

Université de Montréal

# Régulation des chaperons de la présentation antigénique par ubiquitination

par

Annie Ladouceur

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Magister Scientiarum (M.Sc.)  
en Microbiologie et Immunologie

Mai 2009

© Annie Ladouceur, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation des chaperons de la présentation antigénique par ubiquitination

présenté par  
Annie Ladouceur

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Idriss Djilali-Saiah, président-rapporteur  
Dr Jacques Thibodeau, directeur de recherche  
Dr Viktor Steimle, membre du jury

## RÉSUMÉ

La chaîne invariante forme un complexe nonamérique avec les molécules classiques du CMH de classe II. HLA-DM et HLA-DO, des molécules non-classiques de classe II, sont aussi impliquées dans la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T. Ces molécules chaperones de la présentation antigénique modulent la capacité d'une cellule à présenter des antigènes par les molécules classiques du CMH de classe II. La régulation transcriptionnelle des molécules chaperones, tout comme celle des autres molécules du CMH de classe II, est assurée par le transactivateur CIITA. La molécule HLA-DR peut être régulée négativement de manière post-traductionnelle par ubiquitination grâce à l'enzyme E3 ubiquitine ligase MARCH1. Celle-ci est induite par l'interleukine-10 dans les monocytes. L'objectif de ce projet était de déterminer si l'ubiquitination par MARCH1 peut aussi réguler l'expression des molécules chaperones de la présentation antigénique. Les expériences furent réalisées dans le contexte de co-transfections en cellules HEK293T. L'expression des molécules fut évaluée par immunomarquages et cytométrie de flux. Il a été montré que l'isoforme p33 de la chaîne invariante est régulé négativement en présence de MARCH1 à partir de la surface cellulaire, causant ainsi sa dégradation. Tel que démontré par l'utilisation d'un mutant dépourvu de queue cytoplasmique, cette dernière région n'est pas indispensable à ce phénomène. Une hypothèse est qu'une molécule non-identifiée, associée à Ii, serait ubiquitinée par MARCH1, l'entraînant dans sa régulation négative. Il fut déterminé que cette molécule n'était pas CXCR2, un récepteur pouvant être impliqué, avec la chaîne invariante et CD44, en tant que récepteur de MIF (*Macrophage Inhibitory Factor*). Il fut aussi montré que HLA-DO peut être ciblé par MARCH1 mais ceci ne semble pas être un phénomène dominant; l'expression des complexes DO/DM n'étant pas affectée bien qu'ils entrent en interaction avec MARCH1. L'expression de HLA-DM n'est pas affectée par MARCH1. Il n'a toutefois pas été déterminé hors de tout doute si MARCH1 peut modifier DM; des résultats obtenus avec une queue cytoplasmique de DM possédant une lysine laissant suggérer qu'il est possible que MARCH1 interagisse avec DM. Dans l'ensemble, les travaux démontrent que l'ubiquitination par MARCH1 joue un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de la chaîne invariante p33 mais pas HLA-DO et HLA-DM.

## **MOTS-CLÉS**

Chaîne invariante (Ii)

Molécules non-classiques de classe II

HLA-DM

HLA-DO

E3 ubiquitine ligase

MARCH1

MARCH

Molécules classiques du CMH de classe II

HLA

## ABSTRACT

The invariant chain, which form a nonameric complex with the classical MHC class II molecules. HLA-DM and HLA-DO (non-classical class II molecules) are involved in the presentation of antigens to T lymphocytes. The chaperons molecules of the antigenic presentation can modulate the capacity of the cells to present antigens. The transcriptional regulation of the chaperons and all of the other molecules linked to the MHC is assured by the CIITA transactivator. Little is know of the post-transcriptional mechanisms, other than the fact that HLA-DR molecule can be down-regulated by ubiquitination due to E3 ubiquitin ligase MARCH1. MARCH1 is induce by interleukin-10 in monocytes. The goal of this project is to figure out if ubiquitination by MARCH1 can also regulate the expression of the antigenic presentation chaperons. The experiences were performed in the context of co-transfections in HEK293T cells and the expression of the diversés molecules was evaluated by cell stainings and FACS analysis. The p33 isoform of the invariant chain was found to be down-regulated and degraded in the presence of MARCH1. The invariant chain cytoplasmic tail is not completely essential to this phenomenon; a non-identified molecule, associated with Ii, is probably ubiquitinated by MARCH1 and is then down-regulated, together with Ii. It was shown tha CXCR2, a reeptor involved with the invariant chain and CD44 in the reception of the MIF signal, is not that molecule. HLA-DO can ben targetd by MARCH1 but this does not seem to be a general phenomenon; the expression of the DO/DM complexes remaning unaffected even with the interaction of those complexes with MARCH1. Therefore, a certain protection seem to be provided by HLA-DM to HLA-DO. The expression of HLA-DM itself is not affected by the presence of MARCH1. However, it was not cleary demonstrated if MARCH1 can modify DM. Some results obtained with a cytoplasmic tail of DM comprising an additional lysine suggest that there is a possibility that MARCH1 interact with DM. Generally, the work presented here show that ubiquitination by MARCH1 is involved in post-transcriptionnal regulation of the p33 isoform of the invariant chain but not in the regulation of HLA-DO and HLA-DM.

## KEYWORDS

Invariant chain (Ii)

Non-classical class II molecules

HLA-DM

HLA-DO

E3 ubiquitine ligase

MARCH1

MARCH

Classical class II MHC molecules

HLA

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VIII</b>
<b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.0 INTRODUCTION SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 CMH DE CLASSE I.....	7
1.1.2 CMH DE CLASSE II .....	8
<b>1.2 L'APPRÊTEMENT ET LA PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES ENDOGÈNES PAR LE CMH I .....	11
1.2.2 PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES EXOGÈNES PAR LE CMH II.....	12
1.2.3 VOIE DE LA PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES PAR LE CMH II .....	12
<b>1.3 LA CHAÎNE INVARIANTE (Ii).....</b>	<b>15</b>
1.3.1 RÔLES ET FONCTIONS .....	15
1.3.2 STRUCTURE ET ISOFORMES.....	16
1.3.3 Ii EST LE RÉCEPTEUR DE MIF .....	19
1.3.4 MOLÉCULES ASSOCIÉES À Ii: CD44 ET CXCR2.....	19
<b>1.4 LES MOLÉCULES NON-CLASSIQUES.....</b>	<b>22</b>
1.4.1 MOLÉCULE NON-CLASSIQUE DE CLASSE II : HLA-DM .....	22
1.4.2 MOLÉCULE NON-CLASSIQUE DE CLASSE II : HLA-DO .....	24
1.4.3 IMPLICATION DES MOLÉCULES NON-CLASSIQUES EN CLINIQUE .....	26
<b>1.5 L'UBIQUITINATION.....</b>	<b>28</b>
1.5.1 PROCESSUS ET ENZYMES IMPLIQUÉS .....	28
1.5.2 MONO, MULTI OU POLY-UBIQUITINATION .....	30
<b>1.6 LES E3-UBIQUITINES LIGASES.....</b>	<b>31</b>
1.6.1 K3 ET K5 : UBIQUITINES LIGASES VIRALES.....	31
1.6.2 HOMOLOGUES CHEZ L'HUMAIN : FAMILLE DES MARCHs .....	32
1.6.3 IMPLICATION DE MARCH1 ET MARCH8 DANS LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE .....	34
1.7.1 HYPOTHÈSES .....	36
1.7.2 OBJECTIF .....	37

<b><u>CHAPITRE 2 : PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES</u></b> .....	<b>38</b>
2.1 VECTEURS .....	39
2.2 STRATÉGIES DE CLONAGE .....	41
2.3 LIGNÉES CELLULAIRES ET TRANSFECTIONS .....	41
2.4 ANTICORPS .....	42
2.5 MARQUAGES CELLULAIRES ET CYTOMÉTRIE EN FLUX .....	43
2.6 IMMUNOPRÉCIPITATION ET IMMUNOBUVARDAGE .....	44
2.7 STATISTIQUES .....	45
<b><u>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS</u></b> .....	<b>46</b>
<b>3.1 IMPLICATION DE MARCH1 DANS LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2 MARCH1 AFFECTE L'EXPRESSION DES MOLÉCULES DE LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE DANS LES HEK293 CIITA ET LES HELA CIITA/DO</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3 MARCH1 RÉGULE NÉGATIVEMENT L'EXPRESSION DE Iip33</b> .....	<b>56</b>
3.3.1 D'AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE DES MARCH AFFECTENT L'EXPRESSION DE Iip33 .....	58
3.3.2 LA QUEUE CYTOPLASMIQUE DE II N'EST PAS IMPLIQUÉE DANS LA RÉGULATION NÉGATIVE PAR MARCH1 .....	61
3.3.3 CXCR2 N'EST PAS IMPLIQUÉE DANS LA RÉGULATION NÉGATIVE DE Iip33 .....	64
<b>3.4 MARCH1 N'AFFECTE PAS LE CIBLAGE DE HLA-DO ET HLA-DM</b> .....	<b>70</b>
3.4.1 MARCH1 N'INDUIT PAS LA RÉGULATION NÉGATIVE DE HLA-DO ET DES COMPLEXES DO/DM .....	71
3.4.2 MARCH1 N'INDUIT PAS LA RÉGULATION NÉGATIVE DE HLA-DM .....	79
3.4.3 MARCH1 AFFECTE L'EXPRESSION DE CHIMÈRES DE HLA-DM ET HLA-DR .....	81
<b><u>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</u></b> .....	<b>86</b>
4.1 EFFET GÉNÉRAL DE MARCH1 SUR LES CELLULES EXPRIMANT CIITA .....	87
4.2 RÉGULATION DE LA CHAÎNE INVARIANTE PAR MARCH1 .....	88
4.3 RÉGULATION DE HLA-DO ET HLA-DM PAR MARCH1 .....	95
RÉGULATION DE HLA-DO.....	95
RÉGULATION DE HLA-DM.....	97
4.5 CONCLUSION .....	101
<b><u>RÉFÉRENCES</u></b> .....	<b>103</b>



## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. 1 Distribution des gènes HLA chez humain.....	6
FIGURE 1. 2 Représentation schématique des molécules de classe I.....	7
FIGURE 1. 3 Représentation schématique des molécules de classe II.....	8
FIGURE 1. 4 Régulation transcriptionnelle des gènes du CMH de classe II par CIITA ..	10
FIGURE 1. 6 Modèle d'assemblage des chaînes $\alpha$ et $\beta$ du CMH de classe II et de Ii dans le réticulum endoplasmique. ....	12
FIGURE 1. 7 Dégradation de la chaîne invariante de souris par une série de protéases dans les endosomes. ....	13
FIGURE 1. 8 Voie de la présentation des antigènes exogènes par le CMH II. ....	14
FIGURE 1. 9 Isoformes de la chaîne invariante humaine. ....	17
FIGURE 1. 10 Séquence de Iip33 avec représentation des divers motifs .....	18
FIGURE 1. 11 Modèle de transduction du signal induit par MIF. Bien que n'étant pas représentées sur cette figure, les molécules CXCR2 et CXCR4 ont aussi été identifiées comme récepteurs de MIF à la surface cellulaire <sup>82</sup> .....	20
FIGURE 1. 12. Représentation de la queue cytoplasmique de DO $\beta$ .....	25
FIGURE 1. 13. L'ubiquitination grâce à la série d'enzyme E1, E2 et E3. ....	29
FIGURE 1. 14. Les MARCHs sont classées par paires selon leur degré d'homologie. ....	32
FIGURE 3. 1 Analyse de la population de HeLa CIITA/DO transfectée avec YFP ou M1-YFP. ....	49
FIGURE 3. 2 Effet de MARCH1 sur les HEK293 CIITA.....	52
FIGURE 3. 3 Effet de MARCH1 sur les HEK293 CIITA (FACS).....	53
FIGURE 3. 4 Effet de MARCH1 sur les HeLa CIITA/DO .....	54
FIGURE 3. 5 Effet de MARCH1 sur les HeLaCIITA/DO (FACS) .....	55
FIGURE 3. 6 Séquence de la queue cytoplasmique de Ii.....	56
FIGURE 3. 7 MARCH1 et MARCH8 régulent négativement l'expression de Iip33.....	58
FIGURE 3. 8 Les membres de la famille des MARCH ont des effets divergents sur Iip33 .....	60
FIGURE 3. 9 La queue cytoplasmique de Ii n'est pas impliquée dans la régulation par MARCH1.....	62
FIGURE 3. 10 La queue cytoplasmique de Ii n'est pas impliquée dans la régulation par MARCH1 (FACS) .....	63
FIGURE 3. 11 Expression endogène de CXCR2 dans les HEK293T .....	65
FIGURE 3. 12 CXCR2 n'accentue pas la régulation négative de p33 par MARCH1.....	67
FIGURE 3. 13 Interaction entre Iip33 et CXCR2.....	69
FIGURE 3. 14 Séquences des queues cytoplasmiques de HLA-DO $\alpha$ et HLA-DO $\beta$ .....	70
FIGURE 3. 15 Séquence des queues cytoplasmiques de HLA-DM $\alpha$ et HLA-DM $\beta$ .....	71
FIGURE 3. 16 MARCH1 cause une régulation négative de surface du mutant DO $\alpha$ P11V-DO $\beta$ .....	72

FIGURE 3. 17 MARCH1 cause une régulation négative de surface du mutant DO $\alpha$ P11V-Do $\beta$ (FACS) .....	73
FIGURE 3. 18 MARCH1 n'affecte pas l'expression des complexes DO/DM.....	74
FIGURE 3. 19 MARCH1 n'affecte pas l'expression des complexes DO/DMY.....	76
FIGURE 3. 20 Interaction entre DO et MARCH1.....	78
FIGURE 3. 21 MARCH1 n'affecte pas l'expression de DM. ....	79
FIGURE 3. 22 MARCH1 n'affecte pas l'expression de DMY. ....	80
FIGURE 3. 23 Shématisation des mutants de DM et DR utilisés.....	81
FIGURE 3. 24 MARCH1 peut réguler négativement des chimères de DM et DR .....	84
FIGURE 3. 25 La chaîne DR $\alpha$ n'est pas ubiquitinée par MARCH1 lors de l'utilisation du mutant DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K cyto .....	84
FIGURE 4. 1 Séquences des queues cytoplasmiques de HLA-DR $\alpha$ et HLA-DR $\beta$ .....	89
FIGURE 4. 2 Séquence du domaine transmembranaire et de la queue cytoplasmique de CD44 humain. ....	94
FIGURE 4. 3 Schématisation des mutants de DM et DR utilisés et résumé des résultats obtenus. ....	99

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. 1 Quelques rôles et fonctions attribués à la chaîne invariante (Ii). .....	16
TABLEAU 1. 2 Les MARCHs visent des molécules diversifiées. ....	32

## CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

## 1.0 INTRODUCTION SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Les cellules composant le système immunitaire proviennent de progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes provenant eux-mêmes des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Du progéniteur myéloïde sont issus entre autres les macrophages (forme mature des monocytes), les cellules dendritiques (CD), les mastocytes et les neutrophiles. Du progéniteur lymphoïde sont plutôt issus les lymphocytes ainsi que les cellules NK (natural killers). Une partie de ces cellules (macrophages, CD immatures et mastocytes) circule en permanence dans les tissus tandis que les autres (lymphocytes et cellules NK) se concentrent dans les ganglions lymphatiques. La maturation des lymphocytes s'effectue dans les organes lymphatiques primaires (thymus et moelle osseuse) et, ensuite, les lymphocytes circulent grâce aux vaisseaux lymphatiques vers les organes lymphoïdes secondaires (tels les ganglions lymphatiques et la rate) situés le long du système lymphatique<sup>1,2</sup>. Les ganglions lymphatiques sont situés tout au long du système lymphatique. Ils sont hautement organisés et sont responsable du drainage des fluides provenant des tissus en plus d'être le lieu de différenciation des cellules immunitaires et d'activation des lymphocytes<sup>1,2</sup>.

La réponse immunitaire se développe en deux grandes facettes : la réponse innée et la réponse acquise (adaptative). L'immunité innée implique une réponse rapide et à l'antigène. Lors d'une infection, des phagocytes (macrophages et CD immatures) présents en tout temps dans les tissus, reconnaissent les organismes étrangers ou les cellules infectées et les ingèrent. Les macrophages s'activent ainsi et sécrètent alors des cytokines et des chémokines; principaux médiateurs de l'inflammation. Ces médiateurs permettent le recrutement d'autres cellules phagocytaires, dont les neutrophiles ainsi que d'autres macrophages au site de l'infection. L'inflammation augmente le drainage des fluides lymphatiques; amenant les phagocytes porteurs de l'antigène dans les ganglions. L'antigène pourra alors être présenté aux lymphocytes T. Les DCs immatures sont le type cellulaire spécialisé dans cette tâche, mais les macrophages peuvent aussi être des cellules présentatrices d'antigènes dans ce cas. Ces CD présentes dans les tissus sont connues sous le nom de *cellules de*

*Langerhans*. Une cellule présentatrice d'antigène (APC) est une cellule capable d'apprêter un antigène en fragments peptidiques qui seront présentés sur sa surface cellulaire aux lymphocytes T. Outre les macrophages et les DCs, les lymphocytes T et B peuvent aussi être des APCs. De plus, les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages ont la particularité de devenir des APCs professionnelles<sup>1, 3, 4</sup>.

L'immunité acquise, principalement médiée par les lymphocytes et les DC, est suivie du développement d'une mémoire immunitaire. Des suites de la sélection clonale lors de leur maturation, chaque lymphocyte est spécifique à un seul antigène. En attendant leur rencontre avec cet antigène, les lymphocytes migrent à travers le système lymphatique. Les DC immatures migrant vers les ganglions après avoir incorporé l'antigène agissent alors comme les véritables initiateurs de la réponse acquise. Ils présentent l'antigène aux lymphocytes qui s'activent à leur tour et entreprennent une expansion clonale sur quelques jours permettant la génération de lymphocytes effecteurs. De ces lymphocytes effecteurs, une certaine quantité deviendra des lymphocytes mémoires une fois l'infection passée. Ces lymphocytes mémoires survivent très longtemps et, suivant une réinfection, sont immédiatement disponibles pour éliminer l'envahisseur<sup>1</sup>.

Il existe 2 types de lymphocytes T effecteurs: les  $LT_{\text{auxiliaires}}$  (ou  $LT_{\text{helper}}$ ) et les  $LT_{\text{cytotoxiques}}$ . Les  $LT_{\text{cytotoxiques}}$  sont porteurs du marqueur CD8, le co-récepteur se liant aux molécules du CMH de classe I complexées à l'antigène qui, lui, est reconnu par le TCR. Ainsi, une cellule infectée sera porteuse de l'antigène sur son CMH de classe I. Le lymphocyte  $T_{\text{cytotoxique}}$  spécifique reconnaîtra l'antigène et détruira cette cellule. Les  $LT_{\text{auxiliaires}}$  sont porteurs du marqueur CD4 qui se lie aux molécules de CMH de classe II<sup>1</sup>.

Après leur rencontre avec l'antigène, les lymphocytes  $T_{CD4}^{+}$  peuvent se différencier en  $T_H1$ ,  $T_H2$  ou  $T_H17$ ; un mécanisme régi par les différents signaux de costimulation et les cytokines présentes dans l'environnement. Les  $T_H1$ , productrices d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , sont importantes pour l'éradication d'envahisseurs intracellulaires; elles

activent les macrophages, les naturels killers et les  $T_{CD8}^+$ . Les  $T_H2$  (productrices des interleukines IL-4, IL-13, IL-9 et IL-5) activent les mastocytes et sont cruciales pour l'élimination des parasites extracellulaires<sup>5</sup>. Ce sont les lymphocytes T auxiliaires qui sont responsables de l'activation des lymphocytes B de laquelle s'ensuit une commutation isotypique où le lymphocyte B change l'isotype de son anticorps sécrété (de IgM à un autre isotype) et une hypermutation somatique (réarrangement des régions variables des anticorps conduisant à une maturation de l'affinité des anticorps). Ces événements ont lieu dans les centres germinatifs. Elles sont aussi importantes dans les allergies puisque les cytokines qu'elles produisent provoquent une production accrue d'IgGE chez les lymphocytes B. Quant aux  $T_H17$ , elles seraient plutôt impliquées dans les mécanismes pro-inflammatoires. Comme leur nom l'indique, elles produisent de l'interleukine-17<sup>5</sup>.

Tous les lymphocytes  $T_{auxiliaires}$  peuvent aussi, lorsqu'elles reconnaissent l'antigène sur les lymphocytes B, activer ces derniers, les poussant à proliférer et à se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps. Les lymphocytes B sont responsables de la réponse humorale<sup>1</sup>.

### 1.1 COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ

Les molécules du CMH sont membres de la famille des immunoglobulines. Ce sont les travaux de Peter Gorer et George Snell au cours des années 1940 et 1950 qui ont mis en évidence les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité. En utilisant des souches de souris consanguines, Gorer avait identifié certains groupes de gènes codant pour des antigènes des cellules sanguines. En collaboration avec Snell il établit plus tard qu'un de ces groupes de gènes était lié au phénomène de rejet de greffe (*gènes d'histocompatibilité-2*).

Les lymphocytes T ne reconnaîtront leur antigène que s'il est associé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces molécules très polymorphiques permettent à un individu donné de répondre à un certain nombre d'antigènes. La restriction au CMH du soi implique qu'un lymphocyte T donné ne reconnaîtra un antigène que s'il est présenté par une cellule du même haplotype.

Les gènes HLA sont distribués sur une région spécifique du chromosome 6 chez l'humain. HLA (*Human leukocyte antigen*) est le terme utilisé pour désigner génétiquement le CMH humain<sup>6</sup>. La distribution des différents loci est représentée à la FIGURE 1.1. Chez la souris, le complexe majeur d'histocompatibilité est appelé *complexe H-2*. Les gènes sont distribués sur le chromosome 17. Bien que l'organisation des gènes diffère un tant soit peu entre l'humain et la souris, ceux-ci sont tout de même regroupés en 3 régions (I, II et III). Les gènes de la région III encodent les protéines diverses ayant des fonctions immunitaires ou inflammatoires. Par exemple, les molécules du système du complément ainsi que la cytokine TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) sont encodées par cette région. Les molécules HLA de classe I et de classe II ont des structures semblables et sont directement impliquées dans la présentation des antigènes<sup>6</sup>.



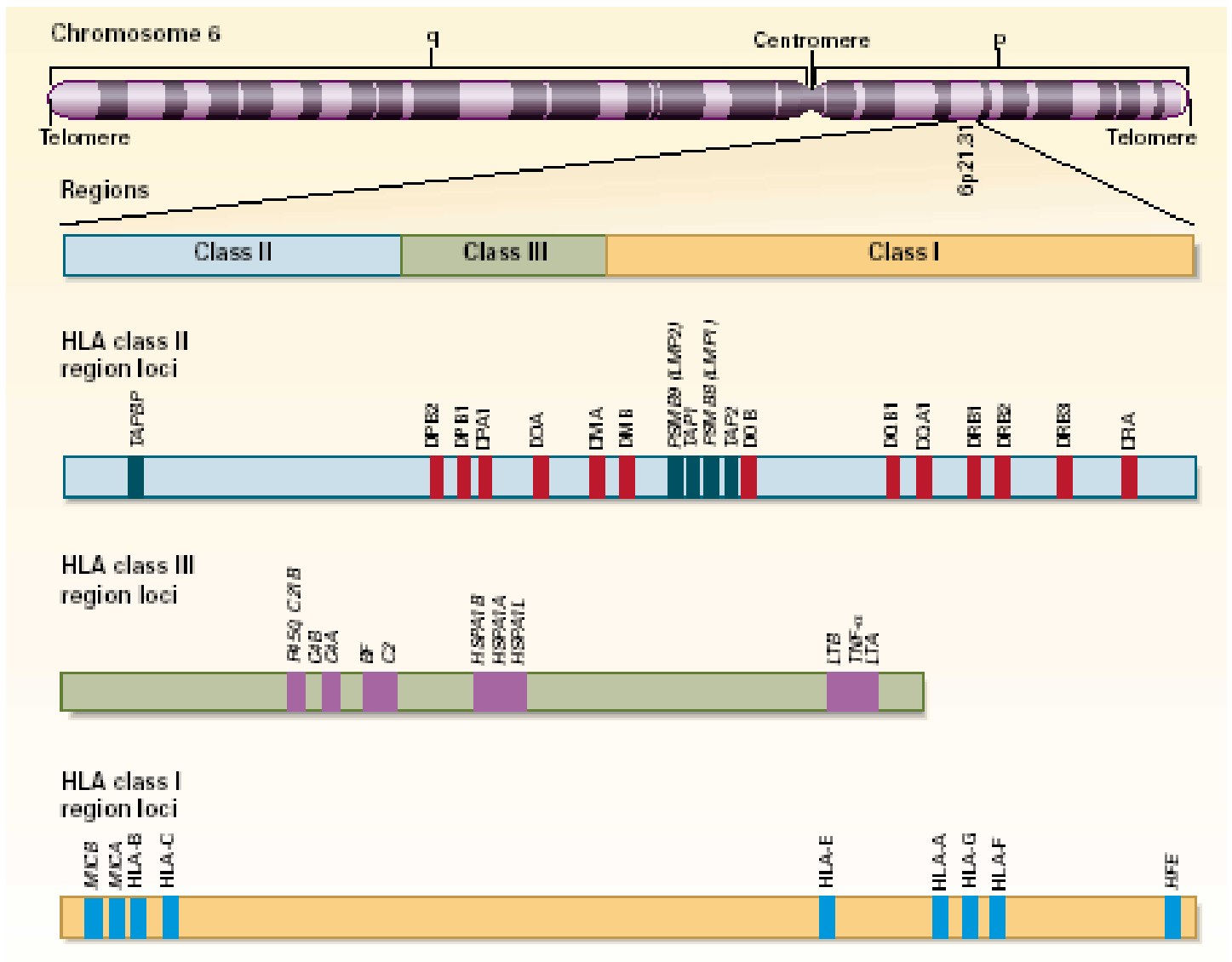


FIGURE 1. 1 Distribution des gènes HLA chez humain.  
 Tiré de : <sup>6</sup>

### 1.1.1 CMH DE CLASSE I

Les molécules HLA de classe I sont exprimées à la surface de la grande majorité des cellules nucléées. La structure générale de la molécule est représentée à la FIGURE 1.2. Les neurones n'exprimeraient pas le CMH de classe I mais ceci est sujet à controverse, certaines publications rapportant une faible expression selon la provenance des cellules. Ce qui est certain est que les NSC (*neuronal stem cells*) expriment bien une faible quantité de CHM de classe I. De plus, un traitement à l'IFN- $\gamma$  permettrait d'induire l'expression du CMH de classe I dans toutes les lignées issues des NSC, y compris les neurones <sup>7</sup>. Les haplotypes sont dénommés HLA-A, -B et -C. Chaque gène présente un grand polymorphisme se présentant en un très vaste nombre d'allèles. Un groupe de gènes donné et lié sur un chromosome est nommé haplotype. La recombinaison entre locus lors de la méiose provoque un mélange des allèles ce qui génère à tout moment de nouveaux haplotypes (autant pour le CMH de classe I que pour le CMH de classe II), contribuant ainsi à la diversité génétique. La recombinaison génétique (ou *crossing over*) est un processus où de nouveaux allèles sont créés. Bien que quelques régions *hotspots* aient été proposées pour la région HLA, ce processus ne contribuerait pas de façon majeure à la diversité génétique <sup>8</sup>.

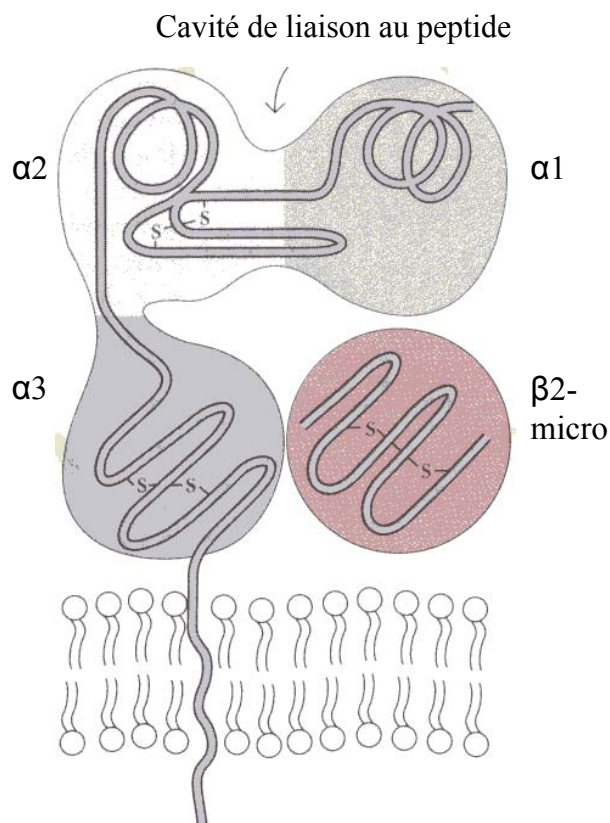


FIGURE 1. 2 Représentation schématique des molécules de classe I.

Le CMH de classe I est composé d'une chaîne  $\alpha$  en 3 domaines associée à une molécule de  $\beta_2$ -microglobuline. Le domaine de liaison aux peptides situé entre les domaines distaux  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  comprend 8 brins antiparallèles et 2 régions  $\alpha$ -hélicoïdales. Tiré de : <sup>9, 10</sup>

### 1.1.2 CMH DE CLASSE II

Le CMH de classe II est exprimé constitutivement sur toutes les cellules présentant des antigènes aux lymphocytes  $T_{CD4}^{+}$  (cellules présentatrices d'antigènes dites "professionnelles"). Celles-ci comprennent les macrophages, les monocytes, les DC ainsi que les lymphocytes B<sup>11</sup>. L'expression peut aussi être induite sur d'autres types cellulaires (par exemple sur des cellules endothéliales) par stimulation à l'interféron- $\gamma$ . Les 3 locus sont HLA-DR, -DQ et -DP. Chaque région est très polymorphique. La structure générale de la molécule de classe II est représentée à la FIGURE 1.3.

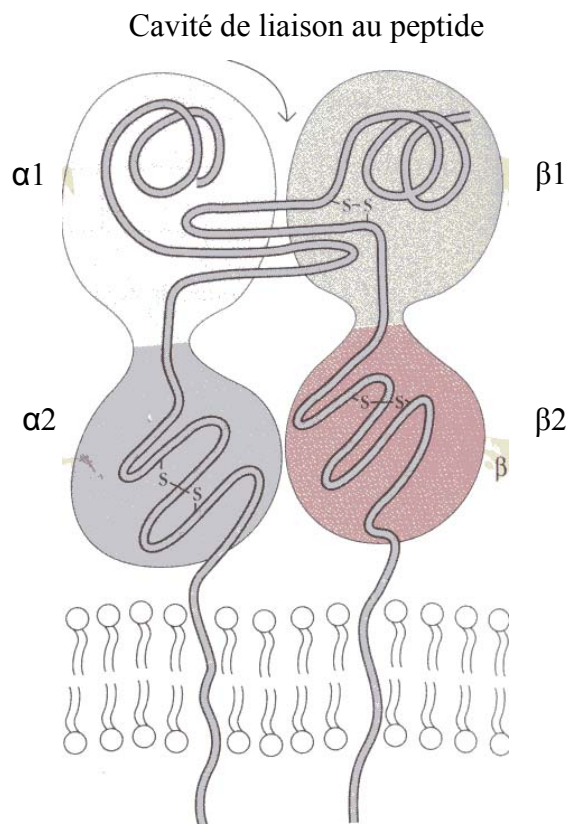


FIGURE 1. 3 Représentation schématique des molécules de classe II.

La molécule de classe II se présente sous la forme d'une chaîne  $\alpha$  (33kDa) et d'une chaîne  $\beta$  (28kDa) associées de façon non covalente et toutes 2 ancrées dans la membrane. *Tiré de :<sup>9,10</sup>.*

### 1.1.3 RÉGULATION DES GÈNES DU CMH DE CLASSE II

#### Régulation transcriptionnelle : transactivateur CIITA

Plusieurs facteurs de transcription se liant à l'ADN ont été identifiés, mais l'acteur majeur de la régulation transcriptionnelle des gènes du CMH de classe II est le transactivateur CIITA (Class II TransActivator, encodé par le gène *MHC2TA*)<sup>12, 13</sup>. Ce gène fut découvert et cloné en 1993 par un groupe de l'Université de Genève qui s'intéressait au syndrome du lymphocyte nu (*bare lymphocyte syndrome*), une maladie provoquant une déficience en molécules de classe II. Les patients atteints de cette maladie sont porteurs d'une mutation dans le gène CIITA<sup>12</sup>. CIITA n'interagit pas directement avec l'ADN; son action est plutôt médiée par son interaction avec d'autres protéines qui, elles, seront liées au promoteur des gènes du CMH de classe II<sup>11</sup>. Ce recrutement de CIITA est dépendant de la liaison de RFX sur une boîte X située en amont du promoteur du gène ciblé<sup>14</sup>. CIITA se démarque des autres facteurs de transcription étudiés à ce jour par le fait qu'il ne régule qu'un nombre limité de gènes, tous dédiés à la présentation des antigènes. En général, les facteurs de transcription régulent des centaines de gènes; CIITA est donc un facteur hautement spécialisé<sup>15</sup>. Bien que l'expression des molécules du CMH de classe II soit normalement restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes, leur expression peut être induite sur d'autres types cellulaires en présence d'interféron- $\gamma$ <sup>11, 16, 17</sup>. De plus, certaines cytokines, telles l'IL-4, l'IL-10, l'interféron  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que le TNF $\alpha$  ont la capacité de modifier l'expression du CMH de classe II en induisant la transcription de CIITA<sup>11</sup>. La transcription de CIITA en tant que gène est régulée par au moins 3 promoteurs et chacun de ces promoteurs régulerait l'expression dans un tissu qui lui est spécifique. Par exemple, l'IFN- $\gamma$  induit les promoteurs pI, pIII et pIV. Le promoteur pII a aussi été identifié mais aucune fonction n'a pu lui être attribuée à ce jour<sup>18-21</sup>. Un résumé des événements de régulation transcriptionnelle est présenté à la FIGURE 1.4.

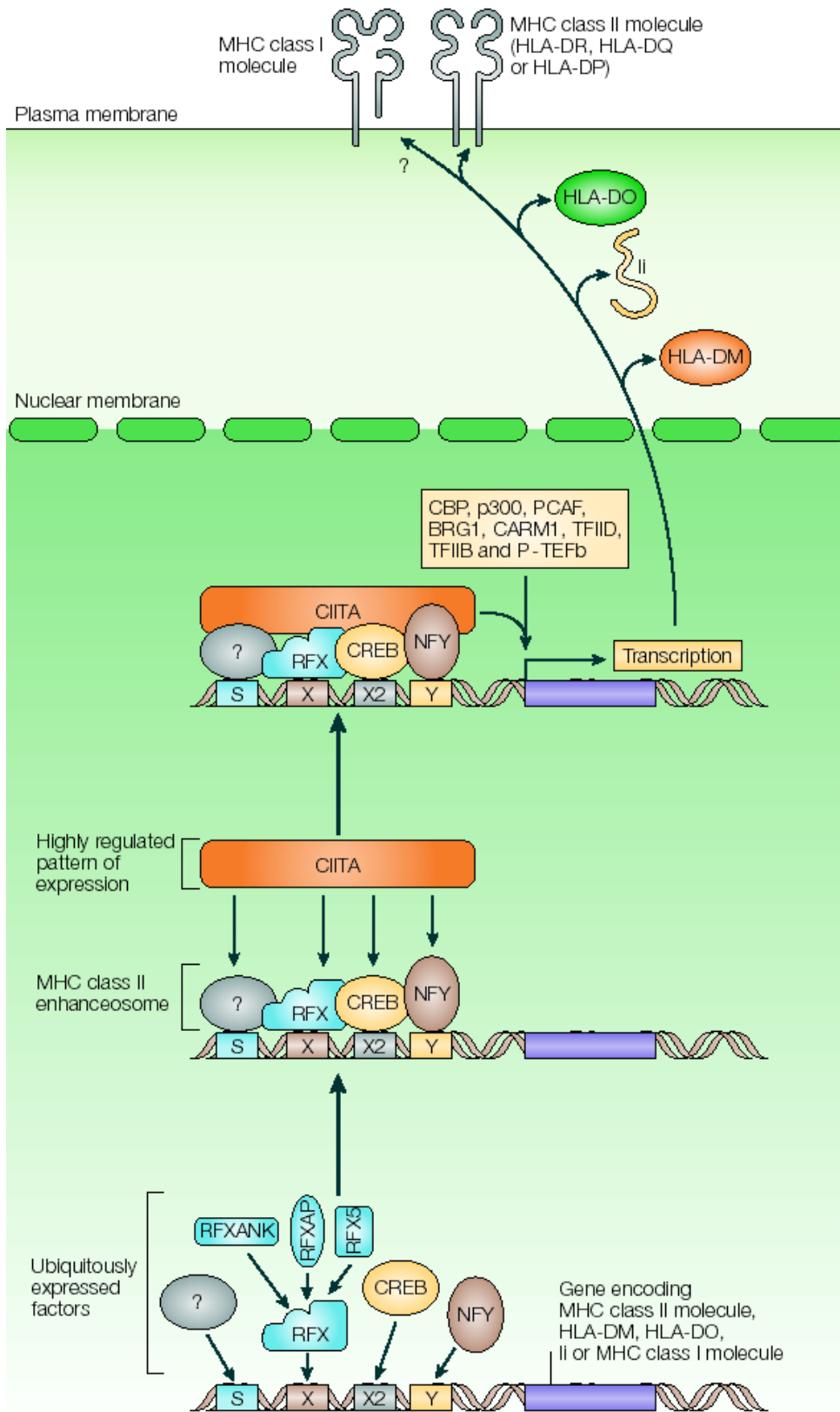


FIGURE 1. 4 Régulation transcriptionnelle des gènes du CMH de classe II par CIITA

Tiré de : <sup>21</sup>

### Régulation post-transcriptionnelle des molécules de classe II

La plupart des événements de régulation post-traductionnelle concernant les molécules de classe II semblent avoir lieu au niveau du transactivateur CIITA<sup>11, 22, 23</sup>. Cependant, le parcours des molécules de classe II dans la cellule peut être modifié par les molécules chaperones de la présentation antigénique; la chaîne invariante, HLA-DO et HLA-DM. De plus, il a cependant été récemment démontré que HLA-DR pouvait être régulé négativement par ubiquitination<sup>24-27</sup>. Ceci sera discuté en détail plus loin.

## 1.2 L'APPRÊTEMENT ET LA PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES

Le récepteur des lymphocytes T (TCR) reconnaît l'antigène lorsque celui-ci est complexé aux molécules du CMH. Le processus d'apprêtement de l'antigène consiste en la digestion d'une protéine antigénique en peptides qui seront fixés sur les molécules du CMH puis exposés à la surface membranaire de la cellule présentatrice d'antigènes pour être présentés aux lymphocytes T.

### 1.2.1 PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES ENDOGÈNES PAR LE CMH I

Les molécules du CMH de classe I s'associent à des antigènes endogènes qui sont apprêtés dans le cytoplasme et présentés aux lymphocytes T<sub>CD8</sub><sup>+</sup> pour donner lieu à la réponse cytotoxique où les lymphocytes T<sub>CD8</sub><sup>+</sup> iront détruire les cellules infectées. Cette voie est dite *cytosolique*. Les antigènes endogènes proviennent de l'intérieur même de la cellule. Ceux-ci comprennent par exemple des protéines virales ou des antigènes tumoraux. Ils sont dégradés en peptides par le protéasome<sup>4, 10</sup>. Le récepteur des lymphocytes T reconnaît l'antigène, mais aussi les molécules du CMH. Le marqueur CD8 porté par les lymphocytes T cytotoxiques interagit avec le CMH de classe I; stabilisant le complexe d'interaction. Un signal de costimulation est donné par l'interaction des molécules B7 (B7.1 et B7.2) exprimées par les CPA et la molécule CD28 exprimée par le lymphocyte T<sup>28</sup>.

### 1.2.2 PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES EXOGÈNES PAR LE CMH II

Les antigènes dits exogènes sont ceux qui proviennent de l'extérieur de la cellule (bactéries extracellulaires, toxines, allergènes). Ceux-ci sont internalisés par phagocytose et digérés en peptides dans des compartiments spécialisés s'apparentant aux endosomes/lysosomes nommés *MIICs* (*MHC class II compartments*)<sup>29, 30</sup>. Ces peptides sont fixés sur les molécules du CMH de classe II (HLA-DR, -DP ou -DQ) et seront présentés aux lymphocytes  $T_{CD4}^+$ . Le principe de la présentation aux lymphocytes est semblable à celui des antigènes endogènes. Le marqueur CD4 interagit spécifiquement avec les molécules du CMH de classe II. Tout comme pour les lymphocytes  $T_{CD8+}$ , un signal de costimulation est donné par l'interaction des molécules B7 (B7.1 et B7.2) exprimées par les CPA et la molécule CD28 exprimée par le lymphocyte T<sup>4, 10</sup>. Le processus d'apprêtement des antigènes de la voie exogène est détaillé au point 1.2.3.

### 1.2.3 VOIE DE LA PRÉSENTATION DES ANTIGÈNES PAR LE CMH II

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH de classe II ainsi que la chaîne invariante (Ii) sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique où elles s'assemblent en un complexe nonamérique  $(\alpha\beta)_3Ii_3$  selon une série précise d'évènements. Tout d'abord, il y a trimérisation de Ii qui se lie ensuite à la chaîne  $\alpha$  du CMH de classe II.  $\alpha$ -Ii se lie ensuite à la chaîne  $\beta$  du CMH de classe II (FIGURE 1.6). Le complexe nonamérique fonctionnel  $(\alpha\beta)_3Ii_3$  correctement replié et associé de façon non covalente peut alors se diriger vers le *trans*-golgi puis vers les endosomes. Il peut aussi passer transitoirement par la membrane cellulaire<sup>4, 29, 31-33</sup>.

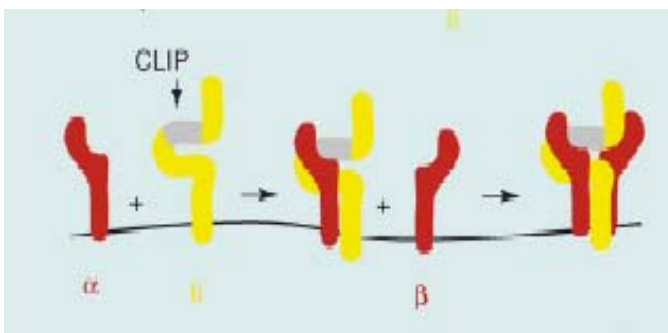
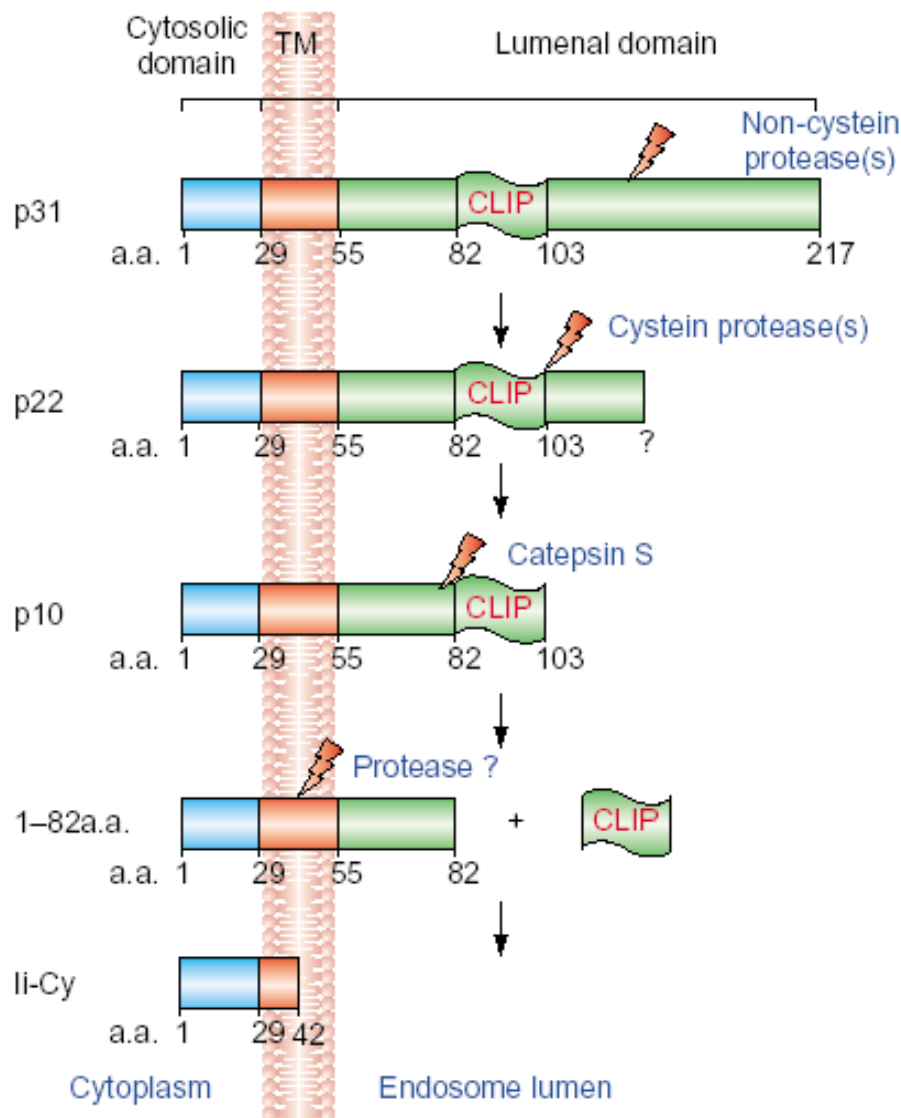


FIGURE 1. 5 Modèle d'assemblage des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH de classe II et de Ii dans le réticulum endoplasmique.

Adapté de : 34

Suivant son parcours dans les endosomes jusqu'aux MIIC (*MHC class II compartments*), li est progressivement dégradé par une série de protéases (FIGURE 1.7) pour ne laisser qu'une fraction Ii-cy de 42 acides aminés dans la membrane et la partie CLIP (*Class II associated Invariant chain derived Peptide*, 21 acides aminés) dans la niche peptidique du CMH de classe II, inhibant de par ce fait la liaison de peptides<sup>4, 35-38</sup>.



*TRENDS in Immunology*

FIGURE 1. 6 Dégradation de la chaîne invariante de souris par une série de protéases dans les endosomes.

Tiré de : 38



Dans les MIICs, le CLIP est échangé contre un peptide antigénique par HLA-DM, une molécule non-classique de classe II<sup>39</sup>. Le CMH de classe II portant maintenant un peptide antigénique migre à la surface où le complexe est présenté aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'activité de HLA-DM peut être inhibée par une autre molécule non-classique de classe II; HLA-DO<sup>40, 41</sup>. Les molécules non-classiques de classe II (HLA-DM et HLA-DO) ainsi que la chaîne invariante sont dénommées *chaperons* de la présentation antigénique et seront discutées plus en détails dans ce mémoire. Un schéma général de la présentation des antigènes est représenté à la FIGURE 1.8; montrant les étapes de la synthèse des protéines à l'accumulation à la surface des complexes CMH  $\alpha\beta$  portant des peptides (pCMH). Ce processus se déroule sur environ 2 heures<sup>35</sup>.

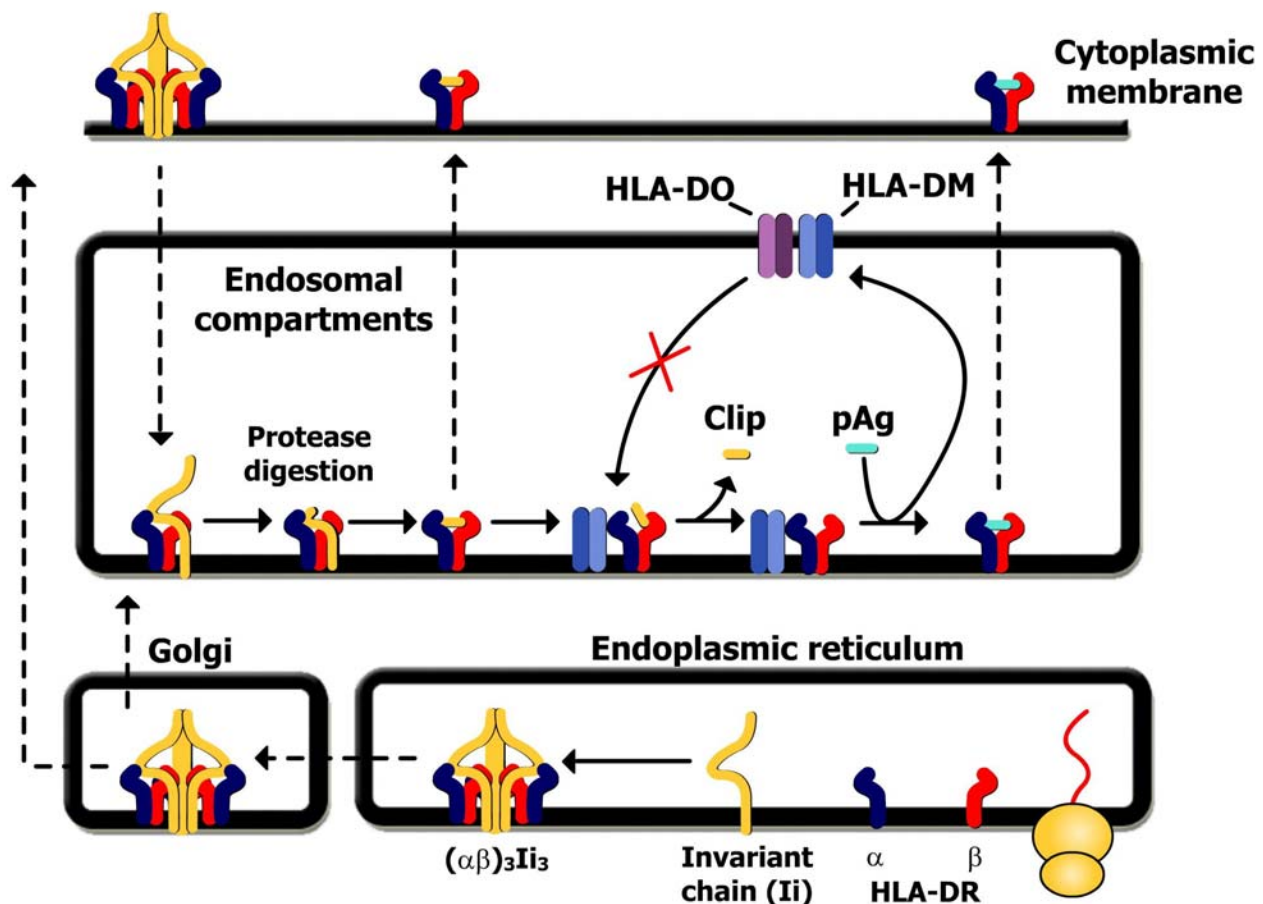


FIGURE 1. 7 Voie de la présentation des antigènes exogènes par le CMH II.  
Illustration par H. Khalil, 2003

### 1.3 LA CHAÎNE INVARIANTE (Ii)

La chaîne invariante (*Ia-associated invariant chain*, In, chaîne  $\gamma$ , **Ii** ou, encore, CD74) a été décrite pour la première fois en 1979 chez la souris comme une sous-unité associée transitoirement aux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de I-A; l'équivalent du CMH de classe II chez l'humain <sup>42</sup>. Par la suite, la chaîne invariante a été identifiée chez l'humain <sup>43, 44</sup> et l'ADNc a été cloné en 1983 par 2 groupes <sup>45, 46</sup>. La glycoprotéine produite est non-polymorphique et le poids moléculaire originalement observé était de 33kDa.

#### 1.3.1 RÔLES ET FONCTIONS

Un des premiers rôles proposés et vérifiés pour la chaîne invariante a été que celle-ci agissait comme chaperon pour HLA-DR, c'est-à-dire qu'elle assurait le repliement correct des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  et le transport hors du RE <sup>47, 48</sup>. Un autre rôle crucial a été révélé en 1990 lorsqu'il a été démontré que l'association de Ii à HLA-DR inhibait le chargement de peptides <sup>33</sup>. Ainsi, il était maintenant compris comment les molécules du CMH de classe II n'acquièrent leur peptide que tardivement dans le transport cellulaire. L'important polymorphisme des molécules du CMH de classe II implique une grande variation dans l'affinité de la niche peptidique pour le CLIP. Il est intéressant de noter que malgré ce polymorphisme, Ii est capable de lier tous les CMH de classe II. Cette capacité est due à des résidus conservés à l'extérieur de la niche peptidique qui permet l'ancrage avec les régions N-terminale (81-89) et C-terminale (103-118) du motif *core CLIP* de Ii <sup>49, 50</sup> (FIGURE 1.10)

Depuis, plusieurs autres fonctions ont été attribuées à Ii; démontrant son importance biologique (TABLEAU 1.1). Entre autres, Ii fait partie du récepteur de MIF (*Macrophage Inhibitory Factor*). La présence d'une certaine quantité de Ii à la surface cellulaire des lymphocytes B permettra donc la réponse à cette cytokine <sup>51</sup>. Ii induit aussi la prolifération et la maturation des lymphocytes B en activant la transcription médiée par NF- $\kappa$ B <sup>52</sup>. Cette dernière fonction nécessite une version tronquée (acides aminés 1-42) de la chaîne invariante; soit Ii-ICD (*intracellular domain*) qui se trouve à être une fraction de la queue cytoplasmique de la molécule. Il

est à noter qu'une partie du Ii de surface peut être modifiée par l'addition d'une chaîne glycosaminoglycane. Cette forme de Ii (forme chondroïtine sulfate, Ii-CS) serait impliquée dans un accroissement de la stimulation des lymphocytes T grâce à son interaction avec CD44<sup>53</sup>.

TABLEAU 1. 1 Quelques rôles et fonctions attribués à la chaîne invariante (Ii).

Fonction	Forme	Localisation	Références
Chaperon lors de l'assemblage des chaînes $\alpha$ et $\beta$ du CMH de classe II	Ii	RE	47, 48
Ciblage intracellulaire des complexes classe II/Ii	Ii	RE, golgi, endosomes	54-56
Inhibe la liaison de peptides au CMH de classe II	Ii	RE, golgi, endosomes	33, 47
Maturation des lymphocytes B (transition T1 à T2)	Ii-ICD		52, 57-59
Induit la survie et la prolifération des lymphocytes B en activant la transcription médiée par l'homodimère NF- $\kappa$ B/p65/RelA et TAF(II)105	Ii-ICD		52, 60-62
Récepteur de MIF : complexe CD74-CD44-CXCR2	Ii	surface	51, 63, 64
Récepteur de MIF : activation de CD44 (puis de ERK1-ERK2)	Ii-ICD (phosphorylé suite à liaison de MIF)	surface	64
Accroît la stimulation des lymphocytes T	Ii-CS, associée au CMH de classe II à la surface cellulaire	surface	53, 65

### 1.3.2 STRUCTURE ET ISOFORMES

Ii est une protéine non-polymorphique de type II (c'est-à-dire dont la queue cytoplasmique est située en N-terminale) intégrale de la membrane. Chez l'humain, 4 isoformes (p33, p35, p41 et p43) sont générés par épissage alternatif de l'exon 6b dans l'ARN messager suivi d'une transcription alternative entre 2 méthionines (FIGURE 1.9). La paire d'isoformes p33 et p35 est largement majoritaire sur la paire p41 et p43; le ratio étant d'environ 10 pour un<sup>66</sup>. Le ratio p33/p35 est d'environ 10/1<sup>67</sup>.

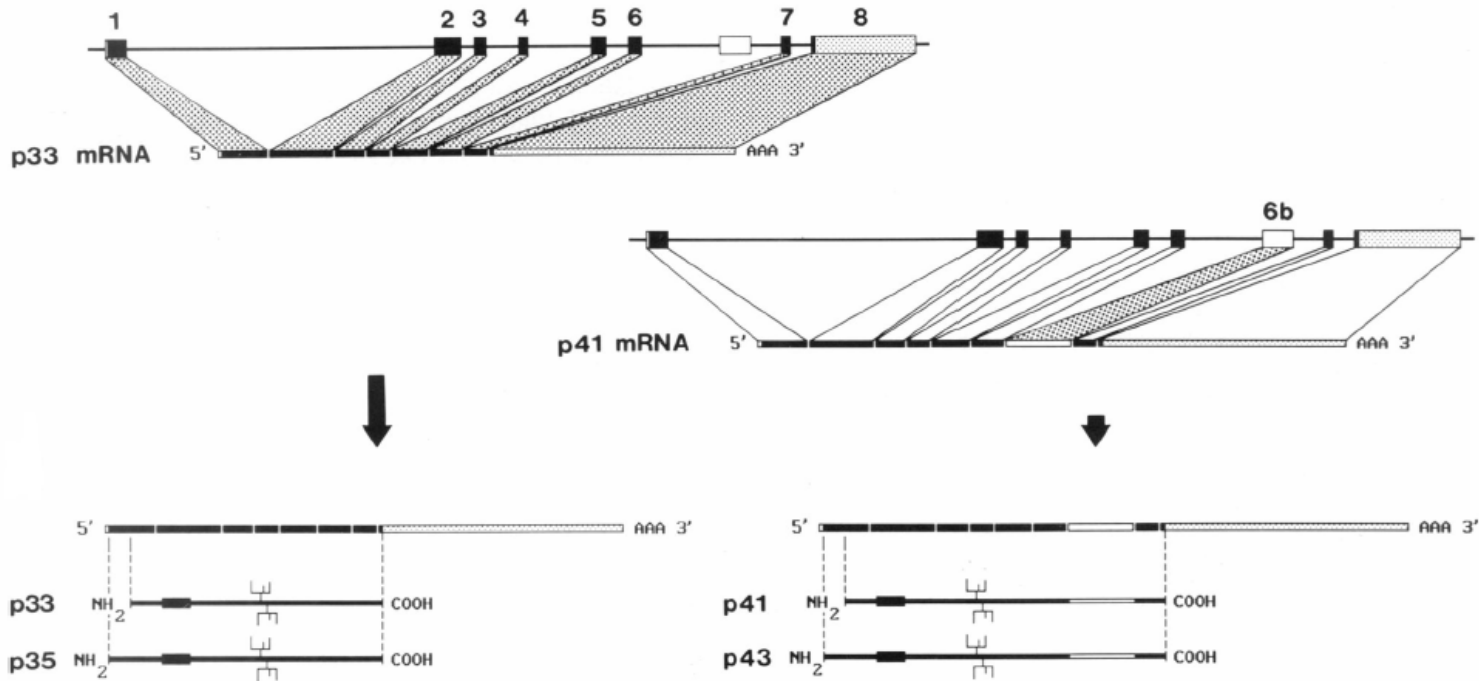


FIGURE 1. 8 Isoformes de la chaîne invariante humaine.

Les 4 isoformes de la chaîne invariante sont formés par l'épissage alternatif de l'exon 6b produisant 2 ARN messagers (p33 et p41) suivi d'une transcription alternative entre 2 méthionines sur chacun de ces ARN messagers. *Tiré de : 66.*

L'isoforme, p33 ou p35, est responsable du choix de la voie empruntée par les complexes  $\alpha\beta\text{Ii}$  en route vers les endosomes où Ii est dégradé<sup>68</sup>. En effet, suivant leur passage au *trans*-golgi, les complexes portant l'isoforme p33 peuvent être détectés à la surface cellulaire. Les complexes  $\alpha\beta\text{Iip33}$  sont donc dirigés aux endosomes soit directement du *trans*-golgi ou après ré-internalisation à partir de la surface. Les complexes  $\alpha\beta\text{Iip35}$  ne sont quant à eux jamais détectés à la surface<sup>68</sup>.

L'extrémité N-terminale de la protéine consiste en une courte queue cytoplasmique de 28 acides aminés contenant un motif di-leucine permettant le ciblage des complexes  $\alpha\beta\text{Ii}$  aux endosomes<sup>55, 69</sup>. L'isoforme p35, transcrit à partir de la première méthionine, possède une queue cytoplasmique allongée de 18 acides aminés; incluant un motif arginine (RXR) de rétention au RE<sup>54, 67, 70</sup>. Ainsi, p35 se trouve incapable de

sortir de RE sans être associé au CMH de classe II. La chaîne  $\beta$  recouvrira le signal de rétention lors de l'assemblage du complexe nonamérique, ce qui permettra la sortie. À l'opposé, p33 ne possède pas ce motif de rétention et peut se diriger rapidement aux endosomes ou à la surface cellulaire. Les divers motifs sont représentés sur la séquence de p33 à la FIGURE 1.10 <sup>71</sup>. Entre autres, la queue cytoplasmique de Ii comprend deux signaux de ciblage aux endosomes; les motifs LI/ML. Ces motifs dirigent les complexes classe II/Ii hors du RE<sup>54-56, 72</sup>. Une autre différence entre les isoformes p33 et p35 est que la queue cytoplasmique de p35 peut être phosphorylée, phénomène modulant la sortie du RE. Iip35 phosphorylé peut interagir avec les protéines 14-3-3 capables de masquer le signal de rétention au RE

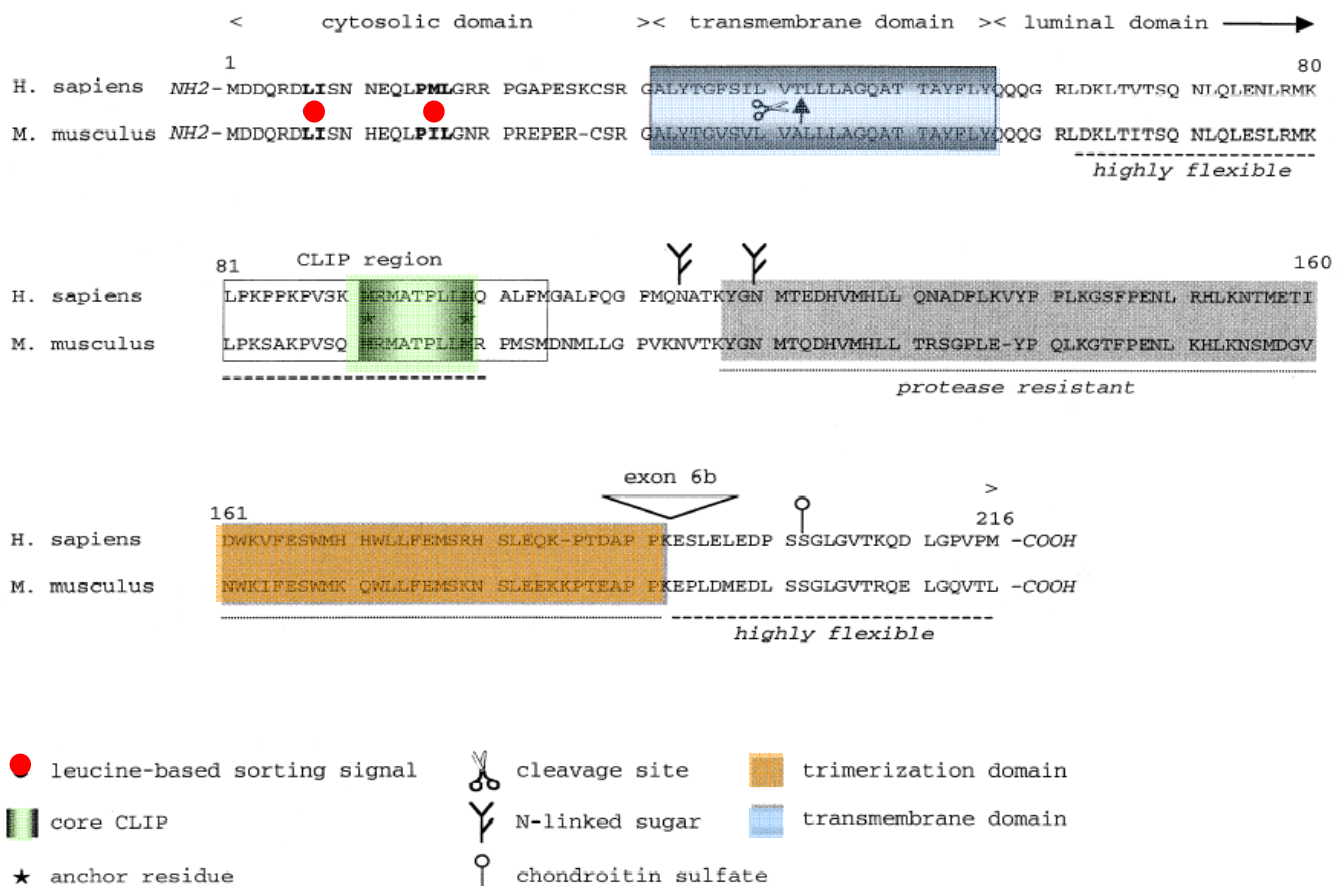


FIGURE 1. 9 Séquence de Iip33 avec représentation des divers motifs

Tiré de : 71

### 1.3.3 Ii EST LE RÉCEPTEUR DE MIF

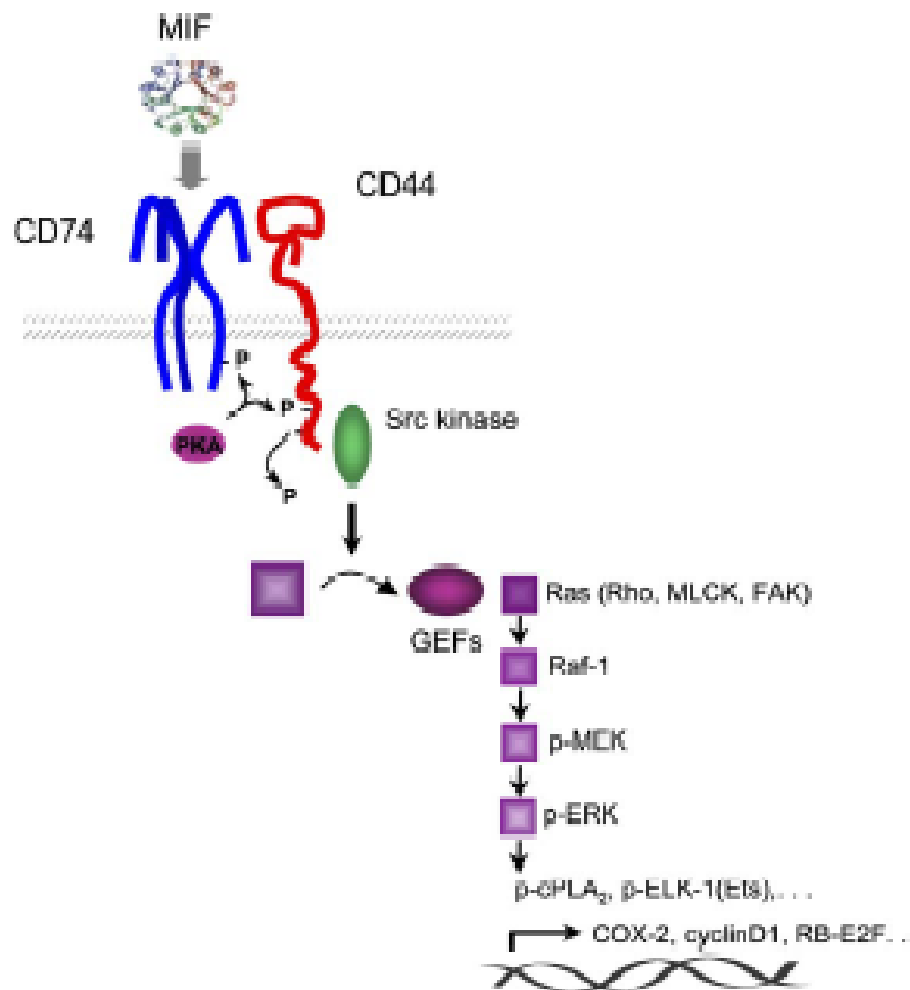
MIF (*Macrophage Inhibitory Factor*) est une cytokine ubiquitaire possédant plusieurs fonctions. Elle régule entre autres l'activation des monocytes/macrophages (en augmentant leur capacité phagocytaire) ainsi que celle des lymphocytes T et joue un rôle crucial lors de certaines maladies immunes ou inflammatoires (choc septique, arthrite rhumatoïde)<sup>77</sup>. Ainsi, MIF est un médiateur important de l'inflammation. Bien que les premières descriptions de MIF remontent à 1966, son récepteur est longtemps resté inconnu et ce n'est qu'en 2003 que le groupe de Bucala à Yale publia les premiers résultats indiquant que le signal de MIF était transmis suite à la liaison de MIF à Ii<sup>51</sup>. Cette étude concluait que MIF liait le domaine extracellulaire de Ii (2 à 5% du Ii total est exprimé à la surface cellulaire) et que la présence de Ii était nécessaire pour la phosphorylation de ERK-1/2 médiée par MIF suivi de la production de PGE<sub>2</sub> et, finalement, de la survie cellulaire<sup>51</sup>. Ensuite, il fut déterminé que Ii subissait une protéolyse à la surface libérant ainsi un fragment cytoplasmique (Ii-ICD) qui allait activer la transcription médiée par l'homodimère NF-κB p65/RelA ainsi que le co-activateur TAF<sub>II</sub>105. Le tout aboutissant à la survie, la maturation et la prolifération des cellules, un procédé démontré dans les lymphocytes B<sup>52, 58-60, 62, 78</sup>.

### 1.3.4 MOLÉCULES ASSOCIÉES À Ii: CD44 ET CXCR2

La transmission du signal induit par MIF n'est pas uniquement l'effet de Ii. En effet, dans ce cas, Ii est associé à 2 autres molécules : CD44 et CXCR2, celles-ci étant indispensables à la fonction de MIF<sup>61, 64</sup>.

La molécule CD44 est une protéine à simple passage trans-membranaire, ubiquitaire et possédant des propriétés kinases. Son ligand principal est l'acide hyaluronique, un composant important de la matrice extracellulaire. D'autres ligands incluent les collagènes et la fibronectine. La fonction principale de CD44 est de maintenir les interactions entre les cellules ainsi que les interactions cellule-matrice<sup>79</sup>. Plusieurs isoformes de CD44 existent et l'expression de certains de ces isoformes peut être régulée par des cytokines<sup>80</sup>. CD44 est impliqué dans la progression de certains cancers et peut être utilisé comme marqueur de tumeurs<sup>81</sup>. Bien que la présence de Ii

soit suffisante pour la liaison de MIF, CD44 est indispensable à la transmission du signal<sup>64</sup>. La FIGURE 1.11 représente la transmission du signal de MIF grâce à l'activation de tyrosines kinases par CD44.



FIG

URE 1. 10 Modèle de transduction du signal induit par MIF. Bien que n'étant pas représentées sur cette figure, les molécules CXCR2 et CXCR4 ont aussi été identifiées comme récepteurs de MIF à la surface cellulaire<sup>82</sup>.

Tiré de : 64

Les molécules CXCR2 et CXCR4 ont aussi été identifiés comme des récepteurs par eux-mêmes pour MIF en 2007<sup>82</sup>. Cette découverte élucidait le fait que certains types cellulaires (par exemple les neutrophiles) pouvaient être ciblés par MIF tout en étant déficient pour Ii. CXCR2 et Ii forment un complexe impliqué dans l'arrêt de la migration des monocyte dans le cadre de l'inflammation. CXCR2 et CXCR4 sont des récepteurs de chémokines couplés aux protéines G (RCPG)<sup>63, 82</sup>. CXCR2 (ou IL-8RB) est un récepteur pouvant lier plusieurs chémokines, principalement l'IL-8 mais aussi CXCL1, CXCL5 et CXCL7. L'IL-8, un chémoattractant pour les leucocytes, peut aussi se lier à un autre récepteur, CXCR1 (IL-8RA), qui, lui, est spécifique pour cette chémokine<sup>83</sup>. Suite à son activation par l'IL-8, CXCR2 est phosphorylé puis internalisé<sup>84</sup>.

D'autres molécules, sans lien avec MIF, peuvent aussi être associées à Ii. La protéine Vpu du VIH de type 1 peut interagir avec la queue cytoplasmique de Ii, ce qui résulte en une diminution des molécules de classe II matures à la surface cellulaire. La présentation des antigène s'avère donc moins efficace par les cellules affectées, ce qui résulte en une atténuation de la réponse immunitaire<sup>85</sup>. Dans les cellules dendritiques immatures traitées au LPS ou avec une donneur d'oxide nitrique, l'oxide-nitrique synthase 2 (NOS2) peut interagir avec Ii et inhiber son clivage par les caspases, assurant ainsi une meilleure stabilité à Ii lors de la maturation des DCs<sup>86</sup>.

### 1.3.5 IMPLICATION DE Ii EN CLINIQUE

La première indication qu'un dérèglement de Ii pouvait avoir des effets cliniques date de 1984 quand une étude démontra que les niveaux d'ARNm correspondant à Ii étaient plus élevés dans les tumeurs CCL (*Chronic Lymphocytic Leukemia*)<sup>87</sup>. Il est évalué qu'environ 90% des cancers de lymphocytes B présentent une surexpression de Ii. D'ailleurs, Ii peut être utilisé comme marqueur de la progression de plusieurs tumeurs<sup>88</sup>. De plus, il est connu que MIF est aussi surexprimé dans plusieurs tumeurs, ce qui expliquerait la prolifération intensive. À ce jour, des essais cliniques en immunothérapie concernant des anticorps monoclonaux antagonistes de Ii ont lieu<sup>88, 89</sup>.



## 1.4 LES MOLÉCULES NON-CLASSIQUES

Les molécules classiques ont été les premières des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité à être décrites. Des gènes supplémentaires ne faisant pas partie des molécules de classe I HLA-E, -F, -G et -H sont dites non-classiques. Leurs fonctions sont diverses. À titre d'exemple, la molécule HLA-E serait impliquée en tant que ligand pour différents récepteurs de la réponse immunitaire innée et acquise<sup>90</sup>. Elle est aussi connue pour inhiber l'activité des cellules NK<sup>91</sup>. Les molécules HLA-F et HLA-G seraient impliquées dans la suppression immunitaire à l'interface materno-fœtale<sup>92, 93</sup>. La molécule HLA-H quant à elle aurait un rôle à jouer dans le métabolisme du fer<sup>94</sup>. Des groupes de gènes codant pour les molécules d'histocompatibilité ont par la suite été découverts. Les molécules encodées par ces gènes ont une expression plus restreinte et des rôles plus spécialisés. Pour cette raison, elles ont été dénommées *non-classiques*. Une autre molécule non-classique de classe I est CD1; une molécule capable de présenter des lipides aux lymphocytes T<sup>95</sup>.

La région classe II quant à elle encode 2 molécules non-classiques : HLA-DM et HLA-DO. Contrairement aux molécules classiques, celles-ci ont un polymorphisme plus limité<sup>96-99</sup>. Elles sont aussi considérées comme des molécules résidentes permanentes des MIICs<sup>100, 101</sup>.

### 1.4.1 MOLÉCULE NON-CLASSIQUE DE CLASSE II : HLA-DM

Cette molécule non-classique composée d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  a été identifiée en 1991<sup>102</sup>. Sa fonction est bien établie. Tout d'abord, DM agit comme un chaperon en interagissant directement avec les molécules classiques de classe II, ce qui les stabilise. Ensuite, DM est capable d'échanger le CLIP présent dans la fente peptidique des molécules classiques de classe II par un peptide antigénique<sup>103, 98, 104-106</sup>.

DM est présent dans les vésicules du système endosomal/lysosomal de toutes les cellules présentatrices d'antigènes, mais à un niveau d'expression moins élevé que les

molécules classiques de classe II. De plus, contrairement à ces dernières, l'expression de DM semble ne pas être totalement dépendante du transactivateur CIITA puisqu'un niveau d'expression basal est observé dans les cellules déficitaires en CIITA<sup>107</sup>. De par sa structure, DM se différencie beaucoup des molécules classiques (à peine 30% d'homologie avec HLA-DR, -DP et -DQ). De plus, la structure cristalline révélée en 1998 a permis de montrer que la fente peptidique de DM demeure fermée par la présence de deux ponts di-sulfure, rendant impossible la fixation de peptides<sup>108</sup>.

Après sa synthèse dans le RE, DM est dirigé vers la voie endosomale grâce à un signal YTPL (à base de tyrosine) présent dans la queue cytoplasmique de sa chaîne  $\beta$ <sup>109</sup>. DM lie alors les complexes CMH de classe II/CLIP et se trouve à être responsable du relâchement du CLIP puis de la stabilisation des complexes vides. L'interaction DM/DR implique de façon prédominante une liaison de faible affinité entre la chaîne  $\alpha$  de DR et la chaîne  $\beta$  de DM<sup>110</sup>. Finalement, DM permet la liaison de peptides antigéniques dans la fente peptidique et assure que seuls les peptides stables seront exprimés à la surface cellulaire<sup>106</sup>. Il a été proposé que la liaison de peptides instables est le résultat d'une interaction transitoire entre DM et DR qui induit un changement conformationnel sur DR menant à une perturbation des liens hydrogènes entre le peptide et DR<sup>111</sup>. De plus, DM peut favoriser le chargement de certains peptides par rapport à d'autres, par exemple en déterminant la nature cryptique ou immunodominante d'un antigène donné<sup>112, 113</sup> ou en avantageant les peptides en association stables avec le CMH de classe II<sup>114, 115</sup>. L'immunodominance est la spécificité d'une réponse à un peptide en particulier. En effet, bien qu'un antigène soit dégradé en plusieurs peptides, seule une minorité d'entre eux ont la possibilité d'être reconnus par les lymphocytes T. La présence de DM semblerait augmenter la présentation des antigènes immunodominants et diminuer celle des antigènes cryptiques<sup>113</sup>.

#### 1.4.2 MOLÉCULE NON-CLASSIQUE DE CLASSE II : HLA-DO

Au milieu des années 1980, le gène DOA (ou encore DNA ou DZA) avait été décrit, mais la protéine entière restait introuvable<sup>116</sup>. Ce gène candidat pour une chaîne  $\alpha$  était intrigant du fait qu'aucun gène codant pour une possible chaîne  $\beta$  n'avait été identifié à proximité. En fait, une des particularités de DO au niveau génétique est que, contrairement aux autres molécules encodées par la région du CMH, les deux chaînes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) se retrouvent séparées (à 200kb de distance), plusieurs autres gènes se retrouvant même entre les deux<sup>117, 118</sup>. Ainsi la chaîne DO $\beta$  n'est pas régulée de la même façon que la chaîne DO $\alpha$  et des autres molécules de classe II; elle n'est pas induite par l'IFN- $\gamma$  et sa transcription peut être indépendante du transactivateur CIITA<sup>117, 119</sup>. Si DM est exprimé dans toutes les cellules présentatrices d'antigènes, la répartition cellulaire de DO est plutôt restreinte aux lymphocytes B, aux cellules épithéliales thymiques ainsi qu'à quelques sous-types de cellules dendritiques<sup>117, 120</sup>.

L'identification de la fonction de DO fut plus ardue que pour DM et il fallut attendre jusqu'à la fin des années 1990 pour les premières évidences d'un rôle précis. Tout d'abord, il fut déterminé que DO formait un hétérodimère DO $\alpha\beta$  très instable et nécessitait une association avec DM pour sortir du RE<sup>100</sup>. Ainsi, la fonction proposée a été celle d'un modulateur de DM, plus précisément d'un inhibiteur de DM<sup>40, 41</sup>. Par la suite, il a été démontré que DO modifiait le répertoire des peptides dans les lymphocytes B en favorisant la présentation des antigènes présents dans les vésicules acides<sup>121</sup>. Les lymphocytes B peuvent internaliser leur antigène par deux mécanismes; soit par endocytose en phase fluide ou par internalisation par le BCR (leur récepteur spécifique, une immunoglobuline membranaire). Les antigènes internalisés par le BCR se retrouvent dans des vésicules au pH acide (lysosomes) où DO est inactif. À l'opposé, le chargement sur les molécules du CMH de classe II des antigènes internalisés en phase fluide sera inhibé par la présence de DO actif inhibant la fonction de DM. Ainsi, les antigènes internalisés par le BCR seront favorablement présentés aux lymphocytes T<sup>121</sup>. Ainsi, l'inhibition de DM par DO résulte globalement en une diminution de la présentation antigénique.

Il a été évalué que, dans les lymphocytes B, environ 50% des molécules de DM sont liées à DO <sup>122</sup>. Les complexes DO/DM qui se forment dans le RE sont dirigés vers la voie endosomale/lysosomale avec les molécules classiques de classe II et sont ensuite brièvement recyclés à partir de la membrane <sup>123</sup>. Ce ciblage est permis grâce au motif YTPL présent dans la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  de DM <sup>109, 124</sup>. La queue cytoplasmique de DO $\beta$  est exceptionnellement longue par rapport aux autres molécules de classe II et contient aussi deux motifs de ciblage aux lysosomes; un à base de tyrosine et un signal di-leucine (FIGURE 1.12) <sup>123, 125</sup>. Il a été démontré que ces deux motifs sont non-fonctionnels quant au ciblage des complexes DM/DO aux lysosomes; dans ce cas, le motif YTPL de DM est suffisant. Par contre, la queue cytoplasmique de DO $\beta$  joue un rôle dans le ciblage à l'intérieur même des MIICs et influençant ainsi l'efficacité du chargement des peptides et régulant la présentation antigénique <sup>123, 125</sup>.

### Queue cytoplasmique de HLA-DO $\beta$ (246-273)

*C-term* QLRAQ **K**GYVRTQMSG NEVSRVLLP QSC *N-term*

FIGURE 1. 11. Représentation de la queue cytoplasmique de DO $\beta$ . Les motifs de ciblage aux lysosomes (à base de tyrosine et le signal di-leucine) sont représentés par des points.

Le mécanisme par lequel DO inhibe la fonction de DM n'a pas encore été totalement élucidé. Il est connu que DM lie la chaîne  $\alpha$  de DO entre autres par le résidu E41 sur DO $\alpha$  mais que d'autres résidus sont aussi impliqués <sup>126</sup>. Un fait intéressant est que les sites de contact DR/DM et DM/DO ne seraient pas les mêmes; indiquant que DO n'inhiberait pas la fonction de DM en compétitionnant pour le site d'attachement sur DR <sup>127</sup>.

L'expression protéique de DO est induite chez les lymphocytes B matures <sup>122</sup>. Ensuite, la régulation des molécules de DO, ainsi que celle des molécules de DM, est dépendante du niveau d'activation de la cellule. Les lymphocytes B primaires expriment une grande quantité de DO et, lorsqu'ils s'activent suivant leur rencontre avec leur antigène leur niveau d'expression de DO et DM est grandement diminué<sup>128, 129</sup>. Plus précisément, il a été démontré que l'expression de DO est régulée négativement dans les centres germinaux <sup>122, 130, 131</sup>. Les centres germinaux se retrouvent dans les tissus lymphoïdes secondaires. Ce sont des sites d'intense prolifération de lymphocytes B suivant leur activation <sup>132</sup>. Cette régulation négative est probablement post-traductionnelle mais le mécanisme en est encore inconnu.

Chez la souris, une certaine quantité de DO (H2-O) à l'état libre à été décrite dans les lymphocytes B primaires. Ceci impliquerait un autre rôle pour DO que celui de modulateur de DM <sup>133</sup>. Cependant, ceci n'a pas encore été décrit pour DO humain où du DO libre n'est pas observé à l'extérieur du RE <sup>134</sup>.

#### 1.4.3 IMPLICATION DES MOLÉCULES NON-CLASSIQUES EN CLINIQUE

##### HLA-DO

En 2002, une étude a démontrée qu'il n'existait pas de mutations particulières ni d'altération de fonction de DO chez des patients atteints de lymphoblastes ou de maladies auto-immunes. Ce groupe avait émis l'hypothèse que DO, vu son expression plutôt restreinte aux lymphocytes B, pourrait jouer un rôle dans le développement de telles maladies <sup>135</sup>.

Dans un autre ordre d'idées, il fut déterminé que DO pouvait être utilisé comme marqueur pour distinguer les lymphomes folliculaires de l'hyperplasie folliculaire, une maladie bénigne; ces lymphomes exprimant une plus grande quantité de DO que la normale <sup>136</sup>.

Concernant les possibilités d'utilisation en immunothérapie, une idée intéressante en vue serait de moduler l'expression de DO pour favoriser la présentation d'antigènes tumoraux<sup>137, 138</sup>.

### HLA-DM

DM pourrait jouer un rôle dans le développement de maladies auto-immunes (entre autres le diabète de type I et l'arthrite rhumatoïde) bien que ceci demeure controversé quant aux preuves cliniques<sup>139-142</sup>. En effet, il a été démontré que, dans des lignées de lymphoblastes B (B-LCL) exprimant une forte quantité de DM, la présentation par HLA-DR4 d'un antigène immunodominant est grandement diminuée; tandis que les cellules exprimant de faibles niveaux de DM présentent mieux l'antigène<sup>143</sup>. Ceci indique une probable association de DM avec certains cancers puisque, dans ce cas la présentation antigénique est amoindrie dû à la quantité anormalement élevée de DM<sup>143</sup>. De plus, certaines données indiquent que les patients ayant des tumeurs telles que des carcinomes du sein et des lymphoblastes présentant une forte expression de DM avaient de meilleures possibilités de rémission. Ceci étant probablement dû au fait que les antigènes tumoraux sont mieux présentés<sup>144, 145</sup>.

La délétion en modèle animal des chaperons de la présentation antigénique, que ce soit Ii, DM ou DO, provoque de graves conséquences au niveau immunologique<sup>146</sup>. Les résultats préliminaires du groupe de Chen indique que les souris déficitaires en H2-O possèderaient un débalancement de la présentation antigénique en faveur de certains antigènes du soi, ce qui provoquerait une certaine auto-immunité<sup>146</sup>. Cependant, aucun cas précis de délétion d'une molécule en particulier n'a pu être identifié à ce jour chez l'humain<sup>147</sup>. Il se peut que ces cas existent, mais soient trop rares pour être bien identifiés. Une hypothèse très probable est que ces cas sont diagnostiqués au sens large "d'immunodéficience", ou CIVD (*common variable immunodeficiency*); une maladie regroupant plusieurs symptômes commun à des déficiences immunitaires. Un meilleur diagnostic des patients pourrait amener une précision des traitements du système immunitaire<sup>146</sup>.

## 1.5 L'UBIQUITINATION

L'ubiquitination a été découverte au début des années 1980 grâce à une collaboration entre trois scientifiques (Aaron Ciechanover, Irwin Rose et Avram Hershko) qui s'interrogeaient sur la dépendance de l'ATP dans le processus de protéolyse intracellulaire. À cette époque, ceci représentait une curiosité puisqu'il n'y a aucune raison apparente d'utiliser de l'énergie lors d'un processus de protéolyse normal. Cependant, dans les années 1970, un groupe de chercheurs avait démontré que les protéines endommagées ou anormales étaient rapidement détruites par la cellule. L'hypothèse était donc qu'une certaine régulation de la protéolyse intracellulaire existait et que c'était cette régulation qui dépendait de l'ATP. La collaboration de Ciechanover, Rose et Herskko a donc amené à la découverte du fait que des protéines pouvaient être marquées par une molécule d'ubiquitine, qui servait de signal pour la dégradation de cette protéine par un complexe enzymatique, le protéasome. Cette découverte leur a valu le prix Nobel de Chimie en 2004 <sup>148</sup>.

### 1.5.1 PROCESSUS ET ENZYMES IMPLIQUÉS

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui consiste en une liaison covalente de l'extrémité C-terminale d'une ubiquitine (polypeptide de 76 a.a. très conservés) et d'un groupement  $\epsilon$ -amino d'un résidu lysine de la protéine cible. Bien que ce soit généralement les résidus lysines qui soient priorisées pour l'ubiquitination, il a été démontré que d'autres résidus (par exemple des cystéines) pouvaient aussi être ubiquitinés en N-terminale. <sup>149, 150</sup>. Le processus est réversible grâce aux enzymes DUBs (*de-ubiquitinating enzyme*) <sup>151</sup>.

L'ubiquitination se produit en trois étapes nécessitant l'intervention de trois enzymes (FIGURE 1.13). Tout d'abord, la molécule d'ubiquitine (Ub) présente dans le cytoplasme est activée par une *ubiquitin-activating enzyme* (E1). L'activation consiste en fait en la formation d'un lien thiol-ester entre la E1 et la glycine en position C-terminal de l'Ub (G76). C'est cette étape qui est dépendante de l'ATP. Le complexe E1-Ub-thiol ester ainsi formé est reconnu par une *ubiquitin-conjugation*

enzyme (E2) et l'Ub est transféré sur un nouveau lien thiol ester sur la E2. Entre alors en jeu les *ubiquitin-ligases enzymes* (E3-ubiquitine ligases). Celles-ci vont recruter la E2 portant l'Ub et faire le lien avec les substrats. L'ubiquitine est alors liée par son extrémité C-terminale au groupement  $\epsilon$ -amino du substrat (résidu lysine) grâce à un lien isopeptide aminé <sup>152, 153</sup>.

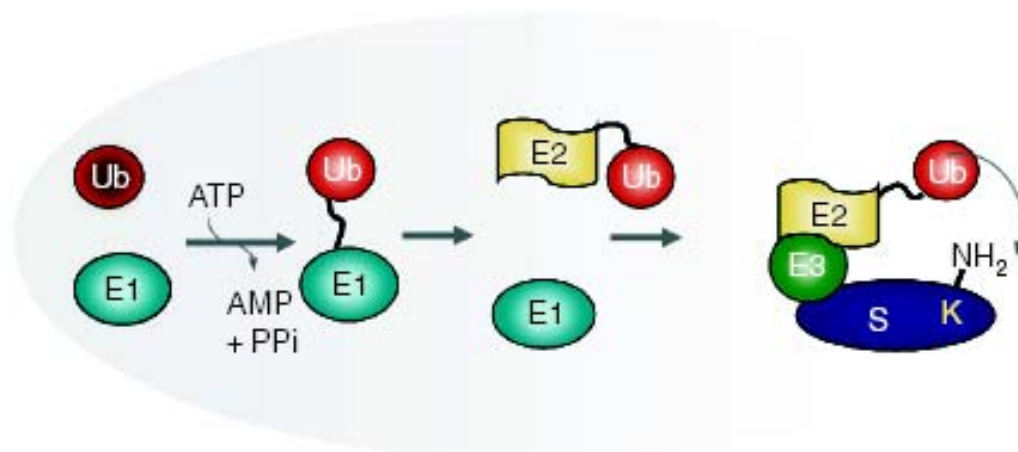


FIGURE 1. 12. L'ubiquitination grâce à la série d'enzyme E1, E2 et E3.  
Tiré de : 153

Il n'existe qu'une seule E1 tandis qu'une quarantaine d'E2 ont été répertoriées dans le génome humain <sup>153</sup>. Les E2 confèrent une certaine spécificité au système. Par exemple, elles auraient un rôle à jouer dans le choix de la lysine à être ubiquitinée <sup>153</sup>. Il est aussi connu que des fonctions sont associées à certaines E2 en particulier; chez *S. cerevisiae* Ubc2 est nécessaire pour la réparation de l'ADN et Ubc3 pour la transition G1 à S lors du cycle cellulaire <sup>154</sup>. Cependant, la spécificité de ces fonctions pourrait majoritairement être le résultat de l'association E2-E3-substrat <sup>154</sup>. En effet, bien qu'une E3 puisse lier plusieurs E2, elle ne peut généralement permettre l'ubiquitination que d'un nombre très limité de substrat <sup>152, 153</sup>. De plus, c'est la E3 ubiquitine ligase qui reconnaît et permet la liaison au substrat.



Traditionnellement, l'ubiquitination de protéines est donc associée à leur dégradation par le protéasome. D'autres fonctions ont aussi été attribuées à l'ubiquitination; telles la relocalisation cellulaire et la régulation négative de molécules de surface <sup>155</sup>. Il a aussi été démontré que l'ubiquitination jouait un rôle important dans nombre de processus biologiques cruciaux (transcription, signalisation, régulation du cycle cellulaire, etc.) <sup>152</sup>. L'ubiquitination est donc amenée à jouer un rôle majeur dans le réseau complexe d'interactions entre protéines à l'intérieur de la cellule <sup>155, 156</sup>. Il est aussi connu que l'ubiquitination est impliquée dans plusieurs processus relié à la régulation de la réponse immunitaire <sup>157, 158</sup>.

### 1.5.2 MONO, MULTI OU POLY-UBIQUITINATION

Une protéine peut être ubiquitinée de diverses façons, chacune amenant la protéine à un destin potentiellement différent. Ainsi, une chaîne d'au moins 4 ubiquitines formée par la lysine 48 de l'Ub amènera à la dégradation par le protéasome. Ce type d'ubiquitination est nommée *polyubiquitination* et est possible grâce au fait que la molécule d'ubiquitine possède elle-même 7 résidus lysine pouvant être ubiquitinés à leur tour.

D'autre part, l'ajout d'une seule ubiquitine sur un résidu lysine (*monoubiquitination*) est responsable de plusieurs événements tels l'endocytose ou la réparation de l'ADN. Une protéine peut aussi être monoubiquitinée sur plusieurs résidus lysine (*multi-ubiquitination*), entraînant l'endocytose de cette protéine <sup>156</sup>.

De plus, en ce qui concerne la polyubiquitination, dépendamment de la lysine par laquelle la chaîne est formée, le destin de la protéine sera différent. Comme mentionné précédemment, une chaîne formée par la lysine 48 de l'Ub amènera à la dégradation par le protéasome. Une chaîne formée plutôt à partir des lysines 11, 29 ou 63 servira de signal pour d'autres processus (réparation de l'ADN, activation de NF- $\kappa$ B, etc.) <sup>156, 159</sup>. Une variante de la polyubiquitination est la polyubiquitination branchée qui serait entre autres responsable de la régulation de l'activité des enzymes E3 ubiquitines ligases <sup>159</sup>.

## 1.6 LES E3-UBIQUITINES LIGASES

Les E3 ubiquitine ligases sont classées selon le domaine catalytique. Les deux familles sont les HECT E3s (**H**omologous to **E6 AP C** Terminus) et les RING E3s (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene). Les HECT ubiquitine ligases lient la molécule d'ubiquitine par un lien thioester; l'ubiquitine est ensuite directement transmise au substrat. Cette famille est moins nombreuse et son principal membre est E6-AP; une ubiquitine ligase recrutée par la protéine E6 du virus du papillome humain pour dégrader le facteur suppresseur de tumeur p53<sup>160, 161</sup>. Les RING ubiquitines ligases quant à elles sont plutôt des protéines adaptatrices qui facilitent la liaison entre l'E2 et le substrat<sup>162</sup>. Le domaine RING se caractérise par une structure de 8kDa *zinc-binding* se composant d'une série de cystéines et d'histidines conservées. Parmi les sous-catégories, il y a les RING-CH (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>) ou RING-H2 (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub>)<sup>163, 164</sup>. Il existe deux familles dérivées des E3 à domaine RING : les U-box et les PHD (*Plant Homeodomain*)<sup>165-168</sup>.

### 1.6.1 K3 ET K5 : UBIQUITINES LIGASES VIRALES

Vers la fin des années 1990, une nouvelle famille de E3s ligases a été répertoriée dans le contexte des infections aux virus herpes. Des virus associés aux sarcomes de Kaposi (KHSV) produisent des E3 ubiquitines ligases capables de réguler négativement l'expression de molécules du CMH de classe I à la surface des cellules infectées, provoquant une évaison de la réponse immunitaire<sup>169-171</sup>. Le domaine actif de ces protéines a tout d'abord été identifié comme étant un motif PHD/LAP C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> (*Plant HomeoDomain, Leukemia-associated protein domain*) et elles ont été classées sous le nom de *modulator of immune recognition* (MIR)<sup>172-175</sup>. Cependant, à ce moment, des études contredisaient les données précédentes plaçant les domaines PHD comme médiateurs de l'ubiquitination et démontraient que ceux-ci ne présentaient pas de fonction ubiquitine ligases<sup>176, 177</sup>. De plus, ils sont structurellement très semblables aux domaines RING-HC (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>) et RING-H2 (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub>) qui, eux, sont reconnus comme étant fonctionnel en tant qu'ubiquitine ligases<sup>162, 178</sup>. Ainsi, cette famille fut classée sous les domaines RING-CH<sup>179, 180</sup>. Il est à noter que, plus tard, d'autres études reconfirmèrent que les domaines PHD étaient capables d'activité E3

ubiquitine ligases<sup>181-183</sup>. Les KHSV encodent deux ubiquitines ligases à domaine RING-CH : K3 et K5 (ou MIR1 et MIR2). Ce sont des protéines intégrales de la membrane localisées dans le RE<sup>170</sup>. Elles sont responsables de la multiubiquitination des molécules de classe I par un lien lysine-63 amenant à l'endocytose et à la dégradation<sup>184</sup>. Ces virus, grâce à K3 et à K5, sont donc capables de diminuer l'intensité de la réponse cytotoxique en empêchant leurs peptides d'être présentés aux lymphocytes T<sub>CD8</sub><sup>+</sup> sur le CMH de classe I, mais aussi d'éviter la réponse des natural killers<sup>153, 185</sup>.

### 1.6.2 HOMOLOGUES CHEZ L'HUMAIN : FAMILLE DES MARCHs

Des alignements de séquences ont permis d'identifier une dizaine de E3 ubiquitines ligases homologues à K3 et K5 dans le génome humain (FIGURE 1.14). Elles ont été nommées MARCH pour *Membrane-Associated RING-CH* et sont localisées aux membranes subcellulaires<sup>180, 186</sup>. Le premier homologue humain identifié fut c-MIR (plus tard renommé MARCH8) en 2003. Bien que les séquences de c-MIR et K3/K5 soient différentes; les molécules présentent des fonctions et une structure très similaires. Il fut d'abord déterminé que MARCH8 régula négativement B7-2 en ubiquitinant sa queue cytoplasmique<sup>186</sup>. Un résumé des différents membres de la famille des MARCHs; leur degré d'homologie ainsi que leurs fonctions spécifiques est présenté à la FIGURE 1.14 et au TABLEAU 1.2.

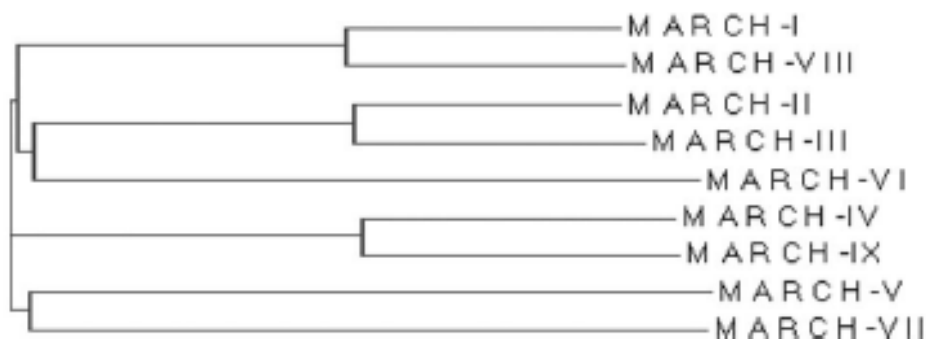


FIGURE 1. 13. Les MARCHs sont classées par paires selon leur degré d'homologie.  
Tiré de : 180

TABLEAU 1. 2 Les MARCHs visent des molécules diversifiées. Les paires (homologues) ont souvent les mêmes cibles. Les localisations cellulaires et tissulaires sont variées; certaines possèdent une expression très restreinte, laissant supposer un rôle unique tandis que d'autres sont plutôt ubiquitaires.

	<b>Molécule visée</b>	<b>Localisation cellulaire</b>	<b>Localisation tissulaire</b>	<b>Références</b>
MARCH 1	Fas-CD95, Tfr, CMH classe II	Endosomes/ Lysosomes	Foie, pancréas, lymphocytes B, DCs immatures	26, 180 187
MARCH 8 ( <i>c-MIR</i> )	B7-2, Fas-CD95, Tfr, CMH classe II	Endosomes/ Lysosomes	poumon, pancréas, ganglions lymphatiques, etc. (ubiquitaire)*	180, 186, 188
MARCH 2	Tfr, B7-2, syntaxin-6, DGL1	RE, TGN, endosomes	ubiquitaire	180, 189, 190
MARCH 3	Affecte TGN46 et l'internalisation de la transférine, dimérise avec MARCH 2 et syntaxin-6	Endosomes/ Lysosomes	Rate, colon, poumon	191
MARCH 6 ( <i>TEB4</i> )	N/D	RE	Plusieurs organes (cerveau, cœur, etc.).	192, 193
MARCH 4	CMH de classe I, CD4	Golgi	cerveau, placenta*	180
MARCH 9	CMH de classe I, CD4, ICAM-1	TGN	ubiquitaire	180, 194
MARCH 5	Mitofusin 2, Drp1	RE	Membrane mitochondriale*	180, 195
MARCH 7 ( <i>axotrophine</i> )	Impliquée dans le contrôle de Foxp3 et SOCS3	N/D	cellules souches, neurones, lymphocytes	196-198
MARCH 10	N/D	N/D	N/D	
MARCH 11	CD4	MVBs, vésicules dérivées du TGN	Spermatides	199

\* Les localisations tissulaires indiquées sont celles où les MARCHs étaient retrouvées en haut nombre de copies (RT-PCR) <sup>180</sup>

Cette famille de E3s pose donc un intérêt certain dans le cadre de la régulation de la réponse immunitaire puisque plusieurs molécules impliquées dans le système immunitaire (CMH de classe II, CMH de classe I et B7-2 par exemple) peuvent être visées.

### 1.6.3 IMPLICATION DE MARCH1 ET MARCH8 DANS LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE

Au cours des dernières années, il a été établi que la surexpression de plusieurs MARCHs pouvait causer la régulation négative de surface de certains immunorécepteurs. Ainsi, en 2006, il a été démontré que, dans les cellules dendritiques immatures, la queue cytoplasmique  $\beta$  de DR est ubiquitinée. L'ubiquitination de la queue cytoplasmique cessant lors de la maturation des cellules dendritiques; provoquant ainsi une accumulation des molécules de classe II à la surface cellulaire<sup>24, 25</sup>. Par la suite, le processus de la régulation négative des molécules de classe II à partir de la surface cellulaire a été démontré dans les lymphocytes B chez la souris. L'enzyme E3 ubiquitine ligase responsable de cette ubiquitination a été identifiée comme étant MARCH8<sup>188</sup>. Dans cette étude de Ohmura-Hoshino et al., la présentation des antigènes aux lymphocytes T était grandement diminuée dans des souris transgéniques exprimant fortement MARCH8. De plus, la régulation négative des molécules de classe II HLA-DR par ubiquitination dû à MARCH8 a été démontré comme étant dépendante du résidu lysine en position 225 sur la queue cytoplasmique  $\beta$  des molécules de classe II<sup>188</sup>. Par la suite, il fut démontré que MARCH1, qui est fortement exprimé dans les lymphocytes B, régulait l'expression des molécules de classe II dans ce dernier type cellulaire<sup>200</sup>. Dans les lymphocytes B des souris transgéniques n'exprimant pas MARCH1, l'ubiquitination des molécules de classe II était abolie. Ainsi, MARCH1, plutôt que MARCH8 (homologue de MARCH1 dont l'expression est ubiquitaire) serait plus spécifiquement responsable de la séquestration des molécules de classe II<sup>200</sup>.

Ensuite, la régulation négative de HLA-DR par MARCH1 a été démontré dans le contexte de la maturation des cellules dendritiques<sup>26</sup>. La capacité de MARCH1 à réguler négativement l'expression de HLA-DR à partir de la surface a été montré en système de surexpression par transfections en cellules HEK293T. De plus, des expériences *in vitro* avec des cellules dendritiques ont permis de montrer que, lors de la maturation de ces cellules, la régulation négative de l'expression de MARCH1 entraîne une stabilisation des molécules de classe II à la surface cellulaire<sup>26</sup>. Il a été

démontré que l'interleukine-10 induit l'expression de MARCH1 ce qui permet la régulation négative de HLA-DR par ubiquitination <sup>27</sup>. Ceci à été montré grâce à des expériences de PCR en temps-réel (pour l'induction de l'expression de MARCH1 par l'interleukine-10) et d'immunoprécipitation et immunobuvardage (pour l'ubiquitination de HLA-DR). Cette étude montrait aussi que l'utilisation d'ARN d'interférence inhibant MARCH1 provoquait l'arrêt de la régulation négative des molécules de classe II <sup>27</sup>.

## 1.7 HYPOTHÈSES ET OBJECTIF

L'expression des chaperons de la présentation antigénique HLA-DO, HLA-DM et Ii joue donc un rôle crucial dans le contexte de la réponse immunitaire; leur présence ou leur absence influençant directement la capacité des cellules à présenter des antigènes. La régulation postraductionnelle des chaperons de la présentation antigénique est importante par exemple dans le contexte de la maturation des lymphocytes B où l'expression des complexes DO/DM est régulée négativement<sup>123, 130</sup>. La régulation de l'expression de surface de la chaîne invariante peut aussi être importante dans le contexte de l'inflammation. En effet, une diminution de Ii à la surface cellulaire entraînerait une baisse de la capacité de réception de MIF, l'important médiateur de l'inflammation<sup>51</sup>.

Il a été démontré que des E3 ubiquitine ligases de la famille des MARCHs étaient impliquées dans la régulation post-traductionnelle par ubiquitination de molécules du CMH de classe I et II et aussi de plusieurs autres immunorécepteurs. En particulier, MARCH1 et MARCH8, localisées aux membranes des endosomes/lysosomes ciblent les molécules du CMH de classe II. L'expression de MARCH8 est ubiquitaire et celle de MARCH1 est plutôt restreinte, principalement aux lymphocytes B et aux cellules dendritiques immatures<sup>180</sup>. MARCH1 est l'effecteur principal de la régulation de CMH de classe II et son expression restreinte est intéressante dans le sens où ceci implique peut-être un rôle moins généralisé<sup>26</sup>.

### 1.7.1 HYPOTHÈSES

La première hypothèse est que Ii, seul ou en complexe nonamérique avec les molécules du CMH de classe II, peut être visé par MARCH1 dû à la présence d'un résidu lysine sur sa queue cytoplasmique. Ceci pourrait être un procédé important pour réguler post-traductionnellement l'expression de la chaîne invariante à la surface cellulaire ou bien intracellulairement, si Ii peut être redirigé ou dégradé par l'ubiquitination.

La deuxième hypothèse est que DO, ou les complexes DO/DM, peuvent être visés par MARCH1. Ceci pourrait expliquer la régulation négative des complexes DO/DM lors de la maturation des lymphocytes B suivant leur entrée dans les centres germinatifs. D'emblée, DM semble un candidat moins propice que DO à la régulation négative puisque qu'il s'agit de la queue cytoplasmique de la chaîne  $\alpha$  qui contient une lysine et non de la chaîne  $\beta$  comme c'est le cas pour DO et DR.

### 1.7.2 OBJECTIF

L'objectif du projet est de déterminer si l'ubiquitination par MARCH1 joue un rôle en lien avec la régulation post-traductionnelle des chaperons de la présentation antigénique, soit les molécules non-classiques de classe II (HLA-DO et HLA-DM) ainsi que la chaîne invariante (Ii). Donc, ceci implique d'observer si la présence de MARCH1 affecte l'expression de DO, DM et Ii et s'il s'agit d'un effet direct de MARCH1.



## CHAPITRE 2 : PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

## 2.1 VECTEURS

Plusieurs vecteurs ont été utilisés : pBudCE4 et pCDNA<sub>3,1</sub> (Invitrogen, Canada) ainsi que pREP4 (Quiagen). Les clonages des molécules de classe II, de la chaîne invariante et des divers mutants ont été réalisés précédemment au laboratoire. Le vecteur RSV.5neo a été obtenu de Eric Long, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rockville, MD, USA <sup>201</sup>.

**HLA-DO** : pBud-DO $\alpha$ , pBud-DO $\alpha$ P11V, pBud-DO $\beta$ , pCDNA<sub>3,1</sub>-DO $\beta$ K

Les vecteurs pBud-DO $\alpha$  et pBud-DO $\beta$  ont été décrit précédemment <sup>126</sup>. Le mutant DO $\alpha$ P11V consiste en une mutation de la proline en position 11 sur la chaîne  $\alpha$  de DO pour une alanine, rendant la molécule plus stable et permettant sa sortie du RE sans l'aide de DM. Ce mutant se retrouve à être exprimé à la surface cellulaire <sup>126</sup>. Le mutant DO $\beta$ K consiste en une mutation de la lysine en position 225 sur la queue cytoplasmique, site potentiel pour l'ubiquitination, sur la queue cytoplasmique de DO $\beta$  en une alanine. Il a été obtenu par mutagenèse dirigée sur le vecteur pBlueScript®IIKS-DO $\beta$  <sup>126</sup> puis sous-cloné dans le vecteur pCDNA<sub>3,1</sub>.

**HLA-DM** : pBud-DM $\alpha\beta$ , pBud-DMY, pBud-DMY+K

Le vecteur pBud-DM $\alpha\beta$  a été décrit précédemment <sup>125, 202</sup>. Le mutant DMY comporte une mutation de la tyrosine en position 230 sur la queue cytoplasmique de DM $\beta$  pour une alanine; résultant en la perte du motif de ciblage aux endosomes YTPL <sup>125</sup>. Le mutant DMY+K comprend un changement de cadre de lecture suivant la mutation du motif YTPL en ATPL. Ceci crée une queue cytoplasmique plus longue comportant l'ajout d'un résidu lysine.

**HLA-DR** : pBud-DR $\alpha$ , pBud-DR $\alpha\beta$ , RSV.5neo-DR $\alpha$ KG:RG

Les ADNc DR $\alpha$  et DR $\beta$  ont été obtenus de E. Long (NIH) et sous-clonés dans le vecteur pBud-CE4 <sup>117, 203</sup>. Le mutant DR $\alpha$ KG:RG comprend la mutation de la première lysine de la queue cytoplasmique en une arginine suivie de l'ajout d'un codon stop, produisant ainsi une queue cytoplasmique écourtée.

**Chimères** : pBud-DM $\alpha\beta$ /DR $\alpha\beta$  cyto, pBud-DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K cyto,

La première chimère consiste en la molécule DM sauvage dont les queues cytoplasmiques des deux chaînes ont été remplacées par celle de DR sauvage. La deuxième chimère comprend la chaîne DR $\beta$  dont la queue cytoplasmique a été

remplacée par celle de DM $\beta$ Y+K<sup>125</sup>. Une erreur de transcription de la polymérase utilisée lors du clonage de DR $\beta$ /DM $\beta$ Y a introduit un codon stop à la fin de la queue cytoplasmique de DM $\beta$ Y; produisant une queue plus longue contenant une lysine supplémentaire.

**Chaîne invariante** : pREP4-Iip33M17A.

La première méthionine a été mutée en une alanine, la traduction se retrouvant ainsi restreinte à Iip33<sup>119</sup>.

**MARCHs** : Les vecteurs encodant les ubiquitines ligases couplées à la molécule fluorescente YFP ont aussi été précédemment clonés au laboratoire (*données non publiées*); il s'agit de pCDNA<sub>3.1</sub>-YFP, pCDNA<sub>3.1</sub>-YFP-MARCH8 $\Delta$ RING, pCDNA<sub>3.1</sub>-YFP-MARCH1 et pCDNA<sub>3.1</sub>-YFP-MARCH8. La molécule YFP a été clonée dans le vecteur pCDNA<sub>3.1</sub> (pCDNA<sub>3.1</sub>-YFP). Les différentes molécules MARCH ont été clonées à la suite de la YFP dans ce vecteur. La protéine MARCH8 $\Delta$ RING consiste en une version tronquée de MARCH8 où le domaine catalytique RING a été supprimé. Cette protéine est donc non-fonctionnelle. Quant aux vecteurs pCDNA<sub>3.1</sub>-YFP-MARCH1 et pCDNA<sub>3.1</sub>-YFP-MARCH8, ils contiennent les molécules MARCH1 et MARCH8 sauvages.

Des vecteurs encodant MARCH1 ou d'autres ubiquitines ligases de la famille des MARCH ont été obtenus du Dr Eric Bartee (Vaccine and Gene Therapy Institute, Oregon Health and Science University, Beaverton, OR, USA) (*données non publiées*). Il s'agit de pUHD10.1-empty, -MARCH1, -MARCH2, -MARCH3, -MARCH4 et -MARCH9. Le vecteur pCS2-MARCH8 a aussi été utilisé. Ces derniers vecteurs consistent simplement les versions sauvages des diverses MARCHs clonés dans le vecteur pUHD10.1 ou pCS2; elles ne sont pas couplés à une molécule détectable telle la YFP.

Le vecteur pCDNA<sub>3</sub>-CXCR2 a été acheté de Missouri S&T cDNA Resource Center, MO, USA (#Cat. CXCR200000).

## 2.2 STRATÉGIES DE CLONAGE

Pour créer un mutant de Ii dont la queue cytoplasmique est tronquée, une PCR a été réalisé sur le vecteur pBSKS-Iip33M17A avec les amorces *reverse* 5'-GCGAATTCACCA TGCGCGGAGCCCTGTACACAGGC-3' et *forward* pUniversel 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'. La première amorce a permis d'insérer un site de restriction EcoRI immédiatement suivi d'une séquence de Kozak (accatg) remplaçant la sérine située à la fin de la queue cytoplasmique de Ii pour une méthionine. La deuxième amorce amplifie à partir du promoteur universel situé sur le vecteur pBluescript ®IIKS +/- (pBSKS). L'insert ainsi amplifié (IiΔcyto) a été digéré par les enzymes de restriction EcoRI et XbaI; le site XbaI se situant sur le vecteur pBSKS, entre le promoteur universel et le cDNA Iip33M17A. Parallèlement, le vecteur pCDNA<sub>3.1</sub> a aussi été digérer EcoRI/XbaI. Le vecteur et l'insert digérés ont ensuite été liés avec la l'enzyme T4 ligase pour obtenir le vecteur pCDNA<sub>3.1</sub>-IiΔcyto.

## 2.3 LIGNÉES CELLULAIRES ET TRANSFECTIONS

Les lignées cellulaires HEK293T (obtenue de E. Cohen, IRCM, Montréal, Canada), HEK293 CIITA et HeLa CIITA/DO ont été cultivées dans du milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) contenant 5% de sérum de veau foetal inactivé (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). Ces lignées cellulaires proviennent de cellules épithéliales humaines transformées. Les HEK293 sont des cellules de rein tandis que les HeLa sont des cellules du col de l'utérus (ATCC, The Global Bioresource Center). Les transfections transitoires des cellules HEK293 ont été réalisées par la méthode de précipitation au calcium (CaCl<sub>2</sub>) avec HBS. Les transfections transitoires des cellules HeLaCIITA/DO ont été réalisées avec de la Lipofectamine LTX couplée au PlusReagent d'Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). 4µg de chaque plasmide étaient transfectés. Les cellules étaient analysées 48h après les transfections.

## 2.4 ANTICORPS

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés (ce sont tous des anticorps de souris sauf l' $\alpha$ DM $\beta$  et l' $\alpha$ GFP) :

**Bu45** (IgG1) est un anticorps monoclonal conformationnel reconnaissant la région C-terminale de Ii humain. L'épitope reconnu sur Ii est détruit suite à l'entrée dans les endosomes tardifs<sup>204</sup>.

**PIN1** (IgG1) est un anticorps monoclonal qui reconnaît la queue cytoplasmique de Ii humain (N-terminale) (Eric Long, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rockville, MD, USA)<sup>205</sup>.

**CerCLIP.1** (IgG1) est un anticorps monoclonal qui reconnaît la région N-terminale de CLIP lié au CMH de classe II (Lisa K. Denzin, Sloan-Kettering Cancer Center, NY, USA)<sup>105, 206</sup>.

**Mags.DO.5** (IgG1) est un anticorps monoclonal conformationnel spécifique pour HLA-DO. Cependant, il reconnaît DO de façon plus efficace lorsque DM est présent. Il reconnaît aussi le mutant DO $\alpha$ p11v (Lisa K. Denzin, Sloan-Kettering Cancer Center, NY, USA)<sup>130</sup>.

**HKC5** (IgG1) est un anticorps monoclonal spécifique reconnaissant le motif di-leucine sur la queue cytoplasmique de DO $\beta$  (Jacques Thibodeau, Université de Montréal, Mtl, Canada)<sup>207</sup>.

**MapDM.1** (IgG1) est un anticorps monoclonal conformationnel reconnaissant DM. (BD Pharmingen, Oakville, ON, Canada)<sup>206</sup>.

**XD5** (IgG1) est un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope linéaire de la chaîne  $\beta$  (domaine  $\beta$ 1) sur toutes les molécules classiques de classe II (HLA-DR, -DP et -DQ)<sup>43, 208</sup>.

**$\alpha$ CXCR2** (IgG2A) est un anticorps monoclonal reconnaissant CXCR2, le récepteur de l'IL-8 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

**IgG1-FITC** et **IgG2A-FITC** sont des anticorps contrôles isotypiques (BioLegend, Burlington, ON, Canada).

**$\alpha$ GFP** est un anticorps polyclonal (fraction IgG) de lapin. Il est utilisé ici pour sa propriété de reconnaître la protéine YFP en immunobuvardage (Invitrogen).

**$\alpha$ DM $\beta$**  est un anticorps polyclonal (fraction IgG) de lapin<sup>125</sup>.

**$\alpha$ MARCH1** et  **$\alpha$ MARCH8** sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les E3 ubiquitines ligases MARCH1 et MARCH8 obtenus de Klaus Früh (Vaccine and Gene Therapy Institute, Oregon Health and Science University, Beaverton, OR, USA).

Les anticorps secondaires pour la cytométrie en flux étaient des anticorps de chèvre anti-souris IgG<sub>(H+L)</sub> couplés au fluorochrome Alexa Fluor 488 (**GAM-488**) (Molecular Probes, Burlington, ON), des anticorps d'âne anti-souris IgG<sub>(H+L)</sub> (**DAM-APC**) (eBiosciences, San Diego, CA, USA) ou de lapin anti-souris IgG1 (**RAM-APC**) (BD Pharmingen, Oakville, ON, Canada) couplés au fluorochrome APC. Pour les immunobuvardages, les anticorps utilisés étaient soit des anticorps de chèvre anti-souris (**GAM-PO**), soit des anticorps de chèvre anti-lapin (**GAR-PO**) couplés à la peroxydase de Raifort (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA).

## 2.5 MARQUAGES CELLULAIRES ET CYTOMÉTRIE EN FLUX

Les immunomarquages cellulaires ont été réalisés suite à la fixation des cellules à la paraformaldéhyde 4% (15min) suivie d'un traitement au NH<sub>4</sub>Cl 50mM (15min). Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution contenant de la BSA (albumine sérique bovine, BioShop, Burlington, ON, Canada) à une concentration de 1% et de la saponine (Sigma) à une concentration de 0,05% pour les marquages totaux. Pour les marquages de surface, les cellules sont incubées avec une solution contenant seulement de la BSA à une concentration de 1% pendant 10 minutes.

L'incubation avec les anticorps primaires s'est faite pendant 45 minutes sur glace. Les cellules étaient ensuite lavées (BSA1% ou BSA1%/Sapo0,05%) puis incubées avec les anticorps secondaires pendant 30 minutes sur glace. Suite à 2 autres lavages, les cellules étaient resuspendues dans du PBS1X puis analysées au cytomètre en flux (FACSCalibur, Becton-Dinckinson, Missisauga, ON).

## 2.6 IMMUNOPRÉCIPITATION ET IMMUNOBUVARDAGE

### *a) Lysats cellulaires*

Les cellules ( $1 \times 10^6$  cellules/100 $\mu$ l) ont été lysées en présence de Triton X-100 (FisherBiotech, Fair Lawn, NJ, USA) 1% dans du tampon de lyse (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>) pendant 20 minutes sur glace. Après la lyse, les lysats étaient centrifugés 1 minute à 13 000g pour en récupérer le surnageant.

### *b) Immunoprécipitation*

$7 \times 10^6$  cellules ont été utilisées pour chaque immunoprécipitation. Le couplage des billes Sépharose protéine G (Amersham Biosciences, Oakville, ON, Canada) (10 $\mu$ l par échantillon) avec l'anticorps (MagDO, Bu45,  $\alpha$ CXCR2, MapDM, ctl isotypique IgG1 ou IgG2) était fait pendant 1h dans 1mL de PBS. En parallèle, les lysats ont été mis en présence de 10 $\mu$ l de billes non-couplées pendant 30 minutes; ceci ayant pour but de diminuer l'adhérence de composés non-spécifiques présents dans les lysats aux complexes billes-Ac. Les complexes billes-Ac ont été récupérés après le couplage par centrifugation et resuspendus dans du tampon de lyse puis ajoutés aux lysats. L'immunoprécipitation a eu lieu o/n. Les complexes billes-Ac-protéines ont ensuite été récupérés par centrifugation et lavés 3 fois avec du tampon de lyse contenant 1% de Triton. Toutes les incubations étaient réalisées à 4°C sur agitateur rotatoire.

### *c) Migration sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE, transfert sur membrane et immunobuvardage*

Les lysats ont été analysés en conditions réductrices. Les complexes billes-Ac-protéines des immunoprécipitations ont été resuspendus dans 20 $\mu$ l de tampon réducteur. Les échantillons ont ensuite été bouillis 5 minutes puis chargés sur gel de polyacrylamide 12%. Le transfert sur membrane de nitrocellulose était réalisé en milieu semi-sec (BioRad, Mississauga, ON, Canada). Le blocage des sites libres sur les membranes a été réalisé pendant 1h avec du TTBS-lait 5%. La solution de TTBS était composée de Tris-HCl, NaCl et Tween-20 (Biomedicals, Aurora, OH, USA). Les membranes étaient incubées o/n avec les anticorps primaires (dans du TTBS-lait) puis 2h avec les anticorps secondaires (dans du TTBS-lait). Le signal de la

peroxydase de Raifort couplée à l'anticorps secondaire a été détecté par chimiluminescence grâce au kit *BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)* de Roche (Laval, QC, Canada) sur des films Fujifilm, Super RX (Tokyo, Japon).

## 2.7 STATISTIQUES

Des tests statistiques ont été utilisés pour déterminer si les différences des moyennes des valeurs de fluorescence observées étaient significatives. Dans tout les cas, 3 paires de données étaient utilisées; soit des immunomarquages en triplicate en deux conditions (en présence de YFP ou MARCH1-YFP). Le test de *t*-student pour données appariées (*paired t-test with two-tailed*) a été utilisé. La valeur «P» était calculée par le logiciel GraphPad Prism. Une valeur  $P < 0,05$  est considérée comme déterminant une différence significative (\*) entre les moyennes. Une valeur  $P \geq 0,05$  indique une différence non-significative (ns).



## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

### 3.1 IMPLICATION DE MARCH1 DANS LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE

Récemment, il a été démontré que la E3 ubiquitine ligase MARCH1, dont l'expression est induite par l'interleukine-10, est responsable de la régulation négative de HLA-DR, ce procédé étant important lors de la maturation des cellules dendritiques et des monocytes<sup>26, 27</sup>. Pour déterminer si MARCH1 joue aussi un rôle dans la régulation d'autres molécules de la présentation antigénique, soit les molécules chaperones Ii, DO et DM, un système *in vitro* de co-transfections de lignées cellulaires transformées (HEK293 et HeLa) a été utilisé plutôt que des cellules primaires pour faciliter la visualisation des effets directs de MARCH1 sur chacune des molécules en particulier.

### 3.2 MARCH1 AFFECTE L'EXPRESSION DES MOLÉCULES DE LA PRÉSENTATION ANTIGÉNIQUE DANS LES HEK293 CIITA ET LES HELA CIITA/DO

L'effet général de MARCH1 sur l'ensemble des molécules de la présentation antigénique a d'abord été vérifié à l'aide de cellules exprimant de façon stable le transactivateur CIITA. Le but de cet exercice était d'observer s'il y avait, en présence de MARCH1, une redistribution des molécules de la présentation antigénique.

Des transfections transitoires des lignées de cellules stables HEK293 CIITA et HeLa CIITA/DO ont d'abord été réalisées avec les vecteurs pCDNA<sub>3.1</sub>-YFP (YFP) ou pCDNA<sub>3.1</sub>-MARCH1-YFP (M1-YFP). MARCH1 est ici couplé à la YFP, ce qui permet de détecter facilement lors de l'analyse la population de cellules transfectées et, ainsi, d'analyser seulement celle-ci en comparaison avec la transfection contrôle exprimant la YFP seule. Après 48h, les cellules étaient récupérées et immunomarquées avec divers anticorps primaires contre le CMH de classe II ainsi que les molécules chaperones de la présentation antigénique (DR, Ii, DO et DM). À noter que les cellules ont toujours été récupérées 48h après les transfections. Puisque les transfections se faisaient avec la YFP, détectée en FL-1 à la cytométrie de flux, l'anticorps secondaire utilisé pour les immunomarquages se devait d'être un anticorps couplé à un fluorochrome exprimant une longueur d'onde différente. Ainsi, le fluorochrome APC, détecté en FL-4 à la cytométrie de flux a été choisi pour

différencier les signaux lors de l'analyse. Pour observer l'expression totale des molécules, une partie des cellules était perméabilisée avant l'ajout de l'anticorps primaire tandis que l'autre partie, qui n'était pas perméabilisée, permettait de détecter seulement l'expression de surface des molécules. Ensuite, les cellules immunomarquées étaient analysées au FACScalibur et la population de cellules transfectées, et donc exprimant la YFP, était sélectionnée à l'aide d'un graphique FL-1 versus FL-4 représentant la fluorescence de chaque cellule dans les 2 longueurs d'onde. Les moyennes de fluorescence présentées pour l'expression des diverses molécules de la présentation antigénique sont donc celles en FL-4 et, de plus, représentent seulement la population de cellules transfectées et exprimant YFP ou M1-YFP. À moins d'indication contraire, cette méthode d'analyse est toujours celle utilisée lorsque les transfections ont lieu avec les vecteurs YFP. À titre d'exemple, un profil des cellules stables HeLa CIITA/DO transfectées et immunomarquées avec l'anticorps XD5 (contre les molécules classiques de classe II) est présenté à la FIGURE 3.1; le but étant de démontrer la façon dont les résultats subséquents sont analysés; et donc de montrer d'où viennent les moyennes de fluorescence indiquées sur les graphiques. La fenêtre "G" indique la sélection des cellules positives pour la YFP; les moyennes de fluorescences en FL-4 de cette fenêtre étaient analysées. Il est à noter que l'efficacité de transfection n'étant pas de 100%, la population de cellules obtenue est hétérogène, ce qui peut fausser l'analyse. En effet, c'est pour cette raison que seule la population de cellules transfectées est sélectionnée pour l'analyse. Ainsi, dans le cas présenté, on observe une diminution de l'expression des molécules de classe II (immunomarquage XD5) en présence de MARCH1. Ceci est confirmé par le pourcentage de cellules YFP-positives et positives pour l'immunomarquage (carré en haut à droite) (FIGURE 3.1). Dans ce cas, 12.50% des cellules transfectées expriment les molécules classiques de classe II (HLA-DR) en présence de la YFP seule et ce pourcentage passe à 3.88% en présence de MARCH1. Cependant, on remarque que la quantité de cellules YFP-positives n'exprimant pas les molécules de classe II (carré en bas à droite) n'en est pas pour autant augmentée. Ceci est dû à une distribution légèrement différente des cellules transfectées avec MARCH1-YFP en comparaison

avec celles transfectées avec YFP. Pour cette raison, il importe de regarder le pourcentage de cellules dans le carré en haut à droite.

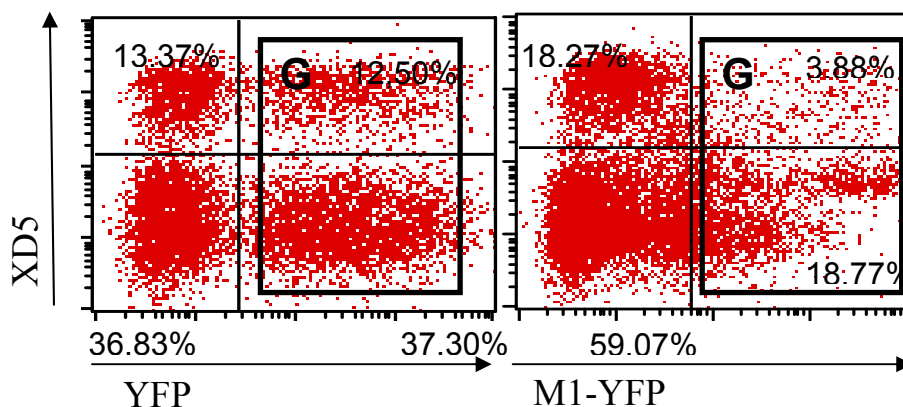


FIGURE 3. 1 Analyse de la population de HeLa CIITA/DO transfectée avec YFP ou M1-YFP. Les cellules stables HeLa CIITA/DO étaient transfectées avec les vecteurs YFP ou M1-YFP puis immunomarquées avec XD5. Les cellules présentées ici n'étaient pas perméabilisées et ceci représente donc l'expression de surface des molécules classiques de classe II. L'analyse au FACScalibur permet d'obtenir un graphique YFP (FL-1) versus XD5 (FL-4). La fenêtre "G" représente la sélection des cellules YFP positives. Le pourcentage de cellules YFP-positives exprimant les molécules de classe II passe donc de 12.50% en présence de la YFP seule à 3.88% en présence de MARCH1.

La FIGURE 3.2 représente l'expression de DR, Ii, DO et DM de la lignée stable HEK293 CIITA en présence ou en absence de MARCH1. L'expression de surface ainsi que l'expression totale (après perméabilisation des cellules) a été observée. Cependant, théoriquement, les molécules chaperones de la présentation antigénique ne sont que marginalement exprimés à la surface cellulaire, sauf Iip33 qui peut y passer de façon transitoire; ce qui explique les très faibles moyennes de fluorescence observées lors des immunomarquages de surface. Ceci implique que les différences de fluorescence seront plus problématiques à analyser pour l'expression de surface que pour l'expression totale des molécules et que ces différences, augmentation ou diminution, seront donc moins reproductibles.

Comme il était attendu, une forte diminution de l'expression de DR (XD5) est observée en présence de MARCH1. Cependant, l'immunomarquage avec l'anticorps

CerCLIP.1 démontre une hausse de l'expression totale des complexes DR/CLIP suite à l'addition de MARCH1. Pour ce qui est des molécules chaperones Ii (Bu45 et PIN1), DO (Mags.DO et HKC5) et DM (MapDM.1), une diminution de leur expression est observée. La même expérience a été répétée avec une autre lignée cellulaire, soit les HeLa CIITA/DO. Les mêmes immunomarquages ont été réalisés et les cellules ont été analysées de la même façon (FIGURE 3.4). Les résultats obtenus avec cette dernière lignée cellulaire sont semblables à ceux obtenus avec les HEK293 CIITA, sauf pour les niveaux des complexes DR/CLIP (CerCLIP.1) dont l'expression totale est diminuée au lieu d'augmentée comme pour les HEK293 CIITA. Cependant, l'expression de CLIP dans les HEK293T CIITA est beaucoup plus faible comparée à l'expression dans les HeLaCIITA/DO; ce qui ne permet pas une bonne comparaison entre les deux types cellulaires.

En parallèle, les résultats originaux (FACS) sont présentés aux FIGURES 3.3 (HEK293 CIITA) et 3.5 (HeLaCIITA/DO). Il est à remarquer que le pourcentage de cellules doubles-positives (exprimant la YFP ainsi que la molécule visée par l'immunomarquage) diminue pratiquement toujours en présence de MARCH1-YFP. Les trois exceptions dans le cas des cellules HeLaCIITA/DO sont l'immunomarquage de surface Bu45 (Ii) ainsi que les immunomarquages totaux HKC5 (DO) et MapDM (DM) où le pourcentage observé augmente (FIGURE 3.5). Cependant, visuellement, il est possible d'observer qu'une population de cellules hautement YFP-positives fausse l'analyse et que l'expression de Ii, DO et DM semble tout de même diminuée en présence de MARCH1.

Le test de *t*-student a été utilisé pour déterminer si les différences observées entre les transfections YFP et M1-YFP sont significatives ( $P < 0,05$ ). La première constatation est que la diminution de l'expression totale de DR n'est pas significative dans les HEK293CIITA. En effet, il est connu que MARCH1 ubiquitine DR ce qui mène à sa régulation négative à partir de la surface<sup>26</sup>, mais pas nécessairement à sa dégradation, du moins dans les cellules de type HEK293T (*données non publiées*). Les différences des moyennes de fluorescence observées dans les HEK293CIITA pour les

immunomarquages CerCLIP, Bu45 et MapDM (surface) ne sont pas significatives. Dans les cas des HeLaCIITA/DO, les différences observées pour les immunomarquages de surface XD5, MagDO et MapDM ne sont pas significatives.

En bref, l'expression de MARCH1 semble tout de même provoquer un certain remaniement de l'expression des molécules chaperones de la présentation antigénique.

Ces deux expériences ont été réalisées pour observer l'effet de MARCH1 sur plusieurs molécules de la présentation antigénique. Il est évidemment difficile de les comparer l'une à l'autre puisque les cellules HEK293T étaient transfectées de façon stable avec CIITA tandis que les cellules HeLa étaient transfectées de façon stable avec CIITA et DO. Ainsi, les cellules HeLa CIITA/DO expriment un peu plus de DO que les HEK293T CIITA (la moyenne de fluorescence passe d'environ 65 à 40 telle que montrée pour les immunomarquages Mags.DO totaux des FIGURE 3.2 et 3.3) puisque le transactivateur CIITA peu induire la production d'une certaine quantité de DO<sup>207</sup>. Prises individuellement, ces expériences donnent quand même une idée sur ce qui se passe en présence de MARCH1. Pour comparer véritablement les HEK293T avec les HeLa; l'idéal serait d'utiliser des cellules transfectées de façon stable telles que les HEK293T CIITA et les HeLa CIITA.

Pour la suite des expériences, les cellules HEK293 ont été préférées aux HeLa puisque les transfections transitoires par précipitation au calcium sont plus efficaces dans les premières.

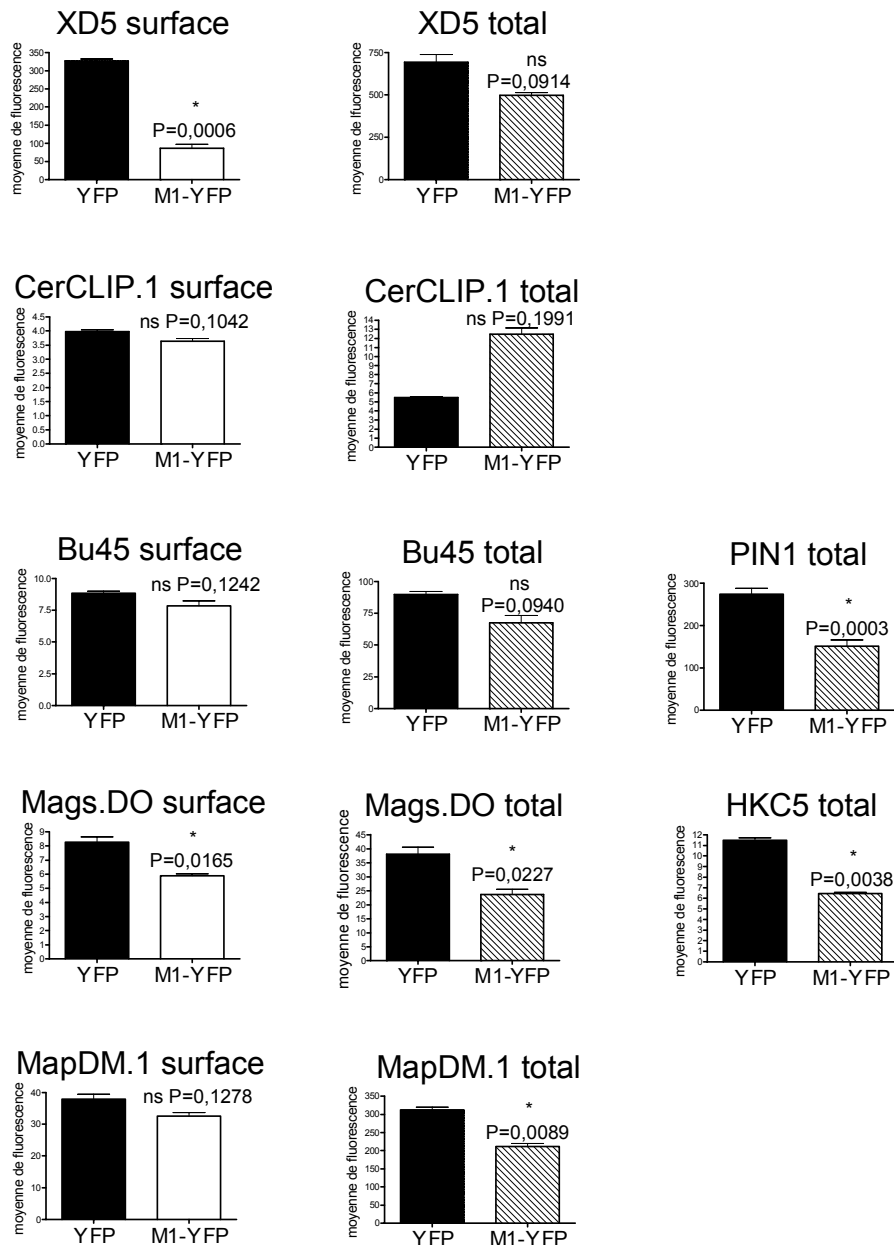


FIGURE 3. 2 Effet de MARCH1 sur les HEK293 CIITA.

Les cellules stables HEK293 CIITA transfectées transitoirement avec les vecteurs YFP ou M1-YFP ont été immunomarquées avec les anticorps XD5, CerCLIP.1, Bu45, PIN1, Mags.DO, HKC5 et MapDM.1). Les immunomarquages des cellules non-perméabilisées représentent seulement l'expression de surface des molécules tandis que les immunomarquages des cellules perméabilisées indiquent l'expression totale (intracellulaire et de surface) des molécules. Les anticorps PIN1 et HKC5 ayant pour cible la queue cytoplasmique de la chaîne invariante et de DO, respectivement, n'ont pu être utilisés que pour mesurer l'expression totale de leurs cibles. Les expériences ont été réalisées en triplicata; c'est-à-dire trois immunomarquages en parallèle des mêmes cellules transfectées. Les barres d'erreurs représentent la moyenne des moyennes de fluorescence obtenues pour les trois résultats. Les résultats du test de *t*-student sont indiqués par la valeur P où une valeur  $P < 0,05$  représente une différence significative (\*) des moyennes des deux colonnes et une valeur  $\geq 0,05$  représente une différence non-significative (ns).

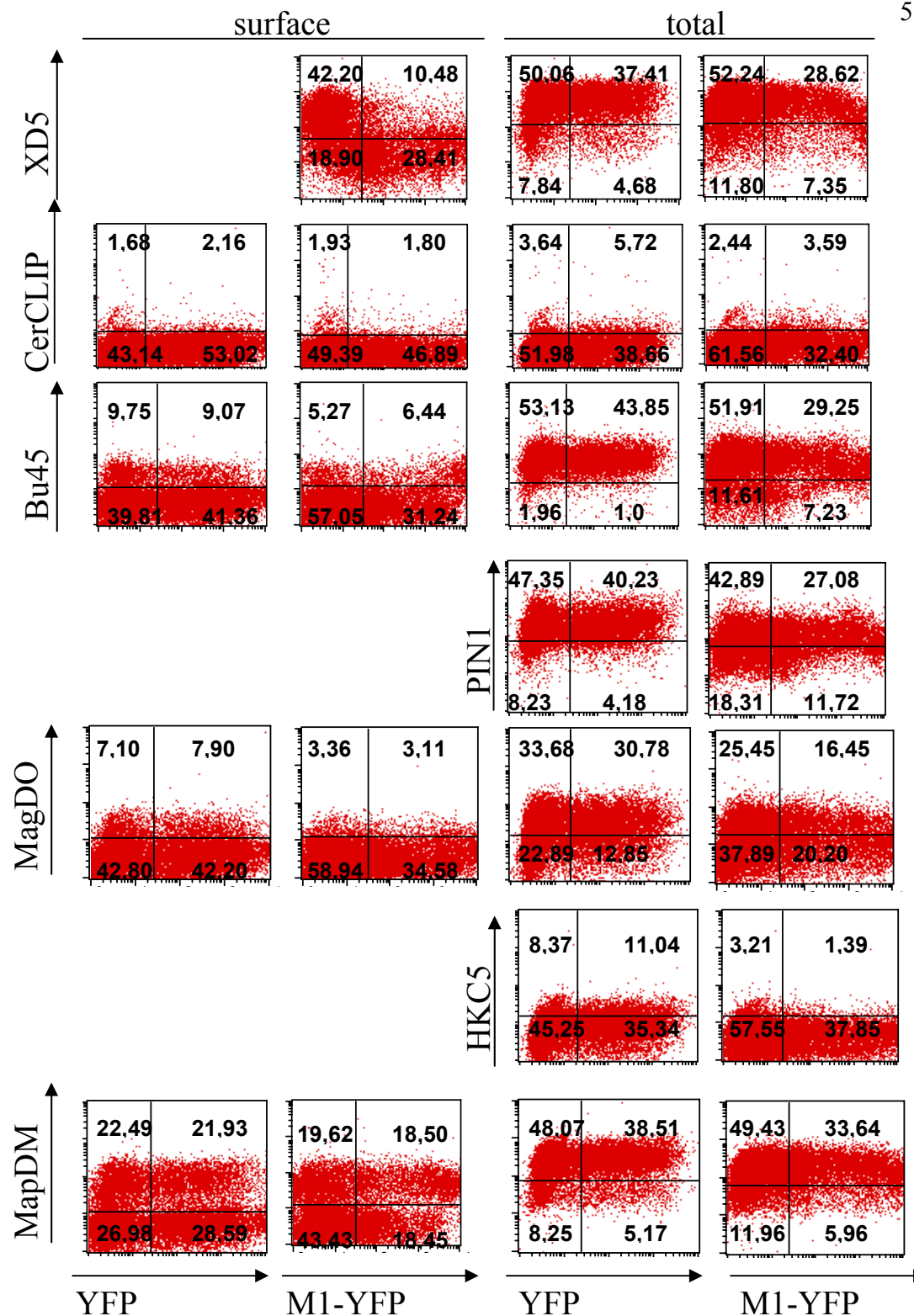


FIGURE 3. 3 Effet de MARCH1 sur les HEK293 CIITA (FACS)

Les résultats originaux de cytométrie de flux des immunomarquages (FL-4) des cellules HEK293 CIITA transfectées avec YFP ou M1-YFP (FL-1) pour un des triplicata sont représentés ici. Le pourcentage des cellules sélectionnées est représenté pour chaque cadran.



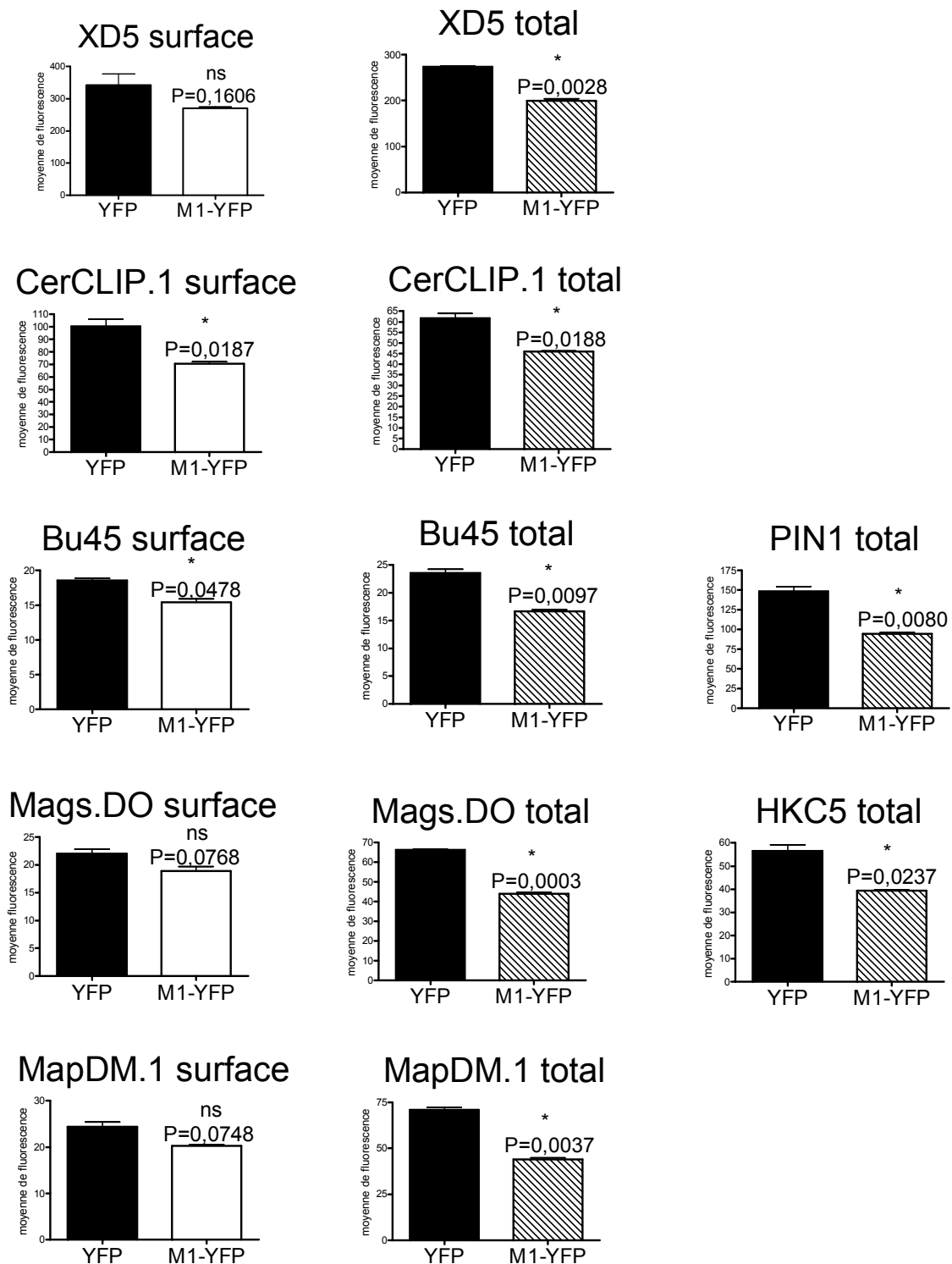


FIGURE 3. 4 Effet de MARCH1 sur les HeLa CIITA/DO

Les cellules stables HeLa CIITA/DO transfectées transitoirement avec les vecteurs YFP ou M1-YFP ont été immunomarquées avec les anticorps XD5, CerCLIP.1, Bu45, PIN1, Mags.DO, HKC5 et MapDM.1).

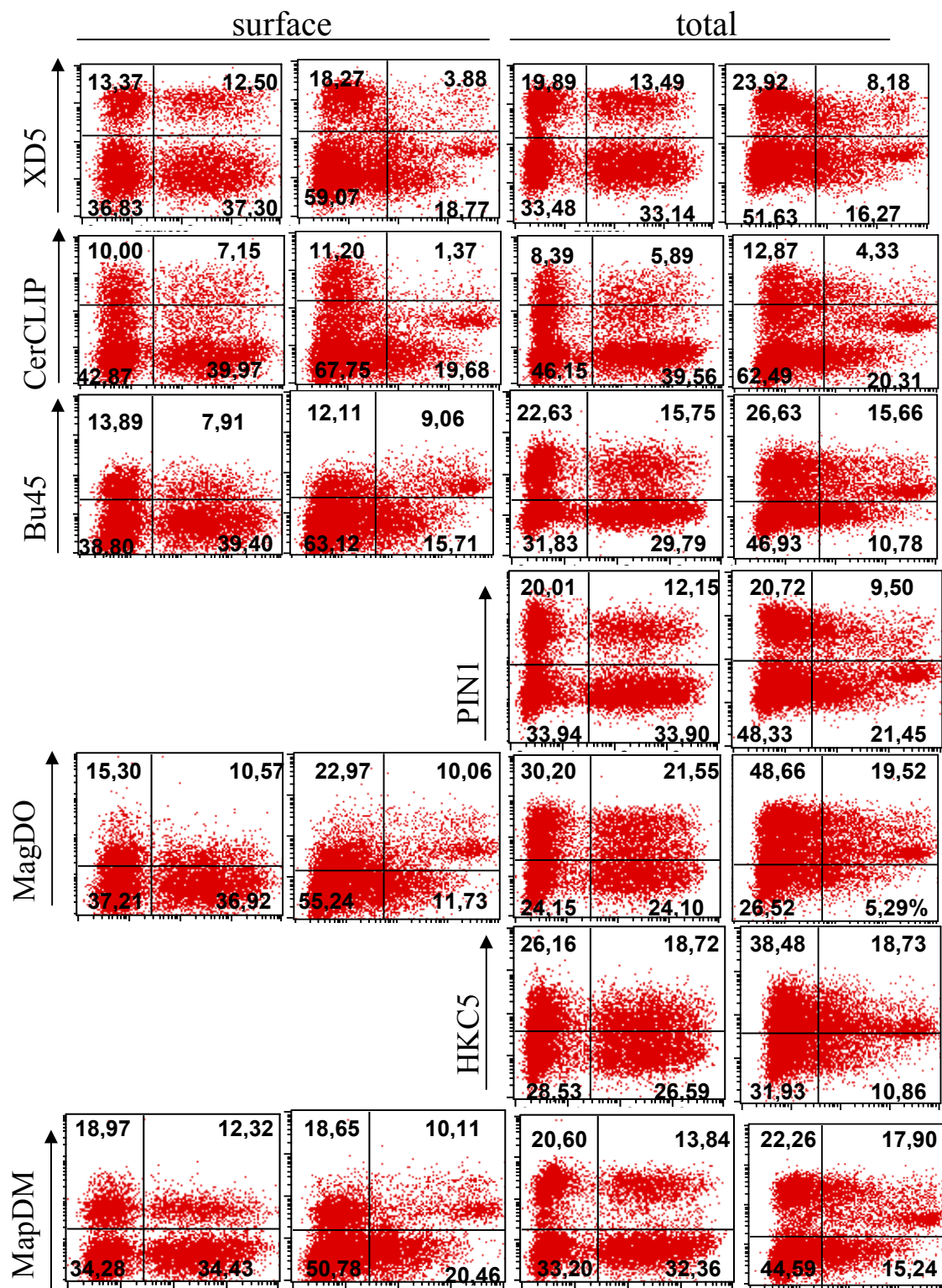


FIGURE 3. 5 Effet de MARCH1 sur les HeLaCIITA/DO (FACS)

Les résultats originaux de cytométrie de flux des immunomarquages (FL-4) des cellules HeLaCIITA/DO transfectées avec YFP ou M1-YFP (FL-1) pour un des triplicata sont représentés ici. Le pourcentage des cellules sélectionnées est représenté pour chaque cadran.

### 3.3 MARCH1 RÉGULE NÉGATIVEMENT L'EXPRESSION DE Iip33

Il a récemment été démontré que l'expression de surface de la molécule HLA-DR (DR) était diminuée en présence de MARCH1 et MARCH8<sup>26, 188, 200, 27</sup>. DR rejoint la voie endocyttaire en association avec Ii où une certaine partie des complexes DR/Ii est recyclée à partir de la membrane plasmique. L'hypothèse est que Ii, ou les complexes DR/Ii, peuvent être régulés négativement à partir de la surface cellulaire en étant ciblés par MARCH1. La chaîne invariante, tout comme DR, possède une lysine dans sa queue cytoplasmique (FIGURE 3.6).

Queue cytoplasmique de Ii



FIGURE 3. 6 Séquence de la queue cytoplasmique de Ii.

Les deux méthionines indiquent les débuts des séquences Iip35 et Iip33. Les motifs de ciblage RXR et LI/ML sont représentés.

Source : UniProtKB/Swiss-Prot entrées P04233 (HG2A\_HUMAN)

Pour diminuer le nombre de variables et observer l'effet direct de MARCH1 sur des molécules de la présentation antigénique (DO, DM et Ii), le système de co-transfections en HEK293T à été choisi.

Tout d'abord, pour observer l'effet de MARCH1 sur la chaîne invariante, l'isoforme Iip33 a été choisi. À noter que, dans les HEK293 CIITA et les HeLa CIITA/DO, les immunomarquages Ii représentaient la quantité totale de Ii, soit p33 et p35. Deux raisons expliquent le choix de p33. Premièrement, la lysine potentiellement ubiquitinée se retrouve à la fois dans la queue cytoplasmique de p33 et de p35, ce qui laisse suggérer qu'il ne devrait pas y avoir de différence entre les deux isoformes s'il y a ubiquitination, d'autant plus que la queue allongée de p35 ne contient pas de lysine supplémentaire. Deuxièmement, p35 possède un signal de rétention au RE et n'est retrouvé en dehors de celui-ci qu'en association avec DR. Ne possédant pas ce signal de rétention, p33 peut être retrouvé sans être associé à DR à l'extérieur du RE et peut même être exprimé à la surface cellulaire. Cette dernière caractéristique rend

l'étude plus aisée puisqu'il est ainsi possible d'observer la régulation négative à partir de la surface et non pas seulement la dégradation par observation de l'expression totale. Puisqu'il est possible qu'une molécule soit ubiquitinée, mais pas nécessairement dégradée, ceci peut se révéler important.

Pour débiter, MARCH8, homologue de MARCH1 ayant aussi DR pour cible, mais possédant une distribution ubiquitaire plutôt que restreinte, a aussi été testé (FIGURE 3.7). Ainsi, les vecteurs M8 $\Delta$ RING-YFP, M1-YFP ou M8-YFP ont été co-transfectés avec p33 dans les HEK293T. Le contrôle négatif M8 $\Delta$ RING est MARCH8 dont le domaine catalytique RING a été tronqué, ce qui en fait une enzyme non fonctionnelle. Ce contrôle est utilisé en lieu d'une transfection avec p33 et sans MARCH. Ainsi, la même quantité totale d'ADN est transfectée. De plus, la co-transfection d'une molécule semblable à MARCH8 mais non-fonctionnelle peut être considérée comme un meilleur contrôle que de transfecter p33 seul. Les cellules ont été immunomarquées avec les anticorps contre la chaîne invariante Bu45 et PIN1 et des lysats ont été préparés pour un immunobuvardage PIN1. L'anticorps PIN1 ne peut être utilisé que pour mesurer l'expression totale de la chaîne invariante puisqu'il a pour cible la queue cytoplasmique<sup>205</sup>. L'anticorps Bu45 étant un conformère, celui-ci ne peut être utilisé en immunobuvardage<sup>204</sup>. Les résultats obtenus de cette expérience démontrent, autant en immunomarquages qu'en immunobuvardages, que l'expression de p33 est diminuée en présence de MARCH1 et de MARCH8 (colonnes 2 et 3). Cette diminution est reproductible d'une expérience à l'autre et les résultats ont aussi été confirmés en HeLa pour les immunomarquages (*données non montrées*). De plus, la diminution de l'expression totale; telle que démontrée par les immunomarquages Bu45 et PIN1 après perméabilisation (colonnes 5, 6, 8 et 9) des cellules ainsi que par l'immunobuvardage (colonnes 3 et 4), indique que p33 est dégradé, tout comme DR qui subit une dégradation lysosomale suivant son internalisation<sup>24</sup>.

Il est à considérer qu'aucun contrôle de chargement des puits n'a été fait pour les immunobuvardages. Ces contrôles auraient été préférables. Cependant, le même nombre de cellules a été chargé dans chaque puits.

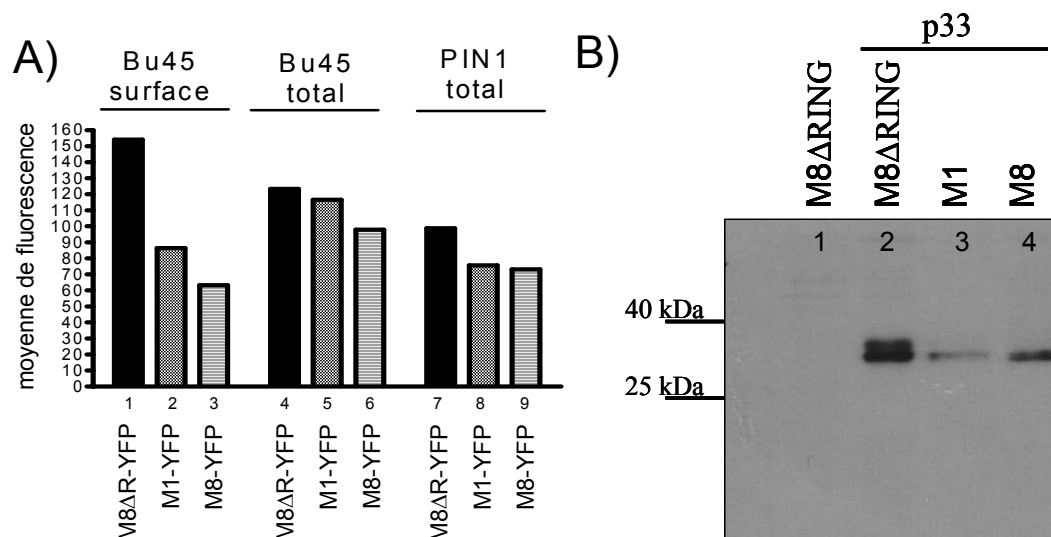


FIGURE 3. 7 MARCH1 et MARCH8 régulent négativement l'expression de Iip33. Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec p33 et les vecteurs M8ΔRING-YFP, M1-YFP ou M8-YFP et A) immunomarquées pour l'expression de surface ou totale (après perméabilisation) pour Iip33. B) Un immunobuvarge PIN1 de lysats en conditions réductrices des mêmes cellules a été réalisé. Dans le cas de l'immunobuvarge PIN1, des cellules transfectées avec seulement M8ΔRING-YFP ont été utilisées en contrôle négatif (colonne 1).

### 3.3.1 D'AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE DES MARCH AFFECTENT L'EXPRESSION DE Iip33

D'autres membres de la famille des MARCHs sont connus pour leur implication dans la régulation négative de certaines molécules du système immunitaire. Entre autres, les homologues MARCH2 et MARCH3 sont impliqués dans l'internalisation du récepteur de la transférine tandis que les homologues MARCH4 et MARCH9 régulent négativement l'expression du CMH de classe I et du récepteur CD4<sup>180, 191</sup>. Ces MARCHs ont été testées par co-transfection avec p33 en HEK293T pour leur capacité à réguler négativement la chaîne invariante (FIGURE 3.8). Les vecteurs pUHD10.1-MARCH2, -MARCH3, -MARCH4, -MARCH9 et -MARCH1 ainsi que pCS2-M8 ont été utilisés. Les MARCHs n'étant pas ici couplées à la YFP, les moyennes de fluorescence observées lors des immunomarquages sont celles de la population totale de cellules et ne représentent pas seulement la population transfectée.

Cette expérience a été réalisée 3 fois avec des résultats semblables. Les résultats observés pour MARCH1 et MARCH8 concordent bien avec ceux obtenus précédemment avec les vecteurs YFP. Bien que les immunomarquages des cellules perméabilisées (expression totale de la chaîne invariante) ne semblent pas démontrer une forte diminution de p33 intracellulaire, l'immunobuvardage des mêmes cellules révèle bien cette diminution. Tout d'abord, il est possible de remarquer l'effet des homologues MARCH4 et MARCH9 qui régulent négativement de façon drastique l'expression de surface de p33 (colonnes 4 et 5). Cette régulation négative s'accompagne aussi d'une importante dégradation de la chaîne invariante comme le démontre les immunomarquages après perméabilisation des cellules (colonnes 11, 12, 18 et 19) ainsi que l'immunobuvardage PIN1 (colonnes 2 et 3). Les résultats des homologues MARCH2 et MARCH3 indiquent que ces MARCHs ne permettent pas une dégradation de la chaîne invariante (colonnes 9, 10, 16 et 17 sur la FIGURE 3.8 A et colonnes 5 et 4 sur la FIGURE 3.8 B). La différence entre les deux réside dans le fait que MARCH2 diminue l'expression de p33 à la surface cellulaire (colonne 2) tandis que MARCH3 l'augmente (colonne 3). Ainsi, MARCH2, mais pas MARCH3, peut réguler négativement p33 à partir de la surface cellulaire.

Il est à noter que l'immunobuvardage PIN1 (FIGURE 3.8 B) ne correspond pas tout à fait avec l'immunomarquage PIN1 (FIGURE 3.8 A). Bien que le même nombre de cellules ait été chargé dans chaque puits, un immunobuvardage avec contrôle de chargement des puits devrait être fait pour obtenir une conclusion finale. Dans le cas présent, les immunomarquages sont sûrement plus précis. Cependant, la diminution drastique de l'expression de p33 en présence de MARCH4 et MARCH9 est particulièrement évidente sur l'immunobuvardage et pourrait être considérée comme un résultat valable.

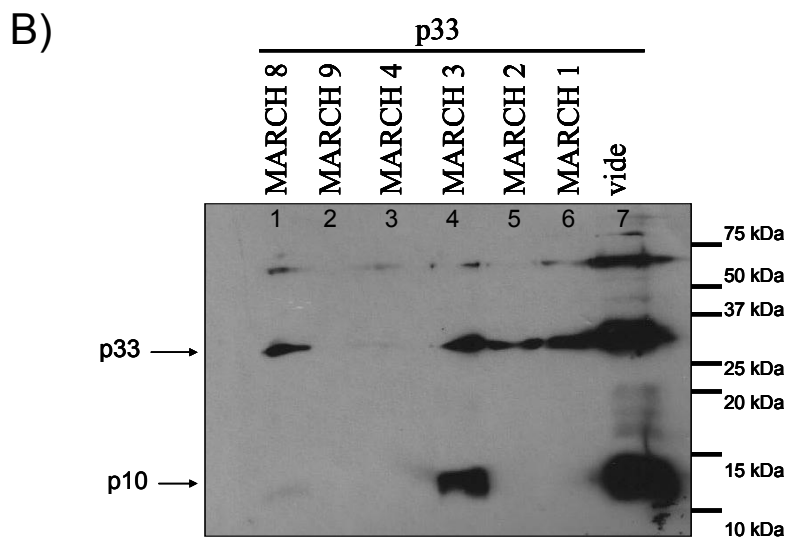
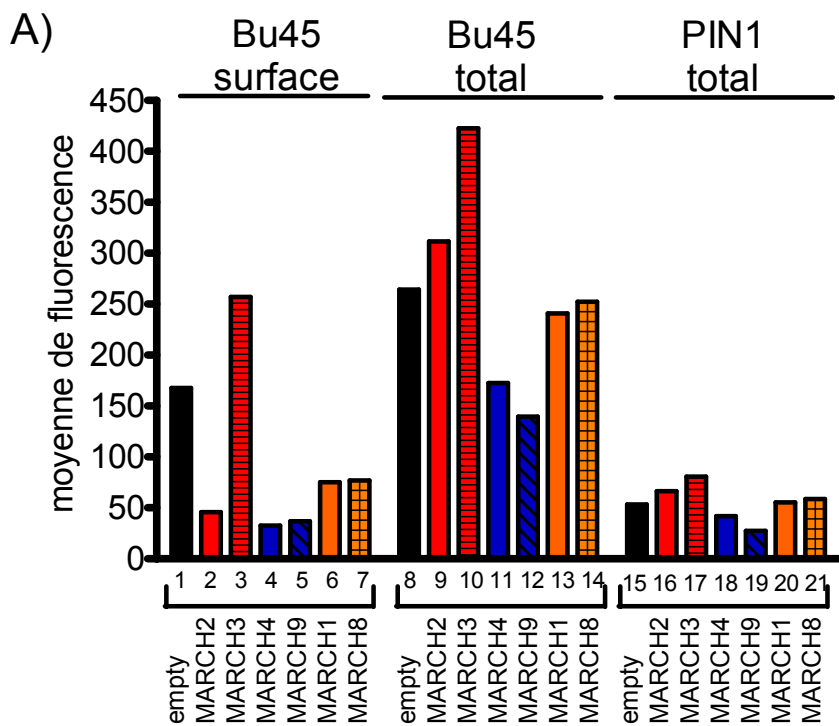


FIGURE 3. 8 Les membres de la famille des MARCH ont des effets divergents sur Iip33  
 Les cellules HEK293T ont été co-transfectées transitoirement avec p33 et les vecteurs pUHD10.1-  
 vide, -MARCH1, -MARCH2, -MARCH3, -MARCH4, -MARCH9 et pCS2-MARCH8. A) Les cellules  
 ont été immunomarquées pour l'expression de surface et l'expression totale après perméabilisation  
 avec des anticorps contre la chaîne invariante (Bu45 et PIN1). B) Un immunobuvardage PIN1 de  
 lysats en conditions réductrices des mêmes cellules a été réalisé.

### 3.3.2 LA QUEUE CYTOPLASMIQUE DE Ii N'EST PAS IMPLIQUÉE DANS LA RÉGULATION NÉGATIVE PAR MARCH1

Du moment qu'il a été conclu que MARCH1 pouvait réguler négativement l'expression de p33, la vérification de l'utilité de la lysine de la queue cytoplasmique a été entreprise. En effet, l'ubiquitination de DR a été démontrée comme étant dépendante de la lysine de la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$ <sup>24, 25, 188</sup> et l'hypothèse est que la chaîne invariante est régulée négativement grâce à l'ubiquitination du résidu lysine de sa queue cytoplasmique. Pour vérifier cette nécessité de la lysine de la queue cytoplasmique de Ii dans la régulation négative par MARCH1, un mutant de Ii sans la queue cytoplasmique a été cloné (pCDNA3.1-Ii $\Delta$ cyto). La queue cytoplasmique de ce mutant est tronquée à partir de la dernière sérine avant le début du domaine transmembranaire; cette sérine étant remplacée par une méthionine pour l'initiation de la transcription (FIGURE 3.9 A). Ainsi, selon l'hypothèse, l'abolition de la queue cytoplasmique devrait contrecarrer la régulation négative par MARCH1. Le mutant Ii $\Delta$ cyto a donc été co-transfecté dans les cellules HEK293T en parallèle avec p33 et YFP ou M1-YFP.

Comme il est possible d'observer à la FIGURE 3.9 B, l'élimination de la queue cytoplasmique de Ii ne réussit pas à contrecarrer complètement la régulation négative par MARCH1 (colonne 4). Une baisse moins importante de l'expression de la chaîne invariante est toutefois observée avec Ii $\Delta$ cyto en comparaison avec p33 pour les immunomarquages Bu45 (colonne 2 versus colonne 4) signifiant que la queue cytoplasmique pourrait être ubiquitinée et régulée, mais qu'elle n'est cependant pas indispensable à la régulation négative de Ii puisque, même tronquée, la chaîne invariante est régulée négativement en présence de MARCH1 (la diminution de l'expression de surface telle que mesurée avec l'anticorps Bu45 est statistiquement significative autant avec p33 que Ii $\Delta$ cyto). Ces immunomarquages ont été réalisées en triplicata (trois immunomarquages des mêmes cellules); les moyennes de fluorescence sont donc accompagnées de barres d'erreurs. Les résultats originaux (FACS) sont aussi présentés (FIGURE 3.10). À noter, en contrôle, les immunomarquages de la queue cytoplasmique de Ii (PIN1) indiquent que la queue cytoplasmique est bel et bien absente de la construction Ii $\Delta$ cyto (FIGURE 3.10).



Ainsi, cette expérience révèle que p33 pourrait être ciblée directement par MARCH1 puisque la régulation négative à partir de la surface cellulaire est quelque peu contrecarrée par l'abolition de la queue cytoplasmique de Ii. Cependant, la queue cytoplasmique n'est pas indispensable et il semblerait qu'il existe aussi une méthode indirecte par laquelle MARCH1 régule négativement l'expression de la chaîne invariante.

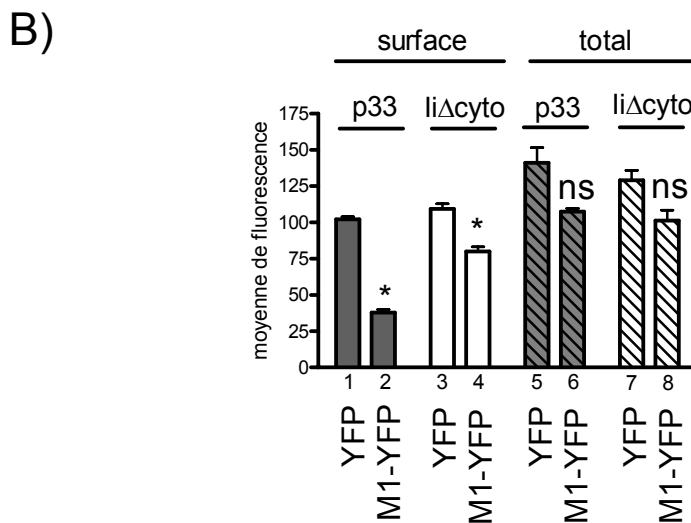
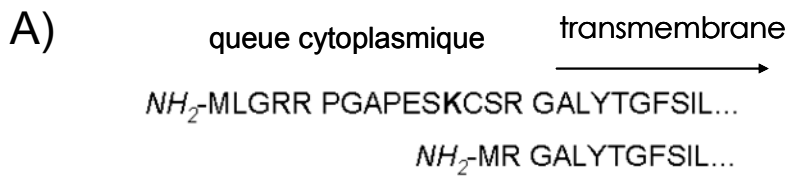


FIGURE 3. 9 La queue cytoplasmique de Ii n'est pas impliquée dans la régulation par MARCH1.

A) Représentation de la construction IiΔcyto versus la version sauvage de l'isoforme p33 de la chaîne invariante. Les cellules HEK293T ont été co-transfectées transitoirement avec p33 ou IiΔcyto et les vecteurs YFP ou M1-YFP. B) L'expression de surface ainsi que l'expression totale (après perméabilisation) de la chaîne invariante dans ces cellules a été déterminée par immunomarquages avec l'anticorps Bu45. Les résultats des tests de *t*-student sont indiquées. Les différences observées entre les transfections YFP vs M1-YFP sont significatives (\*) pour les moyennes des immunomarquages de surface (P=0,0031 pour p33 et P=0,0027 pour IiΔcyto) mais non-significatives (ns) pour les immunomarquages totaux (P=0,1165 pour p33 et P=0,1005 pour IiΔcyto).

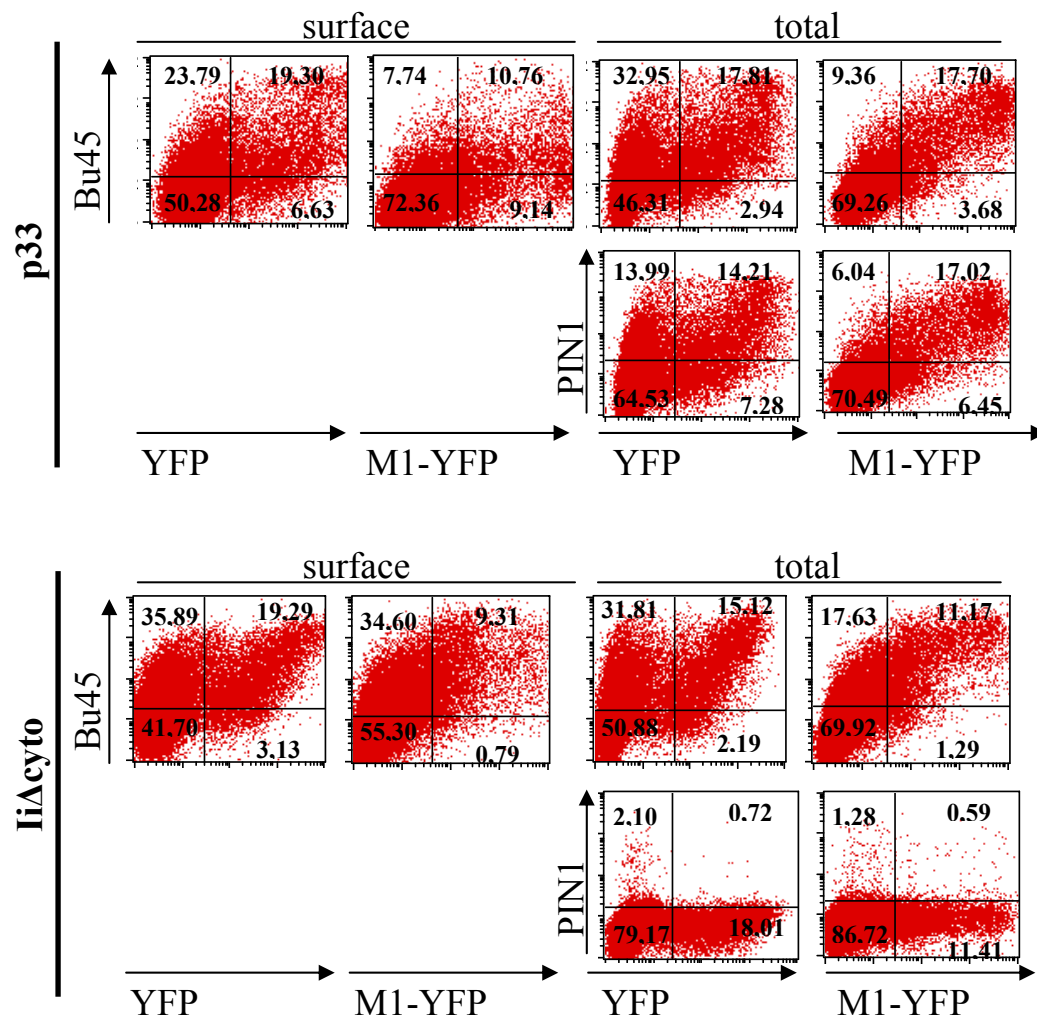


FIGURE 3. 10 La queue cytoplasmique de li n'est pas impliquée dans la régulation par MARCH1 (FACS)

Les résultats originaux de cytométrie de flux des immunomarquages (FL-4) des cellules HEK293T transfectées avec p33 ou li $\Delta$ cyto et YFP ou M1-YFP (FL-1) pour un des triplicata sont représentés ici.

### 3.3.3 CXCR2 N'EST PAS IMPLIQUÉE DANS LA RÉGULATION NÉGATIVE DE Ii33

Comme la queue cytoplasmique de la chaîne invariante ne semble pas être entièrement responsable de la régulation négative, l'hypothèse proposée était qu'une molécule associée à Ii pourrait être ubiquitinée par MARCH1. Cette molécule entraînerait ainsi Ii lors de sa régulation négative. CXCR2 a été le candidat retenu puisque cette molécule fait partie du complexe Ii-CD44 constituant le récepteur de MIF, une cytokine importante dans le processus inflammatoire. CD44 aurait aussi pu être testé. CXCR2 peut aussi à lui seul être un récepteur pour MIF bien que la transmission du signal nécessite la présence de CD44<sup>61, 64</sup>. Comme indiqué à la FIGURE 3.11 A, trois lysines, sites potentiels d'ubiquitination, sont présentes dans la queue cytoplasmiques de CXCR2 mais il n'a cependant jamais été démontré que CXCR2 pouvait être ubiquitiné<sup>84</sup>. De plus, CXCR2 étant un récepteur à trois passages transmembranaires, il possède trois boucles cytoplasmiques dont la deuxième et la troisième contiennent chacune deux lysines (*Source : UniProtKB/Swiss-Protein entrée P25025 – CXCR2\_HUMAN*). Les neutrophiles, les lymphocytes B primaires, mais non les lymphocytes T et B matures expriment CXCR2<sup>209, 210</sup>. Ce récepteur est aussi exprimé à divers niveaux sur les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les mélanomes<sup>211, 212</sup>. Les cellules HEK293 ne sont pas reconnues pour exprimer CXCR2. Le premier élément à vérifier pour valider l'hypothèse était donc l'expression endogène de CXCR2 dans la lignée cellulaire de HEK293T utilisée grâce à un anticorps spécifique  $\alpha$ CXCR2 lors d'immunomarquages de surface ainsi qu'après perméabilisation des cellules. Comme le démontre la FIGURE 3.11 B, les HEK293T utilisées possèdent une faible expression de CXCR2. Comme contrôle pour valider l'efficacité de l'anticorps  $\alpha$ CXCR2, des PBMCs ont été immunomarqués pour leur expression de surface de CXCR2. Dans un cytogramme taille versus granularité, il est possible d'observer deux sous-populations de leucocytes; les monocytes et les lymphocytes matures. En sélectionnant la population de PBMCs correspondant aux lymphocytes matures (c'est-à-dire la population la plus nombreuse et de taille et granularité plus petites que les monocytes, un contrôle négatif est obtenu. Ceci permet d'observer que l'anticorps  $\alpha$ CXCR2 ne produit pas de bruit de fond. La sélection de la population correspondant

aux monocytes représente le contrôle positif. Ainsi, les HEK293T expriment CXCR2 et il se peut que cette molécule soit responsable d'une partie de la régulation négative de la chaîne invariante observée.

A) NPLIYAFIGQKFRHGLLLKILAIHGLISKDSL**PQDSRPSFVGS**SSGHTSTTL

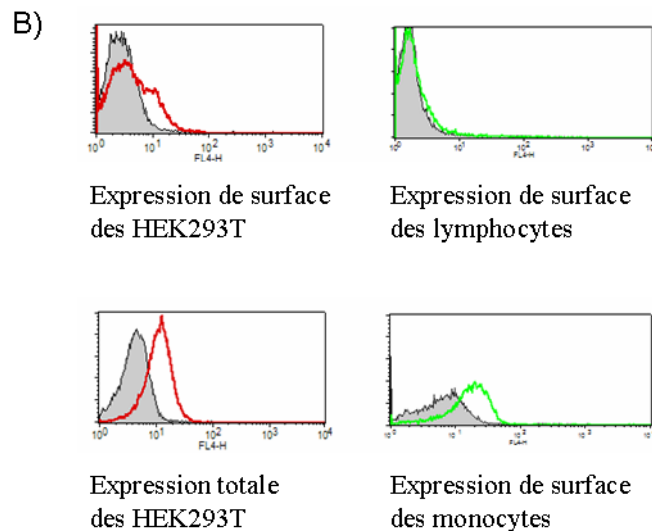


FIGURE 3. 11 Expression endogène de CXCR2 dans les HEK293T

A) Représentation de la queue cytoplasmique de CXCR2<sup>84</sup>. Les 3 lysines sont représentées et la région responsable de l'internalisation par phosphorylation est ombragée. B) Expression endogène en surface et expression totale de CXCR2 dans les HEK293T telle que mesurée avec l'anticorps spécifique  $\alpha$ CXCR2 par immunomarquages de surface ainsi qu'après perméabilisation des cellules. En contrôle, des PBMCs ont été immunomarqués pour l'expression de surface avec le même anticorps. Les sous-populations de lymphocytes et de monocytes ont été sélectionnées et analysées pour leur expression de CXCR2.

Maintenant qu'il était démontré que CXCR2 était exprimé dans les HEK293T, il restait à déterminer si sa présence était responsable de la régulation négative observée pour p33. Puisque l'expression de CXCR2 est faible dans les HEK293T, il fut décidé d'utiliser un ADN de CXCR2 qui serait co-transfecté avec p33 en présence ou en absence de MARCH1. Si l'hypothèse est bonne, la présence d'une plus grande quantité de CXCR2 associée à Ii permettra d'accroître la régulation négative de cette dernière en présence de MARCH1. Ainsi, selon cette hypothèse, une diminution plus importante de l'expression de p33 serait donc observable lors d'une co-transfection

avec CXCR2. Toutefois, il faut garder en tête que ceci dépend aussi de la stoechiométrie et qu'il se peut que li soit déjà saturé en CXCR2. Cependant, vu la très faible quantité de CXCR2 exprimé dans les cellules HEK293T, cette hypothèse mérite d'être testée.

Les transfections transitoires suivantes (avec YFP ou M1-YFP) ont donc été réalisées avec les cellules HEK293T pour observer le phénomène : p33, CXCR2 et p33+CXCR2. Les immunomarquages de la chaîne invariante sur les cellules co-transfectées avec seulement p33 confirment ce qui est observé à la FIGURE 3.12 A. En présence de CXCR2, l'expression de surface de la chaîne invariante diminue toujours (colonne 2) tandis que l'expression totale reste plutôt stable et augmente même quelque peu (colonnes 4 et 6) (FIGURE 3.12 A). Ainsi, la présence de CXCR2 ne provoque pas une augmentation de la régulation négative comme l'hypothèse le suggérait. Plutôt, CXCR2 accorde à p33 une certaine protection contre la dégradation une fois internalisé. Quant à CXCR2 en tant que tel, il peut être régulé négativement à partir de la surface en présence de MARCH1 (colonne 2) et la fraction internalisée semble n'être pas dégradé puisque la quantité totale de CXCR2 augmente (colonne 4) (FIGURE 3.12 B). Cette régulation négative n'est toutefois pas aussi dramatique qu'il aurait été possible de l'imaginer vu la présence des 3 lysines dans la queue cytoplasmique. De plus, la présence de p33 n'affecte pas l'expression de CXCR2; les résultats des immunomarquages CXCR2 sont semblables dans les deux cas; dans le sens où la différence d'expression est semblable. Les moyennes de fluorescence indiquent toutefois qu'il pourrait y avoir une augmentation de l'expression de CXCR2 en présence de p33 (FIGURE 3.12 B). Cependant, nous voulions ici observer l'effet de MARCH1 sur CXCR2 en présence ou absence de p33; il importe donc de regarder la différence d'expression en présence de YFP versus M1-YFP.

En conclusion, CXCR2 ne semble pas être le partenaire de la chaîne invariante initiant la régulation négative, suivi de la dégradation, par MARCH1. CXCR2 conférant même à lip33 une certaine protection contre la dégradation. Cependant, CXCR2 peut être ciblé par MARCH1, ce qui provoque une faible diminution de

l'expression de surface et une augmentation de l'expression totale. Il serait intéressant de refaire cette expérience avec le mutant  $Ii\Delta cyto$  au lieu de p33 pour éliminer l'effet de la queue cytoplasmique de p33 et voir si les résultats seraient différents.

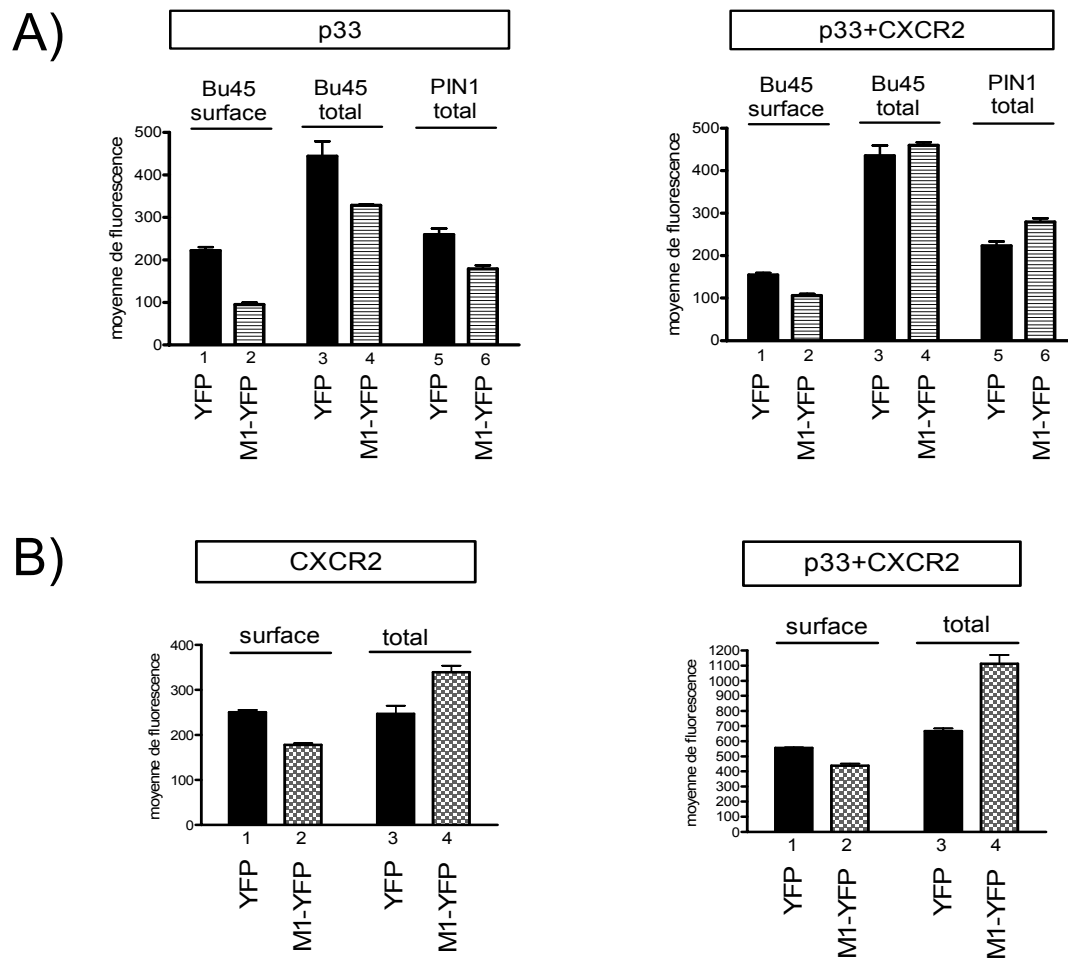


FIGURE 3. 12 CXCR2 n'accentue pas la régulation négative de p33 par MARCH1. Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec p33, CXCR2 et les vecteurs YFP et M1-YFP. L'expression de surface ainsi que l'expression totale (après perméabilisation) de Ii et de CXCR2 a été observée par immunomarquages de A) de Ii avec les anticorps Bu45 et PIN1 et B) de CXCR2 avec l'anticorps  $\alpha$ CXCR2.

Ainsi, CXCR2 n'est pas le partenaire responsable de la régulation négative de la chaîne invariante. Cependant, bien qu'il soit connu que Ii et CXCR2 peuvent former un complexe ceci n'a pas été vérifié dans les HEK293T<sup>63,82</sup>. Il fallait donc confirmer cette interaction dans les cellules utilisées au cours de ces expériences pour s'assurer que les résultats obtenus ne soient pas dus à une absence d'interaction entre Ii et CXCR2 dans ce type cellulaire en particulier. Pour ce faire, une immunoprécipitation  $\alpha$ CXCR2 (colonne 3) suivie d'un immunobuvardage pour la chaîne invariante a été réalisée sur des lysats de cellules HEK293T co-transfectées avec p33 et CXCR2 (FIGURE 3.13).

Une immunoprécipitation contre Ii (Bu45, colonne 2) a servi de contrôle positif tandis que les anticorps isotypiques  $\alpha$ IgG1 (colonne 4) et  $\alpha$ IgG2A (colonne 5) servaient de contrôles négatifs pour les immunoprécipitations Bu45 et  $\alpha$ CXCR2 respectivement. La présence de la chaîne invariante est démontrée lors d'une immunoprécipitation de CXCR2; ce qui apporte la preuve que p33 et CXCR2 interagissent bien ensemble lors de co-transfections dans les cellules utilisées (colonne 3). Ainsi, le fait que la transfection de CXCR2 n'accroît pas la régulation négative de la chaîne invariante n'est pas le résultat d'une absence d'interaction dans les HEK293T.

Il est à noter que cette expérience mérite d'être reproduite en ajoutant certains contrôles tels des contrôles des transfections de la chaîne invariante p33 seule et de CXCR2 seul. De plus, une optimisation de certaines manipulations (telle une incubation avec une quantité différente de l'anticorps Bu45 lors de l'immunoprécipitation) pourrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats. Il aurait aussi été instructif de procéder à un immunobuvardage contre CXCR2. Malheureusement, l'anticorps  $\alpha$ CXCR2 n'est pas utilisable en de telles conditions.

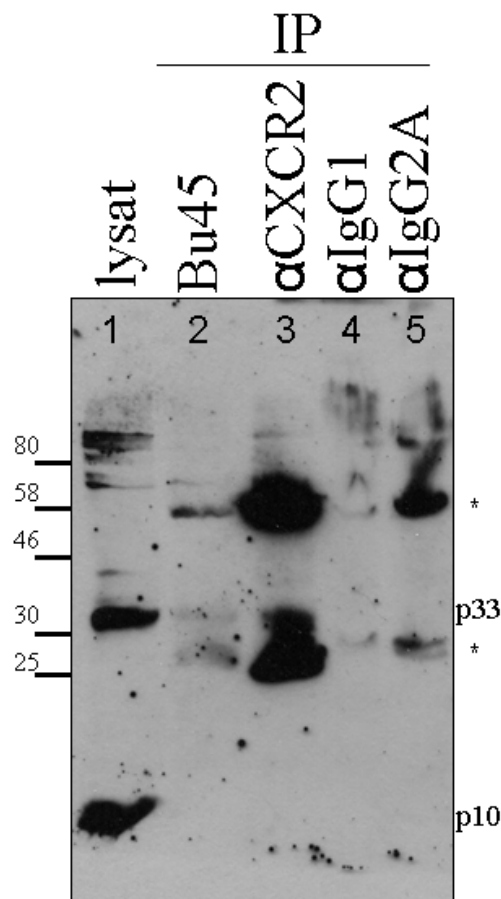


FIGURE 3. 13 Interaction entre Iip33 et CXCR2.

Immunoprécipitation sur des HEK293T co-transfectées transitoirement avec Iip33 et CXCR2 suivi d'un immunobuvardage PIN1. Les (\*) représentent les chaînes lourdes et légères des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation. Un lysat des cellules transfectées a été migré en contrôle (colonne 1). Des immunoprécipitation avec les anticorps Bu45 (colonne 2),  $\alpha$ CXCR2 (colonne 3) et les contrôles isotypiques  $\alpha$ IgG1 (colonne 4) et  $\alpha$ IgG2A (colonne 5) ont été réalisées.

En résumé, la chaîne invariante p33 est régulée négativement en présence de MARCH1, un phénomène pour lequel la queue cytoplasmique de la chaîne invariante n'est pas totalement indispensable. CXCR2, qui interagit avec la chaîne invariante pour former un complexe, semble protéger p33 de la dégradation, mais n'inhibe pas la régulation négative à partir de la surface cellulaire. Ainsi, si un partenaire de p33 est bel et bien touché directement par MARCH1, celui-ci demeure inconnu.



### 3.4 MARCH1 N'AFECTE PAS LE CIBLAGE DE HLA-DO ET HLA-DM

Il est connu que DO et les complexes DO/DM sont régulé négativement dans les lymphocytes B suite à leur activation et leur entrée dans les centres germinatifs<sup>128, 122, 123, 129, 130</sup>. DO possédant une lysine dans la queue cytoplasmique de sa chaîne  $\beta$  (FIGURE 3.14), l'hypothèse proposée est que l'ubiquitination de cette lysine par MARCH1 serait impliquée dans la régulation post-traductionnelle de l'expression de DO dans les lymphocytes B activés.

HLA-DO exerce sa fonction inhibitrice sur HLA-DM et requiert aussi la présence de cette dernière molécule pour sa sortie du RE. De ce fait, DO se retrouve pratiquement toujours en association avec DM<sup>133, 134</sup>. Ainsi, DM joue peut-être un rôle crucial dans la régulation de DO par MARCH. Le rôle de l'ubiquitination dans la régulation de DM, seul ou en association avec DO, sera donc aussi étudié. Cette molécule non-classique de classe II possède une lysine dans la queue cytoplasmique de sa chaîne  $\alpha$  (FIGURE 3.15).

Queue cytoplasmique de HLA-DO  $\alpha$  (241-250)

*C-term* MGTYVSSVPR *N-term*

Queue cytoplasmique de HLA-DO  $\beta$  (246-273)

*C-term* QLRAQ KGYVRTQMSG NEVSRAVLLP QSC *N-term*

FIGURE 3. 14 Séquences des queues cytoplasmiques de HLA-DO $\alpha$  et HLA-DO $\beta$ . Les motifs de ciblage aux lysosomes (tyrosine et di-leucine) de la chaîne DO $\beta$  sont représentés. Source : UniProtKB/Swiss-Protein entrées P06340 (2DOA\_HUMAN) et P13765 (2DOB\_HUMAN)

Queue cytoplasmique de HLA-DM  $\alpha$  (255-261)

*C-term* RKPCSG D *N-term*

Queue cytoplasmique de HLA-DM  $\beta$  (240-263)

*C-term* WRRAGHSSYTP LPGSNYSEGW HIS *N-term*

FIGURE 3. 15 Séquence des queues cytoplasmiques de HLA-DM $\alpha$  et HLA-DM $\beta$ .  
Le motif de ciblage aux endosomes YTPL est représenté. *Source : UniProtKB/Swiss-Protein entrées P28067 (2DMA\_HUMAN) et P28067 (2DMB\_HUMAN)*

#### 3.4.1 MARCH1 N'INDUIT PAS LA RÉGULATION NÉGATIVE DE HLA-DO ET DES COMPLEXES DO/DM

Pour déterminer si le ciblage de DO était affecté par MARCH1, des co-transfections en HEK293T ont été réalisées avec le mutant DO $\alpha$ P11V, la chaîne DO $\beta$  et les vecteurs YFP et M1-YFP. Le mutant DO $\alpha$ P11V est indépendant de DM pour sa sortie du RE et est aussi exprimé à la surface cellulaire contrairement à DO sauvage<sup>126</sup>. Ainsi, si DO est directement ciblé par MARCH1, il sera possible d'observer une diminution de l'expression de ce mutant. De plus, même si une dégradation de DO n'est pas induite par MARCH1, il pourrait tout de même être possible d'observer une diminution de l'expression de surface seulement. En parallèle, une chaîne DO $\beta$  dont la lysine de la queue cytoplasmique a été mutée en une alanine (vecteur pCDNA<sub>3.1</sub>-DO $\beta$ K) a aussi été utilisée. Ceci permettra, dans le cas où il y aurait une régulation négative de DO, d'observer si la lysine de la queue cytoplasmique a un rôle à jouer.

Dans le cadre de l'utilisation du mutant DO $\alpha$ P11V, la molécule HLA-DO (DO) est régulée négativement à partir de la surface cellulaire ce qui semble résulter en une rétention intracellulaire de DO puisque la quantité totale de DO est augmentée (FIGURE 3.17 A). En effet, l'immunomarquage Mags.DO sur les cellules non perméabilisées permet d'observer une diminution statistiquement significative de

l'expression de DO à la surface cellulaire (colonne 2). Les immunomarquages Mags.DO et HKC5, ce dernier anticorps étant dirigé contre la queue cytoplasmique de DO<sup>207</sup>, des cellules perméabilisées indiquent quant à eux que l'expression totale de DO se trouve augmentée en présence de MARCH1 (colonnes 4 et 6) (FIGURE 3.17 A). Cependant, contrairement à l'hypothèse de départ, le fait de supprimer la lysine dans la queue cytoplasmique de DO $\beta$  n'abolit pas complètement la diminution de l'expression observée en présence de MARCH1 en comparaison avec l'utilisation de la chaîne DO $\beta$  sauvage (FIGURE 3.17 B, colonne 2). La diminution de l'expression de surface de DO est moins importante et toujours statistiquement significative, mais l'augmentation de l'expression totale indique que MARCH1 induit toujours un remaniement de DO (colonnes 4 et 6). L'observation des résultats originaux (FACS) selon le pourcentage de cellules positives corrobore ces observations (FIGURE 3.17). Ainsi, un facteur autre que cette lysine est probablement impliqué dans la régulation négative de DO en présence de MARCH1, bien que la lysine pourrait aussi avoir un rôle à jouer.

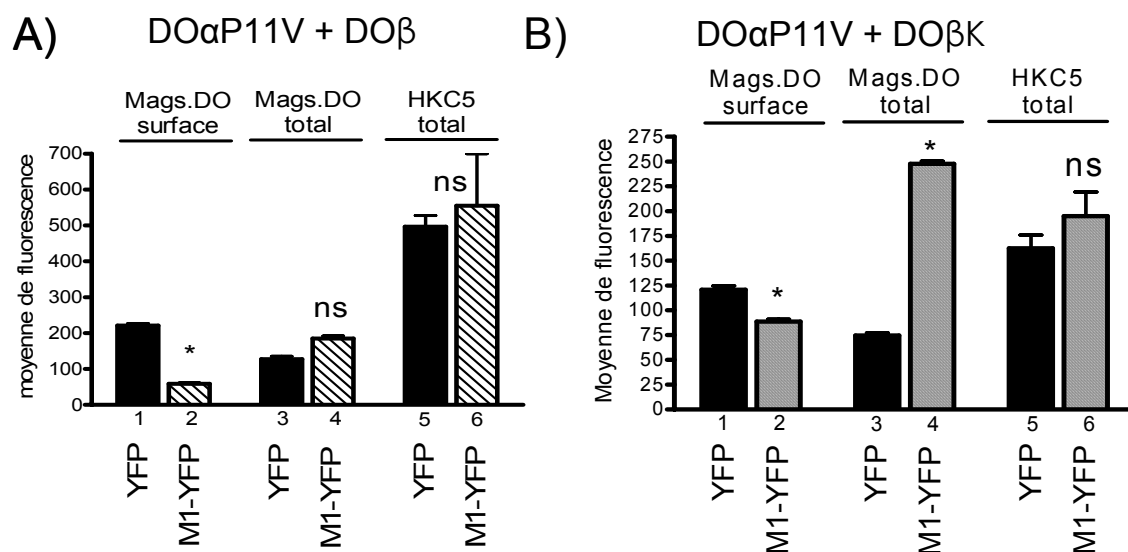


FIGURE 3. 16 MARCH1 cause une régulation négative de surface du mutant DO $\alpha$ P11V-DO $\beta$ . Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec les vecteurs YFP ou M1-YFP, DO $\alpha$ P11V et A) DO $\beta$  ou B) DO $\beta$ K (mutant de la chaîne DO $\beta$  dont la lysine de la queue cytoplasmique a été remplacée par une alanine). L'expression de surface ainsi que l'expression totale (après perméabilisation) a été observée par des immunomarquages contre DO avec les anticorps Mags.DO et HKC5. Ce dernier anticorps n'est utilisé que pour observer l'expression totale puisqu'il cible la queue cytoplasmique de la chaîne DO $\beta$ <sup>207</sup>. Les résultats du test de *t*-student sont indiqués. A) P=0,0008 (colonnes 1 vs 2), P=0,0549 (colonnes 3 vs 4) et P=0,7443 (colonnes 5 vs 6). B) P=0,0042 (colonnes 1 vs 2), P=0,0003 (colonnes 3 vs 4) et P=0,1373 (colonnes 5 vs 6).

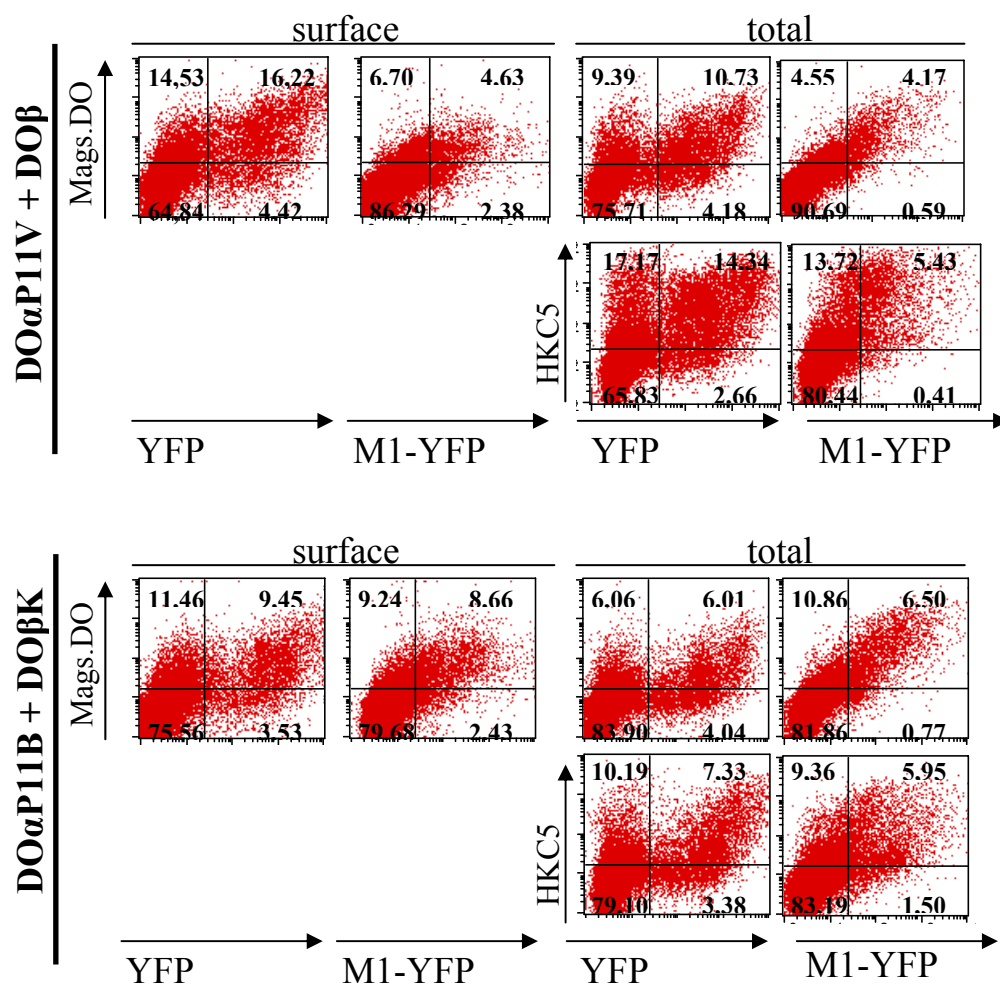


FIGURE 3. 17 MARCH1 cause une régulation négative de surface du mutant DO $\alpha$ P11V-Do $\beta$  (FACS) Les résultats originaux de cytométrie de flux des immunomarquages (FL-4) des cellules HEK293T transfectées avec DO $\alpha$ P11V et DO $\beta$  ou DO $\beta$ k; avec YFP ou M1-YFP (FL-1) pour un des triplicata sont représentés ici.

Par contre, en conditions physiologiques, DO n'est pas exprimé à la surface et n'est pratiquement pas retrouvé en association avec DM à l'extérieur du RE<sup>134</sup>. De plus, il est connu que les complexes DO/DM sont régulés négativement lors de la maturation des lymphocytes B et il serait donc intéressant d'observer si ces complexes peuvent être ciblés par MARCH1<sup>123, 130</sup>. Pour reproduire ces conditions, les cellules HEK293T ont été co-transfectés avec DO et DM ainsi que YFP ou M1-YFP. Des immunomarquages après perméabilisation des cellules ont permis de déterminer

l'expression de DO (FIGURE 3.18 B et C) et de DM (FIGURE 3.18 A). L'expression de surface des molécules n'était pas ici observée puisque les complexes DO/DM ne sont pas exprimés à la surface cellulaire.

Cependant, contrairement à l'hypothèse de départ, la présence de MARCH1 n'affecte pas outre mesure l'expression de DO ni celle de DM dans les cellules transfectées. De plus, la suppression de la lysine de la queue cytoplasmique de DO $\beta$  n'entraîne aucun changement. Ceci n'est toutefois pas un fait important ici puisque MARCH1 n'affecte pas l'expression des molécules étudiées, contrairement à l'expression de surface du mutant DO $\alpha$ P11V dans les cellules transfectées.

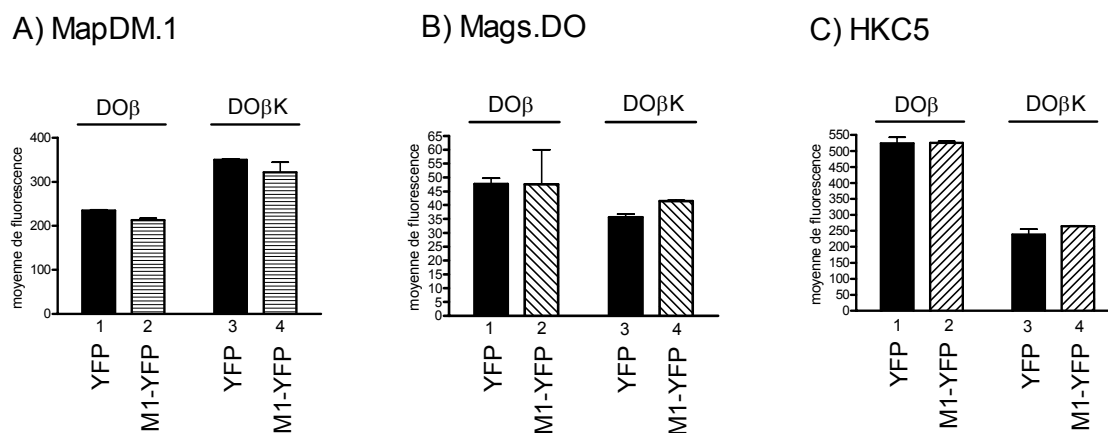


FIGURE 3. 18 MARCH1 n'affecte pas l'expression des complexes DO/DM.

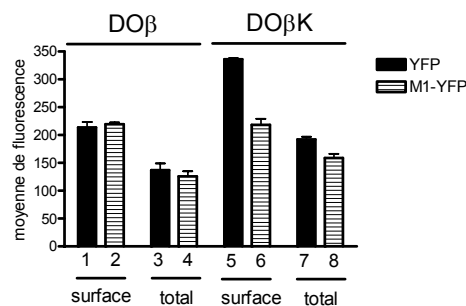
Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec les vecteurs YFP ou M1-YFP, DO $\alpha$ , DO $\beta$  ou DO $\beta$ K (mutant de la chaîne DO $\beta$  dont la lysine de la queue cytoplasmique a été remplacée par une alanine) et DM. L'expression totale (après perméabilisation) a été observée par des immunomarquages contre DM avec l'anticorps A) MapDM.1 et contre DO avec les anticorps B) Mags.DO et C) HKC5.

Par la suite, la même expérience a été répétée dans les mêmes conditions, mais avec le mutant DMY (FIGURE 3.19). Le mutant DMY comporte une mutation du motif de ciblage aux endosomes YTPL de sa queue cytoplasmique DM $\beta$  (YTPL $\rightarrow$ ATPL)<sup>109, 125</sup>. Cette mutation confère à DM la capacité d'être exprimé à la surface cellulaire. Ainsi, dans ce contexte, les complexes DO/DMY seront détectés à la surface et, si

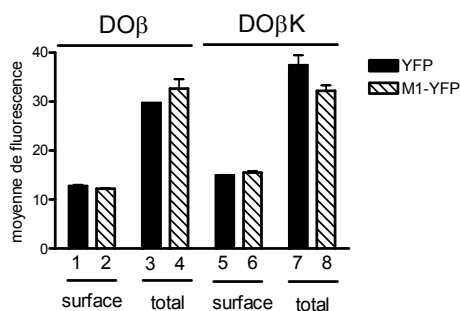
MARCH1 peut réguler négativement ces complexes à partir de la surface, ce système permettra d'observer le phénomène.

Ainsi, les complexes DO/DMY ne sont pas affectés par MARCH1, l'expression de surface de même que l'expression totale telle que mesurée par immunomarquages de cellules HEK293T co-transfectées avec DO $\alpha$ , DO $\beta$  ou DO $\beta$ K, DMY et les vecteurs YFP ou M1-YFP avant et après perméabilisation, respectivement, reste relativement stable (FIGURE 3.19 A, B et C). De plus, tout comme précédemment, l'utilisation de la chaîne DO $\beta$ K dont la lysine est mutée en une alanine n'induit pas de changements majeurs. Certaines différences d'expression sont toutefois observables. Par exemple, la diminution de l'expression de surface de DM en présence de MARCH1 dans la transfection avec DO $\beta$ K (colonne 6) n'est pas reflétée par une augmentation de l'expression totale (colonne 8) (FIGURE 3.19 A). Il se pourrait que cela soit dû au fait que la quantité totale de DMY reste stable malgré une diminution de l'expression de surface. Cependant, rien ne semble pouvoir expliquer hors de tout doute cette baisse en surface. Quant aux immunomarquages totaux avec Mags.DO, la différence d'expression observée en présence de MARCH1 est faible si on prend en considération les valeurs des moyennes de fluorescence (colonnes 3 et 4 versus colonnes 7 et 8) (FIGURE 3.19 B). La différence d'expression observée entre les transfections avec DO $\beta$  et DO $\beta$ K lors des immunomarquages HKC5 est peut-être due à une particularité de l'anticorps (colonnes 1 et 2 versus colonnes 3 et 4) (FIGURE 3.19 C). En effet, HKC5 reconnaît la queue cytoplasmique de DO et il se pourrait que la queue cytoplasmique mutée pour la lysine soit moins bien reconnue que la queue cytoplasmique sauvage. Cependant, ces différences d'expressions ne présentent pas une tendance claire et ne semblent pas concluantes. Ainsi, il est possible de conclure que MARCH1 n'affecte pas, du moins de façon majeure, l'expression des complexes DO/DMY.

## A) MapDM.1



## B) Mags.DO



## C) HKC5

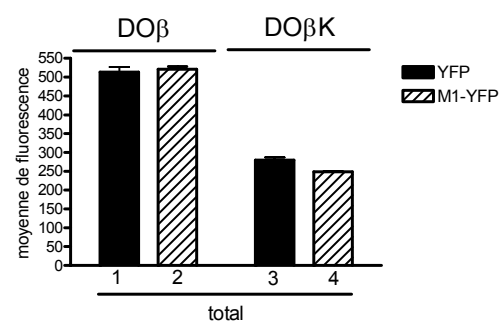


FIGURE 3. 19 MARCH1 n'affecte pas l'expression des complexes DO/DMY. Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec les vecteurs YFP ou M1-YFP, DO $\alpha$ , DO $\beta$  ou DO $\beta$ K (mutant de la chaîne DO $\beta$  dont la lysine de la queue cytoplasmique a été remplacée par une alanine) et DMY. L'expression totale (après perméabilisation) a été observée par des immunomarquages contre DO avec A) l'anticorps MapDM.1 et les anticorps B) Mags.DO et C) HKC5.

Même si les complexes DO/DM ne sont pas visés par MARCH1, il s'avère tout de même que DO seul puisse l'être puisque l'expression du mutant DO $\alpha$ P11V est affectée. Ainsi, il semblerait que MARCH1 puisse cibler DO mais que DM confère une protection à DO. Pour cette raison, l'interaction entre DO et MARCH1 a été vérifiée dans le contexte DO/DM. Ce contexte fut choisi puisqu'il s'agit de celui qui se rapproche le plus des conditions *in vivo*. Il est à noter qu'une possibilité est que DM pourrait empêcher MARCH1 de se lier à DO. Il serait donc aussi intéressant de tester l'effet de MARCH1 sur DO seul. Dans le cas des complexes DO/DM, l'hypothèse ici est que MARCH1 est capable d'interagir avec DO mais que la régulation négative est bloquée par la présence de DM. Des cellules HEK293T ont

été co-transfectés avec DO $\alpha$ , DO $\beta$ , DM et les vecteurs YFP (colonne 2), M8 $\Delta$ RING-YFP (colonne 3) ou M1-YFP (colonne 4). Des cellules non-transfectées ont aussi été utilisées en contrôle négatif (colonne 1). Les cellules ont été récupérées 48h après les transfections et une immunoprécipitation pour DO avec l'anticorps Mags.DO fut réalisée sur les lysats cellulaires, ce qui fut suivi d'immunobuvardages contre DO $\beta$  (HKC5) et DM $\beta$  ( $\alpha$ DM $\beta$ ) en contrôle positif pour s'assurer de la présence des complexes DO/DM, de même qu'un immunobuvardage contre YFP ( $\alpha$ YFP). La FIGURE 3.20 indique que DM est bien immunoprécipité avec DO (FIGURE 3.20 B, colonnes 2, 3 et 4) et que M8 $\Delta$ RING-YFP et M1-YFP, mais pas la YFP seule, interagissent avec les complexes DO/DM puisque celles-ci sont détectées après une immunoprécipitation contre DO (FIGURE 3.20 A, colonnes 2, 3 et 4).



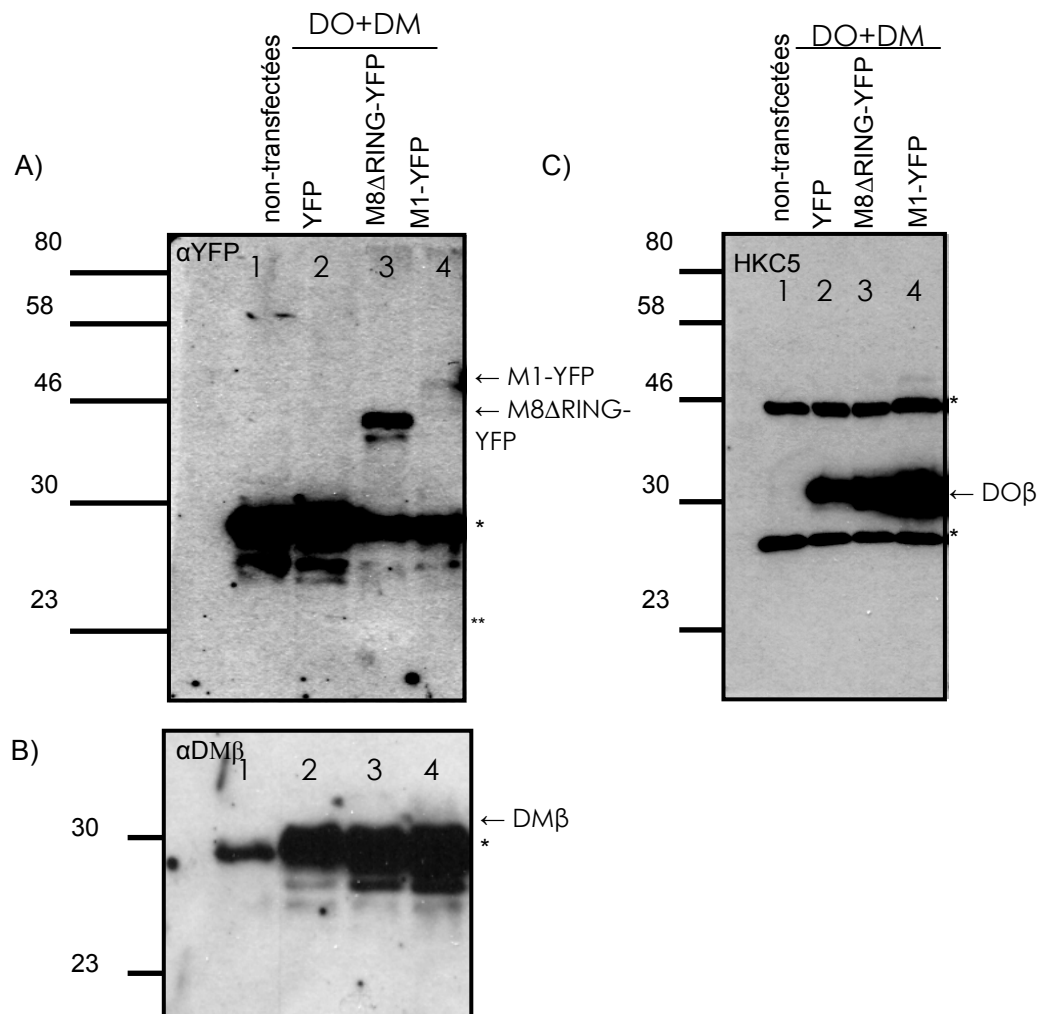


FIGURE 3. 20 Interaction entre DO et MARCH1.

Une immunoprécipitation Mags.DO a été réalisée sur des lysats de cellules HEK293T co-transfectées transitoirement avec DO $\alpha$ , DO $\beta$ , DM et les vecteurs YFP (colonne 2), M8 $\Delta$ RING-YFP (colonne 3) ou M1-YFP (colonne 4). Des cellules non-transfectées sont utilisées en contrôle négatif (colonne 1). Les lysats ont été migrés sur gel en conditions réductrices et des immunobuvardages A)  $\alpha$ YFP, B)  $\alpha$ DM $\beta$  et C) HKC5 ont été réalisés. \* représente les chaînes lourdes ou légères des anticorps ayant servi pour l'immunoprécipitation. Les flèches représentent les molécules visées par l'immunobuvardage en question: M8 $\Delta$ RING-YFP (~44kDa), M1-YFP (54kDa), DM $\beta$  (29kDa) et DO $\beta$  (28kDa).

En conclusion, il semblerait que DO puisse être régulé négativement à partir de la surface cellulaire par MARCH1 mais que la dégradation n'est pas induite (FIGURE 3.16). Cependant, les complexes DO/DM tels que retrouvés en conditions physiologiques ne sont pas ciblés par MARCH1, ce qui indiquerait que MARCH1 n'affecterait pas le ciblage de DO (FIGURE 3.18). MARCH1 peut toutefois interagir avec les complexes DO/DM (FIGURE 3.20). Il est donc possible de penser que DM confère alors à DO une protection contre la régulation négative.

### 3.4.2 MARCH1 N'INDUIT PAS LA RÉGULATION NÉGATIVE DE HLA-DM

S'il a été établi que DM semble protéger DO de la régulation négative, une attention particulière a été tout de même été portée à la molécule DM en tant que telle puisqu'elle est aussi retrouvée seule (sans DO) dans la cellule. De plus, si l'expression de DO est limitée à certains types cellulaires, DM est exprimé dans toutes les cellules présentatrices d'antigènes <sup>107</sup>. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec DM et YFP (colonnes 1 et 3) ou M1-YFP (colonnes 2 et 4) et l'expression de DM en surface ainsi que l'expression totale a été observée par immunomarquages. Tel que démontré à la FIGURE 3.21, l'expression de DM n'est pas affectée (ni augmentée, ni diminuée) par la présence de MARCH1.

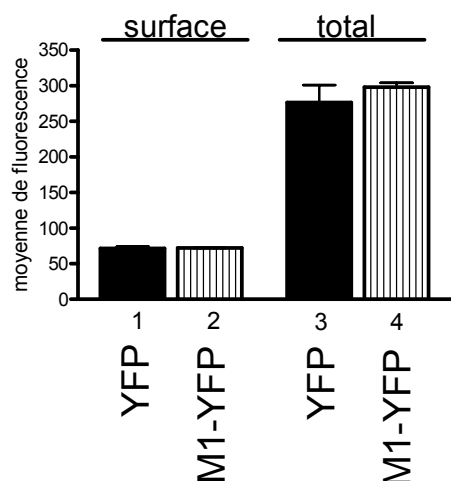


FIGURE 3. 21 MARCH1 n'affecte pas l'expression de DM.

Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec DM et les vecteurs YFP (colonnes 1 et 3) ou M1-YFP (colonnes 2 et 4). L'expression de surface ainsi que l'expression totale (après perméabilisation) a été observée par des immunomarquages MapDM.1.

Cependant, comme déjà mentionné, DM n'est pas fortement exprimé en surface et, pour confirmer l'absence de régulation négative de DM par MARCH1, le mutant DMY, pouvant être exprimé à la surface cellulaire, a été utilisé <sup>125</sup>. Dans cette condition, la présence de MARCH1 ne réussit pas à induire une diminution de l'expression de surface, ni de l'expression totale, de DMY (FIGURE 3.22).

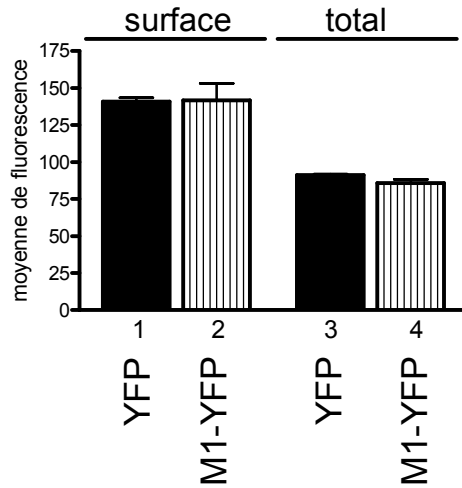


FIGURE 3. 22 MARCH1 n'affecte pas l'expression de DMY.

Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec DMY et les vecteurs YFP (colonnes 1 et 3) ou M1-YFP (colonnes 2 et 4). L'expression de surface ainsi que l'expression totale (après perméabilisation) a été observée par des immunomarquages MapDM.1.

Ainsi, il est possible d'affirmer que le ciblage de DM n'est pas affecté par MARCH1, un résultat conforme à l'hypothèse de départ qui stipulait que DM n'était pas un candidat potentiel à la régulation par les ubiquitines ligases dû l'absence de lysines dans la queue cytoplasmique de sa chaîne  $\beta$ .

### 3.4.3 MARCH1 AFFECTE L'EXPRESSION DE CHIMÈRES DE HLA-DM ET HLA-DR

Pour caractériser l'absence de régulation négative de DM par MARCH1, divers mutants ont été utilisés. Une schématisation des constructions est présentée à la FIGURE 3.23.

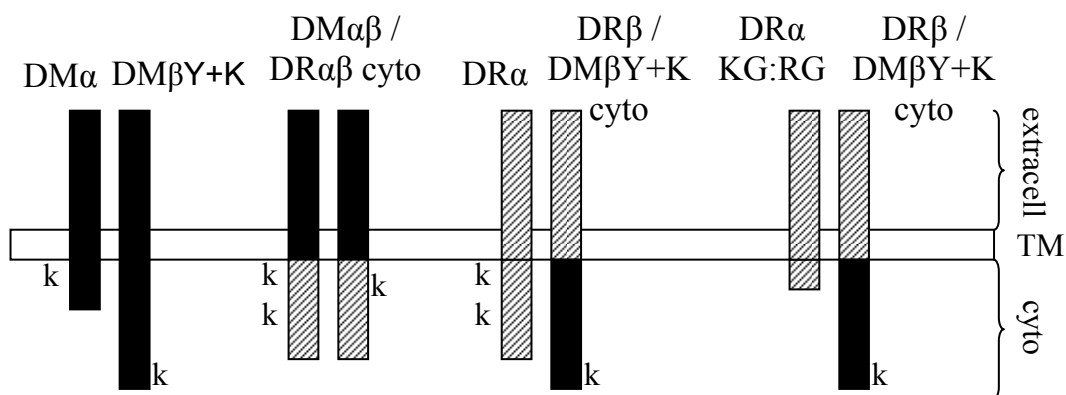


FIGURE 3. 23 Schématisation des mutants de DM et DR utilisés.

Les domaines extracellulaires, transmembranaires (TM) et cytoplasmiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de DR (ligné) et DM (noir) sont représentés pour les 4 mutants utilisés. Les sections en noir représentent DM tandis que les sections hachurées sont celles référant à DR. La lysine de la queue cytoplasmique DM $\alpha$  est située en position 256, soit au tout début de la courte queue cytoplasmique de DM $\alpha$  (7 acides aminés). Le mutant DM $\beta$ Y+K implique l'introduction d'un codon stop à la fin de la queue cytoplasmique sauvage de DM $\beta$ ; produisant une queue cytoplasmique plus longue contenant une lysine. Les lysines de la queue cytoplasmique de DR $\alpha$  sont situées en position 240 et 244 tandis que la lysine de la chaîne DR $\beta$  est située en position 254.

Tout d'abord, la question à savoir si la régulation négative de DM n'était que le résultat de l'absence de lysine dans la queue cytoplasmique DM $\beta$  s'est posée (la séquence de la queue cytoplasmique de DM $\beta$  est représentée à la FIGURE 3.15). Pour répondre à cette question, le mutant DM $\beta$ Y+K a été utilisé. Ce mutant comprend un changement de cadre de lecture produisant une queue cytoplasmique plus longue suivant la mutation du motif de ciblage aux endosomes YTPL en ATPL sur la chaîne  $\beta$ . Dans cette queue cytoplasmique allongée, une lysine est présente. Ainsi, si MARCH1 peut interagir avec DM mais que l'ubiquitination n'est bloquée que par l'absence de lysine, une diminution de l'expression de surface de ce mutant sera observable. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les mutants DM $\beta$ Y ou DM $\beta$ Y+K avec YFP ou M1-YFP et immunomarquées pour l'expression de surface

ainsi que pour l'expression totale de DM. Il s'est avéré que MARCH1 ne semble pas interagir avec DM puisque l'expression de DMY+K n'est pas affecté par l'ajout d'une lysine en comparaison avec DMY en présence de MARCH1 (FIGURE 3.24 A).

S'il est connu que MARCH1 ubiquitine DR, la partie de DR interagissant avec MARCH1 n'est pas connue. Puisque que les derniers résultats indiquaient que DM n'était pas ubiquitiné par MARCH1, des molécules chimériques DM/DR disponibles ont été testées pour observer si la régulation négative pouvait être induite en introduisant des sections de la molécule DR dans DM. Tout d'abord, l'expression de la chimère DM/DRcyto a été comparée à l'expression de DM sauvage en présence de MARCH1. Cette chimère est identique à la molécule DM sauvage sauf pour les 2 queues cytoplasmiques qui ont été remplacées par celles de DR. Tout comme pour l'utilisation de DM sauvage à la FIGURE 3.21, l'expression de surface sera ici marginale. Cependant, la chimère DM/DRcyto est exprimée à la surface cellulaire comme l'indique la FIGURE 3.24 B (colonnes 5 et 6), bien que cette expression ne soit pas très élevée. De plus, l'expression totale de la chimère n'est pas très élevée non plus (colonnes 7 et 8) et il se peut que ceci ne soit dû qu'à une faible efficacité de transfection de ce vecteur ou bien à une dégradation rapide. Ainsi, l'expression de la chimère DM/DRcyto à la surface cellulaire est diminuée en présence de MARCH1 (colonne 6) tandis que l'expression totale reste stable (colonne 8). Ceci indique donc que MARCH1 interagit avec le domaine cytoplasmique de DR avant d'ubiquitiner la lysine de DR $\beta$ , ce qui implique que DM n'est pas reconnu par MARCH1 et expliquerait pourquoi, même avec la présence d'une lysine dans la queue cytoplasmique, MARCH1 ne provoque pas l'ubiquitination de DM. DR serait normalement dégradé suite à son ubiquitination par MARCH1<sup>24</sup>, un phénomène qui n'est pas observé ici. Par contre, des données récentes indiquent que ceci pourrait ne pas être le cas, du moins dans les types cellulaires HEK293T, où, contrairement aux cellules de type HeLa, l'expression totale de DR ne semble pas réduite en présence de MARCH8 (*données non publiées*). L'expression des chimères était mesurée par immunomarquages avec l'anticorps MapDM.1 des cellules transfectées puisque cet anticorps reconnaît un épitope indépendant du domaine cytoplasmique<sup>206</sup>.

L'autre chimère testée consiste en la chaîne DR $\beta$  dont la queue cytoplasmique a été remplacée par celle de DM $\beta$ Y+K, c'est-à-dire la queue cytoplasmique de la chaîne DM $\beta$  comprenant la mutation du motif de ciblage aux endosomes ainsi que la queue allongée avec la lysine<sup>125</sup>. Le vecteur de cette chimère (DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K) est co-transfecté en présence d'une chaîne  $\alpha$ . Donc, la chaîne DR $\alpha$  sauvage a été co-transfectée avec cette chimère. L'expression de surface était alors comparée à celle de la molécule DR sauvage; obtenue par co-transfection des chaînes DR $\alpha$  et DR $\beta$ . Ainsi, il s'avère que, tout comme DR, l'expression de surface de la chimère est diminuée en présence de MARCH1 (FIGURE 3.24 C, colonne 4). Cette expression était mesurée par immunomarquages avec l'anticorps XD5 des cellules transfectées qui reconnaît un épitope situé dans le domaine extracytoplasmique de la chaîne DR $\beta$ <sup>208</sup>. La première hypothèse pour expliquer ce résultat était que, dans le cas de la transfection de la chaîne DR $\alpha$  avec la chimère DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K, il s'agissait plutôt de la queue cytoplasmique de la chaîne  $\alpha$ , possédant 2 lysines, qui était ubiquitinée par MARCH1. Par conséquent, ceci régulerait négativement l'expression du mutant de DR tel que mesurée avec l'anticorps XD5. En effet, il est connu que, si la chaîne  $\beta$  de DR n'est pas disponible pour l'ubiquitination, la chaîne  $\alpha$  peut prendre le relais (*données non publiées*). L'utilisation de la chaîne DR $\alpha$ KG:RG (sans lysines) en co-transfection avec DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K abolirait la régulation négative. En effet, ce mutant de la chaîne  $\alpha$  de DR comprend une mutation de la première lysine pour une arginine suivie immédiatement d'un codon stop éliminant la présence de la deuxième lysine. La chimère DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K a été co-transfectée en HEK293T avec la chaîne DR $\alpha$  ou DR $\alpha$ KG:RG et YFP ou M1-YFP pour observer si l'ubiquitination de la chaîne DR $\alpha$  est responsable de la diminution de l'expression de la chimère. Cependant, ceci n'est pas le cas puisqu'une diminution de l'expression de surface de la chimère est toujours observable avec la chaîne DR $\alpha$  ne comprenant pas de lysines, bien que cette diminution semble plus faible lors de l'utilisation de la chaîne  $\alpha$  sans lysines (FIGURE 3.25, colonnes 2 et 4)). Ainsi, bien que le facteur de diminution de l'expression de la chimère soit moins important, l'effet de MARCH1 n'est tout de même pas aboli ce qui indique l'ubiquitination de la chaîne  $\alpha$  ne peut pas expliquer totalement le phénomène observé.

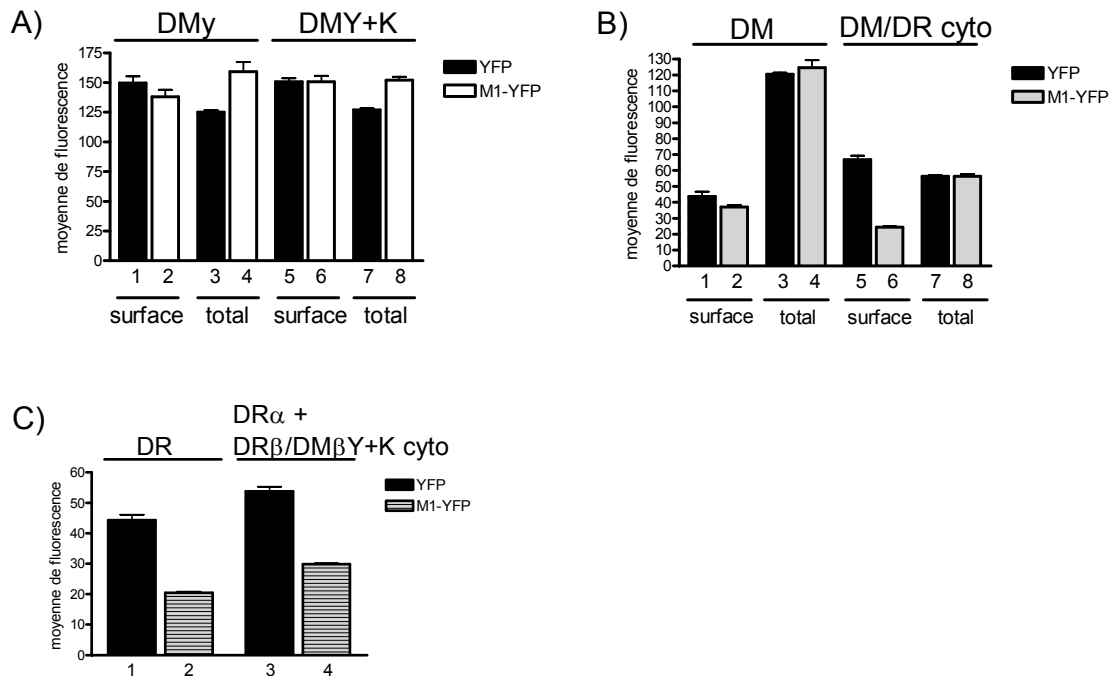


FIGURE 3. 24 MARCH1 peut réguler négativement des chimères de DM et DR  
 Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec DMY, DMY+K, DM, DM/DRcyto, DR $\alpha$ , DR $\beta$  et DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K tel qu'indiqué ainsi que les vecteurs YFP ou M1-YFP. L'expression de surface ainsi que l'expression totale (après perméabilisation) ont été observées par des immunomarquages MapDM.1. pour A) et B) et par immunomarquages XD5 pour C).

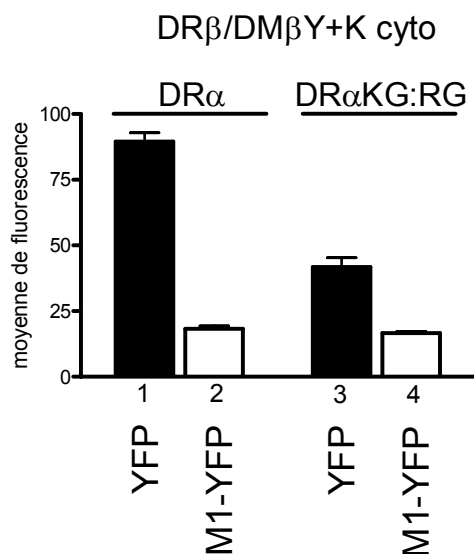


FIGURE 3. 25 La chaîne DR $\alpha$  n'est pas ubiquitinée par MARCH1 lors de l'utilisation du mutant DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K cyto  
 Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement avec DR $\alpha$  et la chimère DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K ou le mutant DR $\alpha$ KG:RG (sans les lysines de la queue cytoplasmique) et DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K ainsi que les vecteurs YFP ou M1-YFP. L'expression de surface a été observée par des immunomarquages XD5.

En conclusion, MARCH1 et MARCH8 n'induisent pas la régulation négative de DM même en présence d'une lysine dans la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$ , ce qui laisse supposer que DM n'est pas reconnu par l'ubiquitine ligase. De plus, les résultats obtenus avec les molécules chimériques, laissent présager que MARCH1 interagirait avec la queue cytoplasmique de DR. Ceci sera élaboré dans la discussion.



## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les molécules Ii, DO et DM jouent un rôle indispensable au niveau de la présentation des antigènes. L'ubiquitine ligase MARCH1, dont l'expression est principalement restreinte aux lymphocytes B avant leur entrée dans les centres germinatifs, est responsable de la régulation négative des molécules du CMH de classe II dans les monocytes<sup>27</sup>. Le but global de ce projet était d'étudier la régulation post-traductionnelle des chaperons de la présentation antigénique en lien avec MARCH1.

#### 4.1 EFFET GÉNÉRAL DE MARCH1 SUR LES CELLULES EXPRIMANT CIITA

Une faible diminution de l'expression de surface de Ii, DO et DM est observée dans des cellules transfectées de façon stable avec CIITA tandis que la diminution semble plus importante lorsque les protéines totales sont observées. L'expression de DR est aussi diminuée; il est connu que MARCH1 ubiquitine DR ce qui mène à sa régulation négative à partir de la surface<sup>26</sup>, mais pas nécessairement à sa dégradation, du moins dans les cellules de type HEK293 (*données non publiées*). Ce dernier fait est corroboré par le test de *t*-student qui indique que la diminution de l'expression totale de DR n'est pas significative dans les cellules HEK293 CIITA mais l'est dans les cellules HeLa CIITA/DO (FIGURES 3.3 et 3.5). Cette diminution est-elle le résultat d'une ubiquitination directe par MARCH1 ou un effet indirect dû à la diminution de l'expression de DR? La chaîne invariante, DO et DM possédant tous au moins une lysine dans une de leurs queues cytoplasmiques, l'ubiquitination directe reste une hypothèse plausible. Cependant, avec la disparition de DR, il est possible de penser que l'utilité de la chaîne invariante s'en trouverait fortement, quoique pas complètement, diminuée. Le même raisonnement s'applique pour DO et DM.

Une observation intéressante est que l'expression totale des complexes DR/CLIP détectés avec l'anticorps CerCLIP.1 augmente légèrement en présence de MARCH1 dans les cellules HEK293 CIITA (après une étude statistique, il a toutefois été déterminé que cette différence n'était pas significative) (FIGURE 3.3). Ces complexes représentent les molécules classiques du CMH de classe II possédant encore le fragment CLIP après la dégradation de la chaîne invariante dans les endosomes, avant que ce fragment ne soit échangé contre un peptide antigénique par

l'action de DM. Cependant, pour les cellules HeLa CIITA/DO, il ne semble pas y avoir de variation. Par contre, il est à noter qu'il n'est pas tout à fait juste de comparer les résultats obtenus pour les cellules HEK293 CIITA et HeLaCIITA/DO. En effet, pour être plus représentatif, il aurait fallu utiliser des cellules HeLaCIITA au lieu des HeLaCIITA/DO. En présence de DM, il est attendu que le niveau de complexe DR/CLIP soit assez bas (ce qui est observé ici) puisque DM permettra l'échange du CLIP contre un peptide antigénique. Avec MARCH1, une diminution de DM est observée ce qui résulte peut-être en une accumulation des complexes DR/CLIP. Une augmentation de DO aurait pu expliquer cette augmentation de DR/CLIP puisque ceci résulterait en une inhibition de la fonction de DM. Cependant, ce n'est pas le cas ici puisque l'expression de DO suit celle de DM en présence de MARCH1.

Ainsi, il y a une diminution de l'expression des molécules chaperones de la présentation antigénique en présence de MARCH1 dans les cellules exprimant le transactivateur CIITA. Pour vérifier si MARCH1 peut cibler précisément Ii, DO ou DM, des cellules n'exprimant que ces molécules par technique de co-transfection en HEK293T ont été utilisées.

#### 4.2 RÉGULATION DE LA CHAÎNE INVARIANTE PAR MARCH1

Les résultats indiquent que la chaîne invariante p33 est internalisée et dégradée en présence de MARCH1, de même qu'en présence de MARCH8 (FIGURE 3.7). Il est possible de critiquer l'hypothèse de la dégradation en mentionnant les particularités des anticorps utilisés. L'épitope reconnu par Bu45 est détruit suite à l'entrée de Ii dans les endosomes; ne permettant pas une bonne vue d'ensemble de l'expression intracellulaire de Ii. Quant à PIN1, cet anticorps reconnaît la queue cytoplasmique de Ii humain, mais est peut-être moins efficace lorsque la queue est masquée ou ubiquitinée, ceci n'a jamais été examiné. Il serait intéressant de vérifier à quelle étape Ii est dégradé en utilisant des inhibiteurs de la dégradation protéosomale et lysosomale. De plus, une expérience à faire serait de co-transfecter p33 avec DR pour vérifier si MARCH à une incidence particulière sur les complexes DR/Ii (immunomarquages Bu45, PIN1 et CerCLIP.1). Un mutant de DR sans les lysines

des queues cytoplasmiques (une sur DR $\beta$  et deux sur DR $\alpha$ ) pourra aussi être utilisé pour éliminer l'importance de la régulation négative directe de DR dans les complexes DR/Ii (FIGURE 4.1). Iip35 devrait aussi être analysé avec DR puisque, seul, p35 ne peut sortir du RE. Il est probable que les résultats divergent puisque les complexes DR/p33 et DR/p35 n'emprunteraient pas exactement les mêmes voies cellulaires<sup>68</sup>. Il serait aussi possible d'utiliser le mutant p35LI/ML; un mutant dont le signal di-leucine pour le ciblage aux endosomes à été muté. L'expression de ce mutant provoque une accumulation de complexes DR/p35 à la surface cellulaire et, en le co-exprimant avec MARCH1, une régulation négative de l'expression de surface pourrait être observée si les complexes DR/p35 sont ciblés.

Queue cytoplasmique de HLA-DR  $\alpha$  (240-254)

C-term **K** GVR**K**SNAAEER RGPL N-term

Queue cytoplasmique de HLA-DR  $\beta$  (251-266)

C-term RNQ**K**GHSGQLQ PTGFSL N-term

FIGURE 4. 1 Séquences des queues cytoplasmiques de HLA-DR $\alpha$  et HLA-DR $\beta$   
 Source : UniProtKB/Swiss-Protein entrées P04229 (2B11\_HUMAN) et P01903 (2DRA\_HUMAN)

MARCH1 et MARCH8 ne sont pas les seules ubiquitines ligases de leur famille à avoir un effet sur l'expression de p33 (FIGURE 3.8). Ce qui ressort principalement de cette expérience est l'effet drastique des homologues MARCH4 et MARCH9 qui éliminent pratiquement entièrement p33 de la surface cellulaire qui semble de plus être complètement dégradée. Pour confirmer l'effet de ces MARCHs sur p33, des traitements des HEK293T transfectées avec des inhibiteurs de la dégradation lysosomale ou protéosomale n'arrivaient pas à arrêter la dégradation de p33 telle que vérifiée par cytométrie de flux et immunobuvardage (*données non montrées*). Les inhibiteurs utilisés étaient la leupeptine (inhibiteur de l'action de la cathepsine B), le chlorure d'ammonium (inhibiteur de la fusion phago-lysosomes) ou le MG132

(inhibiteur du protéasome). MARCH4 et MARCH9 sont principalement connues pour permettre l'ubiquitination des molécules du CMH de classe I (suivi de sa dégradation lysosomale) ainsi que du récepteur CD4<sup>180</sup>. Un immunomarquage du CMH de classe I (avec l'anticorps W6-32) sur les HEK293T montrait une très faible baisse en surface en présence de MARCH4 et MARCH9 (*données non montrées*). Cependant, il a été suggéré que MARCH4 et MARCH9 nécessitent la présence de stimuli extérieurs pour activer leur capacité à réguler le CMH de classe I<sup>180</sup>. Comme les MARCHs utilisées ne sont pas couplées à une molécule détectable, la YFP par exemple, la mesure du CMH de classe I était le seul contrôle possible pour établir leur expression. Les vecteurs sont de même bel et bien exprimés vu le déclin de l'expression de p33. La co-transfection de MARCH4 et MARCH9 avec d'autres molécules a toutefois suggéré que le phénomène est non-spécifique. En effet, la YFP seule s'est aussi trouvée radicalement diminuée en présence de MARCH4 et MARCH9 (*données non montrées*). Il a déjà été observé par le passé que la survie des cellules était affectée lors de la transfection des ubiquitines ligases MARCH4 et MARCH9 (*données non publiées*). Dans les conditions testées ici, la transfection d'une grande quantité d'ADN semblait effectivement affecter la survie des cellules, particulièrement dans le cas de MARCH4 (*données non montrées*). Ainsi, MARCH4 et MARCH9 affecteraient un événement de la transcription ou de la traduction puisque les molécules co-transfectées ne semblent même pas être exprimées. L'expression des molécules testées était régie par plusieurs promoteurs différents (CMV, RSV) et, donc, ceci ne serait pas dû à une inhibition spécifique d'un promoteur donné. MARCH4 et MARCH9 sont localisés aux membranes du golgi et du *trans*-golgi, respectivement<sup>180</sup>. Il serait donc possible que les molécules transcrites dans le RE soient ubiquitinées immédiatement en atteignant l'appareil de golgi et dégradées peu après. Ceci serait un procédé extrêmement efficace vu l'impressionnante régulation négative des molécules transfectées. Cependant, en cellules stables (HEK293 CIITA), ce ne sont pas toutes les molécules qui sont régulées négativement suite à la transfection de MARCH4 ou MARCH9. Le CMH de classe I diminue bel et bien en surface, tout comme Ii (Bu45) et DR (XD5) tandis que l'expression totale de DM (MapDM.1) et Ii (PIN1 et Bu45) n'est pas affectée. De

plus, les diminutions en surface ne sont pas aussi importantes qu'en HEK293T (*données non montrées*). Il est possible de penser que si MARCH4 et MARCH9 affectaient l'expression de ces molécules de façon post-traductionnelle, leur expression serait aussi fortement régulée négativement dans des cellules stables, ce qui n'est pas observé ici.

Un groupe s'était déjà intéressé à la régulation négative de diverses molécules du système immunitaire par les MARCH<sup>180</sup>. Dans leur expérimentation, les molécules HLA2.1 et CD4 étaient régulées négativement à partir de la surface par MARCH4 et MARCH9 tandis que Fas et TfR n'étaient pas touchées. L'expression de Fas et TfR était endogène tandis que HLA2.1 et CD4 étaient transfectées<sup>180</sup>. De plus, bien que les molécules B7.1 et B7.2 ont été toutes deux transfectées, seule l'expression de B7.2 est légèrement diminuée par MARCH4. Ceci indique que l'effet n'est pas le résultat de la transfection puisque, ici, MARCH4 ne diminue pas l'expression du récepteur B7.1 bien qu'il soit transfecté. Cependant, les cellules utilisées étaient des HeLa et non des HEK293T et il est donc possible que ces différences soient dues à ces deux types cellulaires.

Ces résultats obtenus pour MARCH4 et MARCH9 sont très intéressants et intrigants. Des études plus poussées en ce sens sont nécessaires pour évaluer le rôle de ces ubiquitines ligases.

Les homologues MARCH2 et MARCH3 sont sensiblement localisés dans les mêmes compartiments, les endosomes, et peuvent dimériser (TABLEAU 1.2). Ils joueraient surtout un rôle dans le transport vésiculaire au niveau des endosomes, particulièrement par rapport au recyclage des molécules<sup>191</sup>. Bien que MARCH3 affecte l'internalisation de la transferrine, ceci ne serait pas dû à une atteinte directe de son récepteur (TfR); contrairement à MARCH2 qui régule négativement l'expression de surface du TfR<sup>180, 191</sup>. En fait, aucune fonction précise n'a pu être attribuée à MARCH3 à ce jour. Les résultats présentés ici indiquent que MARCH2 et MARCH3 ne permettent pas une dégradation de la chaîne invariante p33; MARCH3 semblant

même créer une certaine accumulation intracellulaire de p33. La différence entre les deux réside dans le fait que MARCH2 diminue l'expression de surface de p33 tandis que MARCH3 l'augmente considérablement. Ainsi, Ii s'ajoute à la liste des molécules dont l'expression peut être régulée négativement par MARCH2. La fonction de MARCH3 reste encore obscure.

À la lumière de ces résultats et considérant que MARCH1 semble l'effecteur principal de la régulation négative de DR dans les monocytes et les cellules dendritiques<sup>26, 27</sup>, il fut décidé de concentrer les études sur cette ubiquitine ligase en particulier. De plus, MARCH1 possède une expression tissulaire plus restrictive. C'est-à-dire qu'elle n'est exprimée que dans certains sous-types cellulaires, tels les lymphocytes B, tandis que l'expression de MARCH8 est plutôt ubiquitaire<sup>180</sup>. Ainsi, il est donc probable que MARCH1 joue un rôle plus spécifique sur Ii.

L'implication de la queue cytoplasmique de Ii a été vérifiée à l'aide du mutant Ii $\Delta$ cyto. Il s'avère que la queue cytoplasmique, et de par ce fait la lysine, ne joue pas un rôle indispensable dans la régulation négative de Ii, bien que celle-ci pourrait contribuer au phénomène (FIGURE 3.9). Les membres de la famille des MARCHs sont transmembranaires et ubiquitinent des résidus présents dans la queue cytoplasmique des molécules; donc accessibles. Le fait que la queue cytoplasmique n'est pas nécessaire à sa régulation négative indique donc que Ii peut ne pas être directement ciblé par MARCH1. La régulation négative est quelque peu inhibée avec Ii $\Delta$ cyto mais la diminution reste bel et bien présente et importante alors qu'elle devrait être complètement abolie. Cependant, ce dernier fait laisse suggérer que MARCH1 pourrait cibler directement Ii mais que ceci n'est pas un phénomène prédominant.

Une expérience à faire serait de muter seulement la lysine de la queue cytoplasmique de Ii plutôt que d'utiliser un mutant dont toute la queue est tronquée. En effet, il est possible de penser que l'absence de la queue cytoplasmique rendrait Ii plus sensible à certains événements ayant lieu dans la cellule. La présence de MARCH1 affecte peut-

être d'autres processus cellulaires ayant, eux, un effet sur l'internalisation de la version tronquée de Ii.

L'hypothèse proposée est donc que la chaîne invariante ne serait pas immédiatement ubiquitinée par MARCH1 mais qu'il existerait plutôt un intermédiaire; c'est-à-dire une molécule en complexe avec Ii qui serait, elle, touchée par MARCH1. CXCR2 a été le candidat retenu puisque cette molécule fait partie du complexe Ii-CD44 qui constitue le récepteur de MIF. CD44 aurait aussi pu être testé mais il fut décidé de commencer par CXCR2. CXCR2 peut aussi à lui seul être un récepteur pour MIF bien que la transmission du signal nécessite la présence de CD44<sup>61, 64</sup>. Trois lysines, sites potentiels d'ubiquitination, sont présentes dans la queue cytoplasmique de CXCR2 (FIGURE 3.11 A). Il n'a jamais été démontré si CXCR2 pouvait être ubiquitiné. Il est connu que suite à la phosphorylation de la queue cytoplasmique, CXCR2, ainsi que CXCR1, sont internalisés. Des études indiquent que CXCR2 est plus fortement et plus rapidement internalisé que CXCR1 et CXCR2 comporte 3 lysines contre une seule pour CXCR1<sup>84</sup>. Serait-il possible que l'ubiquitination soit un mode d'internalisation pour CXCR2? Aucune étude ne s'y est attardé jusqu'à maintenant. En fait, une seule information laisse suggérer indirectement que, peut-être, CXCR2 pourrait être régulé par MARCH1. Dans cette étude, des patients atteints de psoriasis sont traités à l'IL-10 et il est observé que l'expression de CXCR2 sur leurs cellules épithéliales est diminuée<sup>213</sup>. Ceci pourrait donc être dû à MARCH1, induit par l'IL-10 mais pourrait aussi être un résultat indirect, ceci ayant étant seulement observé chez des patients. Cependant, il est connu que l'IL-10 peut activer les kinases reliées à l'activation de STAT et il est possible de penser que celles-ci pourraient phosphoryler CXCR2<sup>214</sup>.

Comme il a déjà été démontré, CXCR2 phosphorylé est internalisé<sup>84</sup>. La FIGURE 3.11 B révèle que les HEK293T expriment bel et bien une faible quantité de CXCR2. De plus, CXCR2 peut être internalisé en présence de MARCH1 comme le démontre la FIGURE 3.12 B. Cette régulation négative n'est toutefois pas aussi intense qu'il aurait été possible de l'imaginer vu la présence des 3 lysines dans la queue



cytoplasmique. Ceci laisse tout de même supposer que l'ubiquitination pourrait bien être la méthode favorisant l'internalisation de CXCR2 sur CXCR1.

La co-transfection de CXCR2 et de p33 permet d'augmenter considérablement le ratio CXCR2/p33 dans la cellule. Ainsi, pour confirmer l'hypothèse que CXCR2 entraîne p33 dans sa régulation négative il faudrait que la diminution de l'expression de p33 en présence de MARCH1 soit fortement accentuée avec la quantité accrue de CXCR2. Ceci n'est cependant pas le cas et CXCR2 semble même conférer une certaine protection contre la dégradation à p33 (FIGURE 3.12 A).

Ainsi, la chaîne invariante est internalisée et dégradée en présence de MARCH1 et ceci semble indépendant de la queue cytoplasmique. CXCR2 n'est pas le partenaire responsable de la régulation négative. Les résultats négatifs obtenus avec CXCR2 par rapport à p33 ne sont pas le résultat d'une absence d'interaction dans ce type cellulaire en particulier (FIGURE 3.13). Une autre molécule en association avec p33 est donc vraisemblablement responsable du phénomène. Il pourrait s'agir de CD44, l'autre partenaire de Ii et CXCR2 lors de la transmission du signal induit par MIF. CD44, dont la fonction principale est de participer aux événements d'adhésion, est largement exprimé sur plusieurs types cellulaires, entre autres sur pratiquement tous les tissus épithéliaux<sup>80, 215</sup>. Ainsi, les cellules HEK293T, qui proviennent de tissus épithéliaux de rein, devraient exprimer CD44. La queue cytoplasmique de CD44 (FIGURE 4.1) est longue de 72 acides aminés et possède plusieurs lysines, sites potentiels pour l'ubiquitination<sup>216</sup>.

Domaine transmembranaire (650-670) et queue cytoplasmique (671-742) de CD44 humain

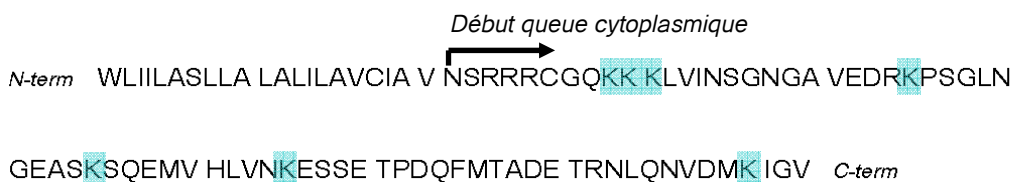


FIGURE 4. 2 Séquence du domaine transmembranaire et de la queue cytoplasmique de CD44 humain. Les 8 lysines présentes dans la queue cytoplasmique sont ombragées  
 Source : UniProtKB/Swiss-Protein entrée P16070 (CD44\_HUMAN)

Il s'agirait ici de répéter les expériences qui ont été réalisées précédemment, mais en remplaçant CXCR2 par CD44; soit de tester l'expression de CD44 avec un anticorps monoclonal spécifique et, ensuite, de procéder à des co-transfections p33+CD44 pour observer les niveaux de p33. La régulation négative de p33 augmenterait de façon dose-dépendante à l'ajout du partenaire ubiquitiné. Si les efforts pour identifier la molécule régulée par MARCH1 à partir de partenaires connus de Ii sont infructueux, une autre méthode à utiliser serait la purification des protéines associées à Ii par approches biochimiques, suivi de leur identification par spectrométrie de masse. Une fois le partenaire identifié, il sera possible de créer un mutant de celui-ci, en coupant entièrement sa queue cytoplasmique ou en mutant sa ou ses lysines. Ceci permettra de vérifier s'il y a blocage de la régulation négative. Si oui, il faudra prouver que cette molécule est ubiquitinée. Ceci pourra être réalisé en immunoprécipitant celle-ci de cellules transfectées avec MARCH1 et en procédant à un immunobuvardage anti-ubiquitine avec l'anticorps P4D1 (Upstate).

#### 4.3 RÉGULATION DE HLA-DO ET HLA-DM PAR MARCH1

##### Régulation de HLA-DO

L'expression du mutant DO $\alpha$ P11V-DO $\beta$  (indépendant de DM pour sa sortie de RE et exprimé à la surface cellulaire) est diminuée à la surface cellulaire et augmentée en total en présence de MARCH1 (FIGURE 3.16). Cependant, il n'y a aucun effet sur les complexes DO/DM comme le démontre l'utilisation de DO sauvage avec DM ou DMY (FIGURES 3.18 et 3.19). La conclusion apparente est donc que DO peut être régulé par MARCH1 mais que la présence de DM empêche la régulation négative en protégeant DO. DM n'empêche toutefois pas l'interaction en tant que telle entre DO et MARCH1 comme le démontre la FIGURE 3.20. Il serait toutefois possible que DM diminue l'interaction entre DO et MARCH1. Ceci pourrait être testé en comparant l'interaction avec MARCH1 des complexes DO/DM versus DO seul. La diminution de l'expression de surface du mutant DO $\alpha$ P11V n'est pas dramatique et pourrait aussi être le résultat d'un effet marginal de surexpression de MARCH1 puisqu'en conditions plus physiologiques (DO/DM) cette diminution n'est pas

observable. Cependant, ceci indique que l'expression de DO peut être affectée par MARCH1 tout en ne démontrant pas que DO soit directement ubiquitiné par MARCH1. L'immunoprécipitation laisse tout de même supposé une interaction directe entre DO et MARCH1.

Il serait douteux que MARCH1 joue un rôle direct ou important dans la régulation de DO, par exemple dans les lymphocytes B et ce même si une interaction entre DO et MARCH1 est bel et bien possible et que les localisations cellulaires restreintes (lymphocytes B et cellules dendritiques immatures principalement) concordent. L'interaction, et l'ubiquitination subséquente, de DO n'est peut-être seulement possible vu le haut degré d'homologie entre DR et DO (60%) qui pourrait permettre à MARCH1 de reconnaître DO même s'il ne s'agit pas de son véritable substrat <sup>107, 217</sup>.

Par contre, s'il est bien connu que la mutation de la lysine de la queue cytoplasmique de DR provoque une inhibition de la régulation négative <sup>27</sup> ceci ne semble pas être le cas pour DO (FIGURE 3.16). Est-ce que ceci indiquerait que, dans ce cas, la régulation négative de DO à la surface serait plutôt le résultat d'un effet indirect de MARCH1 sur DO? Ceci semble peu probable puisque ce ne sont pas toutes les molécules transfectées en HEK293T qui présentent un tel patron d'expression en présence de MARCH1. Est-ce que l'ubiquitination pourrait avoir lieu sur un autre résidu que la lysine? Ceci est aussi douteux si l'hypothèse considérée est que MARCH1 est capable d'interagir avec DO, même si cette molécule n'est pas son substrat principal, en raison de sa grande homologie avec DR. Cependant, il est connu pour d'autres E3 ubiquitines ligases que des cystéines peuvent être ubiquitinées <sup>150</sup> et la chaîne  $\beta$  de DO contient bien une cystéine à l'extrémité complète de la queue cytoplasmique, ce qui n'est pas le cas pour la chaîne  $\beta$  de DR (FIGURES 3.14 et 4.1).

Un point à soulever est le fait que, même si l'expression totale de DO tel que mesurée avec les anticorps Mags.DO et HKC5 ne change pas en présence de MARCH1, il est tout de même possible de penser que les molécules de DO ubiquitinées peuvent être redistribuées dans la cellule. Ainsi, sans amener à la dégradation de sa cible,

MARCH1 pourrait jouer un rôle dans la distribution intracellulaire de DO. Les résultats obtenus avec les complexes DO/DMY (FIGURE 3.19) n'abondent pas dans ce sens puisque s'il y avait eu ubiquitination, un changement dans l'expression de surface des molécules aurait probablement pu être observé. Cependant, l'absence de régulation à partir de la surface cellulaire de ces complexes n'abolit pas hors de tout doute l'hypothèse que les complexes DO/DM pourraient être redistribués dans la cellule après leur ubiquitination. Pour vérifier cette hypothèse, il s'agirait tout d'abord de confirmer si DO est directement visé par MARCH1. Pour cela, il s'agit de voir si DO est ubiquitiné dans les HEK293T. Pour cela, une immunoprécipitation anti-DO suivi d'un immunobuvardage anti-ubiquitine peut être fait. La microscopie confocale pourrait permettre d'observer l'aspect de la cellule vivante en absence ou en présence de MARCH1 et déterminer s'il y a redistribution des molécules de DO. Pour avoir une idée plus exacte des compartiments où seraient situées les molécules, la microscopie électronique pourrait être utilisée.

En perspectives, pour déterminer si MARCH1 joue un rôle majeur dans la régulation post-traductionnelle de DO, certaines autres expériences pourraient être réalisées. Tout d'abord, il serait important de confirmer les résultats obtenus dans un autre type cellulaire, par exemple des HeLa. Aussi, des lymphocytes B purifiés à partir de PBMCs pourraient être utilisés. Il serait possible d'immunoprécipiter DO dans ces cellules et de faire un immunobuvardage pour détecter la présence de MARCH1 ou de l'ubiquitine. L'utilisation d'un ARN d'interférence contre MARCH1 dans des lymphocytes serait aussi utile pour observer l'effet de son abolition sur l'expression des molécules de la présentation. Toutefois, bien que cette dernière expérience apporterait quelques informations sur DO, elle ne permettrait pas de déterminer s'il y a un effet direct.

#### Régulation de HLA-DM

Bien que DM semble à première vue un candidat moins propice à la régulation par les MARCHs, sa lysine étant située sur la queue cytoplasmique de la chaîne  $\alpha$  alors que

DR est régulé négativement par la lysine de la chaîne  $\beta$ , son expression en présence de MARCH1 a tout de même été testée.

Les résultats obtenus démontrent que l'expression de DM n'est pas affectée par MARCH1. Les résultats sont moins concluants au sujet de l'interaction entre DM et MARCH1. En effet, l'ajout d'une lysine dans la queue cytoplasmique de DM $\beta$  n'induisait pas la régulation négative tandis que l'expression d'une chimère de DM contenant les queues cytoplasmiques de DR pouvait être affectée (FIGURE 3.24 A et B). Ceci laissait présager que, soit MARCH1 interagit avec DM mais est incapable d'ubiquitiner sa queue cytoplasmique, ou que MARCH1 interagit avec la queue cytoplasmique de DR pour ubiquitiner celle-ci. Ceci impliquerait que DM n'est pas reconnu par MARCH1 et expliquerait pourquoi, même avec la présence d'une lysine dans la queue cytoplasmique, MARCH1 n'induit pas la régulation négative de DM.

Cependant, une chimère de DR possédant la queue cytoplasmique de DM $\beta$ Y+K, c'est-à-dire avec la mutation du motif de ciblage aux endosomes ainsi qu'avec la lysine ajoutée, est aussi régulée négativement en présence de MARCH1. De prime abord, ceci semble indiquer que la queue cytoplasmique de DM $\beta$  peut être ubiquitinée, ce qui ne concorde pas avec les résultats précédents. La première hypothèse qui stipulait que, dans le cas de la transfection des chaînes DR $\alpha$  et DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K, il s'agissait plutôt de la queue cytoplasmique de la chaîne  $\alpha$ , possédant 2 lysines, qui était ubiquitinée par MARCH1 s'est avéré fausse. En effet, l'utilisation d'une chaîne DR $\alpha$  sans lysines n'inhibe pas la régulation négative (FIGURE 3.25). Donc, qu'est-ce qui permet l'ubiquitination par MARCH1? Pour tenter d'éclaircir le site de reconnaissance de MARCH1 sur la molécule visée une schématisation des mutants utilisés ainsi qu'un résumé des résultats obtenus quant à la régulation négative de surface sont présentés à la FIGURE 4.3.

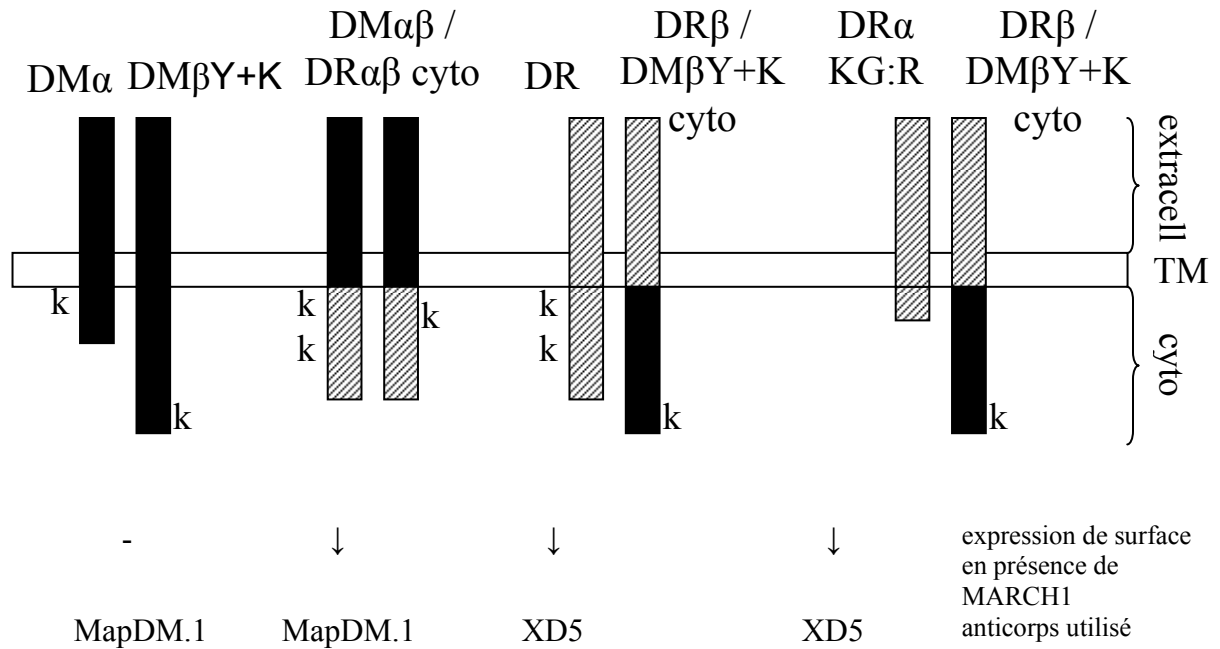


FIGURE 4. 3 Schématisation des mutants de DM et DR utilisés et résumé des résultats obtenus.

Les domaines extracellulaires, transmembranaires (TM) et cytoplasmiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de DR (ligné) et DM (noir) sont représentées pour les 4 mutants utilisés. Les sections en noir représentent DM tandis que les sections hachurées sont celles référant à DR. La lysine de la queue cytoplasmique DM $\alpha$  est située en position 256, soit au tout début de la courte queue cytoplasmique de DM $\alpha$  (7 acides aminés). Le mutant DM $\beta$ Y+K implique l'introduction d'un codon stop à la fin de la queue cytoplasmique sauvage de DM $\beta$ ; produisant une queue cytoplasmique plus longue contenant une lysine. Les lysines de la queue cytoplasmique de DR $\alpha$  sont situées en position 240 et 244 tandis que la lysine de la chaîne DR $\beta$  est située en position 254. L'effet sur l'expression de surface du tant en présence de MARCH1 est indiqué ainsi que l'anticorps utilisé pour mesurer cette expression.

Peu d'informations sont connues sur les mécanismes de reconnaissance et d'attachement des E3 ubiquitines ligases de la famille des MARCHs à leur substrat. D'autres molécules adaptatrices pourraient être impliquées. Par exemple, mK3, la version murine des E3 ubiquitines ligases virales homologues aux MARCHs, nécessite une interaction de sa région C-terminale avec TAP1 et TAP2, en plus de la liaison de son domaine N-terminal avec le CMH de classe I <sup>218</sup>. Dans le cas des molécules de la présentation antigénique, un motif d'attachement est probablement reconnu par MARCH1. La présence de ce type de motif, aussi nommé "motif de dégradation" ou "degron" est commun pour la régulation négative par diverses ubiquitines ligases, mais aucun n'a encore été identifié pour les MARCH <sup>219</sup>. Chez l'ubiquitine ligase en tant que telle, il est connu pour les MARCHs que des domaines

transmembranaires seraient importants dans le processus de reconnaissance du substrat<sup>153</sup>. Ainsi, la question qui se pose est si MARCH1 peut reconnaître DM et, si oui, à quel endroit sur la molécule et pourquoi DMY, même avec l'ajout d'une lysine, n'est pas régulé négativement. Comme le mutant DM/DRcyto est régulé négativement, mais pas DM, les queues cytoplasmiques de DR interagissent probablement avec MARCH1. Les résultats avec la chimère DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K laissent penser que la chaîne DR $\alpha$  pourrait être visée, mais il semble étrange de penser que la chaîne  $\alpha$  de DR interagit avec MARCH1 mais que l'ubiquitination a lieu sur la chaîne  $\beta$ . Cependant, en observant les schémas des molécules DM/DRcyto, DR $\alpha$  + DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K et DR $\alpha$ KG:RG + DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K à la FIGURE 4.3, il est possible de remarquer que la seule partie commune est une très petite section de la queue cytoplasmique de DR $\alpha$ . Une autre hypothèse qui expliquerait les résultats obtenus avec la chimère DR $\beta$ /DM $\beta$ Y+K est que la queue cytoplasmique DM $\alpha$  pourrait créer de l'encombrement stérique dans la région cytoplasmique. Ceci empêcherait l'ubiquitination de la chaîne DM $\beta$ Y+K dans le contexte où elle est exprimé avec DM $\alpha$ . L'ubiquitination serait toutefois possible dans le contexte où les queues cytoplasmiques de DR $\alpha$  ou DR $\alpha$ KG:RG sont utilisées. Ainsi, selon cette hypothèse, MARCH1 peut interagir avec DM qui n'est cependant pas ubiquitiné. Enfin, une dernière hypothèse en lien avec les résultats obtenus avec DMY, serait que le mutant DMY soit exprimé à la surface cellulaire comme mentionné précédemment. Par conséquent, son recyclage serait affecté et différerait de celui de DM sauvage. Si MARCH1 est retrouvé associé aux membranes vésiculaires des endosomes/lysosomes impliqués dans le recyclage, mais que DMY ne transite pas par cette voie, l'interaction même avec MARCH1 s'en trouverait empêchée, ce qui fausserait les résultats. Il faudrait donc s'assurer que le mutant DMY est internalisé de la même façon que DM.

Les résultats ne sont donc pas concluants quant à DM, bien qu'il est possible d'au moins affirmer que MARCH1 ne semble pas jouer de rôle quand à sa régulation. Il serait important de refaire les expériences avec les mutants, dans les HEK293T et dans les HeLa. Pour confirmation, un autre anticorps contre le CMH de classe II

pourrait être utilisé en comparaison; par exemple L243, un conformère reconnaissant HLA-DR mature<sup>33</sup>. Il serait aussi crucial de tenter une immunoprécipitation sur des HEK293T transfectées avec chacun des 4 mutants pour établir s'il y a bel et bien interaction avec MARCH1. Dans ce cas, une immunoprécipitation  $\alpha$ MARCH1 serait suivie d'un immunobuvardage MapDM ou XD5, et vice-versa. Jusqu'ici l'ubiquitination en tant que telle n'a pas été vérifiée directement, tant pour DO que pour DM. Pour réaliser ceci, il faudrait immunoprécipiter la molécule soupçonnée d'être ubiquitinée et de procéder à un immunobuvardage anti-ubiquitine. Cependant, ceci est peu sensible et ne permet pas facilement d'observer l'ubiquitination. De plus, si une molécule n'est que faiblement ubiquitinée ou bien que seulement une faible portion des molécules est ubiquitinée, comme ce pourrait être le cas ici, ceci sera difficilement visible.

Il importe de revenir sur les résultats obtenus avec les cellules stables HEK293 CIITA et HeLa CIITA/DO. Lors de ces transfections, les immunomarquages indiquaient une diminution statistiquement significative de l'expression totale de DO et de DM. À la lumière des résultats obtenus en HEK293T, il semblerait que ceci soit plutôt dû à un effet indirect, peut-être à cause de la forte régulation négative de DR et Ii.

#### 4.5 CONCLUSION

Les résultats présentés dans ce mémoire permettent de suggérer que l'ubiquitination par MARCH1 joue un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de Iip33 mais pas dans celle de DO ou DM. Dans le cas de Ii, cette régulation est peut être indépendante de la queue cytoplasmique. Elle est probablement le résultat d'une molécule associée à Ii qui, elle, est ubiquitinée. Cette molécule associée n'est pas le récepteur de l'IL-8, CXCR2, mais pourrait être CD44, une molécule importante lors du transfert du signal induit par la liaison de MIF. Les résultats ne concordent pas tout à fait avec l'hypothèse. En effet, celle-ci stipulait que la lysine de la queue cytoplasmique était ciblée par MARCH1. La co-transfection avec d'autres E3 ubiquitines ligases de la famille des MARCHs a révélé un effet drastique des homologues MARCH4 et MARCH9 sur les molécules transfectées.



Bien que MARCH1 peut interagir avec DO et réguler négativement son expression en certaines conditions, ceci ne joue probablement pas un rôle important en conditions physiologiques puisque les complexes DO/DM ne sont pas affectés. L'interaction de DO avec MARCH1 est peut-être seulement le résultat de la grande homologie entre DO et DR; c'est-à-dire que MARCH1 interagirait avec DO que parce que DO ressemble à DR, qui est le substrat de MARCH1. DM pourrait aussi protéger DO de la régulation négative. Il n'est toutefois pas totalement exclu que MARCH1 puisse provoquer une redistribution des complexes DO/DM à l'intérieur même de la cellule. Quant à DM seul, dont la queue cytoplasmique de la chaîne  $\beta$  ne comprend aucune lysine, MARCH1 ne semble pas avoir un effet sur son expression.

Ainsi, l'ubiquitination est un processus dont les effets sur la régulation des molécules immunitaires n'ont pas fini d'être élucidés. Les conséquences de l'ubiquitination sont difficiles à déterminer, le résultat pouvant être une dégradation de la molécule ou une redistribution cellulaire. Dans le cas de la chaîne invariante, si les mécanismes de la régulation négative sont élucidés, il est possible de penser à un usage thérapeutique dans le cadre de certaines tumeurs où il est connu que la prolifération intensive est causée par une surexpression de Ii. Une modulation de l'ubiquitination de Ii responsable de sa dégradation pourrait être utilisée pour réduire la prolifération de ces tumeurs. Il se peut aussi que cette prolifération intensive, de tumeurs de lymphocytes B par exemple, soit le résultat d'un dérèglement de MARCH1; ceci pourrait être étudié. Quant à la régulation post-traductionnelle de HLA-DO et HLA-DM, l'ubiquitination ne semble pas être un modulateur majeur. Cependant, il est important de poursuivre les recherches pour déterminer le mécanisme impliqué dans cette régulation. Il est possible de penser que la modulation artificielle de HLA-DO et de HLA-DM pourrait être utile pour contrôler la présentation des antigènes lors de transplantation d'organes, par exemple en provoquant une hausse de l'expression de HLA-DO par rapport à HLA-DM.

## RÉFÉRENCES

1. Delves PJ & Roitt, I. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49 (2000 a).
2. Delves PJ & Roitt, I. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* **343**, 108-117 (2000 b).
3. Palucka K & Banchereau, J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* **19**, 12-25 (1999).
4. Trombetta ES & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review Immunology* **23**, 975-1028 (2005).
5. Rautajoki KJ, Kylaniemi, M., Raghav, S., Rao, K. & Lahesmaa, R. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. *Ann Med* **40**, 322-335 (2008).
6. Klein J & Sato, A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 702-709 (2000).
7. Yin L *et al.* Expression and regulation of major histocompatibility complex on neural stem cells and their lineages. *Stem Cells Dev* **17**, 53-65 (2008).
8. Carrington, M. Recombination within the human MHC. *Immunol Rev* **167**, 245-256 (1999).
9. Goldsby R, Kindt, T. & Osborne, B. *Immunologie: Le cours de Janis Kuby*, Vol. 4e édition. (Dunod, Paris; 2001).
10. Kalish, R. Antigen processing: the gateway to the immune response. *J Am Acad Dermatol* **32**, 640-652 (1995).
11. Ting JP & Trowsdale, J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* **109** (2002).
12. Steimle V, Otten, L.A., Zufferey, M. & Mach, B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). 1993. *Cell* **75**, 135-146 (1993).
13. van den Elsen PJ, Holling, T.M., Kuipers, H.F. & van der Stoep, N. Transcriptional regulation of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* **16**, 67-75 (2004).
14. Masternak K *et al.* CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* **14**, 1156-1166 (2000).
15. Krawczyk M *et al.* Identification of CIITA regulated genetic module dedicated for antigen presentation. *PLoS Genet* **4**, e1000058 (2008).
16. Chang CH, Fontes, J.D., Peterlin, M. & Flavell, R.A. Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J Exp Med* **180**, 1367-1374 (1994).
17. Steimle V, Siegrist, C., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B. & Mach, B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* **265**, 106-109 (1994).
18. Muhlethaler-Mottet A, Otten, L.A., Steimle, V. & Mach, B. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is

- controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO* **16**, 2851-2860 (1997).
19. Wright KL & Ting, J.P. Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes. *TRENDS in Immunology* **27**, 405-412 (2006).
  20. LeibundGut-Landmann S *et al.* Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* **34**, 1513-1525 (2004).
  21. Reith W, LeibundGut-Landmann, S. & Waldburger, J. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* **5**, 793-806 (2005).
  22. Boss JM & Jensen, P.E. Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opinion Immunol* **15**, 105-111 (2003).
  23. Del Pozzo G, Ciullo, M. & Guardiola, J. Regulation of HLA class II gene expression: the case for posttranscriptional control levels. *Microbes Infect* **1**, 943-948 (1999).
  24. Shin JS *et al.* Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature Letters* **444**, 115-118 (2006).
  25. van Niel G *et al.* Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity* **26**, 885-894 (2006).
  26. De Gassart A *et al.* MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *PNAS* **105**, 3491-3496 (2008).
  27. Thibodeau J *et al.* Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur J Immunol* (2008).
  28. Harding FA & Allison, J.P. CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J Exp Med* **177**, 1791-1796 (1993).
  29. Rocha N & Neefjes, J. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO* **27**, 1-5 (2008).
  30. Peters PJ, Neefjes, J., Oorschot, V., Ploegh, H. & HJ., G. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *1991* **349**, 669-676 (1991).
  31. Brown JH *et al.* Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**, 33-39 (1993).
  32. Bikoff EK *et al.* Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med* **177**, 1699-1712 (1993).
  33. Roche PA & Cresswell, P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**, 615-618 (1990).
  34. Koch, N. A revised model for invariant chain-mediated assembly of MHC class II peptide receptors. *TRENDS in Biochemical Sciences* **32**, 532-537 (2007).
  35. Neefjes JJ, Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.J. & Ploegh, H.L. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* **61**, 171-183 (1990).

36. Riese RJ & Chapman, H.A. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **12**, 107-113 (2000).
37. Neefjes JJ & Ploegh, H.L. Inhibition of endosomal proteolytic activity by leupeptin blocks surface expression of MHC class II molecules and their conversion to SDS resistance alpha beta heterodimers in endosomes. *EMBO* **11**, 411-416 (1992).
38. Matza D, Kerem, A. & Shachar, I. Invariant chain, a chain of command. *TRENDS in Immunology* **24**, 6055-6059 (2003).
39. Morris P *et al.* An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* **368**, 551-554 (1994).
40. Denzin LK, Sant'Angelo, D.B., Hammond, C., Surman, M.J. & Cresswell, P. Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* **278**, 106-109 (1997).
41. van Ham SM *et al.* HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* **7**, 950-957 (1997).
42. Jones PP, Murphy, D.B., Hewgill, D. & McDevitt, H.O. Detection of a common polypeptide chain in I--A and I--E sub-region immunoprecipitates. *Mol Immunol* **16**, 51-60 (1979).
43. Charron DJ & McDevitt, H.O. Analysis of HLA-D region-associated molecules with monoclonal antibody. *PNAS* **76**, 6567-6571 (1979).
44. Shackelford DA & Strominger, J.L. Demonstration of structural polymorphism among HLA-DR light chains by two-dimensional gel electrophoresis. *J Exp Med* **115**, 144-165 (1980).
45. Claesson L, Larhammar, D., Rask, L. & Peterson, P.A. cDNA clone for the human invariant y chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure. *PNAS* **80**, 7395-7399 (1983).
46. Long EO *et al.* Isolation of cDNA clones for the p33 invariant chain associated with HLA-DR antigens. *PNAS* **80** (1983).
47. Elliott WL, Stille, C.J., Thomas, L.J. & Humphreys, R.E. An hypothesis on the binding of an amphipathic, alpha helical sequence in Ii to the desotope of class II antigens. *J Immunol* **138**, 2949-2952 (1987).
48. Marks MS, Blum, J.S. & Cresswell, P. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J Cell Biol* **111**, 839-855 (1990).
49. Stumptner P & Benaroch, P. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO* **16**, 5807-5818 (1997).
50. Thayer WP, Ignatowicz, L., Weber, D.A. & Jensen, P.E. Class II-associated invariant chain peptide-independent binding of invariant chain to class II MHC molecules. *J Immunol* **162**, 1502-1509 (1999).
51. Leng L *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* **197**, 1467-1476 (2003).
52. Matza D, Kerem, A., Medvedovsky, H., Lantner, F. & Shachar, I. Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity* **17**, 549-560 (2002).

53. Naujokas MF, Morin, M., Anderson, M.S., Peterson, M. & Miller, J. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* **Naujokas MF, Morin M, Anderson MS, Peterson M, Miller J**, 2 (1993).
54. Lotteau V *et al.* Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* **348**, 600-605 (1990).
55. Pieters J, Bakke, O. & Dobberstein, B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* **106**, 831-846 (1993).
56. Elliott EA *et al.* The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* **179**, 681-694 (1994).
57. Shachar I & Flavell, R.A. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* **274**, 106-108 (1996).
58. Matza D *et al.* Invariant chain induces B cell maturation in a process that is independent of its chaperonic activity. *PNAS* **99**, 3018-3023 (2002).
59. Matza D, Wolstein, O., Dikstein, R. & Shachar, I. Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF(II)105-NF-kappaB-dependent transcription program. *J Biol Chem* **276**, 27203-27206 (2001).
60. Starlets D *et al.* Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Immunobiology* **107**, 4807-4816 (2006).
61. Gore Y *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces B Cell Survival by Activation of a CD74-CD44 Receptor Complex. *The journal of biological chemistry* **283**, 2784-2792 (2008).
62. Becker-Herman S, Arie, G., Medvedovsky, H., Kerem, A. & Shachar, I. CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Molecular biology of the cell* **16**, 5061-5069 (2005).
63. Harrison, C. MIF's receptors revealed. *Nature Reviews / Drugs discovery* **Vol. 6** (2007).
64. Shi X *et al.* CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* **25**, 595-606 (2006).
65. Sant AJ, Cullen, S.E., Giacometto, K.S. & Schwartz, B.D. Invariant chain is the core protein of the Ia-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J Exp Med* **162**, 1916-1934 (1985).
66. Strubin M, Berte, C. & Mach, B. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO* **5**, 3483-3488 (1986).
67. Strubin M, Long, E.O. & Mach, B. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* **47**, 619-625 (1986).
68. Warmerdam PA, Long, E.O. & Roche, P.A. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *Journal of Cell Biology* **133**, 281-291 (1996).
69. Odorizzi CG *et al.* Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J Cell Biol* **126**, 317-330 (1994).

70. Schutze MP, Peterson, P.A. & Jackson, M.R. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO* **13**, 1696-1705 (1994).
71. Stumptner-Cuvelette P & Benaroch, P. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochimica et Biophysica Acta* **1542**, 1-13 (2002).
72. Bremnes B, Madsen, T., Gedde-Dahl, M. & Bakke, O. An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J Cell Sci* **107**, 2021-2032 (1994).
73. Kuwana T, Peterson, P.A. & Karlsson, L. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *PNAS* **95**, 1056-1061 (1998).
74. Anderson HA & Roche, P.A. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J Immunol* **160**, 4850-4858 (1998).
75. Anderson HA, Bergstralh, D.T., Kawamura, T., Blauvelt, A. & Roche, P.A. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J Immunol* **163**, 5435-5443 (1999).
76. O'Kelly I, Butler, M.H., Zilberberg, N. & Goldstein, S.A. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**, 577-588 (2002).
77. Lue H, Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. & Bernhagen, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes and infection* **4**, 449-460 (2002).
78. Binsky I *et al.* IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival. *PNAS* **104**, 13408-13413 (2007).
79. Goodison S, Urquidi, V. & Tarin, D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* **52**, 189-196 (1999).
80. Mackay CR *et al.* Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* **124**, 71-82 (1994).
81. Naor D, Wallach-Dayana, S.B., Zahalka, M.A. & Sionov, R.V. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* **18**, 260-267 (2008).
82. Bernhagen J *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature Medicine* **13**, 587-596 (2007).
83. Lee J *et al.* Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J Biol Chem* **267**, 16283-16287 (1992).
84. Richardson RM, Marjoram, R.J., Barak, L.S. & Snyderman, R. Role of the Cytoplasmic Tails of CXCR1 and CXCR2 in Mediating Leukocyte Migration, Activation, and Regulation. *The journal of immunology* **170**, 2904-2911 (2003).
85. Hussain A, Wesley, C., Khalid, M., Chaudhry, A. & Jameel, S. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and

- modulates major histocompatibility complex class II presentation. *J Virol* **82**, 893-902 (2008).
86. Huang D, Cai, D.T., Chua, R.Y., Kemeny, D.M. & Wong, S.H. Nitric-oxide synthase 2 interacts with CD74 and inhibits its cleavage by caspase during dendritic cell development. *J Biol Chem* **283**, 1713-1722 (2008).
  87. Narni F *et al.* HLA-DR-associated invariant chain is highly expressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **68**, 372-377 (1986).
  88. Burton JD *et al.* CD74 is expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy. *Clin Cancer Res* **10**, 6606-6611 (2004).
  89. Stein R *et al.* CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res* **13**, 5556s-5563s (2007).
  90. Sullivan LC, Clements, C.S., Rossjohn, J. & Brooks, A.G. The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue antigens* **72**, 415-424 (2008).
  91. Rouas-Freiss N, Marchal, R.E., Kirszenbaum, M., Dausset, J. & Carosella, E.D. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *PNAS* **94**, 5249-5254 (1997).
  92. Kuroki K & Maenaka, K. Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface. *Eur J Immunol* **37**, 1727-1729 (2007).
  93. Nagamatsu T *et al.* Human leukocyte antigen F protein is expressed in the extra-villous trophoblasts but not on the cell surface of them. *Am J Reprod Immunol* **56**, 172-177 (2006).
  94. Feder JN *et al.* The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *PNAS* **95**, 1472-1477 (1998).
  95. Silk JD, Salio, M., Brown, J., Jones, E.Y. & Cerundolo, V. Structural and functional aspects of lipid binding by CD1 molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**, 369-395 (2008).
  96. Naruse TK *et al.* Limited polymorphism in the HLA-DOA gene. *Tissue antigens* **53**, 359-365 (1999).
  97. Inoko H, Ando, A., Kimura, M. & Tsuji, K. Isolation and characterization of the cDNA clone and genomic clones of a new HLA class II antigen heavy chain, DO alpha. *J Immunol* **135**, 2156-2159 (1985).
  98. Alfonso C & Karlsson, L. Nonclassical MHC class II molecules. *Annual Review Immunology* **18**, 113-142 (2000).
  99. Karlsson L, Surh, C.D., Sprent, J. & Peterson, P.A. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* **351**, 485-488 (1991).
  100. Liljedahl M *et al.* HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO* **15**, 4817-4824 (1996).
  101. Sanderson F *et al.* Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* **266**, 1566-1569 (1994).
  102. Kelly AP, Monaco, J.J., Cho, S.G. & Trowsdale, J. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* **353**, 571-573 (1991).

103. Sloan VS *et al.* Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* **375**, 802-806 (1995).
104. Sherman MA, Weber, D.A. & Jensen, P.E. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* **3**, 197-205 (1995).
105. Denzin LK & Cresswell, P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* **82**, 155-165 (1995).
106. Denzin LK, Fallas, J.L., Prendes, M. & Yi, W. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunological Reviews* **207**, 279-292 (2005).
107. Karlsson, L. DM and DO shape the repertoire of peptide-MHC-class-II complexes. *Current Opinion in Immunology* **17**, 65-70 (2005).
108. Mosyak L, Zaller, D.M. & Wiley, D.C. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* **9**, 377-383 (1998).
109. Copier J *et al.* Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J Immunol* **157**, 1017-1027 (1996).
110. Davies MN *et al.* Identification of the HLA-DM/HLA-DR interface. *Mol Immunol* **45**, 1063-1070 (2008).
111. Narayan K *et al.* HLA-DM targets the hydrogen bond between the histidine at position beta81 and peptide to dissociate HLA-DR-peptide complexes. *Nat Immunol* **8**, 92-100 (2007).
112. Nanda NK & Sant, A.J. DM determines the cryptic and immunodominant fate of T cell epitopes. *J Exp Med* **192**, 781-788 (2000).
113. Sant AJ *et al.* The relationship between immunodominance, DM editing, and the kinetic stability of MHC class II:peptide complexes. *Immunol Rev* **207**, 261-278 (2005).
114. van Ham SM *et al.* Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J Exp Med* **184**, 2019-2024 (1996).
115. Kropshofer H *et al.* Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO* **15**, 6144-6154 (1996).
116. Trowsdale J & Kelly, A. The human HLA class II alpha chain gene DZ alpha is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO* **4**, 2231-2237 (1985).
117. Tonnelie C, DeMars, R. & Long, E.O. DO beta: a new beta chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO* **4**, 2839-2847 (1985).
118. Serenius B, Rask, L. & Peterson, P.A. Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO beta gene is a divergent member of the class II beta gene family. *J Biol Chem* **262**, 8759-8766 (1987).
119. Khalil H *et al.* The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *International Immunology*, **15**, 1249-1263 (2003).
120. Hornell TM *et al.* Human dendritic cell expression of HLA-DO is subset specific and regulated by maturation. *J Immunol* **176**, 3536-3547 (2006).



121. Kropshofer H *et al.* A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO* **17**, 2971-2981 (1998).
122. Chen X *et al.* Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J Exp Med* **195**, 1053-1062 (2002).
123. van Lith M *et al.* Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *The journal of immunology* **167**, 884-892 (2001).
124. Marks MS *et al.* A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol* **131**, 351-369 (1995).
125. Brunet A, Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. & Thibodeau, J. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *The journal of biological chemistry* **275**, 37062-37071 (2000).
126. Deshaies F *et al.* A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM. *PNAS* **102**, 6443-6448 (2005).
127. Pashine A *et al.* Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides. *Immunity* **19**, 183-192 (2003).
128. Roucard C *et al.* In vivo and in vitro modulation of HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation. *The journal of immunology* **167** (2001).
129. Lapointe R, Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. & Hwu, P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Research* **63**, 2836-2843 (2003).
130. Glazier KS *et al.* Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J Exp Med* **195**, 1063-1069 (2002).
131. Chalouni C, Banchereau, J., Vogt, A.B., Pascual, V. & Davoust, J. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. *International Immunology*, **15**, 457-466 (2002).
132. Janeway C, Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. Immunobiology - The immune system in health and disease. **6th edition** (2005).
133. Fallas JL, Yi, W., Draghi, N.A., O'Rourke, H.M. & Denzin, L.K. Expression patterns of H2-O in mouse B cells and dendritic cells correlate with cell function. *J Immunol* **178**, 1488-1497 (2007).
134. Chen X, Reed-Loisel, L.M., Karlsson, L. & Jensen, P.E. H2-O expression in primary dendritic cells. *J Immunol* **176**, 3548-3556 (2006).
135. van Lith M, van Ham, M. & Neeffjes, J. Novel polymorphisms in HLA-DOA and HLA-DOB in B-cell malignancies. *Immunogenetics* **54**, 591-595 (2002).
136. Chen X, Jensen, P.E. & Li, S. HLA-DO. A useful marker to distinguish florid follicular hyperplasia from follicular lymphoma by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* **119**, 842-851 (2003).

137. Chamuleau ME, Ossenkoppele, G.J. & van de Loosdrecht, A.A. MHC class II molecules in tumour immunology: prognostic marker and target for immune modulation. *Immunobiology* **211**, 619-625 (2006).
138. Bellemare-Pelletier A *et al.* HLA-DO transduced in human monocyte-derived dendritic cells modulates MHC class II antigen processing. *Journal of leukocyte biology* **78**, 95-105 (2005).
139. Pinet V *et al.* Polymorphism of the HLA-DMA and DMB genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **40**, 854-858 (1997).
140. Morel J *et al.* HLA-DMA\*0103 and HLA-DMB\*0104 alleles as novel prognostic factors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **63**, 1581-1586 (2004).
141. Moxley G & Han, J. HLA DMA and DMB show no association with rheumatoid arthritis in US Caucasians. *Eur J Immunogenet* **28**, 539-543 (2001).
142. Siegmund T, Donner, H., Braun, J., Usadel, K.H. & Badenhoop, K. HLA-DMA and HLA-DMB alleles in German patients with type 1 diabetes mellitus. *Tissue antigens* **54**, 291-294 (1999).
143. Lich JD, Jayne, J.A., Zhou, D., Elliott, J.F. & Blum, J.S. Editing of an immunodominant epitope of glutamate decarboxylase by HLA-DM. *J Immunol* **171**, 853-859 (2003).
144. Jastaniah WA, Alessandri, A.J., Reid, G.S. & Schultz, K.R. HLA-DM expression is elevated in ETV6-AML1 translocation-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* **30**, 487-489 (2006).
145. Oldford SA *et al.* Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *18* **11** (2006).
146. Chen X, Jensen, P.E. & S., L. MHC class II antigen presentation and immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes. *Exp Mol Pathol* doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.011 (2008).
147. Fischer, A. Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nat Immunol* **5**, 23-30 (2004).
148. Wilkinson, K.D. The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. *PNAS* **102**, 15280-15282 (2005).
149. Wang X *et al.* Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *Journal of Cell Biology* **177**, 613-624 (2007).
150. Cadwell K & Coscoy, L. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* **309**, 127-130 (2005).
151. Love KR, Catic, A., Schlieker, C. & Ploegh, H.L. Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes. *Nat Chem Biol* **3**, 697-705 (2007).
152. Nandi D, Tahiliani, P., Kumar, A. & Chandu, D. The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* **31**, 137-155 (2006).
153. Lehner PJ, Hoer, S., Dodd, R. & Duncan, L.M. Downregulation of cell surface receptors by the K3 family of viral and cellular ubiquitin E3 ligases. *Immunological Reviews* **207**, 112-125 (2005).

154. Hershko A & Ciechanover, A. The Ubiquitin System. *Annual Review Biochemistry* **67**, 425-479 (1998).
155. Mukhopadhyay D & Riezman, H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* **315**, 201-205 (2007).
156. Haglung, K., Di Fiore, P. and I. Dikic Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *TRENDS in Biochemical Sciences* **28**, 598-803 (2003).
157. Ben-Neriah, Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol* **3**, 20-26 (2002).
158. Gómez-Martín D, Díaz-Zamudio, M. & Alcocer-Varela, J. Ubiquitination system and autoimmunity: the bridge towards the modulation of the immune response. *Autoimmun Rev* **7**, 284-290 (2008).
159. Woelk T, Sigismund, S., Penengo, L. & Polo, S. The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Division* **13** (2007).
160. Jackson PK *et al.* The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* **10**, 429-439 (2000).
161. Scheffner M, Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. & Howley, P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53 (1993).
162. Borden KL & Freemont, P.S. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 395-401 (1996).
163. Lorick KL *et al.* RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *PNAS* **96**, 11364-11369 (1999).
164. Joazeiro CA & Weissman, A.M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-552 (2000).
165. Coscoy L & Ganem, D. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol* **13**, 7-12 (2003).
166. Lu Z, Xu, S., Joazeiro, C., Cobb, M.H. & Hunter, T. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Molecular Cell* **9**, 945-956 (2002).
167. Sun, Y. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **2**, 623-629 (2003).
168. Hatakeyama S, Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. & Nakayama, K.I. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* **276**, 33111-33120 (2001).
169. Coscoy L & Ganem, D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *PNAS* **97**, 8051-8056 (2000).
170. Coscoy L & Ganem, D. A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *J Clin Invest* **107**, 1599-1606 (2001 b)).
171. Ishido S, Wang, C., Lee, B.S., Cohen, G.B. & Jung, J.U. Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. *J Virol* **74**, 5300-5309 (2000).
172. Nicholas J *et al.* A single 13-kilobase divergent locus in the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome contains nine open

- reading frames that are homologous to or related to cellular proteins. *J Virol* **71**, 1963-1974 (1997).
173. Boname JM & Stevenson, P.G. MHC class I ubiquitination by a viral PHD/LAP finger protein. *Immunity* **15**, 627-636 (2001).
  174. 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. *88* **1-2** (2002).
  175. Lorenzo ME, Jung, J.U. & Ploegh, H.L. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 utilizes the ubiquitin-proteasome system in routing class major histocompatibility complexes to late endocytic compartments. *J Virol* **76**, 5522-5531 (2002).
  176. Scheel H & Hofmann, K. No evidence for PHD fingers as ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* **13**, 285-287 (2003).
  177. Aravind L, Iyer, L.M. & Koonin, E.V. Scores of RINGS but no PHDs in ubiquitin signaling. *Cell Cycle* **2**, 123-126 (2003).
  178. Capili AD, Schultz, D.C., RauscherIII, F.J. & Borden, K.L. Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *EMBO* **20**, 165-177 (2001).
  179. Swanson R, Locher, M. & Hochstrasser, M. A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* **15**, 2660-2674 (2001).
  180. Bartee E, Mansouri, M., Hovey-Nerenberg, B.T., Gouveia, K. & Früh, K. Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins. *The journal of virology* **78**, 1109-1120 (2004).
  181. Dul BE & Walworth, N.C. The plant homeodomain fingers of fission yeast Msc1 exhibit E3 ubiquitin ligase activity. *J Biol Chem* **282**, 18397-18406 (2007).
  182. Bienz, M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *TRENDS Biochem Scie* **31**, 35-40 (2006).
  183. Ivanov AV *et al.* PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell* **28**, 823-837 (2007).
  184. Duncan LM *et al.* Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO* **25**, 1635-1645 (2006).
  185. Thomas M, Wills, M. & Lehner, P.J. Natural killer cell evasion by an E3 ubiquitin ligase from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochem Soc Trans* **36**, 459-463 (2008).
  186. Goto E *et al.* c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity. *The journal of biological chemistry* **278**, 14657-14668 (2003).
  187. Ohmura-Hoshino M *et al.* A Novel Family of Membrane-Bound E3 Ubiquitin Ligases. *J. Biochem.* **Vol. 140**, 147-154 (2006).

188. Ohmura-Hoshino M *et al.* Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. *The journal of immunology* **177**, 342-354 (2006).
189. Nakamura N, Fukuda, H., Kato, A. & Hirose, S. MARCH-II is a syntaxin-6-binding protein involved in endosomal trafficking. *Mol Biol Cell* **16**, 1696-1710 (2005).
190. Cao Z, Huett, A., Kuballa, P., Giallourakis, C. & Xavier, R.J. DLG1 is an anchor for the E3 ligase MARCH2 at sites of cell-cell contact. *Cell Signal* **20**, 73-82 (2008).
191. Fukuda H, Nakamura, N. & Hirose, S. MARCH-III Is a novel component of endosomes with properties similar to those of MARCH-II. *J Biochem* **139**, 137-145 (2006).
192. Hassink G *et al.* TEB4 is a C4HC3 RING finger-containing ubiquitin ligase of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **1**, 647-655 (2005).
193. Kreft SG, Wang, L. & Hochstrasser, M. Membrane topology of the yeast endoplasmic reticulum-localized ubiquitin ligase Doa10 and comparison with its human ortholog TEB4 (MARCH-VI). *J Biol Chem* **281**, 4646-4653 (2006).
194. Hoer S, Smith, L. & Lehner, P.J. MARCH-IX mediates ubiquitination and downregulation of ICAM-1. *FEBS Letters* **581**, 45-51 (2007).
195. 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* **7**, 1019-1022 (2006).
196. Ramalho-Santos M, Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R. & Melton, D. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* **298**, 597-600 (2002).
197. Su AI *et al.* Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *PNAS* **99**, 4465-4470 (2002).
198. Muthukumarana P *et al.* Regulatory transplantation tolerance and "stemness": evidence that Foxp3 may play a regulatory role in SOCS-3 gene transcription. *Transplantation* **84**, S6-11 (2007).
199. Morokuma Y *et al.* MARCH-XI, a novel transmembrane ubiquitin ligase implicated in ubiquitin-dependent protein sorting in developing spermatids. *J Biol Chem* **282**, 24806-24815 (2007).
200. Matsuki Y *et al.* Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO* **26**, 846-854 (2007).
201. Long EO *et al.* Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells. *Hum Immunol* **31**, 229-235 (1991).
202. Faubert A, Samaan, A. & Thibodeau, J. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J Biol Chem* **277**, 2750-2755 (2002).
203. Sekaly RP, Tonnelle, C., Strubin, M., Mach, B. & Long, E.O. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J Exp Med* **164**, 1490-1504 (1986).
204. Wraight CJ *et al.* Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J Biol Chem* **265**, 5787-5792 (1990).
205. Koch N, Koch, S. & Hämmerling, G.J. Ia invariant chain detected on lymphocyte surfaces by monoclonal antibody. *Nature* **299**, 644-645 (1982).

206. Denzin LK, Robbins, N.F., Carboy-Newcomb, C. & Cresswell, P. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* **1**, 595-606 (1994).
207. Khalil H *et al.* Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells. *Tissue antigens* **60**, 372-382 (2002).
208. Radka SF, Machamer, C. & Cresswell, P. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and Western blotting. *Hum Immunol* **10**, 177-186 (1984).
209. Nakayama T *et al.* Human B cells immortalized with Epstein-Barr virus upregulate CCR6 and CCR10 and downregulate CXCR4 and CXCR5. *J Virol* **76**, 3072-3077 (2002).
210. Murphy PM & Tiffany, H.L. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* **253**, 1280-1283 (1991).
211. Moser, B. *et al.* Expression of transcripts for two interleukin 8 receptors in human phagocytes, lymphocytes and melanoma cells. *Biochem J* **294**, 285-292 (1993).
212. Varney ML *et al.* Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis* **20**, 723-731 (2003).
213. Reich K *et al.* Response of Psoriasis to Interleukin-10 is Associated with suppression of Cutaneous Type 1 Inflammation, Downregulation of the Epidermal Interleukin-8/CXCR2 Pathway and Normalization of Keratinocyte Maturation. *J Invest Dermatol* **116**, 319-329 (2001).
214. Murray, P.J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* **178**, 2623-2629 (2007).
215. Terpe HJ, Stark, H., Prehm, P. & Günthert, U. CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* **101**, 79-89 (1994).
216. Thorne RF, Legg, J.W. & Isacke, C.M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci* **117**, 373-380 (2004).
217. Cho SG, Attaya, M. & Monaco, J.J. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* **353**, 573-576 (1991).
218. Wang X, Lybarger, L., Connors, R., Harris, M.R. & Hansen, T.H. Model for the interaction of gammaherpesvirus 68 RING-CH finger protein mK3 with major histocompatibility complex class I and the peptide-loading complex. *J Virol* **78**, 8673-8686 (2004).
219. House CM *et al.* Elucidation of the substrate binding site of Siah ubiquitin ligase. *Structure* **14**, 695-701 (2006).