2002, **88**(1): 55-69.
45. Jahnke M, Trowsdale J, Kelly AP. Ubiquitination of HLA-DO by MARCH family E3 ligases. *European journal of immunology* 2013, **43**(5): 1153-1161.
46. Yonashiro R, Ishido S, Kyo S, Fukuda T, Goto E, Matsuki Y, *et al.* A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *The EMBO Journal* 2006, **25**(15): 3618-3626.

47. De Gassart A, Camosseto V, Thibodeau J, Ceppi M, Catalan N, Pierre P, *et al.* MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, **105**(9): 3491-3496.
48. Corcoran K, Jabbour M, Bhagwandin C, Deymier MJ, Theisen DL, Lybarger L. Ubiquitin-mediated regulation of CD86 protein expression by the ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH-1 (MARCH1). *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**(43): 37168-37180.
49. Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Mito-Yoshida M, Goto E, Aoki-Kawasumi M, Nakayama M, *et al.* Cutting edge: requirement of MARCH-I-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cells. *The Journal of Immunology* 2009, **183**(11): 6893-6897.
50. Galbas T, Steimle V, Lapointe R, Ishido S, Thibodeau J. MARCH1 down-regulation in IL-10-activated B cells increases MHC class II expression. *Cytokine* 2012, **59**(1): 27-30.
51. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Huppé G, Tremblay J, Aumont A, Houde M, *et al.* Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *European journal of immunology* 2008, **38**(5): 1225-1230.
52. Landmann S, Mühlethaler-Mottet A, Bernasconi L, Suter T, Waldburger J-M, Masternak K, *et al.* Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *The Journal of experimental medicine* 2001, **194**(4): 379-392.
53. Lee AW, Wang N, Hornell TM, Harding JJ, Deshpande C, Hertel L, *et al.* Human cytomegalovirus decreases constitutive transcription of MHC class II genes in mature Langerhans cells by reducing CIITA transcript levels. *Molecular immunology* 2011, **48**(9): 1160-1167.

54. Walseng E, Furuta K, Goldszmid RS, Weih KA, Sher A, Roche PA. Dendritic cell activation prevents MHC class II ubiquitination and promotes MHC class II survival regardless of the activation stimulus. *Journal of Biological Chemistry* 2010, **285**(53): 41749-41754.
55. Tze LE, Horikawa K, Domaschenz H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, *et al.* CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10–driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *The Journal of experimental medicine* 2011, **208**(1): 149-165.
56. Jung M, Sabat R, Krätzschar J, Seidel H, Wolk K, Schönbein C, *et al.* Expression profiling of IL-10–regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *European journal of immunology* 2004, **34**(2): 481-493.
57. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann T. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine* 1989, **170**(6): 2081-2095.
58. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 2001, **19**(1): 683-765.
59. Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, Sutterwala FS, Lara-Tejero M, Galán JE, *et al.* Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 2006, **25**(6): 941-952.
60. Koppelman B, Neeffjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II $\alpha\beta$ peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 1997, **7**(6): 861-871.

61. Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke WD, Volk HD, *et al.* Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Experimental dermatology* 2006, **15**(12): 991-1004.
62. Wolk K, Witte E, Reineke U, Witte K, Friedrich M, Sterry W, *et al.* Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22? *Genes and immunity* 2005, **6**(1): 8-18.
63. Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Goto E, Aoki M, Mito-Yoshida M, Uematsu M, *et al.* Novel regulation of MHC class II function in B cells. *The EMBO journal* 2007, **26**(3): 846-854.
64. Oh J, Wu N, Baravalle G, Cohn B, Ma J, Lo B, *et al.* MARCH1-mediated MHCII ubiquitination promotes dendritic cell selection of natural regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 2013, **210**(6): 1069-1077.
65. Schulz C, Perdiguero EG, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 2012, **336**(6077): 86-90.
66. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* 1992, **176**(6): 1693-1702.
67. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3⁺ M-CSFR⁺ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nature immunology* 2007, **8**(11): 1207-1216.

68. Naik SH, Sathe P, Park H-Y, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature immunology* 2007, **8**(11): 1217-1226.
69. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 1994, **179**(4): 1109-1118.
70. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko A-C, Krijgsveld J, *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature immunology* 2013, **14**(8): 821-830.
71. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF- cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *NATURE-LONDON-* 1992: 258-258.
72. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, *et al.* A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006, **311**(5757): 83-87.
73. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature immunology* 2014, **15**(10): 929-937.
74. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology* 2014, **14**(8): 571-578.

75. Mildner A, Yona S, Jung S. A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells. *Adv Immunol* 2013, **120**: 69-103.
76. Falk LA, Vogel SN. Comparison of bone marrow progenitors responsive to granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor-1. *Journal of leukocyte biology* 1988, **43**(2): 148-157.
77. MacLennan I, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DMY, Zúñiga E, *et al.* Extrafollicular antibody responses. *Immunological reviews* 2003, **194**(1): 8-18.
78. Hunt D, Wilson JE, Weih KA, Ishido S, Harton JA, Roche PA, *et al.* Francisella tularensis elicits IL-10 via a PGE (2)-inducible factor, to drive macrophage MARCH1 expression and class II down-regulation.
79. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology* 2011, **89**(8): 836-843.
80. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* 1995, **182**(2): 389-400.
81. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren H-G, *et al.* Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 2004, **305**(5687): 1153-1157.
82. de Baey A, Lanzavecchia A. The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *The Journal of experimental medicine* 2000, **191**(4): 743-748.

83. King LS, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annual Review of Physiology* 1996, **58**(1): 619-648.
84. Norbury CC. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 2006, **117**(4): 443-451.
85. Buttgerit F, Burmester G-R, Brand MD. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunology today* 2000, **21**(4): 194-199.
86. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science* 2009, **324**(5930): 1029-1033.
87. Chawla A, Nguyen KD, Goh YS. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Immunology* 2011, **11**(11): 738-749.
88. Chance B, Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1956, **17**: 65-134.
89. Chance B, Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation IV. The respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry* 1955, **217**(1): 429-438.
90. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2012, **1817**(6): 851-862.
91. Rich P. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions* 2003, **31**(6): 1095-1106.
92. Lodish H. Molecular cell biology. Macmillan, 2008.

93. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, *et al.* HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003, **112**(5): 645-657.
94. Elks PM, van Eeden FJ, Dixon G, Wang X, Reyes-Aldasoro CC, Ingham PW, *et al.* Activation of hypoxia-inducible factor-1 α (hif-1 α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood* 2011, **118**(3): 712-722.
95. Borregaard N, Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *Journal of Clinical Investigation* 1982, **70**(3): 550.
96. Lewis J, Lee J, Underwood J, Harris A, Lewis C. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *Journal of leukocyte biology* 1999, **66**(6): 889-900.
97. Sher R, Wadee A, Joffe M. The enhancement of eosinophil function by lymphocyte supernatants. *Clinical and experimental immunology* 1983, **51**(3): 525.
98. Sumbayev VV, Nicholas SA, Streatfield CL, Gibbs BF. Involvement of hypoxia-inducible factor-1 HiF (1 α) in IgE-mediated primary human basophil responses. *European journal of immunology* 2009, **39**(12): 3511-3519.
99. Venge P, Moberg L, Björnsson E, Bergström M, Långström B, Håkansson L. Mechanisms of basal and cytokine-induced uptake of glucose in normal human eosinophils: relation to apoptosis. *Respiratory medicine* 2003, **97**(10): 1109-1119.
100. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, *et al.* Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 2010, **115**(23): 4742-4749.

101. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 2013, **38**(4): 633-643.
102. Tannahill G, Curtis A, Adamik J, Palsson-McDermott E, McGettrick A, Goel G, *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 [bgr] through HIF-1 [agr]. *Nature* 2013, **496**(7444): 238-242.
103. MacIver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Coloff JL, Rathmell JC. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of leukocyte biology* 2008, **84**(4): 949-957.
104. Jones RG, Thompson CB. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* 2007, **27**(2): 173-178.
105. Doughty CA, Bleiman BF, Wagner DJ, Dufort FJ, Mataraza JM, Roberts MF, *et al.* Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood* 2006, **107**(11): 4458-4465.
106. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, *et al.* Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 2010, **115**(23): 4742-4749.
107. Weinhouse S, Warburg O, Burk D, Schade AL. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956, **124**(3215): 267-272.
108. Keilin D. The history of cell respiration and cytochrome Cambridge Univ. Press, London 1966.

109. Warburg O. Notizen zur entwicklungsphysiologie des Seeigeleies. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 1915, **160**(4): 324-332.
110. Buxton DB, Schwaiger M, Nguyen A, Phelps ME, Schelbert HR. Radiolabeled acetate as a tracer of myocardial tricarboxylic acid cycle flux. *Circulation research* 1988, **63**(3): 628-634.
111. Ackermann RF, Lear JL. Glycolysis-induced discordance between glucose metabolic rates measured with radiolabeled fluorodeoxyglucose and glucose. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1989, **9**(6): 774-785.
112. Lear JL, Ackermann RF. Evaluation of radiolabeled acetate and fluoroacetate as potential tracers of cerebral oxidative metabolism. *Metabolic brain disease* 1990, **5**(1): 45-56.
113. Pelletier M, Billingham LK, Ramaswamy M, Siegel RM. Extracellular flux analysis to monitor glycolytic rates and mitochondrial oxygen consumption. *Methods Enzymol* 2014, **542**: 125-149.
114. Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Méndez G, Eberl T, Margreiter R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 1995, **27**(6): 583-596.
115. David G N, Victor M D-U, Min W, Per Bo J, George W R. Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *Journal of Visualized Experiments* 2010(46).
116. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology* 2013, **31**.

117. Meredith MM, Liu K, Darrasse-Jeze G, Kamphorst AO, Schreiber HA, Guermonprez P, *et al.* Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *The Journal of experimental medicine* 2012, **209**(6): 1153-1165.
118. Satpathy AT, Wumesh K, Albring JC, Edelson BT, Kretzer NM, Bhattacharya D, *et al.* Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *The Journal of experimental medicine* 2012, **209**(6): 1135-1152.
119. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, *et al.* Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine* 2012, **209**(6): 1167-1181.
120. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010, **330**(6005): 841-845.
121. Shalek AK, Satija R, Adiconis X, Gertner RS, Gaublomme JT, Raychowdhury R, *et al.* Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 2013, **498**(7453): 236-240.
122. Vander Lugt B, Khan AA, Hackney JA, Agrawal S, Lesch J, Zhou M, *et al.* Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation. *Nature immunology* 2014, **15**(2): 161-167.
123. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai X-M, *et al.* Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature immunology* 2006, **7**(3): 265-273.

124. Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, *et al.* The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**(13): 3115-3130.
125. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000, **95**(11): 3489-3497.
126. Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in cell biology* 2004, **14**(11): 628-638.
127. Miller JC, Brown BD, Shay T, Gautier EL, Jojic V, Cohain A, *et al.* Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature immunology* 2012, **13**(9): 888-899.
128. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature immunology* 2012, **13**(11): 1118-1128.
129. Helft J, Böttcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, *et al.* GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+ MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 2015, **42**(6): 1197-1211.
130. Shin J-S, Ebersold M, Pypaert M, Delamarre L, Hartley A, Mellman I. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 2006, **444**(7115): 115-118.

131. Garedew A, Henderson SO, Moncada S. Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation* 2010, **17**(10): 1540-1550.
132. Hill B, Dranka B, Zou L, Chatham J, Darley-Usmar V. Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal. *Biochem J* 2009, **424**: 99-107.
133. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, **105**(48): 18782-18787.
134. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *The Journal of clinical investigation* 2010, **120**(1): 142.
135. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, *et al.* Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(49): 19345-19350.
136. Fogal V, Richardson AD, Karmali PP, Scheffler IE, Smith JW, Ruoslahti E. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 2010, **30**(6): 1303-1318.

137. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, *et al.* Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, **107**(19): 8788-8793.
138. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, *et al.* Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003, **299**(5608): 896-899.
139. Hill B, Awe S, Vladykovskaya E, Ahmed Y, Liu S, Bhatnagar A, *et al.* Myocardial ischaemia inhibits mitochondrial metabolism of 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *Biochem J* 2009, **417**: 513-524.
140. Eaton P, Li J-M, Hearse DJ, Shattock MJ. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1999, **276**(3): H935-H943.
141. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990, **87**(4): 1620-1624.
142. Kotamraju S, Tampo Y, Keszler A, Chitambar CR, Joseph J, Haas AL, *et al.* Nitric oxide inhibits H₂O₂-induced transferrin receptor-dependent apoptosis in endothelial cells: Role of ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(19): 10653-10658.
143. Lambert AJ, Brand MD. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Mitochondrial DNA*. Springer, 2009, pp 165-181.

144. Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 2010, **48**(7): 905-914.
145. Shmookler RR, Goldstein S. Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells. Genome number, integrity, and methylation. *The Journal of biological chemistry* 1983, **258**(15): 9078-9085.
146. Wei Y-H, Lee H-C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental biology and medicine* 2002, **227**(9): 671-682.
147. Fossati G, Moulding DA, Spiller DG, Moots RJ, White MR, Edwards SW. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *The Journal of immunology* 2003, **170**(4): 1964-1972.
148. Samji T, Hong S, Means RE. The Membrane Associated RING-CH Proteins: A Family of E3 Ligases with Diverse Roles through the Cell. *International Scholarly Research Notices* 2014, **2014**.
149. Michaelis L, Menten ML. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem z* 1913, **49**(333-369): 352.
150. Pitot HC, Barsness L, Goldsworthy T, KITAGAWA T. Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature* 1978, **271**(5644): 456-458.

151. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, *et al.* Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 2007, **317**(5834): 121-124.
152. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology* 2015, **15**(4): 203-216.
153. Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nature Reviews Microbiology* 2010, **8**(4): 296-307.
154. Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N. T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* 1996, **9**(2): 211-220.

Annexe

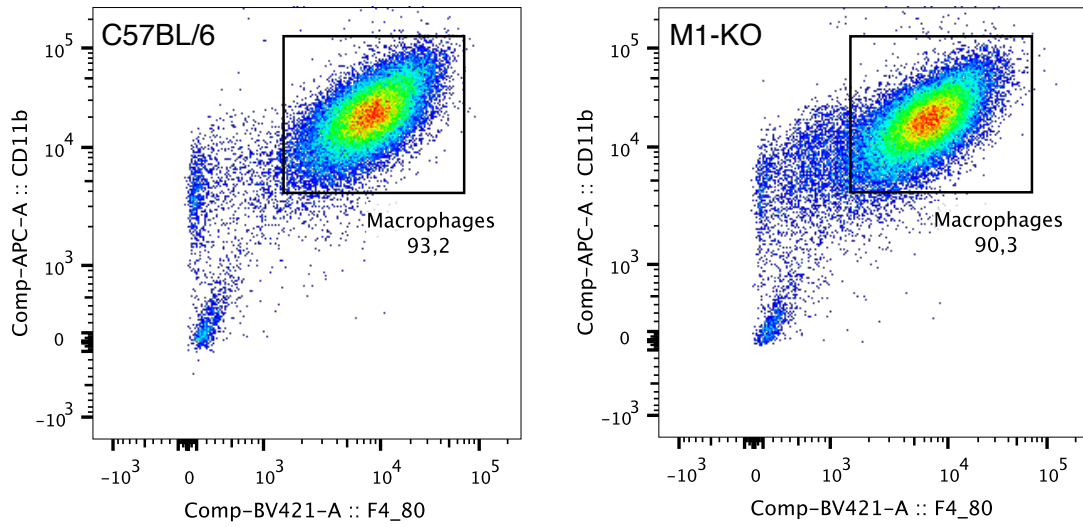


Figure S1a Proportions de cellules CD11b F4/80 double positives, de souris C57BL/6 et M1-KO, après 7 jours de différenciation de moelle osseuse en présence de M-CSF.

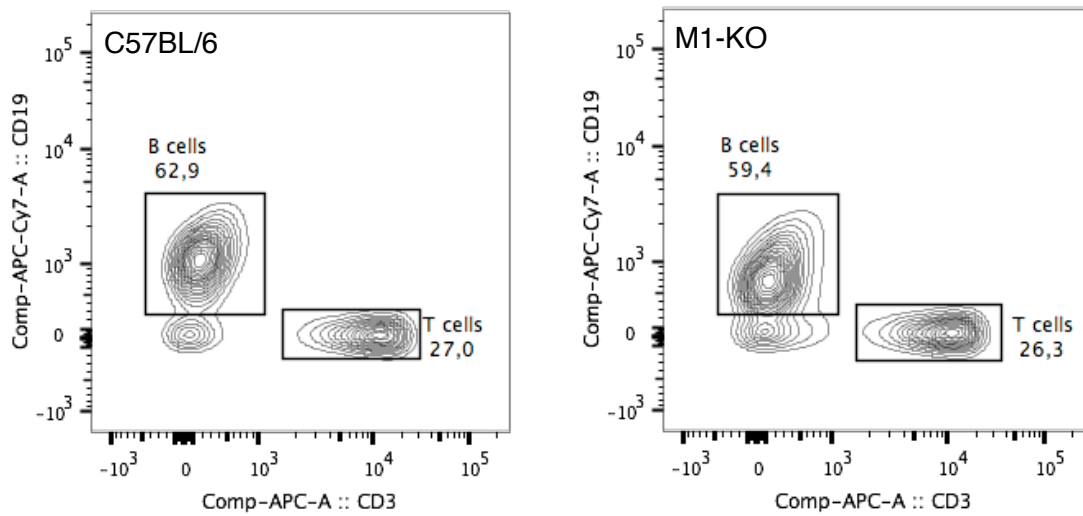


Figure S1b Proportions de cellules CD19 et CD3 positives dans une rate de souris C57BL/6 et de M1-KO.