

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Du protéome à l'immunopectome : le modèle SIMP/STT3-B

Par

Etienne Caron

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Science (M.Sc)

en Sciences Biomédicales

août 2004

© Etienne Caron, 2004



W

4

U58

2005

V. 018

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉL
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Du protéome à l'immunopeptome : le modèle SIMP/STT3-B

Par
Etienne Caron

Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Sera évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvain Meloche
Claude Perreault
Michel Desjardins

SOMMAIRE

Dérivant d'une fraction du protéome cellulaire, l'immunopeptome correspond à l'ensemble des peptides associés aux molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Pour des raisons inconnues, la contribution des protéines à l'immunopeptome est très inégale. Pour mieux comprendre la relation entre le protéome et l'immunopeptome, nous avons étudié une protéine présentant un "phénotype extrême", STT3-B. Chez la souris et l'humain, STT3-B génère des niveaux particulièrement élevés de peptides associés aux molécules du CMH I. Nous avons émis l'hypothèse que la forte contribution de STT3-B pour l'immunopeptome pouvait dépendre de son comportement intracellulaire et de certains domaines protéiques de STT3-B. Suite à la fusion de STT3-B₁₋₅₇₅, STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ à l'ovalbumine et la quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL à la surface, nous avons démontré que ces domaines de STT3-B sont suffisants pour augmenter la contribution de l'ovalbumine à l'immunopeptome. Suivant la transfection des cellules HEK293 et COS7, nous avons démontré que la protéine EGFP/STT3-B s'accumule de façon juxtanucléaire. Cette accumulation juxtanucléaire, que nous avons dénommée SERTA ("Smooth Endoplasmic Reticulum Tubular Arrays"), correspond à une prolifération du R.E. (Réticulum Endoplasmique), dépend des microtubules et de l'activité du protéasome. Nous avons de plus mis en évidence que les régions STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ jouent un rôle majeur dans la régulation de la formation des SERTAs et que STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ est nécessaire à la contribution optimale de STT3-B pour l'immunopeptome. Basés sur ces résultats, nos travaux futurs seront davantage orientés vers l'immunothérapie. La propriété "SERTAs-forming" de STT3-B et les domaines STT3-B₁₋₅₇₅, STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ pourront être utilisées dans le but d'augmenter l'immunogénicité d'une oncoprotéine, c'est-à-dire sa contribution à l'immunopeptome.

Mots-clés : STT3-B, SERTA, Immunopeptome, ovalbumine

ABSTRACT

Derived from a small sample of the cell proteome, the immunopeptome corresponds to the whole MHC I-associated peptides at the cell surface. For unknown reasons, the contribution of proteins to the immunopeptome is very unequal. To get a better understanding of the relation between the proteome and the immunopeptome, we studied a self-protein with an "extreme phenotype", STT3-B. In mouse and human cells, STT3-B generates high amounts of MHC I-associated peptides. We hypothesized that the strong contribution of STT3-B to the immunopeptome could depend on its intracellular behaviour and on different STT3-B domains. Following quantification of the H2-K^b/SIINFEKL complexes at the cell surface, we showed that fusion of STT3-B₁₋₅₇₅, STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ and STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ is sufficient to increase the contribution of the ovalbumin to the immunopeptome. We showed that EGFP/STT3-B accumulates in a juxtannuclear manner in HEK293 and COS7 cells. This juxtannuclear accumulation, refer as SERTA ("Smooth Endoplasmic Reticulum Tubular Arrays"), corresponds to an E.R. (Endoplasmic Reticulum) proliferation, depends on the microtubules and on the activity of the proteasome. Moreover, we showed that STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ and STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ play a major role in the regulation of SERTAs formation and STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ is necessary to optimize the contribution of STT3-B to the immunopeptome. Based on these results, our future works will be focus in the field of immunotherapy. The "SERTAs-forming" capacity of STT3-B, STT3-B₁₋₅₇₅, STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ and STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ could be used to increase the immunogenicity of an oncoprotein, i.e. its contribution to the immunopeptome.

Key words: STT3-B, SERTA, Immunopeptome, ovalbumin

TABLES DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
1. Introduction générale.....	1
2. La présentation des peptides par les molécules du CMH I.....	1
2.1 <i>Le protéasome, un partenaire au cœur de l'immunité adaptative</i>	2
2.2 <i>L'immunoprotéasome, un joueur clef mieux adapté</i>	4
2.3 <i>Le régulateur PA28</i>	5
2.4 <i>La localisation intracellulaire du protéasome et de l'immunoprotéasome</i>	6
2.5 <i>Du Protéome à l'immunopeptome</i>	7
2.5.1 <i>Tant de protéines pour si peu de peptides, d'où provient cette perte?</i>	7
2.5.2 <i>La source de ces peptides antigéniques</i>	9
2.5.2.1 <i>L'hypothèse des DRiPs</i>	9
2.5.2.2 <i>Définir l'immunopeptome par spectrométrie de masse</i>	11
3. Le modèle SIMP/STT3-B.....	12
3.1 <i>L'identification de la protéine SIMP/STT3-B</i>	12
3.2 <i>STT3-B : membre du complexe oligosaccharyltransférase</i>	14

4. La génération de peptides dérivés de protéines entrant dans la voie de sécrétion...	16
4.1 <i>La dégradation des protéines par la voie du ERAD</i>	17
4.1.1 <i>La reconnaissance du substrat</i>	17
4.1.2 <i>La rétrotranslocation du R.E. vers le cytoplasme</i>	18
4.2 <i>Identification de protéines virales et tumorales, précurseurs de peptides immunogènes et dégradées par la voie du ERAD</i>	19

INTÉRÊTS SCIENTIFIQUES ET OBJECTIFS.....21

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....23

1. Réactifs et anticorps.....	23
2. Culture cellulaire et transfections.....	23
3. Constructions.....	24
4. Quantification des complexes H2-K ^b /SIINFEKL.....	28
5. Traduction <i>in vitro</i> et Western blot.....	28
6. Microscopie électronique, stéréoscopique et immunofluorescence.....	29

RÉSULTATS.....31

1. Analyses bioinformatiques.....	31
2. Comparaison de l'efficacité de présentation du peptide SIINFEKL provenant de STT3-B et de l'ovalbumine	39
3. Expression de STT3-A/B dans un système <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	43
4. STT3-B s'accumule de façon juxtanucléaire et se distingue de l'agrésome.....	46
5. Étude de la dernière région transmembranaire STT3-B ₅₂₉₋₅₅₆	54
5.1 <i>La région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ correspond à un signal d'ancrage de type II et peut être suffisante pour induire la formation de SERTAs</i>	54
5.2 <i>La région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ est nécessaire à la génération optimale de SERTAs et est essentielle à la rétention complète de STT3-B au niveau</i>	

<i>du R.E.</i>	61
5.4 <i>L'absence de la région STT3-B provoque une dégradation plus efficace de STT3-B par le protéasome</i>	64
6. <i>Évaluation de régions candidates à un rôle dans la dégradation de STT3-B</i>	65
6.1 <i>La région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ joue un rôle dans la dégradation de la protéine et dans la formation de SERTAs</i>	65
6.2 <i>Influence de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ sur la dégradation par le protéasome</i>	69
7. <i>STT3-A/B, deux protéines modèles pour augmenter la contribution de l'ovalbumine à la formation de l'immunopeptome</i>	72
7.1 <i>Les régions STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ sont suffisantes pour augmenter l'immunogénicité de l'ovalbumine</i>	72
7.2 <i>Les multiples domaines transmembranaires de STT3A/B sont suffisants pour augmenter la contribution de l'ovalbumine à la génération de l'immunopeptome</i>	76
DISCUSSION	77
1. <i>La localisation intracellulaire de STT3-B</i>	77
2. <i>Une protéine source de DRiPs</i>	78
2.1 <i>Les caractéristiques intrinsèques de STT3-B</i>	78
2.2 <i>La formation de SERTAs</i>	81
2.3 <i>Les SERTAs et la machinerie du ERAD</i>	85
2.4 <i>Les SERTAs et la présentation d'antigènes</i>	88
3. <i>Régions impliquées dans la localisation, la stabilité et la contribution à l'immunopeptome</i>	91
3.1 <i>La région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂</i>	91
3.2 <i>La région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃</i>	93
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	98
RÉFÉRENCES	103

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Composition du protéasome 26S	3
Figure 2 : Composition de l'immunoprotéasome.....	4
Figure 3 : Génération de peptides par la dégradation des DRiPs.....	10
Figure 4 : Localisation du complexe OST au niveau du translocon.....	15
Figure 5 : Rétrotranslocation des protéines du R.E. vers le cytoplasme.....	16
Figure 6 : Analyses bioinformatiques de STT3-B.....	32
Figure 7 : Analyses bioinformatiques de STT3-A.....	35
Figure 8 : Efficacité de présentation du peptide SIINFEKL.....	40
Figure 9 : Expression de STT3-A/B.....	44
Figure 10 : Accumulation juxtanucléaire de STT3-B.....	47
Figure 11 : Caractérisation de la formation des SERTAs.....	51
Figure 12 : Caractérisation de la région STT3-B ₅₂₉₋₅₅₆	55
Figure 13 : Délétion de la région STT3-B ₅₂₉₋₅₅₆	62
Figure 14 : Délétion de la région STT3-B ₆₁₂₋₆₆₂	66
Figure 15 : Influence de la région riche en lysine STT3-B ₇₉₀₋₈₂₃	70
Figure 16 : Quantification des complexes H2-K ^b /SIINFEKL.....	73
Figure 17 : Approche immunothérapeutique.....	95

LISTE DES TABLES

Tableau 1 : Effet de la clasto-Lactacystin sur différents substrats du protéasome...53

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ApoB:** Apolipoprotein B
- ATPase :** Adénosine triphosphatase
- cDNA :** Complementary deoxyribonucleic acid
- CFTR :** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- CMH:** Complexe majeur d'histocompatibilité
- COS :** Green African monkey fibroblast
- CTL:** Cytotoxic T lymphocyte
- DAD1:** Defender against apoptotic cell death 1
- DALIS :** Dendritic cell aggresome-like induced structures
- DRiPs :** Defective ribosomal products
- EDEM:** Endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase-like
- EGFP :** Enhanced green fluorescent protein
- EOR :** Endoplasmic reticulum overload response
- ERAC:** Endoplasmic reticulum-associated compartment
- ERAD:** Endoplasmic reticulum-associated degradation
- ERAP1:** Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
- ERGIC :** Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment
- FITC:** Fluorescéine isothiocyanate
- FRAP:** Fluorescence recovery after photobleaching
- GST:** Glutathione S-transferase
- HCV:** Hepatitis C virus
- HCMV:** Human cytomegalovirus
- HEK :** Human embryonic kidney
- HeLa :** Human cervix adenocarcinoma
- HIV :** Human immunodeficiency virus
- HLA :** Human leucocyte antigen
- HMG:** 3-hydroxy-3-methylglutaryl
- HMW:** High molecular weight

IB : Immunoblot
IFN- γ : Interféron gamma
IRES: Internal ribosomal entry site
Itm1 : Integral membrane protein 1
JAK : Janus kinase
LAP: Leucine aminopeptidase
ME : Microscopie électronique
MFI : Mean fluorescence intensity
mRNA : Messenger ribonucleic acid
MTOC: Microtubule organisation centre
PCR : Polymerase chain reaction
PDI: Protein disulphide isomerase
PEST : Proline, glutamic acid, serine, threonine
PML: Promyelocytic leukemia
OSER: Organized Smooth endoplasmic reticulum
OST: Oligosaccharyltransférase
RI: Ribophorin I
RII: Ribophorin II
R.E.: Réticulum endoplasmique
rER : Rough endoplasmic reticulum
RER: Réticulum endoplasmique rugueux
RNA : Ribonucleic acid
sER : Smooth endoplasmic reticulum
SEREC : Smooth endoplasmic reticulum exit compartment
SERTAs: Smooth endoplasmic reticulum tubular arrays
SIMP : Souce of immunodominant MHC-associated peptides
TAA : Tumor-associated antigen
TAP: Transporter for antigen processing
TCR : T cell receptor
tER : Transitional endoplasmic reticulum
TOP: Thimet oligopeptidase

TPPII: Tripeptidyl peptidase II

Ub: Ubiquitine

UPR : Unfolded protein response

VTC : Vesicular-tubular clusters

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier Dr. Claude Perreault de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance pour effectuer les premiers travaux sur STT3-B. J'apprécie particulièrement sa présence puisqu'il m'aura inculqué deux aspects importants en recherche : la rigueur scientifique et la créativité.

J'aimerais remercier Dr. Rock, Dr. Yewdell et Dr. Sztul pour l'obtention de certains réactifs sans lesquels ces travaux n'aurait pu être effectués.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire avec qui j'ai travaillé de près ou de loin. Je remercie tout particulièrement Renée Charbonneau tant pour son appui scientifique que pour son appui moral. J'aimerais également remercier Dr. Dario Lehoux et Dr. Kevin McBride pour les discussions passionnantes sur STT3-B.

Merci à ma copine Ariane qui aura su comprendre ma passion au travail et supporter mes moments de délires scientifiques. Merci également à ma famille pour leurs encouragements tout au long de ma maîtrise.

INTRODUCTION

1. Introduction générale

La dégradation du protéome représente une étape essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire, pour le recyclage des acides aminés, mais également pour communiquer l'état de santé de la cellule. Les gnathostomes ont évolué de façon à présenter un petit échantillon de leur protéome aux cellules effectrices du système immunitaire. En effet, suivant la protéolyse des protéines du soi, les peptides générés sont transportés à la surface cellulaire en association avec les molécules du CMH I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I). À l'intérieur de cellules normales, la génération et l'acheminement de ces peptides ("antigen processing") est effectué de façon continue, résultant ainsi en la présentation d'une grande variété de complexes CMH I-peptide (immunopeptome). Toute modification dans l'environnement intracellulaire, causée par une instabilité génomique ou par l'entrée d'un pathogène, provoque des changements dans la nature des peptides présentés, ce qui constitue le signal d'alarme pour les CTLs ("Cytotoxic T Lymphocytes") CD8+. Le rôle des CTLs est donc de patrouiller l'organisme et de reconnaître tout changement au niveau de l'immunopeptome, permettant ainsi l'éradication des cellules potentiellement néfastes pour l'organisme.

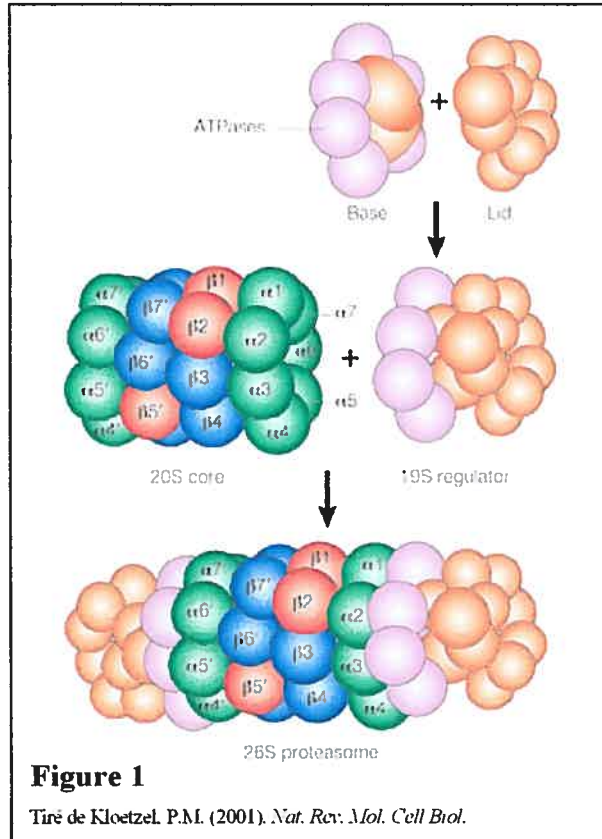
2. La présentation des peptides par les molécules du CMH I

Il a été déduit que le protéome entier pouvait contribuer à la génération de peptides antigéniques (Lauemoller et al., 2000). Bien que certains peptides soient générés indépendamment du protéasome, ce dernier représente une pièce clé dans ce processus. En exerçant la dégradation de la majorité des protéines, le protéasome permet l'accès des peptides libérés au canal TAP ("Transporter for Antigen

Processing"). En se liant avec une fraction de ces peptides, TAP possède la capacité de les expédier vers l'intérieur du R.E. (Réticulum Endoplasmique). C'est ensuite par une affinité spécifique entre un peptide et une molécule du CMH I qu'un complexe stable se forme, permettant ainsi à ce dernier de poursuivre sa route dans la voie de sécrétion. Bien qu'il y ait certaines exceptions à cette voie de présentation, il est maintenant bien reconnu que la grande majorité des peptides sont générés et présentés de cette façon.

2.1 Le protéasome : un partenaire au cœur de l'immunité adaptative

Il est maintenant bien reconnu que le protéasome est l'unité enzymatique produisant la quasi totalité des peptides associés aux CMH I (Rock et al., 1994). Le protéasome 26S est l'une des unités protéolytiques les plus utilisées par les eucaryotes pour la dégradation des protéines (Rock and Goldberg, 1999). Distribué de façon ubiquitaire et présent en forte concentration (8×10^5 molécules par cellule; Princiotta et al., 2003), le protéasome diffuse entre le cytoplasme et le noyau dans l'objectif d'éliminer les protéines non fonctionnelles (Reits et al., 1997). C'est la dégradation partielle de ces protéines disfonctionnelles qui donnera naissance à des milliers d'oligopeptides variant entre 4 et 20 résidus (Kisselev et al., 1999). Bien que 15% des peptides produits par le protéasome soient de taille adéquate pour leur association avec le CMH I, 20% de ces peptides ne sont que des précurseurs (Cascio et al., 2001) et devront donc être remodelés par d'autres protéases. Le remodelage ou "trimming" des peptides par les protéases intracellulaires représente une étape majeure pour optimiser l'association des peptides avec TAP et/ou le CMH I.



Le protéasome 26S est constitué de deux complexes régulateurs 19S, lesquels sont situés aux extrémités du complexe catalytique 20S (Fig. 1). Le protéasome 20S comprend 14 sous-unités distinctes distribuées sous forme de quatre anneaux de type $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ alors que le complexe 19S est formé de six sous-unités ATPase et de neuf à dix sous-unités non-ATPase. Afin de rendre le protéasome fonctionnellement actif pour la dégradation des protéines,

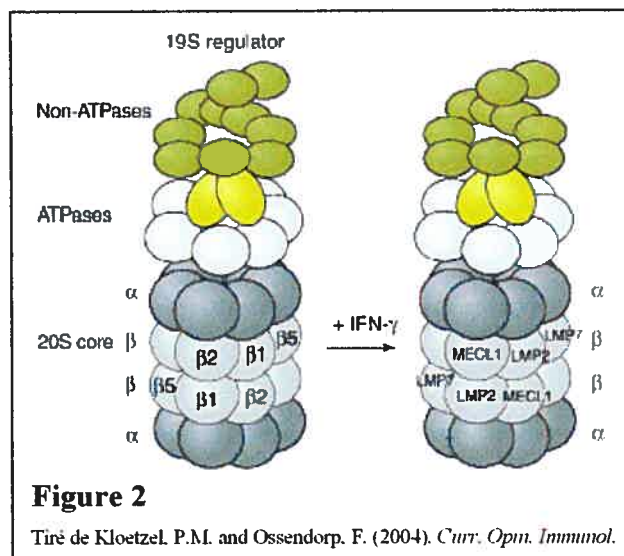
l'assemblage des unités régulatrices

est primordial. En effet, en plus de finaliser le dépliement de la protéine cible avant son entrée dans la partie catalytique du protéasome, le complexe 19S permet de reconnaître les protéines ayant subi le processus de polyubiquitination (Glickman et al., 1999). L'ubiquitine (Ub) est une protéine très bien conservée parmi les eucaryotes. Cette protéine de 76 acides aminés est extrêmement abondante dans la cellule ($\sim 10^8$ copies par cellule HeLa; Haas and Bright, 1985) et son implication est indéniable au niveau de la régulation du système immunitaire (Liu, 2004). L'ubiquitine est elle-même ubiquitinée afin de produire des chaînes d'ubiquitines. Lorsque ces chaînes sont formées, elles se lient à la partie régulatrice 19S, laquelle achemine la protéine cible vers le complexe catalytique (Thrower et al., 2000). Bien que la majorité des substrats du protéasome subissent cette modification post-traductionnelle, certaines protéines échappent à cette règle (Verma and Deshaies, 2000). Quelle est donc l'importance de l'ubiquitination pour la formation de l'immunopeptide? Par l'utilisation de cellules thermosensibles à l'enzyme activant l'ubiquitine, Michalek et al. (1993) ont démontré un rôle majeur de l'ubiquitination dans la présentation des peptides associés au CMH I. D'autres études ont également

démontré que l'induction de l'ubiquitination permettait d'accélérer la présentation des peptides et de stimuler une réponse CTL plus efficace (Grant et al., 1995; Tobery and Siliciano, 1997). Par ailleurs, d'autres travaux ont démontré que l'ubiquitination n'est pas nécessaire pour la génération des peptides (Cox et al., 1995; Cascio et al., 2001). Le protéasome joue donc un rôle majeur dans la génération des peptides. Cependant, les processus effectués pour acheminer les protéines au protéasome ne sont pas encore entièrement élucidés.

2.2 L'immunoprotéasome : un joueur clef mieux adapté

Le protéasome existe sous deux formes chez les eucaryotes, lesquels se distinguent par la constitution du complexe 20S. Régulées par la production de cytokines, LMP2 et LMP7 représentent deux protéines protéasomales encodées par le locus du CMH (Monaco and McDenitt, 1982). Lorsque les lymphocytes T activés relâchent l'interferon-gamma (IFN- γ), LMP2, LMP7 et MECL1 (MECL1 étant encodée à l'extérieur du locus CMH) sont incorporées dans le protéasome 20S (Fig. 2) et provoquent une altération de ses activités protéolytiques, ayant comme effet de modifier l'immunopeptome (Driscoll et al., 1993; Gaczynska et al., 1993). Par son



rôle au niveau de l' "antigen processing", ce protéasome remodelé est référé comme étant l'immunoprotéasome. Lorsque comparé au protéasome constitutif, l'immunoprotéasome permet d'augmenter l'efficacité de présentation des peptides (Goldberg, et al., 2002),

représentant ainsi un complexe protéolytique spécialisé pour le système immunitaire. Plusieurs études démontrent

que la modification des sites de clivage serait en grande partie responsable d'une telle performance. Il a par exemple été suggéré que les oligopeptides générés par l'immunoprotéasome possèdent une extension en N-terminal (Cascio et al., 2001). Cette extension permettrait à l'oligopeptide de s'associer et d'être transporté plus rapidement par TAP, favorisant ainsi l'efficacité de présentation des peptides (Momburg et al., 1994). Bien que les mécanismes expliquant la performance de l'immunoprotéasome ne soient pas tous résolus, il n'en reste pas moins qu'une souris "knock-out" pour LMP2 et/ou LMP7 perd sa capacité à présenter certains peptides immunogéniques (Fehling et al., 1994; Van Kaer et al., 1994) et possède un répertoire CTL altéré (Chen et al., 2001), démontrant ainsi directement l'importance de ces sous-unités dans la réponse immunitaire adaptative.

2.3 Le régulateur PA28

Il existe chez les eucaryotes supérieurs un complexe protéasomal régulateur, nommé 11S REG ou PA28, qui semble jouer un rôle important au niveau de l'"antigen processing". Chez les mammifères, PA28 est présent sous deux formes : PA28 α et PA28 β , chacun d'eux étant modulé par la présence d'IFN- γ (Rechsteiner et al., 2000). Ce complexe possède la propriété de lier les anneaux alpha du protéasome 20S et de favoriser l'ouverture à l'extrémité de celui-ci. Plusieurs rôles ont été proposés pour le complexe PA28 $\alpha\beta$ tel que 1) l'ouverture de l'unité 20S coordonnée à une activité catalytique plus élevée (Dick et al., 1996), 2) l'interaction du protéasome avec certaines chaperones ou composantes du R.E. (Rechsteiner et al., 2000) et 3) l'assemblage de l'immunoprotéasome (Preckel et al., 1999). D'autre part, il a été démontré que l'absence de PA28 $\alpha\beta$ chez des souris "knock out" provoquait une diminution de la variété de certains peptides et de la reconnaissance par les CTLs (Murata et al., 2001). Bien que les rôles physiologiques de ce complexe régulateur restent à éclaircir sous plusieurs points, plusieurs éléments suggèrent fortement qu'il posséderait la capacité de moduler l'immunopeptome.

2.4 La localisation intracellulaire du protéasome et de l'immunoprotéasome

Il est reconnu depuis un certain temps que le protéasome se localise dans le cytoplasme et dans le noyau (Tanaka and Ichiara, 1989). Par la maîtrise de différentes techniques telles que l'immunofluorescence, la microscopie électronique et le fractionnement intracellulaire, les études les plus récentes ont démontré que le protéasome n'est en rien un complexe passif en l'attente de protéines cibles. Par la caractérisation d'unités protéasomales fusionnées à GFP, les études par Reits et al. (1997) ont démontré de façon élégante que le protéasome avait la capacité de se déplacer très rapidement vers l'intérieur du noyau, supportant ainsi l'idée du "search and destroy" (Anton et al., 1999). Bien que le protéasome soit présent dans tout le cytoplasme, on le retrouve en plus grande concentration au niveau du centrosome sous conditions physiologiques normales (Wigley et al., 1999). Par la présence élevée de molécules impliquées dans la voie de dégradation protéasomale, le centrosome est considéré comme un centre spécialisé en protéolyse. Ce concept fut d'abord proposé par Wójcik et al. (1996), qui suite au traitement de cellules avec un inhibiteur du protéasome, nota la formation d'un agrégat périnucléaire riche en protéasome et en protéines ubiquitinées. D'autres études ont par la suite confirmé que de tels "agrésomes" étaient retrouvés dans diverses conditions (Johnston et al., 1998; Kopito, 2000). L'agrésome est généralement observé suite à l'inhibition du protéasome ou la surexpression d'une protéine propice à agréger ou difficile à dégrader. Bien que la formation d'agrésomes soit impliquée dans certaines maladies neurodégénératives (Kopito, 2000), très peu d'évidence démontre leur réelle existence à l'intérieur de cellules normales. Quoi qu'il en soit, de récentes études ont démontré que la localisation d'une protéine à un tel site permettait d'augmenter la génération de peptides à la surface cellulaire (Anton et al., 1999; Lacaille et al., 2000) et d'induire une réponse CTL plus efficace envers un antigène spécifique (Hung et al., 2003). L'équivalent nucléaire du centrosome correspondrait à un ensemble de petits sous-domaines nucléaires nommés PML ("Promyelocytic Leukemia"). Il a par ailleurs été démontré que l'IFN- γ influençait la distribution de l'immunoprotéasome et de PA28

en provoquant leur accumulation à l'intérieur de ces corps nucléaires (Fabunmi et al., 2001). Il est donc vraisemblable que le centrosome et PML soient des sites particulièrement efficaces pour la dégradation protéasomale.

La dégradation des protéines qui entrent dans la voie classique de sécrétion s'effectue par un mécanisme de rétrotranslocation : le ERAD ("Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation"). Ce mécanisme consiste à réexpédier les protéines incorrectement repliées du R.E. vers le cytoplasme. Puisque le protéasome est absent de la lumière du R.E., c'est par ce processus que les protéines à conformation inadéquate atteignent le protéasome cytosolique. On estime qu'environ 14% du protéasome cytoplasmique est associé à la membrane du R.E., et ce uniquement du côté cytosolique (Rivett et al., 1992). Il a d'ailleurs été proposé que le complexe régulateur PA28 pourrait favoriser l'association du protéasome ou de l'immunoprotéasome avec le R.E. via une interaction avec TAP (Rechsteiner et al., 2000). Cette association entre PA28 et TAP permettrait un acheminement beaucoup plus direct des peptides libérés vers la lumière du R.E.. Sous l'effet de l'IFN- γ , l'immunoprotéasome possède également la capacité de s'associer à la membrane du R.E., du moins dans des cellules HeLa (Brooks et al., 2000). Ce recrutement dynamique du protéasome ou de l'immunoprotéasome au niveau du R.E. pourrait permettre de mieux gérer la dégradation des protéines rétrotransloquées et/ou l'incorporation des peptides dans la lumière du R.E..

2.5 Du protéome à l'immunopeptome

2.5.1 Tant de protéines pour si peu de peptides : d'où provient cette perte?

Lorsque les peptides sont expulsés du protéasome, un jeu de compétition s'amorce entre les différentes peptidases cytosoliques et TAP pour l'obtention de ces

peptides. TPPII (Tripeptidyl Peptidase II) (Reits et al., 2004), LAP (Leucine Aminopeptidase) (Beninga et al., 1998) et TOP (Thimet Oligopeptidase) (York et al., 2003) représentent les peptidases cytoplasmiques activement impliquées dans le remodelage des peptides libérés par le protéasome. Plus de 99% des peptides générés par le protéasome sont éliminés par ces peptidases cytosoliques (Reits et al., 2003). Ceci explique en partie l'inefficacité de la présentation des peptides par les molécules du CMH I. Il faut en moyenne entre 2000 et 10 000 protéines pour qu'un seul peptide soit présenté à la surface en association avec une molécule du CMH I (Yewdell et al., 2003). C'est leur manque de protection qui rend les peptides si susceptibles à l'attaque massive des protéases. En effet, possédant un temps de demi-vie très court (5 secondes), un peptide libéré dans le cytoplasme aura en moyenne 6 secondes pour voyager dans la cellule et s'associer à TAP, sans quoi il sera dégradé. Par contre, puisque les peptidases sont absentes du noyau, les peptides produits à ce niveau demeureront intacts tant et aussi longtemps qu'ils ne diffuseront pas vers le cytoplasme (Reits et al., 2003).

Environ 20% des oligopeptides sortant du protéasome possèdent une extension N-terminal. Ces peptides subiront l'action des aminopeptidases cytosoliques, lesquelles enlèvent un acide aminé à toutes les 2-3 secondes (Reits et al., 2003). Bien qu'en général les peptidases dégradent entièrement ces oligopeptides, elles sont impliquées activement dans le processus de "trimming" peptidique et jouent de cette façon un rôle majeur vers l'obtention de peptides d'affinité adéquate pour leur association à TAP. Lorsque les peptides entrent dans la lumière du R.E., trois possibilités sont proposées : 1) un remodelage supplémentaire par ERAP1, une aminopeptidase résidente du R.E. (Saric et al., 2002), 2) une association avec le CMH de classe I menant à l'exportation du complexe vers la surface cellulaire ou 3) une réexpédition du peptide vers le cytoplasme via le translocon Sec61 (Koopmann et al., 2000). Dans ce dernier cas, l'expulsion du peptide dans le cytoplasme résultera pour une seconde fois en une compétition entre les peptidase et TAP.

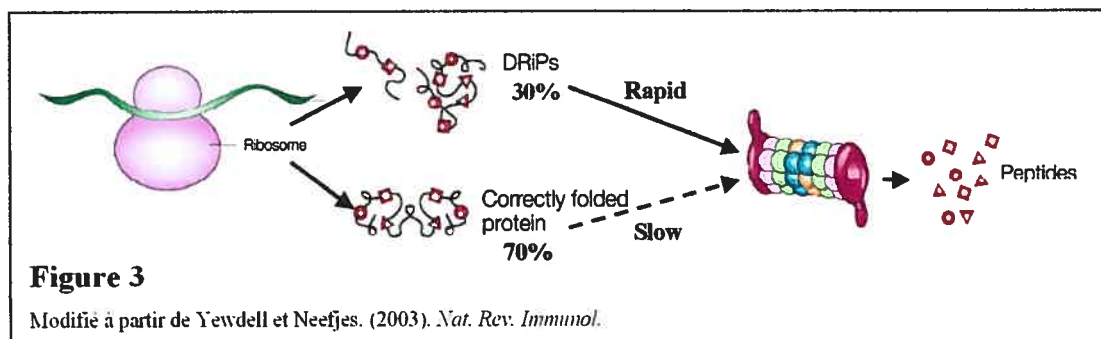
2.5.2 La source de ces peptides antigéniques

Un grand projet est né : le "human MHC project". L'élaboration de ce projet implique entre autres la formation de banques de données renfermant des milliers de peptides associés aux différents haplotypes du CMH I. On retrouve un si grand répertoire de peptides du soi et du non-soi dans ces banques de données que les immunologistes ont déduit qu'aucune protéine ne semblait pouvoir échapper à la formation de l'immunopeptome. Par contre, il est logiquement très peu probable que 2×10^9 copies d'environ 30 000 protéines différentes soient représentés de façon équivalente sur seulement 100 000 molécules du CMH I exprimés à la surface (Yewdell et al., 2003). Existerait-il donc certains précurseurs contribuant davantage à la formation de l'immunopeptome? Une des premières équipes à s'être penchées sur cette question avait émis l'hypothèse que les peptides dérivait de petits fragments aberrants d'ARN (De Plaen et al., 1988). Par contre, une accumulation d'évidences indique jusqu'à ce jour que la très grande majorité des peptides présentés dérivent de protéines dégradées ayant été synthétisées suivant un cadre de lecture standard (Shastri et al., 2002). Ceci soulève une autre question : est-ce que les peptides dérivent de protéines natives ou bien de protéines défectueuses n'ayant jamais atteint leur conformation native?

2.5.2.1 L'hypothèse des DRiPs

La perfection n'existe pas au niveau moléculaire et cellulaire. De l'ADN à l'obtention d'une protéine fonctionnelle, plusieurs erreurs sont commises : la mauvaise incorporation d'acides aminés, une mauvaise intégration dans la membrane, une conformation structurale incorrecte, des interactions protéine-protéine inadéquates, etc. Yewdell et al. (1996) donna l'acronyme DRiPs ("Defective Ribosomal Products") à ces protéines imparfaites nouvellement synthétisées. Partant d'une vieille hypothèse sur la dégradation rapide des protéines nouvellement

synthétisées (Wheatley et al., 1982), il lança l'idée que les DRiPs pourraient contribuer plus activement à la génération de l'immunopeptome. C'est l'étude de la nucléocapside, une protéine provenant du "vesicular stomatitis virus", qui mena à l'hypothèse des DRiPs. Bien que cette protéine possède un temps de demi-vie très long, une réponse T CD8+ spécifique à un peptide de la nucléocapside pouvait être détectée moins de 45 minutes suivant la synthèse de cette protéine (Esquivel et al., 1992). Des résultats biochimiques, cellulaires et immunologiques ont permis de mettre en évidence l'existence réelle des DRiPs et leur contribution majeure à la génération de peptides (Reits et al., 2000; Schubert et al., 2000; Khan et al., 2001; Voo et al., 2004). Reits et al (2000) ont démontré, par l'utilisation de la protéine recombinante TAP-GFP et par la technique de FRAP ("Fluorescence Recovery After Photobleaching"), que les DRiPs représentaient une source majeure de peptides associés aux molécules du CMH de classe I. Supportant cette idée, Schubert et al. (2000) ont publié dans le même numéro de la revue *Nature* que les DRiPs sont bien réels et qu'ils représentent entre 30 et 80% des protéines nouvellement synthétisées, lesquelles sont rapidement dégradées par le protéasome (Fig. 3). Biochimiquement, les DRiPs sont des protéines ayant été en grande majorité polyubiquitinées, retrouvées dans les HMW ("High Molecular Weight"), principalement dans la fraction insoluble, et dégradées par le protéasome dans les 10 minutes suivant leur synthèse. C'est d'ailleurs par la génération des DRiPs que les lymphocytes T CD8+ peuvent reconnaître aussi rapidement une cellule infectée, soit dans les premières minutes suivant l'entrée du virus. Si la majorité des peptides présentés provenaient de protéines virales hautement stables, les T CD8+ interviendraient plusieurs heures et même plusieurs jours suivant l'infection, ce qui rendrait le contrôle viral beaucoup moins efficace.



L'hypothèse "Yewdellienne" a jusqu'à maintenant été évaluée par l'utilisation de protéines virales. Qu'en est-il des protéines du soi ? Est-ce que certaines protéines endogènes sources de DRiPs contribueraient plus activement à la formation de l'immunopeptome? Plusieurs protéines endogènes sont sources de DRiPs. Par contre, aucune étude n'a jusqu'à maintenant directement évalué la capacité des DRiPs du soi à la formation de l'immunopeptome. Le meilleur exemple de protéine endogène source de DRiPs correspond sans aucun doute au modèle CFTR ("Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator"), dont 80% des molécules nouvellement synthétisées sont acheminées vers la voie de dégradation par le protéasome (Kopito, 1999). On retrouve également d'autres protéines du soi source de DRiPs telles que "peripheral myelin protein 22" (Pareek et al., 1997), "thyrotropin receptor" (Fernandez et al., 2002), "δ-opioid receptor" (Petaja et al., 2001), "apolipoprotein B" (Yao et al., 1997) et "olfactory G-protein coupled receptors" (Lu et al., 2003). Parce qu'elles sont susceptibles aux erreurs et difficiles à replier, une grande proportion de ces protéines nouvellement synthétisées sont dégradées, devenant ainsi potentiellement une source majeure de peptides antigéniques. Pouvons-nous prédire quels types de protéines sont propices à être précurseurs de DRiPs? Cela pourrait dépendre de deux facteurs : 1) la complexité intrinsèque de la protéine et 2) de la complexité des interactions avec d'autres protéines (Yewdell et al., 2001). Par exemple, les petites molécules solubles comptant peu d'interactions protéine-protéine devraient représenter une faible source de DRiPs. À l'autre extrême, de grosses molécules à multiples domaines transmembranaires compris à l'intérieur d'un complexe protéique et dont les interactions protéine-protéine sont exigeantes devraient représenter une forte source de DRiPs.

2.5.2.2 Définir l'immunopeptome par spectrométrie de masse : une approche directe

Outre les protéines "DRiPsantes", quels autres types de précurseurs du soi pourraient représenter des pièces clés dans la construction de l'immunopeptome?

Définir l'immunopeptome, c'est-à-dire identifier le répertoire et la quantité de peptides présentés, représente une approche intéressante pour répondre à cette question. L'approche analytique par spectrométrie de masse a l'avantage d'être directe et non biaisée (Purcell and Gorman, 2004). Partant de cette approche, Hickman et al. (2004) ont séquencé plus de 200 peptides présentés par HLA-B*1801. En reliant chacun de ces peptides à leur protéine source, il démontra que ces peptides dérivait d'un large éventail de protéines endogènes, et qu'étonnamment les "RNA-binding proteins" représentaient le seul groupe de protéines se démarquant nettement des autres par leur contribution beaucoup plus généreuse à la formation des peptides associés à HLA-B*1801. Curieusement, la comparaison du répertoire peptidique présenté par HLA-B*0702 entre des cellules non-infectées et infectées au HIV révèle que les différences ne se situent pas au niveau de la présentation de peptides viraux mais plutôt à celle de peptides dérivant de protéines du soi, lesquelles correspondent à des "RNA-binding proteins" et des "cell cycle regulatory proteins" (Hickman et al., 2003). Jusqu'à démonstration du contraire et pour des raisons obscures, ces résultats suggèrent que les "RNA-binding proteins" seraient des précurseurs contribuant plus efficacement à bâtir l'immunopeptome.

3. Le modèle SIMP/STT3-B : une protéine du soi source de peptides associés aux molécules du CMH I

3.1 L'identification de la protéine SIMP/STT3-B

On reconnaît maintenant que certaines protéines semblent participer de façon plus prononcée à la génération de peptides, tant au niveau de la variété que de la quantité. Par exemple, parmi les huit peptides encodés par le chromosome Y, six d'entre eux proviennent de seulement deux protéines différentes, Uty et Smcy (Simpson et al., 1997; Roopenian et al., 2002). De même, alors que la majorité des peptides liés au CMH I sont présents entre 1 et 100 copies par cellule, on retrouve

10000 copies du peptide SFFPEITHI provenant de la protéine JAK 1 kinase (Rammensee et al., 1993). Par ailleurs, Pion et al. (1997) ont démontré que sur des splénocytes de souris C57BL/6, 1% des molécules H2-D^b sont liées au peptide KAPDNRETL (H7^a ou B6^{dom1}), soit 1000 copies par cellule. Ce chiffre s'élève d'ailleurs à 100 000 copies par cellules sur des splénocytes stimulés. Outre le peptide H7^a, SIMP est précurseur de deux autres peptides : NLYDKAGKV, présenté par HLA-A2 (résultat non-publié), et DERVFVALY, présenté par HLA-B18 (Hickman et al., 2004).

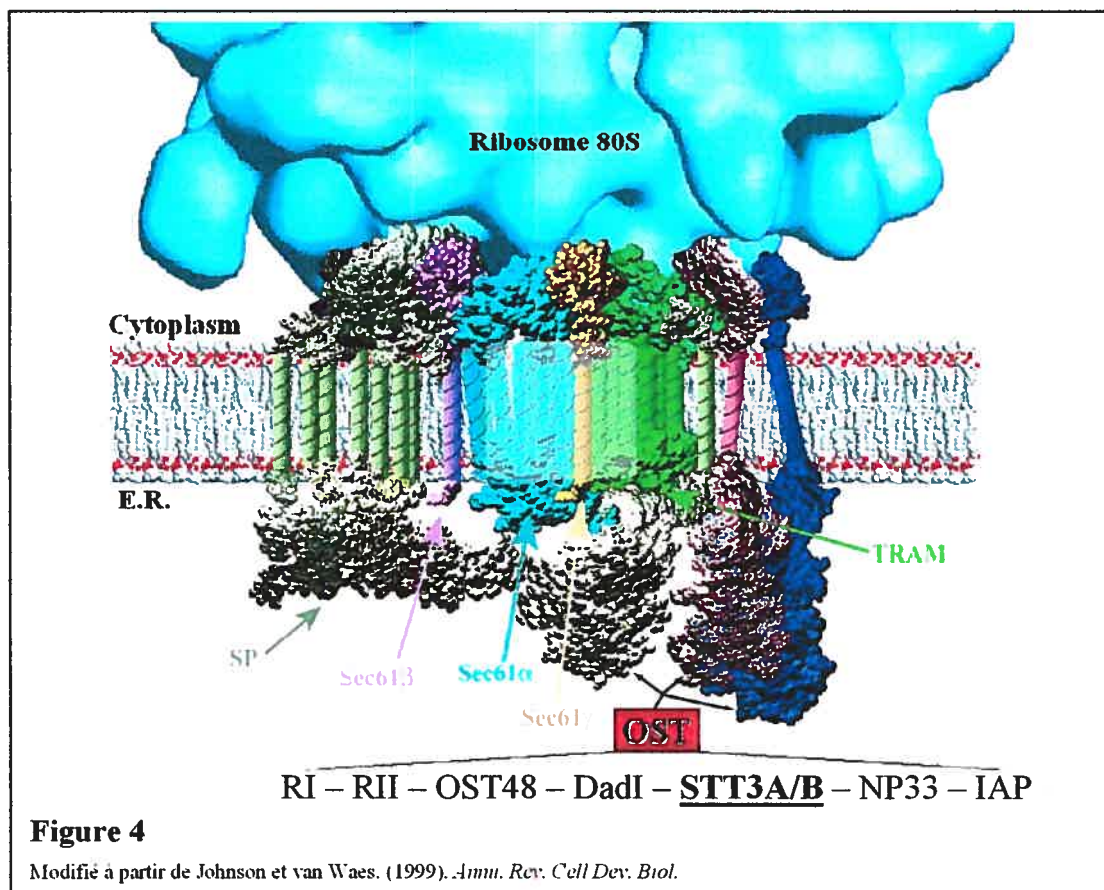
Afin de mieux comprendre pourquoi certaines protéines du soi contribuent plus efficacement à l'immunopeptome, nous avons opté pour l'étude de la protéine SIMP (STT3-B), source du peptide H7^a, lequel est retrouvé en quantité très élevée à la surface des cellules de souris H2^b (Pion et al., 1997; Pion et al., 1999; Fontaine et al., 2001; McBride et al., 2002). Chez la souris, le gène SIMP ("Source of Immunodominant MHC-associated Peptides") a été à l'origine identifié comme source de l'antigène mineur immunodominant H7^a (B6^{dom1}) (McBride et al., 2002). hSIMP (SIMP humaine) représente une protéine hautement conservée possédant un homologue chez la levure, Stt3p, dont l'identité est de 53% au niveau de la séquence en acides aminés. Par ailleurs, entre hSIMP et mSIMP (SIMP murine), on atteint une identité de 97%. De façon intéressante, une étude a démontré que des peptides associés au CMH de classe I provenaient préférentiellement de protéines fortement conservées (Yeager et al., 2000).

Localisée dans la membrane du R.E., la protéine Stt3p chez la levure exerce un rôle critique dans la N-glycosylation des protéines et de ce fait, est essentielle à la viabilité cellulaire (Zufferey et al., 1995). Bien que Stt3p soit bien caractérisée chez la levure, on n'a que depuis très récemment confirmé la fonction de son homologue SIMP chez les eucaryotes plus évolués (Kelleher et al., 2003). Les eucaryotes plus évolués possèdent deux homologues fonctionnels de Stt3p, STT3-A et STT3-B, lesquels se distinguent par des propriétés enzymatiques différentes (Kelleher et al., 2003) et correspondent à *Itm1* (Hong et al., 1996) et SIMP (McBride et al., 2002),

respectivement. Puisque SIMP représente un homologue fonctionnel de Stt3p, nous croyons approprié de lui attribuer, à l'instar de Kelleher, la dénomination STT3-B.

3.2 STT3-B: membre du complexe oligosaccharyltransferase

Bien caractérisé chez la levure, le complexe OST (oligosaccharyltransférase) est localisé à proximité du translocon et est impliqué dans la N-glycosylation des protéines entrant dans la lumière du R.E. (Knauer and Lehle, 1999). La N-glycosylation est un processus essentiel et représente une modification cotraductionnelle hautement conservée. Le rôle du complexe OST est de transférer un oligosaccharide riche en mannose ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sur la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr ou X correspond à tous les acides aminés sauf une proline. C'est lors de son passage dans le translocon qu'une protéine possédant cette séquence subira l'ajout de l'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le complexe OST est composé de 9 sous-unités formant 4 sous-complexes : Swp1p-Wbp1p-Ost3p / Ost1p-Ost5p / Stt3p-Ost4p-Ost3p / Ost6p (Knauer et al., 1999). Parmi ces sous-unités, 5 d'entre elles sont encodées par des gènes essentiels (WBP1, SWP1, OST1, OST2 et STT3). À l'intérieur de ce complexe, Stt3p représente la sous-unité la plus hydrophobe et la plus conservée. Cette protéine joue un rôle au niveau de la reconnaissance de la séquence peptidique en plus de posséder le site actif pour effectuer le transfert de l'oligosaccharide sur le substrat (Yan and Lennarz, 2002; Nilsson et al., 2003). Chez les mammifères, le complexe OST du translocon est composé de 8 sous-unités jusqu'à présent identifiées : RI (Ribophorin I), RII (Ribophorin II), OST48, DAD1, STT3-A/B, N33, IAP (Fig. 4). Suivant l'arbre phylogénétique de STT3 (Kelleher et al., 2003), on retrouve deux paralogues du gène (STT3-A/B) d'*Arabidopsis thaliana* jusqu'à l'*Homo sapiens*. L'existence et la conservation de ces deux homologues fonctionnels de STT3 soulèvent une question fondamentale: pourrait-il y exister des différences subtiles ou majeures au niveau de la fonction respective de STT3-A et STT3-B? Outre l'étude de Kelleher et al. (2003) qui a démontré des différences au niveau de leurs propriétés enzymatiques, Koiwa et

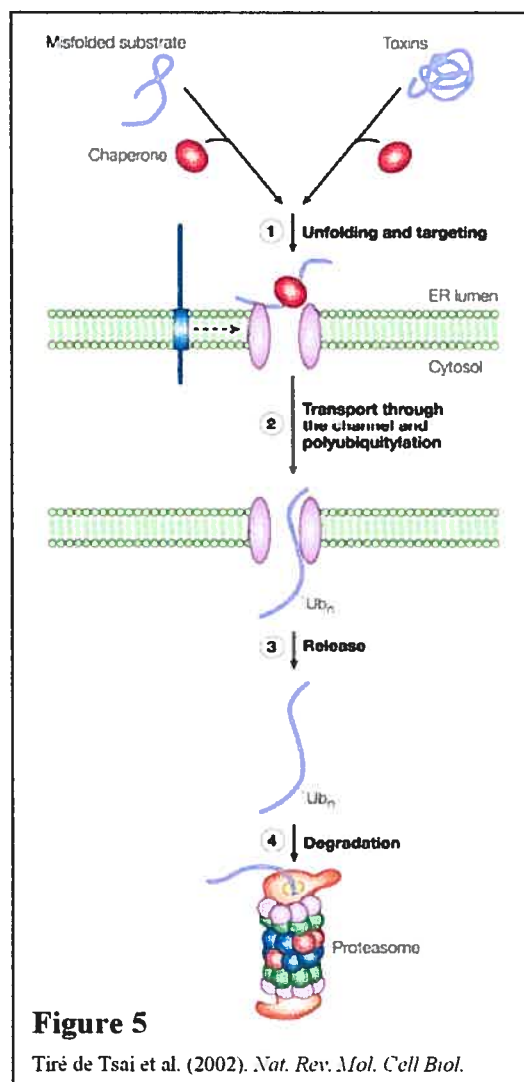


al. (2003) ont distingué l'implication de STT3-A/B dans le contrôle du UPR ("Unfolded Protein Response") chez *Arabidopsis thaliana*. Ces auteurs ont démontré qu'une mutation à l'intérieur du gène STT3-A empêchait le rétablissement de l'homéostasie cellulaire suite à l'induction d'un stress osmotique au NaCl. À l'opposé, l'homéostasie cellulaire est parfaitement rétablie pour des cellules contenant une mutation dans le gène STT3-B. Ces résultats suggèrent que STT3-A/B peuvent exercer des rôles bien distincts suite à une perturbation des conditions physiologiques. Il est toutefois important de noter qu'un double mutant pour STT3-A/B chez *Arabidopsis thaliana* n'est pas viable (Koiwa et al. 2003). La conservation de la duplication de ce gène représente une constatation intéressante sur le plan fonctionnel de STT3-A/B. Ceci suggère fortement que malgré leurs similitudes, ces deux paralogues ont des rôles essentiels non redondants. Peu de résultats à ce niveau ont été publiés jusqu'à ce jour, le meilleur reste donc à venir pour éclaircir cette énigme de l'évolution.

4. La génération des peptides dérivés de protéines entrant dans la voie de sécrétion

La génération et la présentation des peptides provenant de protéines entrant dans la voie classique de sécrétion soulève un point intéressant. Partant de notre modèle, comment STT3-B, une glycoprotéine résidente du R.E., accède-t-elle au protéasome cytosolique? Alors que toutes les glycoprotéines sont transloquées vers l'intérieur du R.E. lors de leur synthèse, le chemin inverse est tout aussi valable pour leur dégradation. Ces molécules sont ainsi rétrotransloquées pour accéder au protéasome cytosolique (Fig. 5). Plusieurs études démontrent que la rétrotranslocation des protéines du R.E. vers le cytoplasme représente la principale voie empruntée pour la dégradation des protéines du R.E. et pour la génération des peptides dérivant de ces protéines (Wang et al., 1999). De façon générale, ces

protéines sont rétrotransloquées, dé-N-glycosylées, polyubiquitinées et dégradées par le protéasome. Plusieurs protéines sont des substrats du ERAD. Les protéines endogènes les plus étudiées entrant dans cette voie sont: "α1-antitrypsin" (Oda et al., 2003), "HMG CoA reductase" (Gardner et al., 2001), "prepro-α factor" (McCracken et al., 1996), "apolipoprotein B100" (Wang et al., 2000), "cytochrome P-450" (Correia, 2003), CFTR (Xiong et al., 1999), TCR subunits α and δ ("T-Cell Receptor") (Huppa et al., 1997), et "MHC class I molecules" (Wiertz et al., 1996).



S'appliquant fort probablement à STT3-B pour la génération de ses peptides, ce processus de transport rétrograde sera abordé en deux volets : 1) les étapes de base du ERAD et 2) des exemples de protéines virales ou tumorales, source de peptides immunogéniques, entrant de cette voie de dégradation.

4.1 La dégradation des protéines par la voie du ERAD

4.1.1 La reconnaissance du substrat

Comment distinguer une protéine devant poursuivre sa route dans la voie de sécrétion de celle devant être rétrogradée vers la voie de dégradation ? La "décision" d'expédier les protéines vers la voie de dégradation s'effectue par la reconnaissance de signaux primaires entre différentes protéines. L'exposition d'une région hydrophobe représente un signal important et permet ainsi à la protéine incorrectement repliée d'être reconnue par les chaperones du R.E.. La PDI ("Protein Disulphide Isomerase") représente une oxidoréductase dans la lumière du R.E. impliquée dans la formation des ponts disulfures durant le repliement des protéines. Son rôle dans la dégradation des protéines a été décrit initialement suite à des expériences chez la levure démontrant que PDI interagissait avec certaines protéines incorrectement repliées et qu'un mutant de PDI retardait la dégradation de certaines protéines (Gillece et al., 1999). La chaperone BiP, de la famille des "heat shock protein 70", exerce également un rôle important dans la voie du ERAD. BiP semble interagir de façon préférentielle avec certaines séquences hydrophobes (Blond-Elguindi et al., 1993) qui seraient exposées lors du mauvais repliement d'une protéine. Il a été démontré qu'un mutant de BiP empêchait la dégradation de certaines protéines et que celles-ci s'accumulaient sous forme stable agrégée, suggérant ainsi un rôle de BiP dans le maintien d'un état structural non agrégé, adéquat pour la rétrotranslocation (Nishikawa et al., 2001). Une étude plus récente démontre de plus que l'efficacité de dégradation d'une protéine résidente du R.E. peut dépendre de son domaine de liaison à BiP et de la concentration de celle-ci (Kabani et al., 2003).

La N-glycosylation des protéines entrant dans la lumière du R.E. est cruciale pour le repliement adéquat des glycoprotéines mais également pour le transport rétrograde. La mannosidase I représente une enzyme clé indirectement impliquée dans le processus de dégradation des glycoprotéines (Cabral et al., 2001). Cette enzyme retire un mannose à l'extrémité de l'oligosaccharide, créant ainsi un résidu $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Ce n'est qu'après plusieurs tentatives de repliements par le cycle calnexine-calréticuline que cette étape enzymatique est amorcée. Deux récentes publications parues dans la revue *Science* ont démontré que la protéine EDEM intervenait dans le processus du ERAD par son interaction avec le résidu Man_8 . C'est suite à cette interaction que la glycoprotéine incorrectement repliée est expédiée à l'extérieur du R.E. pour sa dégradation (Oda et al., 2003; Molinari et al., 2003).

4.1.2 La rétrotranslocation du R.E. vers le cytoplasme

Suivant la reconnaissance de la protéine fonctionnellement inadéquate, il est généralement reconnu que celle-ci devra repasser par le complexe Sec61 pour être acheminée au cytoplasme. Il y a bien longtemps que ce complexe protéique est reconnu pour effectuer la translocation des protéines vers l'intérieur du R.E. de façon co- ou post-traductionnelle. C'est d'ailleurs par l'interaction de certains partenaires clés tel que le ribosome, le complexe Sec62-Sec63 et BiP qu'on pourrait qualifier le complexe Sec61 de versatile pour assurer un transport protéique efficace. L'hypothèse du transport rétrograde des protéines semblait ainsi attrayante puisque aucun autre canal protéique identifié n'était doté d'une telle souplesse. Aujourd'hui, plusieurs substrats du ERAD ont été caractérisés et retrouvés en association avec le complexe Sec61 pour leur destruction dans le cytoplasme (Bebok et al., 1998; de Virgilio et al., 1998; Petaja-Repo et al., 2001). En accord avec ces résultats, l'utilisation d'une souche mutante pour Sec61 en levure révèle que la dégradation de certains substrats du ERAD est empêchée ou retardée (Pilon et al., 1997; Plemper et al., 1997). Certaines études réfutent cependant le rôle de Sec61 dans la rétrotranslocation de certains substrats tel que HMG CoA reductase et Ubc6 (Walter

et al., 2001), suggérant ainsi un mécanisme de dislocation indépendant de Sec61. La rétrotranslocation Sec61-indépendante est d'ailleurs observée pour certaines protéines bactériennes (Kihara et al., 1999) et mitochondriales (Leonhard et al., 2000).

La polyubiquitination des protéines est une modification importante pour leur dégradation mais également pour leur rétrotranslocation (Shamu et al., 2001). Cette chaîne d'ubiquitines serait d'ailleurs utilisée à titre de signal pour rétrotransloquer la protéine du complexe Sec61 vers le cytoplasme (Jarosch et al., 2002; Flierman et al., 2003). Une protéine membre de la famille des ATPases, nommé Cdc48 chez la levure et p97 chez les mammifères joue un rôle prédominant au niveau de la rétrotranslocation (Ye et al., 2001). C'est en liant deux autres molécules, soit Ufd1 et Npl4 que p97 peut interagir avec les chaînes d'ubiquitines reliées à la protéine sortant du R.E. (Ye et al., 2003). Le complexe p97-Ufd1-Npl4 exercerait par la suite une dislocation complète de la molécule. Très récemment, Derlin-1 a été identifiée comme une protéine membranaire résidente du R.E. requise pour la rétrotranslocation des protéines incorrectement repliées. Cette protéine permettrait d'établir le lien entre la reconnaissance du substrat dans la lumière du R.E. et la fonction de p97 dans le cytoplasme (Lilley and Ploegh, 2004; Ye et al., 2004).

4.2 Identification de glycoprotéines virales et tumorales, précurseurs de peptides immunogènes et dégradées par la voie du ERAD

Ploegh et son équipe furent les premiers à proposer un mécanisme impliquant la dislocation des protéines du R.E. vers le cytoplasme pour leur dégradation par le protéasome. Ces travaux démontrèrent l'implication de la molécule US11, une protéine virale transmembranaire de type I, dans la dégradation de molécules du CMH I (Wiertz et al., 1996). Les protéines virales représentent des candidats adéquats comme sources de peptides antigéniques dérivant du ERAD. Par exemple, les glycoprotéines de l'enveloppe virale sont synthétisées et transloquées dans la lumière du R.E.. Plusieurs évidences démontrent que certains peptides immunogènes

viraux sont produits suivant la rétrotranslocation de leur protéine source. Ainsi, la molécule "env" du HIV représente un exemple typique de glycoprotéine virale rétrotransloquée générant plusieurs peptides antigéniques (Ferris et al., 1999). Ferris et al. (1999) ont démontré qu'une asparagine du peptide RPNNNTRKSI, préalablement N-glycosylée sur la protéine, avait été modifiée en acide aspartique une fois le peptide présenté à la surface, devenant ainsi RPNDNTRKSI. Ce changement biochimique d'acide aminé n'est exercé chez les eucaryotes que suivant l'action de la N-glycanase ou de la glycoasparaginase, deux enzymes permettant la dé-N-glycosylation de la protéine avant son entrée dans le protéasome. Représentant une étape du ERAD, la désamination de l'asparagine sous l'action de ces enzymes provoque ce changement d'acide aminé, démontrant de cette façon que le peptide présenté provient d'un substrat du ERAD. La Tyrosinase, une protéine hautement exprimée dans les mélanomes humains, est d'ailleurs utilisée comme modèle pour l'étude de la présentation de peptides dérivant de protéines membranaires. Tout comme dans l'exemple cité ci-haut, le peptide Tyr₃₆₉₋₃₇₇ dérivant de la Tyrosinase subit également le processus de désamidation, démontrant ainsi que cette protéine emprunte la voie du ERAD pour la génération de ce peptide (Skipper et al., 1996; Mosse et al. 1998). Il a d'ailleurs été démontré par une approche biochimique que la Tyrosinase représentait un substrat classique du ERAD par la reconnaissance de son résidu Man₈-. La reconnaissance de ce signal permettrait d'amorcer la dislocation de la Tyrosinase du R.E. vers le cytoplasme (Wang and Androlewicz, 2000).

La dégradation de la glycoprotéine E1 du virus HCV s'effectue également suivant la rétrotranslocation de celle-ci du R.E. vers le cytoplasme (Selby et al., 1999). D'autres travaux semblent de plus indiquer que la glycoprotéine B du HCMV est sous l'influence d'un tel transport rétrograde vers l'extérieur du R.E. (Wang et al., 1999). Ce mécanisme semble ainsi devenir une généralité pour l'ensemble des protéines entrant dans la voie de sécrétion, incluant par conséquent de nombreuses protéines virales ou tumorales. La dégradation des protéines associées au R.E. représente donc un mécanisme important pour le déclenchement d'une réponse immunitaire efficace.

INTÉRÊTS SCIENTIFIQUES ET OBJECTIFS

À ce jour, on retrouve très peu d'information sur la protéine STT3-B. Avant même de connaître sa fonction chez les mammifères, son niveau de conservation révélait déjà son influence majeure au point de vue de la biologie cellulaire. Exerçant la N-glycosylation des protéines entrant dans la lumière du R.E., STT3-B représente ainsi une protéine à la base du contrôle de qualité de toutes glycoprotéines dans la lumière du R.E.. Il est donc impensable d'imaginer l'absence ou le dérèglement d'une telle modification co-translationnelle, sans quoi l'apoptose cellulaire est engagée. L'étude de STT3-B est donc d'un intérêt scientifique majeur pour plusieurs raisons. Étant donné son rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'identification d'éventuelles mutations à l'intérieur du gène de STT3-B soulèverait d'importantes questions sur leurs conséquences physiologiques, tant sur le plan de la transformation néoplasique que sur le plan des maladies héréditaires. De plus, du point de vue fondamental, la caractérisation biochimique de cette protéine ne peut apporter que davantage de connaissances sur les mécanismes impliquant les protéines polytopiques du R.E.. Les mécanismes de translocation membranaire, de contrôle de qualité dans le R.E., de rétrotranslocation, et d'expédition au protéasome représentent tous des domaines d'études très chauds en biologie cellulaire dans lesquels STT3-B pourrait être utilisée à titre de protéine polytopique modèle. De plus, l'étude de cette protéine fait le pont entre la biologie cellulaire et l'immunologie, deux domaines dont l'impact est au plus haut niveau sur le plan scientifique.

Du point de vue immunologique, STT3-B représente une protéine source de peptides antigéniques. Selon nos connaissances, aucune autre protéine n'est comparable à STT3-B au niveau de la performance à générer des peptides immunogènes. Alors que toute protéine a le potentiel de générer des peptides, nous possédons peu de renseignements pour expliquer pourquoi certaines protéines, telle que STT3-B, contribuent de façon plus active à la formation de l'immunopeptome. Nous croyons donc que l'étude de cette protéine nous permettra de mieux

comprendre les causes de cette sélection. L'investigation et la compréhension de cet aspect de l'immunologie sont fondamentales puisque la présentation antigénique représente la base même de la réponse immunitaire. Déterminer les raisons de cette contribution active à l'immunopeptome pourrait d'ailleurs représenter un avancement important au niveau de l'immunothérapie. Ceci nous permettrait d'augmenter la génération de peptides présentés à la surface et d'induire une réponse immunitaire plus efficace.

Nous avons donc émis l'hypothèse que certaines des propriétés intrinsèques à STT3-B seraient responsables de sa forte contribution à la formation de l'immunopeptome. Nos objectifs étaient donc 1) d'identifier certaines caractéristiques propres à STT3-B suivant son expression *in vitro* et *in vivo*, 2) d'identifier et de caractériser certaines régions candidates pouvant jouer un rôle au niveau de sa contribution à l'immunopeptome et 3) d'évaluer l'influence de ces différentes régions candidates précédemment caractérisées sur la contribution d'une autre protéine source de peptide, soit l'ovalbumine, à la formation de l'immunopeptome.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Réactifs et anticorps

Le clasto-Lactacystin β -lactone (clasto-Lactacystin) provient de Calbiochem et la tumucamycin provient de Sigma Aldrich. Les anticorps commerciaux ont été obtenus des distributeurs suivants : anti-GFP (Santa Cruz Biotechnologies), anti- α -tubulin (Research Diagnostics), anti-GST (Abcam), anti-c-myc (Abcam), anti-mouse IgG et anti-rabbit IgG couplé à la peroxidase (Sigma Aldrich), anti-rabbit FITC (BD Pharmingen). L'anticorps 25-D1.16. couplé à l'Alexa, spécifique au complexe H2-K^b/SIINFEKL, provient du laboratoire du Dr. Jonathan Yewdell (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda).

2. Culture cellulaire et transfections

La lignée cellulaire HEK293 a été obtenue par ATCC (American Type Culture Collection). La lignée cellulaire COS7 nous a été donnée par Dr. Nathalie Labrecque (Centre de recherche Guy-Bernier, Montréal). La lignée cellulaire COS7-K^b nous a été donnée par Dr. Kenneth Rock (University of Massachusetts, Worcester). Les cellules HEK293 et COS7-K^b ont été mises en culture dans du DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) "high glucose" supplémenté avec 10% FBS (Fetal Bovine Serum) et antibiotiques. Les cellules COS7 ont été mises en culture dans du DMEM "high glucose" supplémenté avec 10% CS (Calf Serum) et antibiotiques. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂. Les cellules HEK293, COS7 et COS7-K^b ont été transfectées transitoirement avec le Fugene6 (Roche Diagnostic) dans des plaques à 6 puits selon les instructions du distributeur.

3. Constructions

La protéine EGFP/PEST est encodée par le vecteur pZsProSensor-1 (Clontech). Le vecteur encodant pour GFP-250 est un cadeau de Dr. Sztul (University of Alabama at Birmingham, Birmingham). Les protéines de fusion contenant STT3-B proviennent de son cDNA préalablement cloné dans pcDNA3 (Invitrogen Life Technologies). Le clonage de STT3-B a été initialement effectué par Compatigène Inc. en utilisant les amorces 5'-TTATCGATGCGGAGGACGAGCGAGACC-3' et 5'-CGGATTCGCAAGTG AGGCCAGAACAGCGC-3' pour l'amplification par PCR. Le cDNA de STT3-A a été cloné suivant un RT-PCR à partir de mRNA de tissu testiculaire de souris. Les amorces 5'-CATGCCATGGCAGTTGCCACCCATTGATGTC-3' et 5'-TTTTCTTTTTCGGCCGCAATGTGACGTTTACGTGTCCTTG-3' ont été utilisées pour l'amplification PCR du cDNA de STT3-A, lequel a été inséré dans le vecteur pTriEx-3/Hygro (Novagen) digéré *NcoI/NotI* en fusion avec les étiquettes HSV et His₆. La protéine de fusion EGFP/STT3-B a été créée suivant la digestion *EcoRI* du vecteur pcDNA3/STT3-B et de l'insertion du produit de digestion dans le vecteur pEGFP-C2 (Clontech), préalablement digéré par *EcoRI*. Les protéines mutantes contenant des délétions ont été générées suivant trois PCR différents en utilisant pcDNA3/STT3-B comme template d'ADN. Pour générer la construction EGFP/STT3-B_{Δ529-556}, les amorces 5'-GGAATTCGATGCGGAGGACGAGCGAGA-3' et 5'-TTGAAAGGTAGCGATATCCCAAGCCCTCTTCAGGTTTC-3' ont été utilisées pour le premier PCR. Le PCR #2 a été effectué avec les amorces 5'-GATATCGCTACCTTTCAAACGCCTACTCCAGTCCAAGT-3' et 5'-GGAATTCGGCCAGAACAGCGCATTT-3'. Les deux produits PCR ont été purifiés et combinés dans la même réaction comme template d'ADN pour le PCR #3. Les amorces 5'-GGAATTCGATGCGGAGGACGAGCGAGA-3' et 5'-GGAATTCGGCCAGAACAGCGCATTT-3' ont été utilisées pour le PCR #3. Le produit PCR #3 a été sous-cloné dans pPCR-Script/Amp (Stratagene), digéré *EcoRI* et cloné dans pEGFP-C2 préalablement digéré *EcoRI*/déphosphorylé. Pour générer la construction EGFP/STT3-B_{Δ487-501}, les amorces 5'-GGAATTCGATGCGGAGGACGAGCGA

GA-3' et 5'-TTTAAAGCTAGCGATATCTTCATGTCATCCCCCAAATAG-3' ont été utilisées pour le PCR #1. Pour le PCR #2, les amorces 5'-GATATCGCTAGCTTTAAAAAGAAACCCAGGAAACTTGTA-3' et 5'-GGAATTCGGCCAGAACAGCGCATTT-3' ont été utilisées. Les produits PCR #1 et #2 ont été purifiés et combinés pour l'amplification #3 avec les amorces 5'-GGAATTCGATGCGGAGGACGAGCGAGA-3' et 5'-GGAATTCGGCCAGAACAGCGCATTT-3'. Le produit PCR #3 a été sous-cloné et cloné dans pEGFP-C2 de la même façon que mentionné ci-haut. Pour la génération de EGFP/STT3-B_{Δ790-823}, le sous-clone pPCR-Script/STT3-B a été digéré par *XhoI* et l'insert a été intégré dans le vecteur pEGFP-C2 prédigéré par *XhoI*/déphosphorylé. Pour la génération de pEGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃, le vecteur pEGFP-C2/STT3-B a été digéré *XhoI/EcoRI* et le produit de digestion inséré dans pEGFP-C1 prédigéré avec *XhoI/EcoRI*. Pour la génération de la protéine EGFP/STT3B-SIINFEKL, un PCR a été effectué à partir de pcDNA3/STT3-B et des amorces 5'-GAAGATCTGATGCGGAGGACGAGCGAGA-3' et 5'-GTGACTCGAGGTTTGTGACCCAGTTTTTCAAAGTTGATTACTCACTTTATATATCCTGACAAG-3'. Le produit PCR a été sous-cloné dans pPCR-Script/Amp. Ce sous-clone a été digéré avec *XhoI* et cloné dans pEGFP-C1/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ prédigéré *XhoI*/déphosphorylé. Cette construction a été digérée avec *BglII*, purifié et reliqué sur lui-même. Pour la création de la protéine EGFP/STT3-B_{Δ612-662}-SIINFEKL, deux PCR ont été effectués à partir du vecteur pEGFP-C1/STT3B-SIINFEKL et les paires d'amorces suivantes : 5'-GGAATTCGATGCGGAGGACGAGCGAGA-3' / 5'-TTTAAAGCTAGCGATATCCATGCCAGCAATCTGATAGC-3' (PCR#1) et 5'-GATATCGCTAGCTTTAAAGGAGGAGTGATTGGCTATTC-3' / 5'-GGAATTCGGCCAGAACAGCGCATTT-3' (PCR#2). Les produits PCR ont été sous-clonés dans pPCR-Script/Amp. L'insert généré suivant la digestion de pPCR-Script/PCR#2 par *NheI/NotI* a été intégré dans le vecteur pPCR-Script/PCR#1 prédigéré *NheI/NotI*. Cette construction a été digérée *EcoRI* et l'insert a été intégré dans pEGFP-C2 prédigéré *EcoRI*/déphosphorylé. Le vecteur pIRES2-EGFP/STT3B-KAPDNRETL a été généré en digérant pEGFP-C2/STT3-B avec *BglII/SalI* et en intégrant l'insert dans le vecteur pIRES2-EGFP préalablement digéré *BglII/SalI*. Le

vecteur pIRES2-EGFP/STT3B-SIINFEKL a été généré en digérant le vecteur pEGFP-C1/STT3B-SIINFEKL avec *BgIII/EcoRI* et en intégrant l'insert produit dans pIRES2-EGFP prédigéré avec *BgIII/EcoRI*. Les constructions suivantes ont été obtenues en amplifiant les régions de STT3-B avec l'amorce "forward" 5'-GGAATTCCTCCCAACATCAAAGCATTG-3' et les amorces "reverse" suivantes :

pEGFP-C1/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ (5'-CGGGATCCTTGCTTGTGACCCACGTGCA-3'),
 pEGFP-C1/STT3-B₅₂₉₋₆₁₁ (5'-CGGGATCCATGCCAGCAATCTGATAGC-3'),
 pEGFP-C1/STT3-B₅₂₉₋₆₆₂ (5'-CGGGATCCCTCCGAAAATAACCAACACA-3'),
 pEGFP-C1/STT3-B₅₂₉₋₇₁₄ (5'-CGGGATCCCATAAGGCAGTTTAACAGAG-3'),
 pEGFP-C1/STT3-B₅₂₉₋₇₇₅ (5'-CGGGATCCTGTTGTCAGGTGCTTTCCTACT-3'). Les produits PCR ont tous été digérés avec *EcoRI/BamHI* et intégrés dans pEGFP-C1 prédigéré *EcoRI/BamHI*. pEGFP-C1/STT3-B₅₂₉₋₈₂₃ a été obtenu en digérant pEGFP-C2/STT3-B avec *ApaI* et en intégrant l'insert produit dans pEGFP-C1 prédigéré avec *ApaI*/déphosphorylé. Pour créer GST/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ a été amplifiée et sous-clonée dans pDrive (Qiagen). La construction pDrive/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ a été digérée avec *EcoRI/XhoI* et l'insert a été intégré dans pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) prédigéré avec *EcoRI/XhoI*, créant ainsi pGEX-6P-1/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆. La protéine de fusion GST/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ a été amplifiée à partir de pGEX-6P-1/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et des amorces 5'-CACACAGGAAACAGTATTCATG-3' et 5'-GGAAGATCT ATCGTCAGTCAGTCACGATG-3'. Le produit PCR a été intégré dans le vecteur pCMV-3a (Stratagene) prédigéré avec *EcoRV*. Le vecteur pIRES2-EGFP/OVALBUMINE-STT3B₅₂₉₋₅₅₆ a été générée en amplifiant l'ovalbumine et en créant une mutation dans le codon stop. Le PCR a été fait à partir du vecteur pcDNA3.1/OVALBUMINE (cadeau du Dr. Kenneth Rock) et des amorces 5'-CGGGATCCCCTCGAAAGACAACACTCAG-3' et 5'-GGAATTCTTCTTCTTTGTAAGGGGAAAC-3'. Le produit PCR a été cloné dans le vecteur pcDNA3 prédigéré *BamHI/EcoRI*. Provenant du vecteur pGEX6-P-1/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ a été fusionnée à l'ovalbumine du vecteur pcDNA3 prédigéré avec *EcoRI/XhoI*. La construction pcDNA3/OVALBUMINE-STT3B₅₂₉₋₅₅₆ a été digérée *BamHI/XhoI* et intégrée dans pIRES2-EGFP prédigéré *BgIII/SalI*. Le produit de digestion de pcDNA3/OVALBUMINE *BamHI/EcoRI* a été intégré au vecteur

pIRES2-EGFP prédigéré avec *BgIII/EcoRI*, créant ainsi pIRES2-EGFP/OVALBUMINE. Pour la construction pIRES2-EGFP/OVALBUMINE-STT3B₇₉₀₋₈₂₃, l'ovalbumine a été réamplifiée pour la région OVALBUMINE₆₁₋₃₈₆ à partir du vecteur pcDNA3/OVALBUMINE et des amorces 5'-GCTCGAGACACCATGGATAAACTTCCAGGATTTCGG-3' et 5'-GCTCGAGCTTCTTTGTAAGGGGAAACAC-3', et ensuite sous-clonée dans pPCR-Script. Ce sous-clone a été digéré avec *XhoI* et le produit de digestion a été intégré dans pEGFP-C1/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ prédigéré avec *XhoI*/déphosphorylé. Le clone pEGFP-C1/OVALBUMINE-STT3B₇₉₀₋₈₂₃ a été digéré avec *BgIII/EcoRI* et le produit de digestion a été intégré dans pIRES2-EGFP prédigéré avec *BgIII/EcoRI*. La protéine chimérique STT3B-OVALUBMINE du vecteur pIRES2-EGFP a été générée en amplifiant par PCR la région codant pour les 575 premiers acides aminés de STT3-B et la région 61-386 de l'ovalbumine. Les amorces 5'-GAAGATCTGATGCGGAGGACGAGCGAGA-3' et 5'-GGAATTCCTGG TACCATCATGATTGT-3' ont été utilisées pour le PCR sur pcDNA3/STT3-B et les amorces 5'-GGAATTCGATAAACTTCCAGGATTTCGG-3' et 5'-GGAATCTTCTTCTTTTAAAGGGGAAAC-3' pour le PCR sur pcDNA3/OVALBUMINE. La portion de STT3-B et de l'ovalbumine ont été sous-clonées dans pPCR-Script/Amp et pDrive, respectivement. Le sous-clone pPCR-Script/STT3-B₁₋₅₇₅ a été digéré *BgIII/EcoRI* et le produit de digestion a été intrégré dans pIRES2-EGFP prédigéré *BgIII/EcoRI*, créant ainsi pIRES2-EGFP/STT3-B₁₋₅₇₅. Le sous-clone pDrive/OVALBUMINE₆₁₋₃₈₆ a été digéré avec *EcoRI* et l'insert a été intégré dans pIRES2-EGFP/STT3-B₁₋₅₇₅ prédigéré avec *EcoRI*/déphosphorylé. La protéine chimérique STT3A-OVALBUMINE du vecteur pIRES2-EGFP a été générée en amplifiant les 601 premiers acides aminés de STT3-A avec les amorces 5'-AGATCTCAGTTGCCACCCATTGATGTC-3' et 5'-CAATTGATACGCTTCTC GGAAGTCAT-3'. La portion de STT3-A a été sous-clonée dans pPCR-Script. La portion OVALBUMINE₆₁₋₃₈₆ a été obtenue suivant la digestion de pIRES2-EGFP/STT3B-OVALBUMINE avec *EcoRI*. Le produit de digestion a été intégré dans la construction pPCR-Script/STT3-A₁₋₆₀₁ en digérant cette dernière par *MfeI*/déphosphorylé. Le sous-clone pPCR-Script/STT3A-OVALBUMINE a été

digéré avec *Bgl*III/*Sac*II et le produit de digestion a été intégré dans pIRES2-EGFP pré-digéré avec *Bgl*III/*Sac*II. Pour générer la construction c-myc/STT3-B, la construction pcDNA3/STT3-B a été digéré avec *Eco*RI et le produit de digestion a été intégré dans pCMV-3c préalablement digéré avec *Eco*RI.

4. Quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL

Les cellules COS7-K^b ont été transfectées dans des plaques à 6 puits avec les différentes constructions. 48h post-transfection, les cellules ont été récoltées en les incubant dans du PBS/EDTA 2mM à 37°C pendant environ 10 min. L'anticorps 25-D1.16 couplé à l'Alexa a été incubé avec les cellules 30 min sur glace pour une dilution finale de 1/200. Après trois lavages au PBS/BSA 0,1%, les cellules traitées ont été utilisées pour l'analyse en cytométrie en flux.

5. Traduction *in vitro* et Western blot

Traduction in vitro. Les réactions de transcription/traduction *in vitro* se sont effectuées à partir de lysats de réticulocytes du STP3 Kits (Novagen). Le ³⁵S-Met utilisé pour la réaction a été obtenu chez Sigma Aldrich. La synthèse des protéines et leur quantification ont été effectuées en suivant le protocole du distributeur. La conversion du nombre de cpm en nombre de molécules synthétisées a été effectuée à partir des calculs établis par Ambion. Pour les réactions de synthèse à partir de pTriEx3/Hygro, le vecteur a dans un premier temps été digéré avec l'enzyme de restriction *Bsu*36I pour empêcher la synthèse de la protéine HYGRO, cette dernière étant sous le contrôle de la séquence IRES du vecteur.

Western blot. Pour évaluer l'effet de la tunicamycin sur le niveau de N-glycosylation des protéines chimériques EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, EGFP/STT3-B₅₂₉₋₆₁₁, EGFP/STT3-B₅₂₉₋₆₆₂, EGFP/STT3-B₅₂₉₋₇₁₄, EGFP/STT3-B₅₂₉₋₇₇₅, EGFP/STT3-B₅₂₉₋₈₂₃, les cellules HEK293 ont été transfectées et incubées à 37°C. 24h post-

transfection, la tunicamycin a été ajoutée à une concentration finale de 10 μ M et les cellules ont ensuite été incubées pour une période de 16h. Les cellules ont par la suite été récupérées, resuspendues dans du PBS et lysées directement avec du "SDS loading buffer 5X" à une concentration finale de 2,5X. Les lysats cellulaires ont été chauffés 5min à 95°C avant d'être chargés sur gel SDS-PAGE 10%. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. La membrane bloquée a été incubée pour 1 heure avec les anticorps aux dilutions suivantes dans du TBS/lait5%: anti-GFP (1/800) et anti-tubulin (1/1000). Suivant plusieurs lavages au TBS, la membrane a été incubée avec un anti-mouse IgG couplé à la peroxidase (1/5000). Suivant quelques lavages, la révélation des protéines d'intérêt a été effectuée par chemiluminescence avec le réactif ECL (Amersham Biosciences). La détection des protéines fusionnées à l'épitope c-myc a été effectuée de la même façon que décrit ci-haut. Les protéines ont migré dans un gel SDS-PAGE 8%. L'anti-c-myc a été utilisé à une dilution finale de 1/2000 et l'anticorps secondaire anti-rabbit IgG couplé à la peroxidase a été utilisé à une dilution finale de 1/10000. Pour le fractionnement cellulaire entre les protéines membranaires et solubles, les échantillons ont été préparés à partir de cellules COS7 transfectées. La séparation des protéines solubles et membranaires a été effectuée selon Li et al. (2003).

6. Microscopie électronique, stéréoscopique et immunofluorescence

Microscopie stéréoscopique et immunofluorescence. La co-localisation des protéines avec le R.E. a été effectuée avec DsRed2-ER (Clontech), une protéine chimérique contenant les signaux adéquats pour se localiser à l'intérieur du R.E.. Les résultats de co-localisation ont été obtenus par microscopie stéréoscopique à fluorescence (LEICA Microsystems). Les résultats de co-localisation obtenus à partir de ces outils ont été confirmés par microscopie confocale en utilisant des marqueurs de protéines endogènes résidentes du R.E.. Pour la détection de la protéine GST/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, les cellules COS7 transfectées ont été lavées 2 fois 5 min avec du PBS et fixées avec de la formaldéhyde 4% durant 30 min. Suivant deux lavages de 5

min chacun, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 0,1% pendant 30 min à 37°C. Après 3 lavages de 5min chacun, les cellules ont été bloquées avec du PBS/FBS10% pendant 1h à température pièce pour ensuite être relavées 2 fois 5 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anti-GST (1/500) dilué dans du PBS/TritonX-100 0,01%. 3 lavages de 5 min ont été effectués pour ensuite incuber les cellules avec l'anti rabbit-FITC (1/1000) durant 1h à T.P.. Suivant 5 lavages de 5 min, la détection de la protéine en microscopie stéréoscopique a été effectuée.

Microscopie électronique: préparation de l'échantillon. Les cellules COS7 ont été ensemencées sur pétri de 10cm à une densité de 8×10^5 cellules. Les cellules ont été transfectées 24h après ensemencement. 48h post-transfection, les cellules ont été récoltées et lavées 2 fois au PBS froid dans des tubes à centrifugation. Les cellules ont ensuite été transférées dans un tube de 1,5mL et centrifugées 5 min à 2000 rpm. Le culot a été resuspendu dans deux volumes de glutéraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate pour être fixé durant 1h à 4°C. Les cellules ont ensuite été centrifugées 5min à 2000rpm et resuspendu dans du tampon de lavage (0,1M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et de Na_2HPO_2). Après 3 lavages, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 2-4 volumes d'agar 2% pré-chauffé à 50°C. Les cellules ont été centrifugées 5 min à 12000 rpm et incubées à 4°C pendant 1h. L'échantillon a par la suite été acheminé au laboratoire de microscopie électronique

RÉSULTATS

1. Analyses Bioinformatiques

Puisqu'on retrouve très peu d'informations dans la littérature sur STT3-A et STT3-B chez les mammifères, nous avons procédé à des analyses bioinformatiques afin d'acquérir une base solide d'informations sur ces deux paralogues. Pour ce faire, nous avons procédé à une analyse bioinformatique telle que la localisation chromosomique de leur gène respectif (par NCBI map viewer), l'obtention de modèles topologiques (par SOSUI et TOPO2), l'identification de certains motifs protéiques (par ScanProsite et PESTfind) et les alignements multiples entre différents homologues de STT3 (par ClustalX).

Les analyses cytogéniques révèlent que mSTT3-B et hSTT3-B se localise sur le chromosome 9F3 et 3p22, respectivement (Fig. 6A). STT3-B correspond à une protéine de 823 a.a. totalisant un poids moléculaire de 93kDa (Fig. 6B). Certains motifs distinguent STT3-B de STT3-A, soit la présence d'un fort signal PEST (score=28 à partir de PESTfind) et la présence de deux signaux de localisation nucléaire dont l'un d'eux est situé dans une région riche en lysine à l'extrémité C-terminale de STT3-B. STT3-B correspond à une protéine polytopique hautement hydrophobe tel que démontré par l'analyse "Kyte and Doolittle" (Fig. 6C) et le modèle topologique (Fig. 6D). Le modèle topologique de STT3-B démontre de plus que les peptides générés suivant la dégradation de STT3-B se situent de part et d'autre de la membrane dans différentes régions hydrophiles de la protéine.

mSTT3-A et hSTT3-A se localise sur le chromosome 9A4 et 11q23.3, respectivement (Fig. 7A). STT3-A représente une protéine de 705 acides aminés pour un poids moléculaire de 81 kDa (Fig. 7B). Tout comme son paraglogue STT3-B, le patron d'hydrophobicité (Fig. 7C) et le modèle topologique (Fig. 7D) démontrent

Figure 6. Analyses bioinformatiques de STT3-B

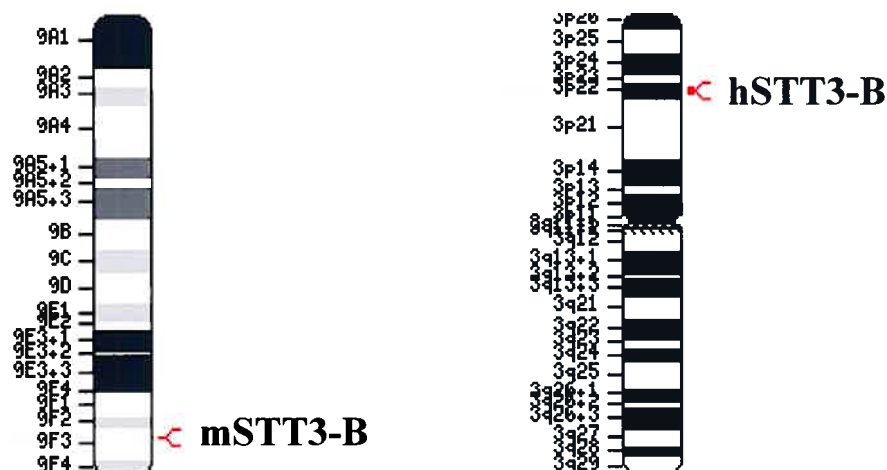
- A) Localisation chromosomique de STT3-B murine (mSTT3-B) et humaine (hSTT3-B) établie par "NCBI map viewer".

- B) Séquence en acides aminés de STT3-B murin mettant en évidence les régions transmembranaires (soulignées), les peptides associés aux molécules du CMH I (rouges), le signal PEST (bleu), les sites de N-glycosylation (verts), la région riche en lysine (jaune) et les signaux de localisation nucléaire bipartite (gras).

- C) Patron d'hydrophobicité "Kyte and Doolittle" de STT3-B murin

- D) Modèle topologique de STT3-B murin constitué par TOPO2. Les régions mises en évidences sont les peptides associés aux molécules du CMH I (rouges) et les sites de N-glycosylation (verts).

A



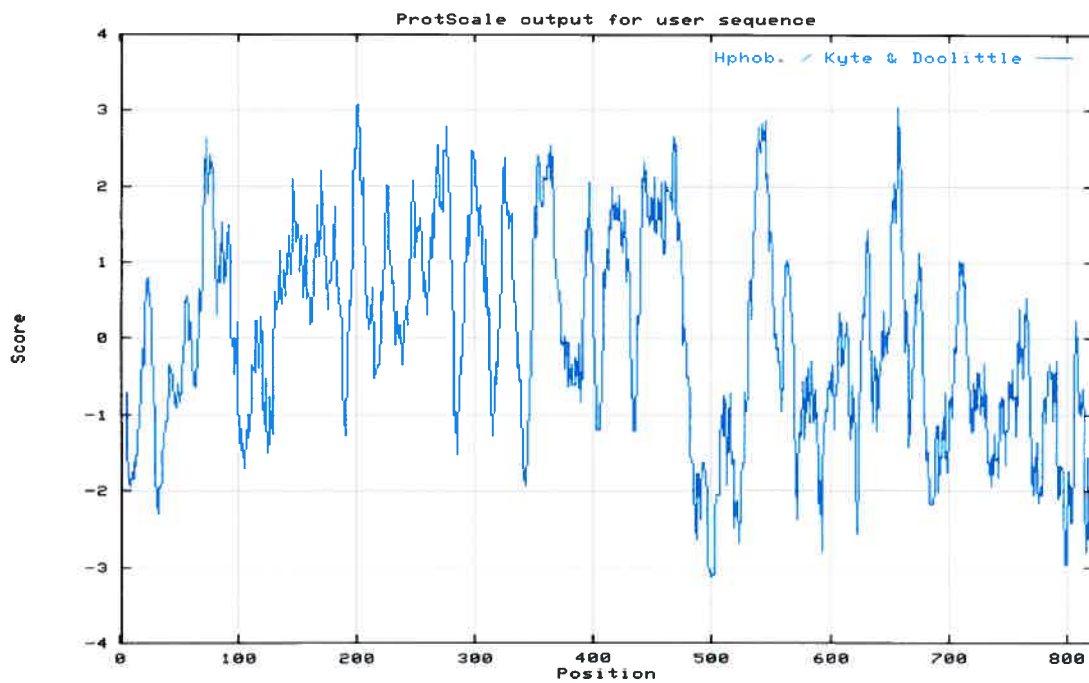
B

```

1 MAEPSAPESK HKSSLNSSPW SGLMALGNSR HGHHGPGTQS ASRAAAPKPG PPAGLSGGLS
61 QPAGWQSLLS FTILFLAWLA GFSSRLFAVI RFESIIHEFD PWFNYRSTHH LASHGFYEFL
121 NWFDERAWYP LGRIVGGTVY PGLMITAGLI HWILNTLNIT VHIRDVCVFL APTFSGLTSI
181 STFLLTRELW NQGAGLLAAC FIAIVPGYIS RSVAGSFDNE GIAIFALQFT YYLWVKSVKT
241 GSVFWMCCC LSYFYMVSAW GGYVFIINLI PLHVFVLLLM QRYSKRVYIA YSTFYIVGLI
301 LSMQIPFVGF QPIRTSEHMA AAGVFALLQA YAFLQYLRDR LTKQEFQTLF FLGVSLAAGA
361 VFSLVIYLTY TGYIAPWGR FYSLWDTGYA KIHIPIIASV SEHQPTTWVS FFFDLHILVC
421 TFPAGLWFCI KNINDERVALVAISAVYF AGVMVRLMLT LTPVVCMLSA IAFSNVFEHY
481 LGDDMKRENP PVEDSSDEDDRNPGLYDKAGKARKHVTE QEKPEEGLGP NIKSIVTMLM
541 LMLLMFAVH CTWVTSNAYS SPSVVLASYN HDGTRNILD D FREAYFWLRQ NTDEHARVMS
601 WWDYGYQIAG MARRTTLVDN NTWNNSHIAL VGKAMSSNET AAYKIMRSLD VDYVLVIFGG
661 VIGYSGDDIN KFLWMVRIAE GEHPKDIREG DYFTQQGEFR VDKAGSPDLL NCLMYKMSYY
721 RFGEMQLDFR TPPGFDRTRN AEIGNKDIKF KHLEEFTSE HWLVRIYKVAPLNRETTGH
781 KPRVTNIVPK QKYLSKKTTKRKRGYVKNKLVFKKGKTSK KTV

```


C



D

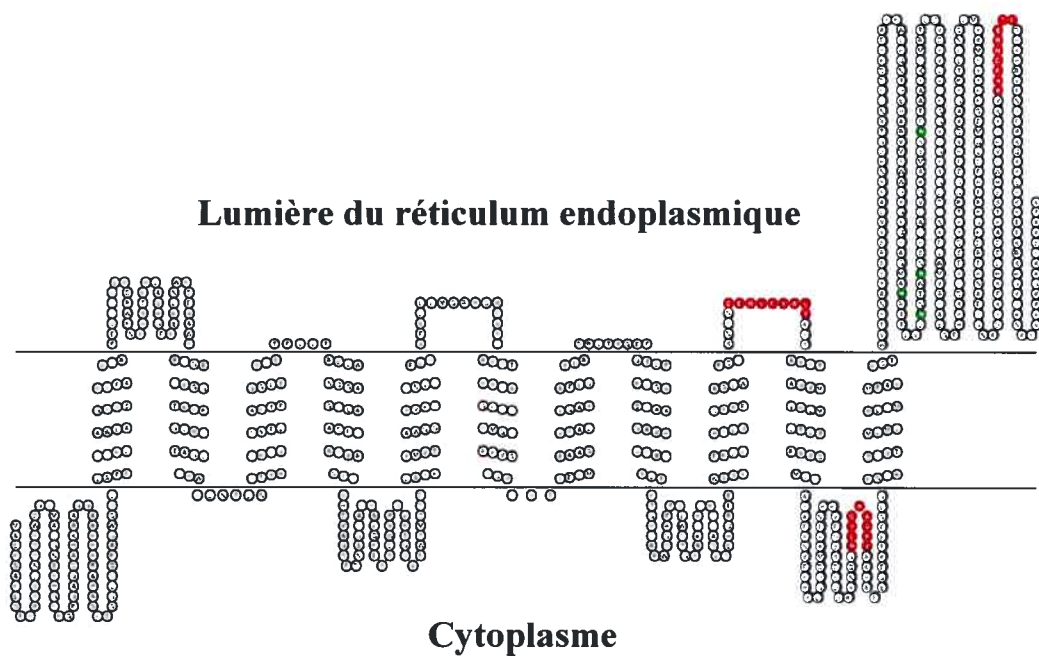
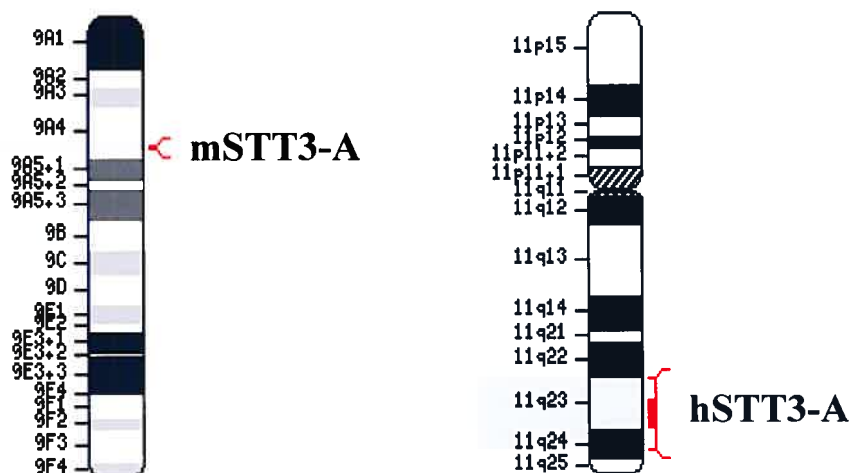


Figure 7. Analyses bioinformatiques de STT3-A

- A) Localisation chromosomique de STT3-A murine (mSTT3-A) et humaine (hSTT3-A) établie par "NCBI map viewer".
- B) Séquence en acides aminés de STT3-A murin mettant en évidence les régions transmembranaires (soulignées) et les sites de N-glycosylation (verts).
- C) Patron d'hydrophobicité "Kyte and Doolittle" de STT3-A murin
- D) Modèle topologique de STT3-A murin constitué par TOPO2. Les sites de N-glycosylations sont en vert.
- E) Alignements multiples entre les homologues de STT3, soit STT3-A/B humain (hSTT3-A/B), STT3-A/B murin (mSTT3-A/B) et Stt3p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les zones en noir correspondent aux acides aminés identiques alors que les zones en gris correspondent aux acides aminés aux propriétés biochimiques comparables.

A



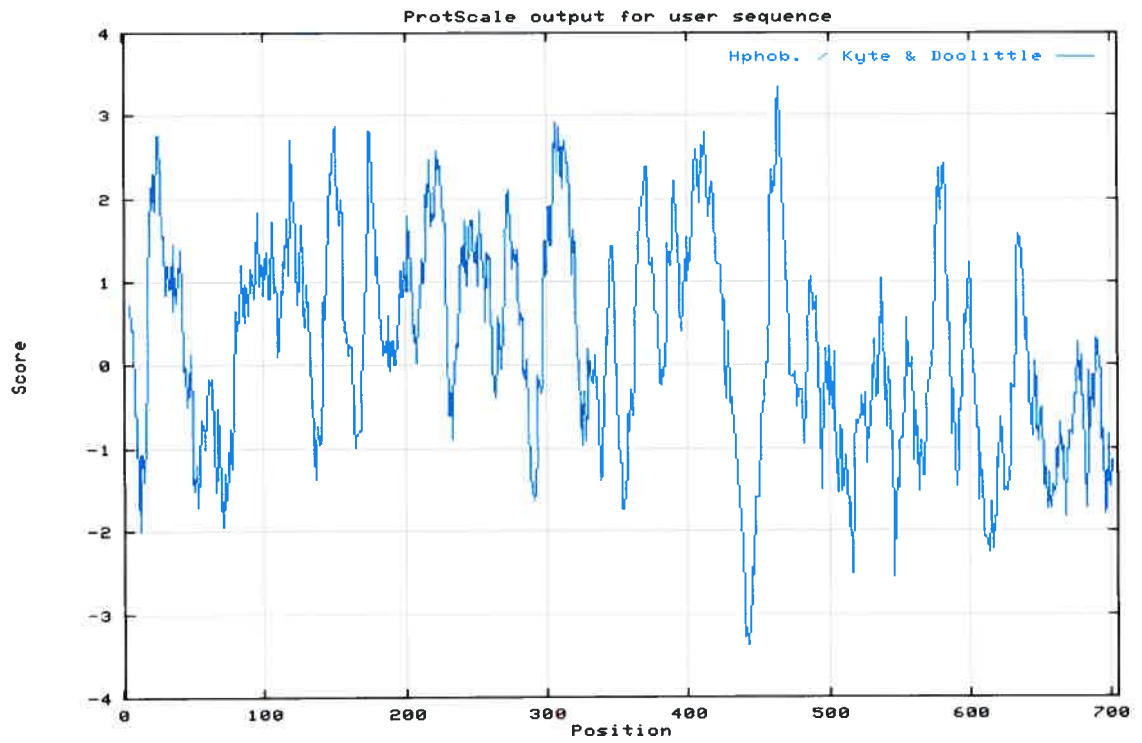
B

```

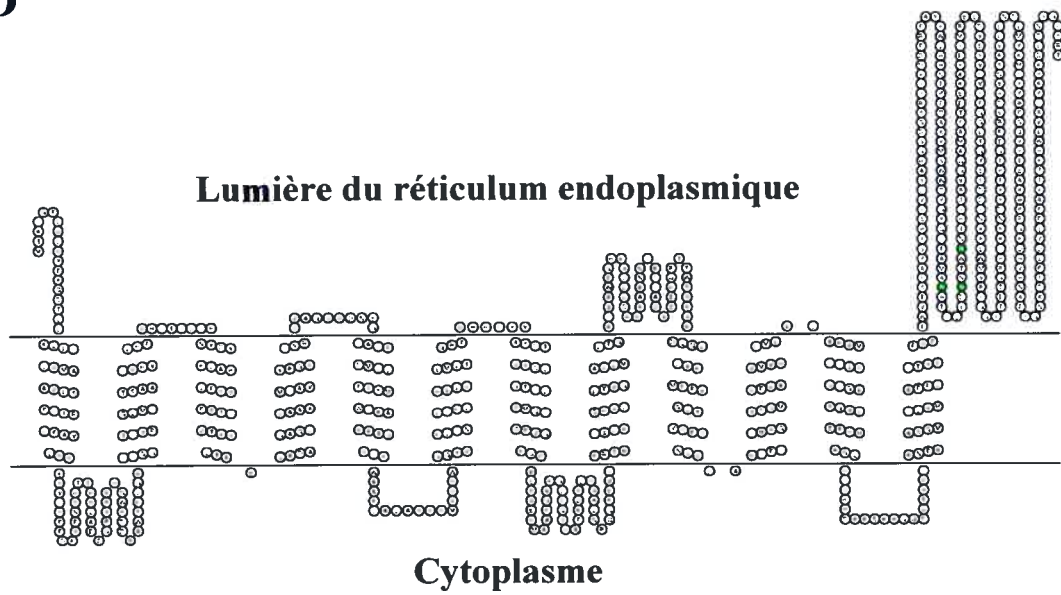
1  MTKLGFRLRS  YEQDTLLKL  LILSMAAVLS  FSTRLFAVLR  FESVIHEFDP  YFNYRTRFL
61  AEEGFYKFHN  WFDDRAWYPL  GRIIGGTIYP  GLMITSAAIY  HVLHFFHITI  DIRNVCVFLA
121  PLFSSFTTIV  TYHLTKELKD  AGAGLLAAAM  IAVVPGYISR  SVAGSYDNEG  IAIFCMLLTY
181  YMWIKAVKTG  SIYWAACAL  AYFYMVSSWG  GYVFLINLIP  LHVLVMLTG  RFSHRIYVAY
241  CTVYCLGTIL  SMQISFVGFO  PVLSEHMAA  FGVFGLCQIH  AFVDYLRSKL  NPQQFEVLF
301  SVISLVGFVL  LTVGALLMLT  GKISPWTGRF  YSLLDPSYAK  NNIPIIASVS  EHQPPTWSSY
361  YFDLQLLVFM  FPVGLYYCFS  NLSDARIFII  MYGVTSMYFS  AVMVRMLVL  APVMCILSGI
421  GVSQVLSTYM  KNLDISRPDK  KSKKQDSTY  PIKNEVASGM  ILVMAFFLIT  YTFHSTWVTS
481  EAYSSPSIVL  SARGGDGSRI  IFDDFREAYY  WLRHNTPEDA  KVMSWWDYGY  QITAMARTI
541  LVDNTWNT  HISRVGQAMA  STEEKAYEIM  RELDVSYVLV  IFGGLTGYSS  DDINKFLWMV
601  RIGGSTETGR  HIKENDYYTP  TGEFRVDREG  SPVLLNCLMY  KMCYYRFGQV  YTEAKRPPGF
661  DRVRNAEIGN  KDFELDVLEE  AYTTEHWLVR  IYKVKDLNDR  GLSRT

```

C



D



bien STT3-A correspondent à une glycoprotéine polytopique dont le niveau d'hydrophobicité est très élevé.

Les alignements multiples entre les homologues de STT3 schématisent bien le haut niveau de conservation de cette protéine au niveau de leur séquence en acides aminés (Fig. 7E). Le domaine hydrophile en C-terminal de STT3 représente la région la plus conservée, soit approximativement entre les acides aminés 470 et 695 de hSTT3-B. Les différences entre les homologues de STT3 sont principalement situées au niveau des extrémités amino- et carboxy-terminale et dans la région 430 à 470 de hSTT3-B.

2. Comparaison de l'efficacité de présentation du peptide SIINFEKL provenant de STT3-B et de l'ovalbumine

L'efficacité de présentation d'un peptide par sa protéine source a d'abord été définie comme étant le ratio de la quantité des complexes CMH-peptide à la surface sur le taux de synthèse de la protéine précurseur de ce même peptide [1]. Afin de confirmer directement que STT3-B représente une protéine plus efficace à la génération de peptides, nous avons opté pour l'utilisation du peptide dérivant de l'ovalbumine, SIINFEKL, lequel est quantifiable à la surface cellulaire lorsque associé à H2-K^b. Afin que STT3-B représente une protéine source du peptide SIINFEKL, nous avons génétiquement modifié la séquence codant pour le peptide H7^a (KAPDNRETL) par la séquence codant pour le peptide SIINFEKL, créant ainsi STT3B-SIINFEKL. La protéine native, soit STT3B-KAPDNRETL a été utilisée à titre de contrôle négatif. Les différentes constructions utilisées sont schématisées à la figure 8A. Les cellules COS7-K^b ont donc été transfectées, récoltées et marquées par l'anticorps 25-D1.16 tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Suite aux analyses par cytométrie en flux, nos résultats ne démontrent aucune présentation du complexe H2-K^b/SIINFEKL lorsque les cellules transfectées expriment les protéines utilisées à titre de contrôle négatif, soit MOCK et STT3B-KAPDNRETL. Le niveau

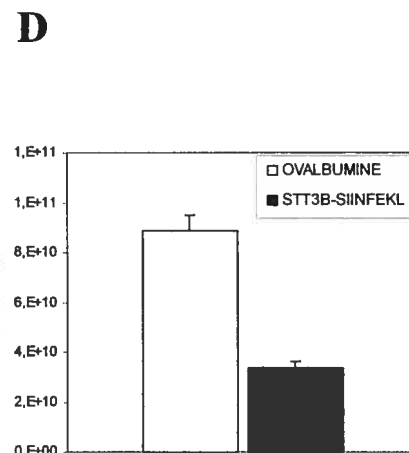
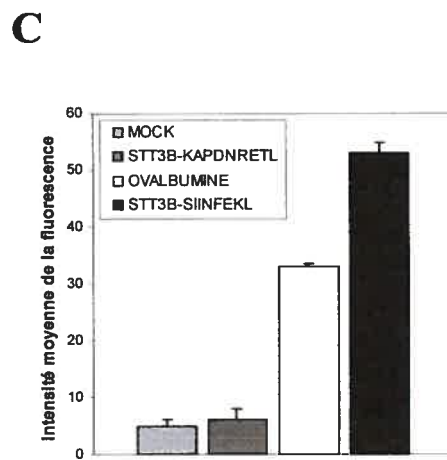
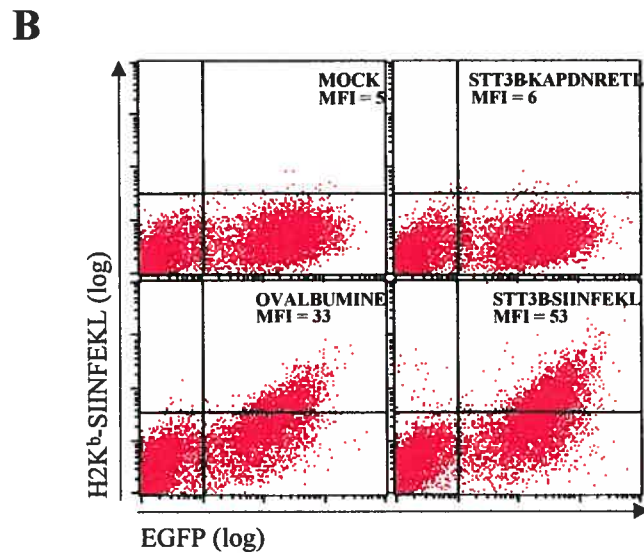
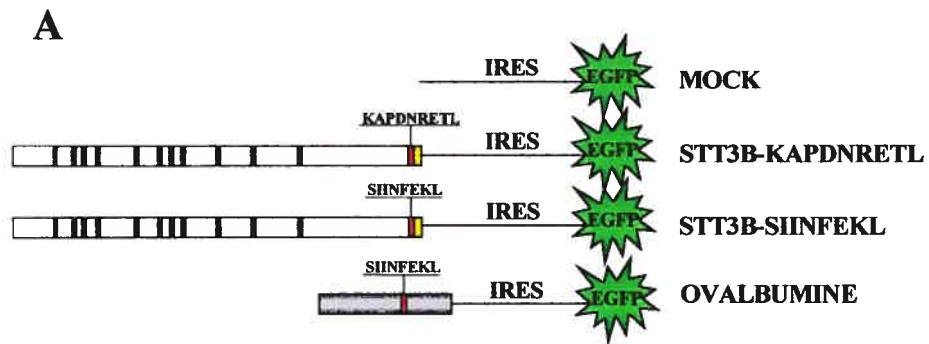
Figure 8. Efficacité de présentation du peptide SIINFEKL

A) Schématisation des différentes constructions utilisées provenant du vecteur bicistronique pIRES2-EGFP. Ce schéma met en évidence les régions transmembranaires (bandes noires), la région riche en lysine de STT3-B (bande jaune) et certains peptides générés (bandes rouges). STT3B-KAPDNRETL représente la protéine native. STT3B-SIINFEKL représente la protéine STT3-B dont la séquence KAPDNRETL a été modifiée pour SIINFEKL. L'ovalbumine représente la protéine mère du peptide SIINFEKL.

B) Présentation du complexe H2-K^b/SIINFEKL et analyse par cytométrie en flux. 48h après la transfection des COS7-K^b par des constructions différentes, les cellules ont été incubées avec l'anticorps 25-D1.16, et analysées par cytométrie en flux. La MFI indiquée représente l'intensité moyenne de la fluorescence obtenue par le marquage de l'anticorps 25-D1.16. sur la population de cellules exprimant la EGFP.

C) Schématisation graphique de la quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL dérivant de l'expression des différentes protéines. L'augmentation de la MFI entre l'ovalbumine et STT3B-SIINFEKL est statistiquement significative ($p < 0,005$). Ce résultat provient d'une expérience en triplicata représentative de trois expériences indépendantes.

D) Efficacité d'expression par transcription/traduction *in vitro*. Les deux protéines sources du peptide SIINFEKL ont été synthétisées dans les mêmes conditions, précipitées et quantifiées au compteur β . Les valeurs obtenues ont été converties en nombre de molécules synthétisées. La différence d'expression entre les deux protéines est statistiquement significative ($p < 0,0001$). Ce résultat correspond à une expérience en triplicata représentative de 4 expériences indépendantes.



de base de l'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) se situe donc environ à une valeur de 5 (Fig. 8B,C). Cependant, suite à l'expression de l'ovalbumine ou de STT3B-SIINFEKL, on observe une présentation des complexes H2-K^b/SIINFEKL à la surface cellulaire. Nos résultats démontrent que le peptide SIINFEKL est présenté 1,6 fois plus lorsqu'il provient de STT3B-SIINFEKL que lorsqu'il provient de l'ovalbumine, soit par une MFI de 53 et de 33, respectivement (Fig. 8C). Afin de comparer adéquatement l'efficacité de présentation du peptide SIINFEKL provenant de STT3B-SIINFEKL et de l'ovalbumine, l'évaluation du taux de synthèse respectif de ces deux protéines a été effectuée par traduction *in vitro*. Nos résultats démontrent que le taux de synthèse de STT3B-SIINFEKL est 2,6 fois moins élevé que celui de l'ovalbumine (Fig. 8D). La normalisation de la quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL sur le taux de synthèse de chacune de ces deux protéines sources nous permet d'estimer que l'efficacité de présentation du peptide SIINFEKL est environ 5 fois plus efficace lorsque ce dernier dérive de STT3-B que lorsqu'il dérive de sa protéine mère, l'ovalbumine. Ce résultat démontre ainsi que STT3-B représente une protéine source plus susceptible à générer des peptides associés aux molécules du CMH I.

$$\text{Efficacité de présentation} = \frac{\text{Quantification des complexes CMH I-peptide}}{\text{Taux de synthèse}} \quad [1]$$

Pour comprendre les raisons expliquant la forte contribution de STT3-B à la formation de l'immunopeptome, nous avons opté pour une approche biochimique et cellulaire. Les résultats suivants sont donc divisés en trois axes: 1) l'identification de certaines caractéristiques propres à STT3-B suivant son expression *in vitro* et *in vivo*, 2) l'identification et la caractérisation de certains domaines protéiques pouvant jouer un rôle au niveau de la contribution de STT3-B à l'immunopeptome et 3) l'influence de ces différents domaines identifiés sur la contribution de l'ovalbumine à la formation de l'immunopeptome.

3. Expression de STT3-A et STT3-B dans un système *in vitro* et *in vivo*

Suite au clonage du cDNA de STT3-A et STT3-B murin, l'expression des protéines respectives a été effectuée par transcription/traduction *in vitro* tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Le poids moléculaire théorique étant de 81kDa pour STT3-A et 93kDa pour STT3-B, nous avons initialement effectué cette expérience afin de déterminer le poids moléculaire auquel ces deux paralogues peuvent être détecté sur gel SDS-PAGE. Suite à leur synthèse respective en présence de ³⁵S-Met, la détection sur gel de STT3-A et STT3-B se situe au niveau des haut poids moléculaire sous l'apparence d'une traînée (Fig. 9A). Ces résultats démontrent qu'en milieu soluble, soit le milieu de la réaction de synthèse, ces deux paralogues sont fortement propices à s'agréger, créant ainsi une migration aberrante sur gel SDS-PAGE. Aucune bande au poids moléculaire approprié ne peut être observée pour l'une ou l'autre des protéines. Cette susceptibilité à s'agréger est d'ailleurs probablement la conséquence de fortes interactions entre les domaines hydrophobes des protéines polytopiques synthétisées. Tel que démontré sur gel, une différence majeure au niveau de l'intensité des deux traînées peut être observée. Suite à la précipitation et à la quantification des produits de synthèse radioactifs, nos résultats montrent que l'efficacité d'expression de STT3-A est 7 fois plus élevée de celle de STT3-B (Fig. 9B). Notons d'ailleurs que STT3-B possède une grande région riche en GC en 5' de son cDNA, laquelle est absente du cDNA de STT3-A et pourrait hypothétiquement expliquer cette altération au niveau de l'efficacité d'expression entre ces deux paralogues.

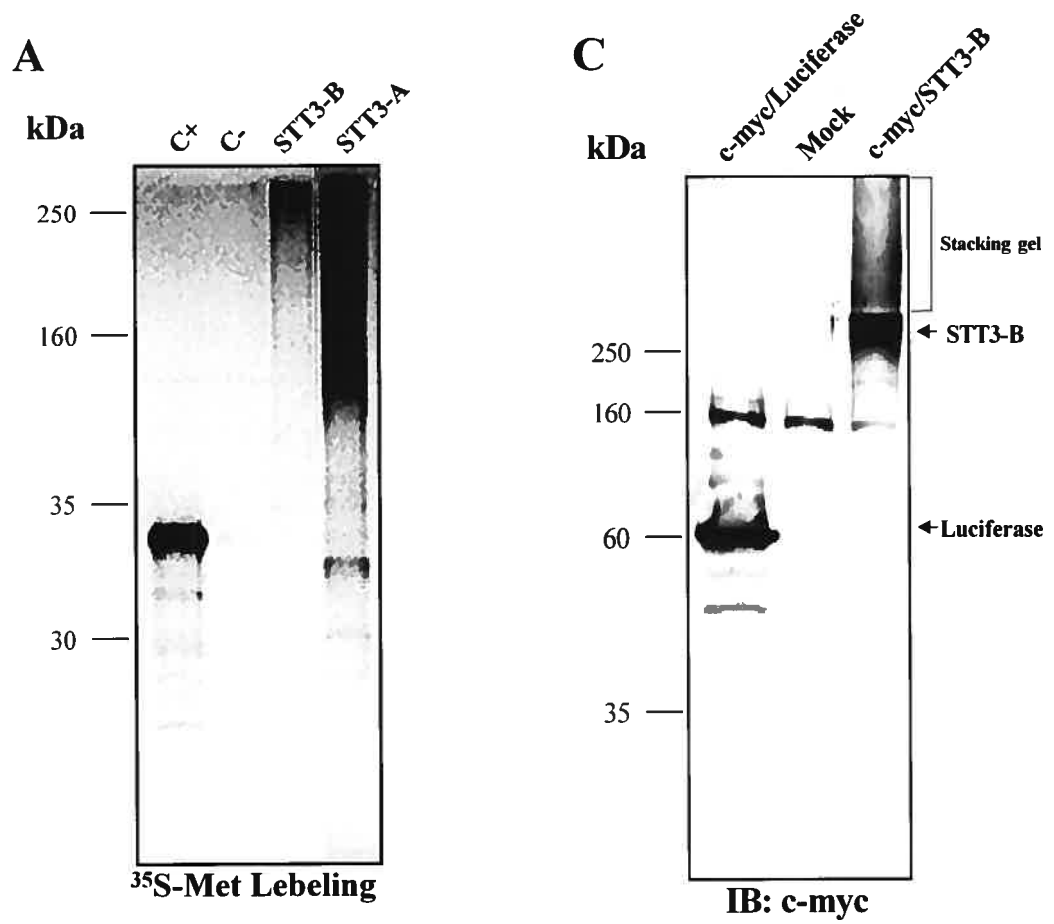
La détection de la protéine de fusion c-myc/STT3-B a également été effectuée par Western blot suivant la transfection de cellules HEK293. Nos résultats montrent que la protéine c-myc/STT3-B se retrouve un fois de plus au niveau des HMW (Fig 9C). Bien que ce résultat puisse être la conséquence d'une extraction protéique inadéquate (détergeant inadéquat), deux autres possibilités sont

Figure 9. Expression de STT3-A et STT3-B

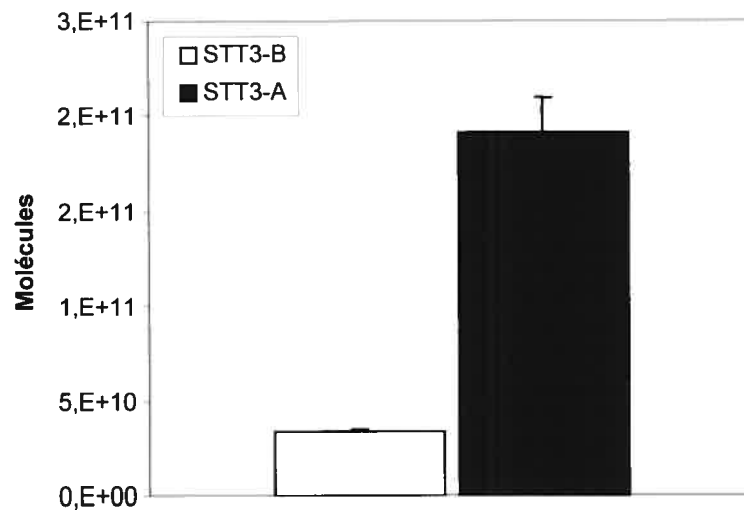
A) Expression de STT3-A et STT3-B par transcription/traduction *in vitro*. Suivant la synthèse des deux protéines respectives en présence de ^{35}S -Met, un gel SDS-PAGE a été effectué pour la détection de ces deux orthologues. Le contrôle positif (C+) correspond à la protéine HYGRO encodée par le vecteur pTriEx-3/hygro, laquelle est détectée à un poids moléculaire de 34kDa. Le contrôle négatif (C-) représente le résultat de synthèse à partir du vecteur vide. STT3-A et STT3-B sont détectées sous forme de traînée au niveau des hauts poids moléculaires. À noter la présence d'une bande à 33kDa pour STT3-A, laquelle dérive probablement d'une synthèse protéique partielle.

B) Quantification des protéines synthétisées. Suivant la synthèse et la précipitation des protéines marquées au ^{35}S -Met, celles-ci ont été quantifiées au compteur β . Les valeurs obtenues ont été converties en nombre de molécules synthétisées (voir Matériel et Méthodes). La différence d'expression entre les deux protéines est statistiquement significative ($p < 0,005$). Ce résultat correspond à une expérience en triplicata représentative de 3 expériences indépendantes.

C) Surexpression de STT3-B dans des cellules HEK293. 48h suivant la transfection par les vecteurs encodant c-myc/Luciférase, c-myc/STT3-B ou le vecteur vide (MOCK), les cellules ont été lysées et les protéines respectives ont été détectées par Western blot contre l'épitope c-myc, lequel est fusionné en N-terminal de la Luciférase ou de STT3-B. Alors que c-myc/Luciférase est détectée à un poids moléculaire de 60kDa, c-myc/STT3-B est détectée dans les hauts poids moléculaires sous l'apparence d'une traînée. Notons la présence d'une bande non-spécifique à 160kDa pour tous les échantillons.



B



envisageables, soient la présence d'agrégats intracellulaires ou d'une accumulation de c-myc/STT3-B polyubiquitinées difficilement dégradées.

4. STT3-B s'accumule de façon juxtanucléaire et se distingue de l'agrésome

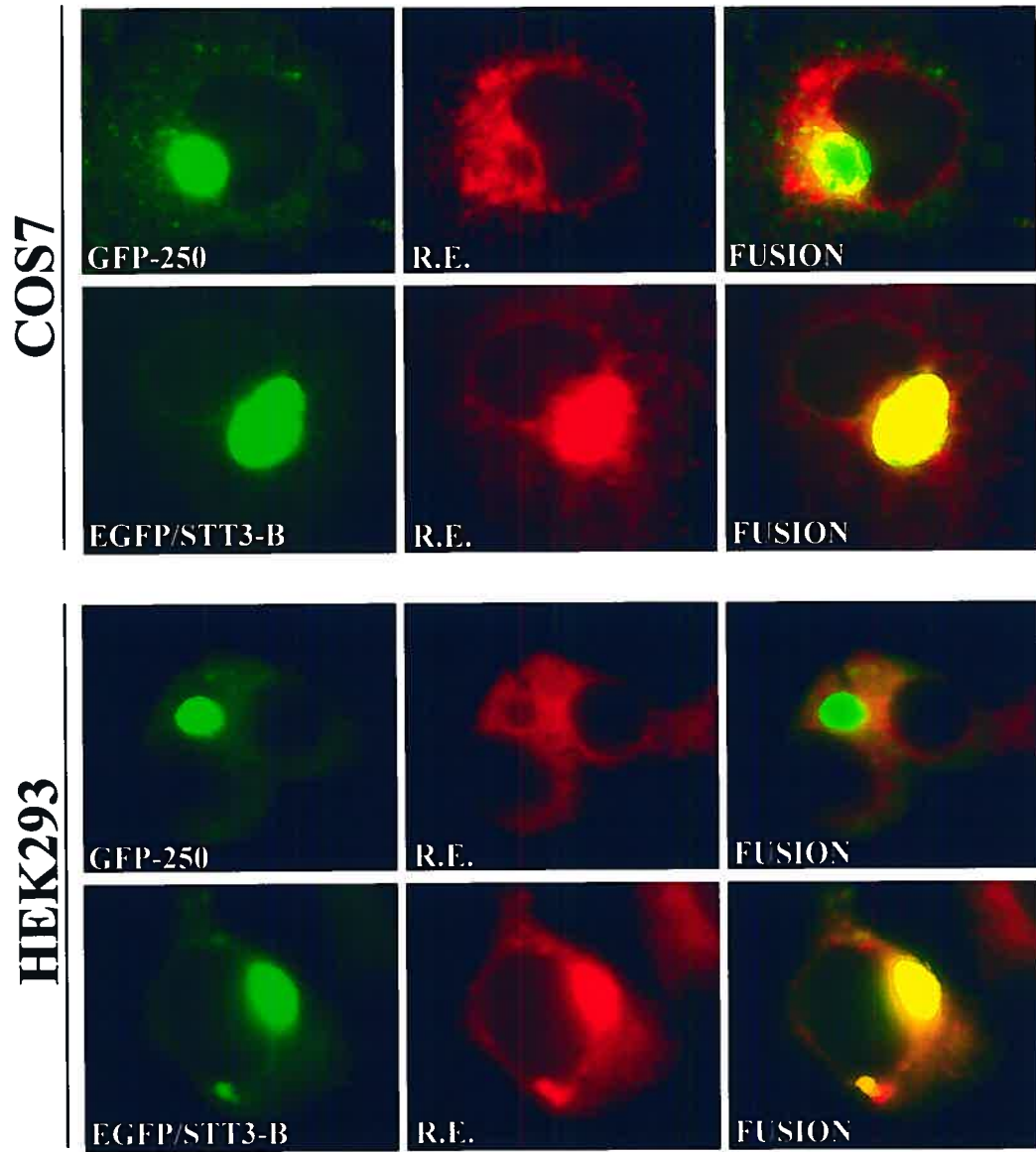
La présence d'une telle traînée en Western blot est fréquemment observée suite à la détection de protéines fortement propices à s'agréger à l'intérieur de cellules eucaryotes (Ward et al., 1995; Jonhston et al., 1998). Fait très intéressant, une protéine hautement propice à l'agrégation dans un milieu soluble peut s'accumuler de façon juxtanucléaire au niveau du MTOC ("Microtubule Organization Center"), formant ainsi un agrésome (Jonhston et al., 1998). Puisque les protéines fortement propices à s'agréger s'accumulent au MTOC, site spécialisé dans la dégradation des protéines, nous avons soulevé l'hypothèse que la forme rétrotransloquée de STT3-B pourrait posséder un certain potentiel "Aggresome-forming". Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons transfecté des cellules COS7 et HEK293 avec un vecteur codant pour la protéine de fusion EGFP/STT3-B. Cette protéine a par la suite été co-localisée avec une protéine chimérique résidente du R.E.. La même expérience de co-localisation a été effectuée mais en utilisant cette fois-ci un contrôle positif de protéine formant un agrésome, GFP-250 (Garcia-Mata et al., 1999). Tel qu'illustré à la figure 10A, EGFP/STT3-B s'accumule de façon juxtanucléaire tout comme l'agrésome GFP-250. L'accumulation de EGFP/STT3-B co-localise entièrement avec le marqueur du R.E. alors qu'aucune co-localisation n'est observée entre ce même marqueur et GFP-250. De plus, nos études en microscopie électronique révèlent que cette accumulation juxtanucléaire correspond à un réseau tubulo-vésiculaire laissant penser à un recrutement et une prolifération désorganisée de membranes du R.E., soit la génération d'un "anastomosing ER" (Fig. 10B), structure morphologique qu'on nommera SERTA ("Smooth Endoplasmic Reticulum Tubular Arrays"). Bien que l'identification exacte des composantes membranaires ne puisse être effectuée sur

Figure 10. Accumulation juxtanucléaire de STT3-B

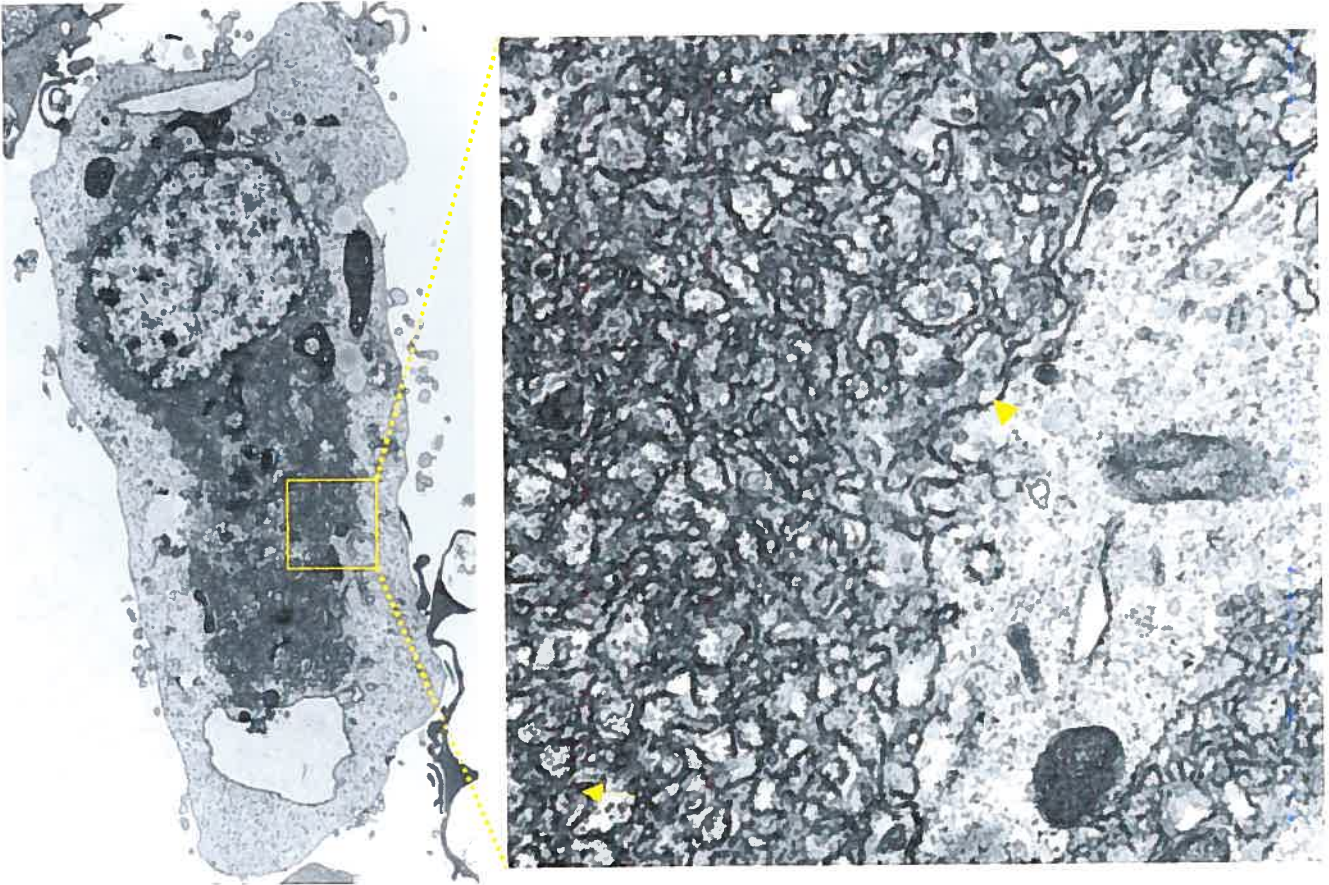
A) L'accumulation juxtanucléaire de EGFP/STT3-B se distingue de l'agrésome. Les cellules COS7 ou HEK293 ont été co-transfectées avec GFP-250 et DsRed2-ER (R.E.) ou par EGFP/STT3-B et DsRed2-ER. GFP-250 représente une protéine formant un agrésome alors que DsRed2-ER correspond à une protéine chimérique résidente du R.E. (voir Matériel et Méthodes). 40h post-transfection, la co-localisation (FUSION) de GFP-250 et de EGFP/STT3-B a été effectuée avec la protéine résidente du R.E.

B) Identification des SERTAs. 48h suivant la surexpression de EGFP/STT3B, les cellules COS7 ont été préparées tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes pour une analyse en microscopie électronique. L'accumulation juxtanucléaire de EGFP/STT3-B correspond à un recrutement et une prolifération du R.E.. Le plus fort grossissement met en évidence la formation du "anastomosing ER", lequel est composé de R.E. lisse (pointe de flèche) et de R.E. rugueux (flèche).

A



B



cette image, le plus fort grossissement met néanmoins en évidence la présence de R.E. lisse et de R.E. rugueux. Ces résultats démontrent que EGFP/STT3-B se distingue de l'agrésome par sa séquestration au niveau d'un sous-domaine du R.E.. Une telle accumulation de EGFP/STT3-B dans la membrane du R.E. suggère que les mécanismes de rétrotranslocation de EGFP/STT3-B de la membrane du R.E. vers le cytoplasme sont inefficaces, du moins lorsque EGFP/STT3-B est surexprimée.

La littérature suggère que la formation de sous-domaines du R.E. comparables aux SERTAs dépend de l'activité du protéasome et des microtubules (Kamhi-Nesher et al., 2001). Désirant évaluer si la formation des SERTAs est modulée par l'activité du protéasome et par l'action des microtubules, nous avons traité les cellules surexprimant EGFP/STT3-B au clasto-Lactacystin et au nocodazole, bloquant ainsi l'activité du protéasome et l'action des microtubules, respectivement. 48h suivant la surexpression de EGFP/STT3-B dans les cellules HEK293, environ 20% des cellules transfectées contenaient des SERTAs (Fig. 11B). Suivant l'ajout d'un inhibiteur spécifique du protéasome (clasto-Lactacystin), 3 fois plus de cellules contenaient des SERTAs, soit 60% des cellules transfectées (Fig. 11B). Une augmentation de l'intensité moyenne de la fluorescence de 2,3 a également été notée suivant l'ajout de la clasto-Lactacystin (Tableau 1). Ces résultats démontrent que le protéasome régule la dégradation de EGFP/STT3-B. Il est d'ailleurs généralement reconnu que la stabilisation d'une protéine dans la voie de sécrétion suite à l'ajout d'un inhibiteur du protéasome implique le passage de cette protéine dans la voie du ERAD (Elkabetz et al., 2003). L'augmentation de l'intensité moyenne de la fluorescence et de la proportion de SERTAs en présence de clasto-Lactacystin démontre ainsi que EGFP/STT3-B est une protéine rétrotransloquée, substrat du protéasome. L'ajout du nocodazole nous a de plus permis d'établir que la formation des SERTAs est dépendante des microtubules. Suite à l'ajout de la clasto-Lactacystin et du nocodazole dans le milieu de culture des cellules HEK293, l'accumulation juxtanucléaire de EGFP/STT3B est rompue, causant une dispersion d'amas protéiques (Fig. 11D). Suite à ces résultats, nous croyons que les caractéristiques des SERTAs identifiées se rapprochent nettement d'un "Quality Control compartment" (Kamhi-Nesher et al.,

Figure 11. Caractérisation de la formation des SERTAs

A) Effet de la clasto-Lactacystin sur la formation des SERTAs (pointe de flèche). 24h suivant la transfection des cellules HEK293 avec EGFP/STT3-B, les cellules ont été incubées soit en absence, soit en présence de la clasto-Lactacystin durant 16h.

B) Quantification des cellules contenant des SERTAs. Suivant l'incubation de cellules HEK293 avec de la clasto-Lactacystin durant 16h, le décompte des cellules transfectées contenant des SERTAs a été effectué en comparaison avec les cellules non-traitées. Pour chaque expérience, six champs microscopiques pour une moyenne de 100 cellules par champ ont été utilisés pour le décompte. La différence entre les deux groupes est statistiquement significative ($p < 0,005$). Ce résultat correspond à une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

C) Intensité de la fluorescence par cytométrie en flux. 16h suivant le traitement des cellules HEK293 au clasto-Lactacystin, l'intensité moyenne de la fluorescence provenant de EGFP/STT3-B a été mesurée en comparaison avec les cellules non-traitées. Les analyses quantitatives sont retrouvées dans le tableau 1.

D) Dépolarisation des microtubules par l'ajout du nocodazole. Afin d'observer l'implication des microtubules sur l'accumulation juxtanucléaire de EGFP/STT3-B, les cellules HEK293 ont été mises en présence de la clasto-Lactacystin et du nocodazole pour une période de 8h.

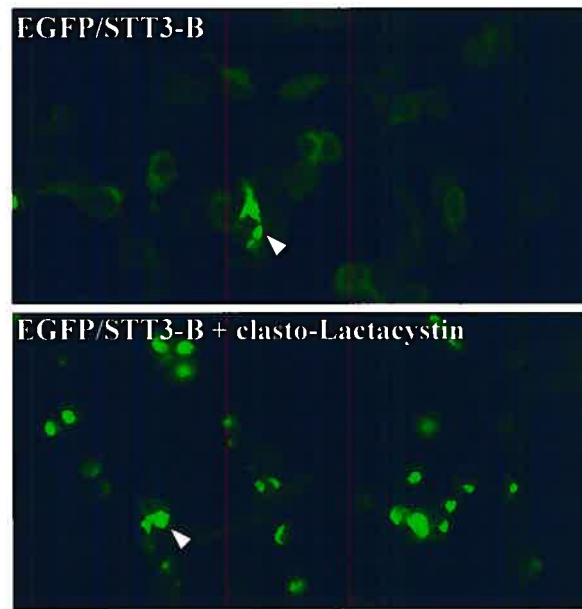
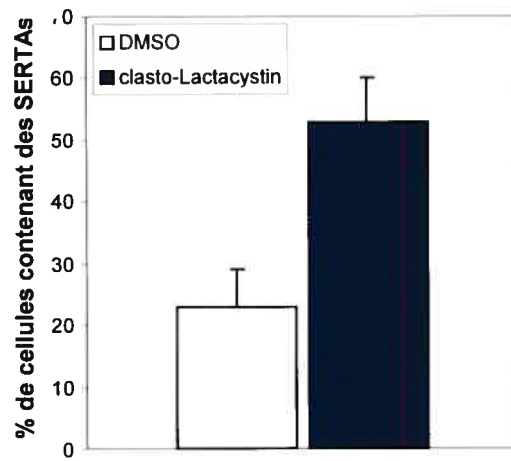
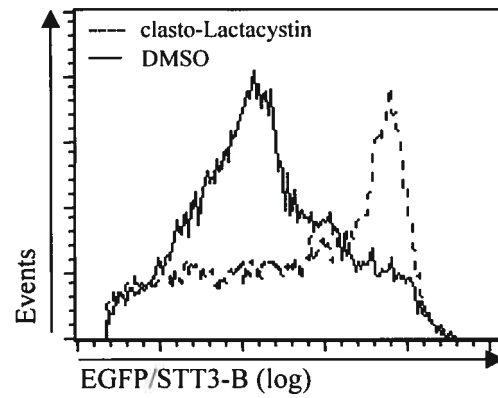
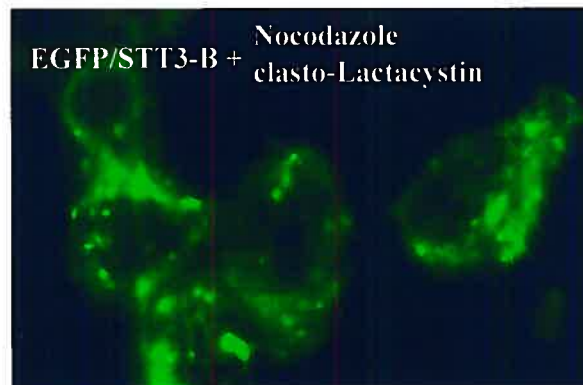
A**B****C****D**

Tableau 1. Effet de la clasto-Lactacystin sur différents substrats du protéasome

Constructions	MFI (DMSO)	MFI (clasto-Lactacystin)	Ratio (clasto-Lactacystin / DMSO)
EGFP/STT3-B	179 ± 3	408 ± 18	2,3 ± 0,4
EGFP/STT3-B _{Δ529-556}	82 ± 4	384 ± 12	4,7 ± 0,06
EGFP/PEST	169 ± 6	381 ± 5	2,3 ± 0,05

24h suivant la transfection des HEK293 par ces différentes constructions, les cellules ont été mises en présence (clasto-Lactacystin) ou en absence (DMSO) de l'inhibiteur du protéasome. L'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) a été mesurée en cytométrie en flux. Le ratio calculé à partir des valeurs provenant de EGFP/STT3-B_{Δ529-556} est plus élevé que celui provenant de EGFP/STT3-B ($p < 0,01$). La MFI provenant de EGFP/STT3-B_{Δ529-556} en condition physiologique normal (DMSO) est plus faible que la MFI provenant de la protéine native ($p < 0,01$). Aucune différence statistiquement significative entre la MFI de EGFP/STT3-B et celle de EGFP/STT3-B_{Δ529-556} en présence de clasto-Lactacystin. Ces résultats sont tirés d'une expérience représentative de deux expériences indépendantes. Mêmes observations notées à partir des cellules COS7.

2001; Frenkel et al., 2004) ou du ERAC ("ER-Associated Compartment") (Huyer et al., 2004) parce que les SERTAs représentent une accumulation juxtanucléaire de protéines séquestrées dans le R.E., dépendent de l'activité du protéasome et de l'action des microtubules.

5. Étude de la dernière région transmembranaire STT3-B₅₂₉₋₅₅₆

5.1 La région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ correspond à un signal d'ancrage de type II et peut être suffisante pour induire la formation de SERTAs

Il a déjà été démontré que certaines régions transmembraines provenant de protéines résidentes du R.E. ont la capacité à elles seules d'induire la prolifération de membranes du R.E. lorsque la EGFP fusionnée est orientée du côté cytoplasmique (Snapp et al., 2003). Afin d'évaluer si une région transmembranaire de STT3-B peut être suffisante pour induire la formation de SERTAs, nous avons d'abord étudié la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, une région très hydrophobe riche en Methionine-Leucine, prédite par le programme SignalP (Nielsen et al., 1999) pour être un signal d'ancrage. Suite à la fusion de cette région en C-terminal de EGFP (EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆), cette protéine chimérique a été surexprimée dans les cellules HEK293, co-localisée avec la protéine résidente du R.E. et analysée par microscopie électronique. Les résultats de microscopie entre le R.E. et EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ démontrent que la co-localisation est parfaite au niveau de l'accumulation juxtanucléaire et très forte mais incomplète à l'extérieur de ce compartiment (Fig. 12A). Suite à la surexpression de EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, l'analyse de l'infrastructure cellulaire met en évidence la formation du "anastomosing E.R." (Fig. 12B). Ces résultats démontrent que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ est suffisante pour induire la formation de SERTAs, tout comme la protéine entière EGFP/STT3-B. Étonnamment, la proportion de cellules transfectées possédant ce phénotype morphologique est environ deux fois plus élevée dans les cellules transfectées par EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ que dans celles transfectées par la protéine

Figure 12. Caractérisation de la dernière région transmembranaire STT3-B₅₂₉₋₅₅₆

A) Accumulation juxtanucléaire de EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆. Les cellules HEK293 ont été co-transfectées avec EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et DsRed2-ER (R.E.). 40h post-transfection, la co-localisation (FUSION) de EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ a été effectuée avec la protéine résidente du R.E.

B) Analyse morphologique de l'accumulation juxtanucléaire de EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ par microscopie électronique.

C) Quantification des SERTAs formés par EGFP/STT3-B et EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆. 16h suivant l'absence ou la présence de clasto-Lactacystin, la proportion de cellules HEK293 transfectées contenant des SERTAs a été quantifiée. Les différences entre chaque groupe sont statistiquement significatives ($p < 0,001$). Ce résultat correspond à une expérience représentative de deux expériences indépendantes. Pour chaque expérience, 6 champs microscopiques ont été utilisés pour un total d'environ 100 cellules par champ.

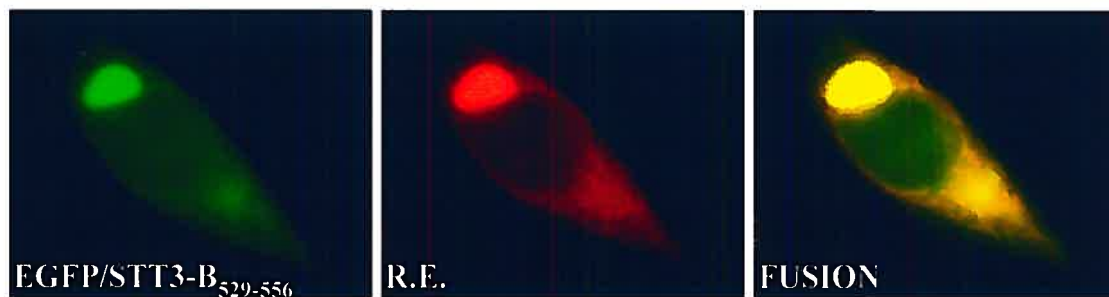
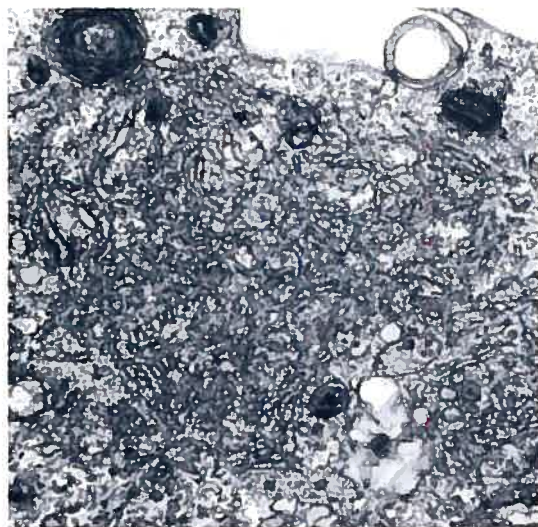
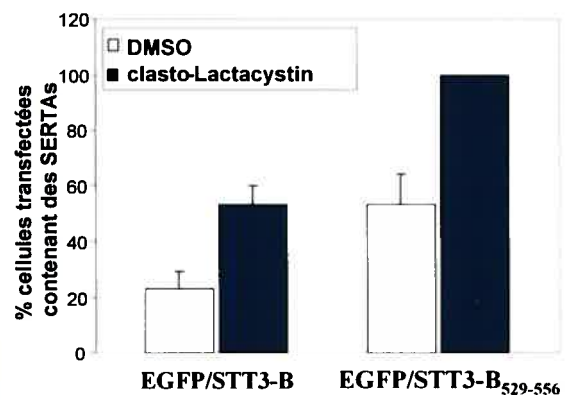
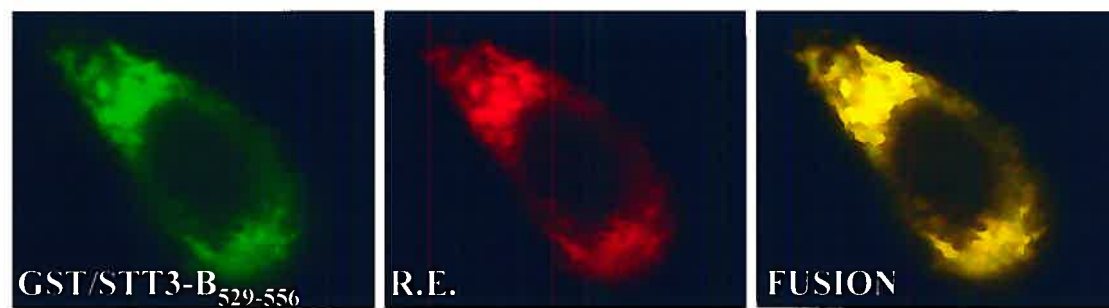
D) Même chose qu'en A) à l'exception que la détection de la protéine GST/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ s'est effectuée par immunofluorescence contre l'épitope GST.

E) Schématisation des constructions utilisées. Les régions STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, STT3-B₅₂₉₋₆₁₁, STT3-B₅₂₉₋₆₆₂, STT3-B₅₂₉₋₇₁₄, STT3-B₅₂₉₋₇₇₅ et STT3-B₅₂₉₋₈₂₃ sont fusionnées à EGFP et représentent des portions du grand domaine hydrophile C-terminal de STT3-B (région en bleu). La région en gris représente la dernière région transmembranaire de STT3-B. Les symboles rouges correspondent aux sites de N-glycosylation. La région en jaune correspond à la région riche en lysine de STT3-B.

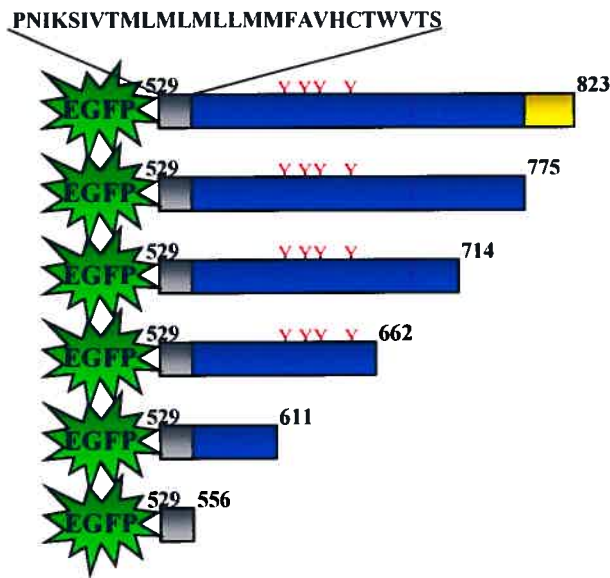
F) Effet de la tunicamycin sur la glycosylation des protéines de fusion. 24h suivant la transfection des HEK293 par les différentes constructions, les cellules ont été incubées avec (+) ou sans (-) tunicamycin pour une durée de 16h. La détection des

protéines a été effectuée par Western blot contre l'épitope GFP. L'alpha-tubulin a également détectée sur cette même membrane pour la normalisation de la quantité de protéines chargées sur gel.

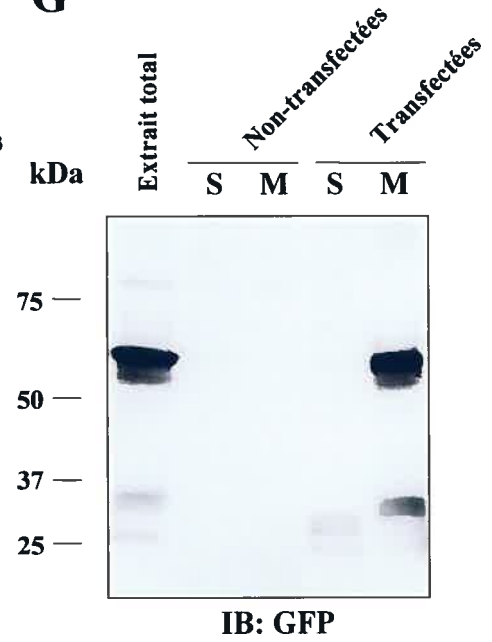
G) Fractionnement cellulaire. 48h suivant la transfection des cellules par EGFP/STT3-B₅₂₉₋₈₂₃, les cellules ont été lysées et la fraction soluble (S) a été séparée de la fraction membranaire (M). Des cellules non-transfectées ont également été utilisées pour s'assurer de la spécificité de l'anticorps. La détection de la protéine a été effectuée par Western blot contre l'épitope GFP.

A**B****C****D**

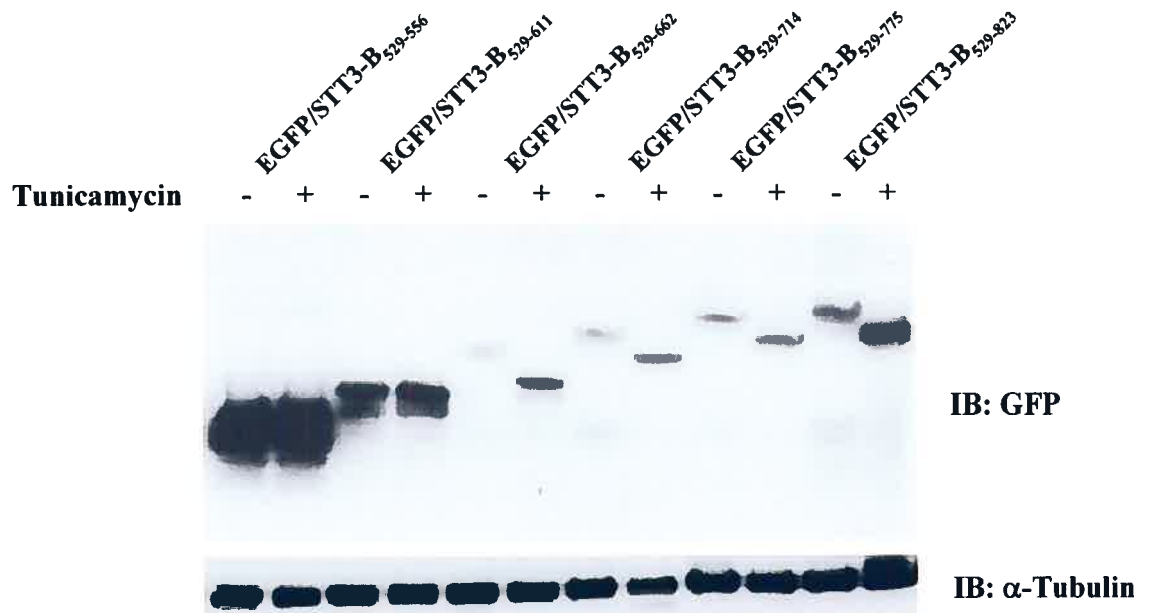
E



G



F



entière possédant les 11 domaines transmembranaires (Fig. 12C). Ceci suggère que le potentiel "SERTAs-forming" d'une protéine ne dépendrait pas nécessairement du nombre de régions transmembranaires. Cette capacité à induire une prolifération du R.E. pourrait par ailleurs provenir des propriétés biochimiques de la protéine transmembranaire. Snapp et al. (2003) ont mis en évidence l'implication considérable des propriétés dimérisantes de EGFP dans la formation de OSER ("Organized Smooth Endoplasmic Reticulum"), un type de prolifération du R.E.. Considérant que les propriétés intrinsèques de EGFP pourraient être en partie responsables de la formation de SERTAs, nous avons évalué le plein potentiel de ce "SERTAs-inducing domain" par la fusion de la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ à GST. La GST est une protéine cytoplasmique dont les propriétés biochimiques intrinsèques diffèrent largement de la EGFP, principalement par son très faible niveau d'hydrophobicité. Nos résultats démontrent que contrairement aux résultats précédents, aucune formation de SERTAs n'est observée suivant la détection de la protéine chimérique GST/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, que ce soit en absence ou en présence d'inhibiteur du protéasome (résultats non-illustrés). Cependant, l'ajout du domaine STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ à la protéine cytosolique GST a également comme conséquence de provoquer une localisation totale de la molécule chimérique dans le R.E. (Fig. 12D). Ces résultats soulèvent deux points. D'abord, par la localisation de deux protéines cytosoliques (EGFP et GST) au niveau du R.E., ces résultats suggèrent que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ représenterait un signal d'ancrage permettant de transloquer la protéine dans la membrane du R.E.. Deuxièmement, nous démontrons que cette séquence hydrophobe possède des limites dans sa capacité à induire la formation de SERTAs, et que la formation de ceux-ci peuvent être influencée par la nature de la protéine fusionnée. La surexpression et la détection de c-myc/STT3-B en immunofluorescence résulte également à la formation de SERTAs (résultat non-illustré). Ceci démontre que EGFP ne joue pas de rôle majeur dans la formation de SERTAs lorsqu'elle est fusionnée à la molécule STT3-B entière. Nos résultats laissent croire que par ses propriétés intrinsèques, EGFP pourrait être impliquée dans la formation de SERTAs lorsqu'elle est fusionnée à une seule région transmembranaire ancrée dans la membrane du R.E..

Afin d'appuyer l'hypothèse que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ permet l'ancrage de EGFP et de GST dans la membrane du R.E., différentes constructions ont été élaborées, lesquelles possèdent différentes portions du domaine hydrophile C-terminal de STT3-B fusionnées à EGFP (Fig. 12E). Puisque ce domaine C-terminal possède les 4 sites de N-glycosylation de STT3-B, il devient possible d'évaluer l'orientation du domaine C-terminal (cytoplasmique ou lumière du R.E.) en évaluant le niveau de N-glycosylation de ces différentes protéines chimériques. La détection de ces différentes protéines de fusion a été effectuée par Western blot après le traitement des cellules HEK293 par la présence ou l'absence de tunicamycin, un inhibiteur de la N-glycosylation. On observe suite au Western blot que l'effet de la tunicamycin entraîne une diminution du poids moléculaire pour les protéines EGFP/STT3-B₅₂₉₋₆₆₂, EGFP/STT3-B₅₂₉₋₇₁₄, EGFP/STT3-B₅₂₉₋₇₇₅, EGFP/STT3-B₅₂₉₋₈₂₃ (Fig. 12F), lesquelles représentent les 4 protéines de fusion possédant les sites de N-glycosylation. La détection de EGFP/STT3-B₅₂₉₋₈₂₃ par Western blot a été également effectuée suivant le fractionnement des protéines solubles et des protéines membranaires. La détection de EGFP/STT3-B₅₂₉₋₈₂₃ s'observe uniquement dans la fraction membranaire, démontrant ainsi que cette protéine chimérique est bien localisée à l'intérieur de membranes (Fig. 12G). Ces résultats démontrent que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, est suffisante pour insérer et ancrer une protéine initialement cytosolique dans la membrane du R.E.. La région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ est également suffisante pour orienter la synthèse du domaine hydrophile C-terminal de STT3-B vers la lumière du R.E.. Ceci suggère fortement que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ représente un signal d'ancrage de type II parce qu'elle permet 1) l'insertion et l'ancrage d'une protéine dans la membrane du R.E. et 2) d'orienter le domaine C-terminal de la protéine dans la lumière du R.E. (Goder and Spiess, 2001). D'autre part, une forte diminution du niveau de certaines protéines chimériques peut également être observée, principalement pour EGFP/STT3-B₅₂₉₋₆₆₂ (Fig. 12F). Cette observation soulève certaines questions intéressantes au niveau de la stabilité de cette protéine. Cet aspect sera élaboré ci-bas.

5.2 La région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ est nécessaire à la génération optimale de SERTAs et est essentielle à la rétention complète de STT3-B au niveau du R.E.

Après avoir évalué que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ pouvait être suffisante pour induire la formation de SERTAs, nous avons évalué si celle-ci était nécessaire à leur formation. Afin de répondre à cette question, nous avons produit une protéine mutante possédant une délétion pour cette région transmembranaire, créant ainsi EGFP/STT3-B_{Δ529-556}. En établissant la proportion de cellules transfectées contenant des SERTAs pour EGFP/STT3-B et EGFP/STT3-B_{Δ529-556}, on observe que la formation de SERTAs est maintenue, bien que diminuée de moitié, lorsque la protéine mutante est surexprimée (Fig. 13C). (Il est à noter que la proportion de SERTAs provenant de EGFP/STT3-B est légèrement inférieure à celle de la Fig. 11B. Cette discordance est probablement la conséquence de l'utilisation d'une nouvelle lignée de cellules HEK293.) Ce résultat démontre donc que cette région n'est pas nécessaire à l'induction de SERTAs mais qu'elle possède un effet inducteur à leur génération.

Par ailleurs, on observe chez 40% des cellules transfectées par EGFP/STT3-B_{Δ529-556} une accumulation protéique à l'extérieur du R.E. (Fig. 13B,C). Observés dans les deux lignées cellulaires testées (HEK293 et COS7), ces regroupements protéiques diffèrent des SERTAs par leur localisation intracellulaire mais également au niveau de leur grosseur et de leur nombre par cellule (Fig. 13A,B). Ceci suggère que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, absente de cette protéine mutante, serait nécessaire à une rétention complète de la molécule dans la membrane du R.E.. Ces résultats supportent ainsi l'idée que cette dernière région transmembranaire correspond à un signal d'ancrage, lequel pourrait être nécessaire à la translocation complète et à la localisation de STT3-B dans la membrane du R.E.. D'autre part, ces résultats suggèrent également que EGFP/STT3-B_{Δ529-556} serait rétrotransloquée plus

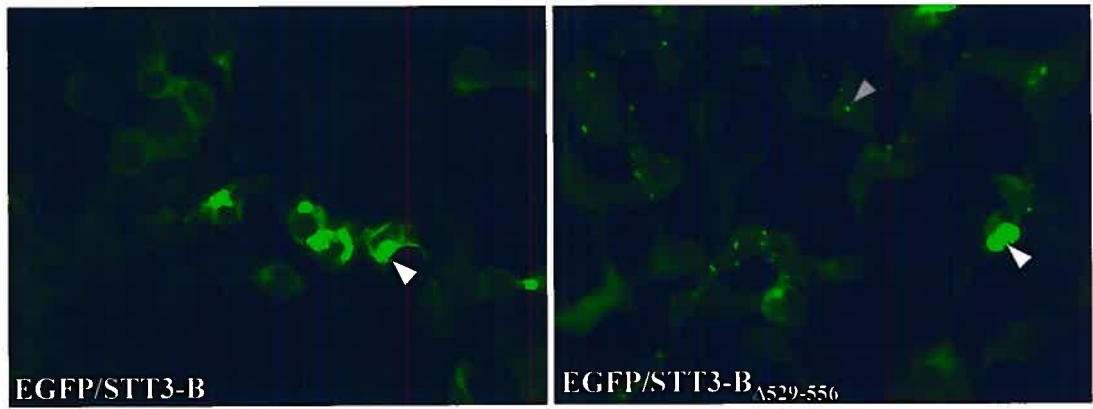
Figure 13. Délétion de la dernière région transmembranaire STT3-B_{Δ529-556}

A) Visualisation intracellulaire de la protéine native EGFP/STT3-B et de la protéine mutante EGFP/STT3-B_{Δ529-556}. 48h suivant la surexpression des protéines respectives, on observe la formation des SERTAs (pointe de flèche blanche) et la présence d'un nouveau type de regroupement protéique uniquement présent lors de la surexpression de EGFP/STT3-B_{Δ529-556} (pointe de flèche grise).

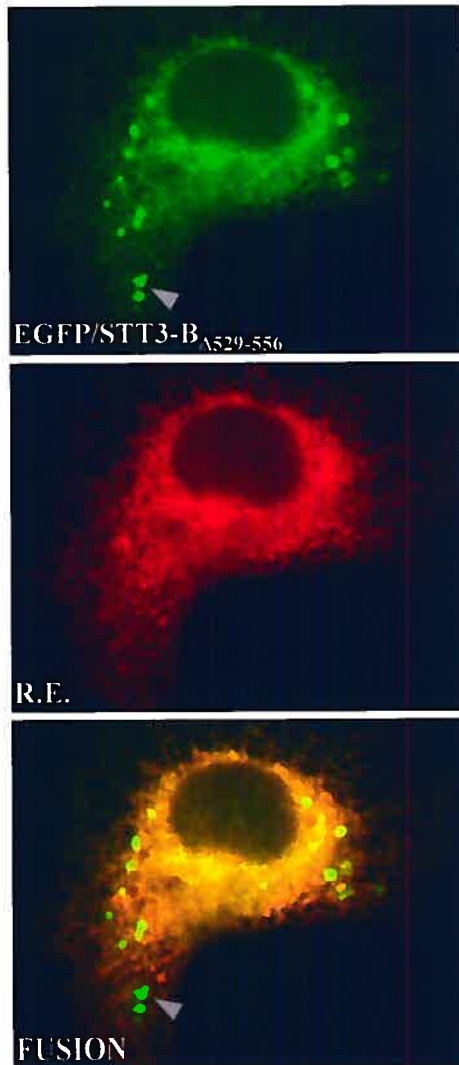
B) L'accumulation protéique de EGFP/STT3-B_{Δ529-556} se distingue des SERTAs. La co-localisation de la protéine mutante et du R.E. a été effectuée 48h suivant la co-transfection de EGFP/STT3-B_{Δ529-556} et de la protéine résidente du R.E..

C) Quantification des différents regroupements protéiques identifiés. 48h suivant la transfection des cellules HEK293, la proportion de cellules contenant des SERTAs formés par EGFP/STT3-B et par EGFP/STT3-B_{Δ529-556} a été quantifiée. La quantification de la proportion de cellules contenant les petits amas protéiques à l'extérieur du R.E. a également été effectuée. Pour chaque expérience, six champs microscopiques ont été utilisés pour le décompte des cellules, pour une moyenne d'environ 100 cellules par champ. Ce résultat correspond à une expérience représentative de trois expériences indépendantes. La diminution du contenu en SERTAs entre la protéine native et mutante est statistiquement significative ($p < 0,001$). Les amas protéiques se distinguant des SERTAs sont retrouvés uniquement suivant la surexpression de la protéine EGFP/STT3-B_{Δ529-556}.

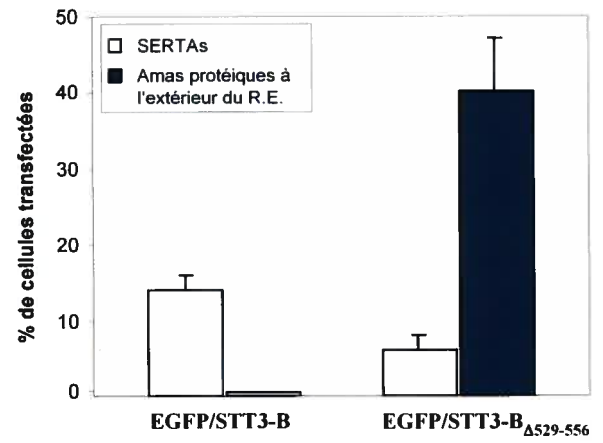
A



B



C



efficacement que EGFP/STT3-B puisqu'on retrouve deux fois moins de SERTAs suite à la surexpression de la protéine mutante.

5.4 L'absence de la dernière région transmembranaire provoque une dégradation plus efficace de STT3-B par le protéasome

Afin de tester l'hypothèse que EGFP/STT3-B $_{\Delta 529-556}$ est rétrotransloquée plus efficacement que la protéine native, nous avons évalué la susceptibilité de ces deux protéines à se faire dégrader par le protéasome. Alors qu'une rétrotranslocation inefficace diminue l'accessibilité d'une protéine au protéasome, une rétrotranslocation plus rapide devrait l'augmenter. Suite à la transfection de EGFP/STT3-B et de EGFP/STT3-B $_{\Delta 529-556}$, on observe une nette différence au niveau de l'intensité de fluorescence respective des deux protéines tant en microscopie qu'en cytométrie en flux. L'analyse en cytométrie en flux révèle d'ailleurs que l'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) émise par la protéine mutante est environ deux fois plus faible que celle de la protéine native (Tableau 1). Afin de s'assurer que cette diminution de fluorescence n'est pas la conséquence d'une expression plus faible de cette protéine mutante, nous avons mesuré la MFI pour chacune des deux protéines suivant l'ajout d'un inhibiteur du protéasome. Cet essai a été de plus effectué par l'ajout d'un contrôle positif reconnu pour être un substrat du protéasome (EGFP/PEST; voir Matériel et Méthodes). On constate que l'inhibiteur du protéasome a comme effet de ramener l'intensité moyenne de la fluorescence au même niveau pour EGFP/STT3-B et EGFP/STT3-B $_{\Delta 529-556}$. L'inhibition du protéasome se fait ainsi ressentir deux fois plus fortement sur la protéine mutante, soit par une augmentation de la fluorescence de 4,7 fois comparativement à la protéine native dont l'accumulation de la fluorescence est de 2,3 fois (Tableau 1). La fluorescence de EGFP/PEST est également augmentée de 2,3 fois suivant l'ajout de l'inhibiteur du protéasome. Ce résultat démontre que sous des conditions normales, la protéine EGFP/STT3-B $_{\Delta 529-556}$ est dégradée plus efficacement par le protéasome que la protéine native. Ces résultats suggèrent que ce dernier domaine transmembranaire

est impliqué dans la stabilité de la protéine, fort probablement au niveau de l'ancrage complet de STT3-B dans la membrane du R.E. La translocation incomplète de cette molécule pourrait être ainsi responsable de son instabilité, résultant en une rétrotranslocation plus rapide. Ce résultat appuie donc l'idée que EGFP/STT3-B $_{\Delta 529-556}$ est rétrotransloquée plus efficacement que la protéine native, accédant plus rapidement au protéasome que EGFP/STT3-B et devenant ainsi un meilleur substrat pour la machinerie de dégradation. L'étude de la région STT3-B $_{\Delta 529-556}$ démontre de plus l'influence d'un signal d'ancrage dans le potentiel "SERTAs-forming" d'une protéine. À notre connaissance, cette constatation représente la toute première évidence établissant un lien entre les signaux d'ancrage d'une protéine polytopique, l'efficacité de sa rétrotranslocation et la formation de SERTAs.

6. Évaluation de régions candidates à un rôle dans la dégradation de STT3-B

6.1 La région STT3-B $_{612-662}$ joue un rôle dans la dégradation de la protéine et dans la formation des SERTAs

Nous avons investigué l'effet d'une région pouvant influencer le niveau de dégradation de STT3-B et par le fait même, de la quantité de peptides libérés par le protéasome. L'étude des six protéines chimériques schématisées à la figure 12E suggère une influence de la région STT3-B $_{612-662}$ sur l'efficacité de dégradation de ces protéines chimériques. La détection par Western blot de ces six protéines chimériques démontre une nette diminution de la quantité de protéines entre EGFP/STT3-B $_{529-556}$ et EGFP/STT3-B $_{529-662}$ (Fig. 12F). La faible détection de la protéine EGFP/STT3-B $_{529-662}$ pousse à croire que la région STT3-B $_{612-662}$ ajoutée pourrait être suffisante pour augmenter l'instabilité de la protéine chimérique EGFP/STT3-B $_{529-662}$. Partant de cette hypothèse, la délétion de la région STT3-B $_{612-662}$ pourrait-elle influencer négativement l'efficacité de dégradation de STT3-B *in toto*? La région STT3-B $_{612-662}$

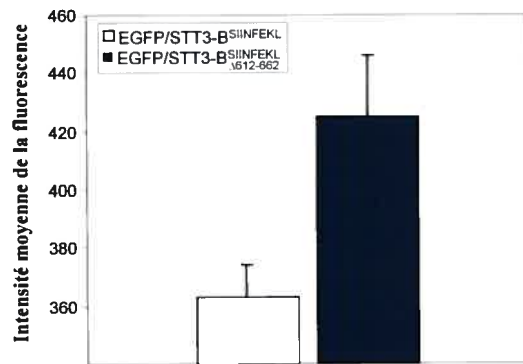
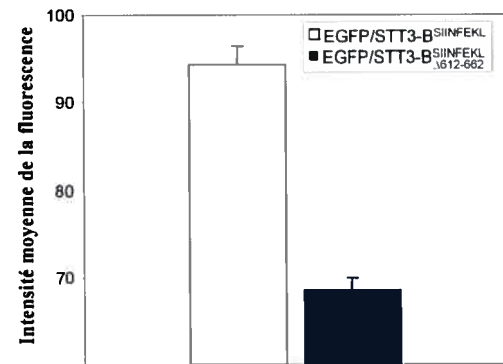
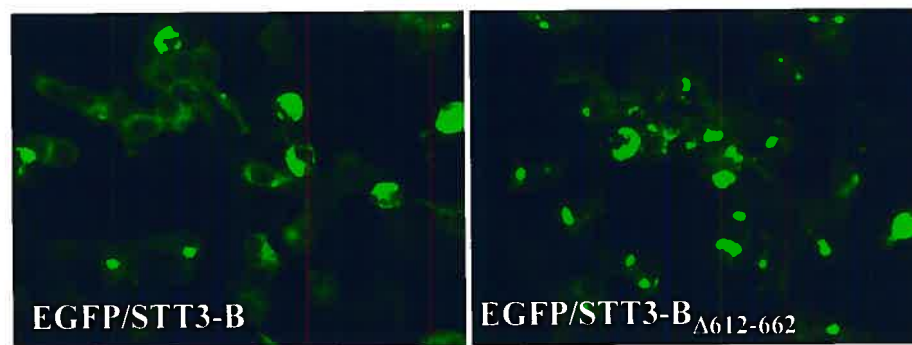
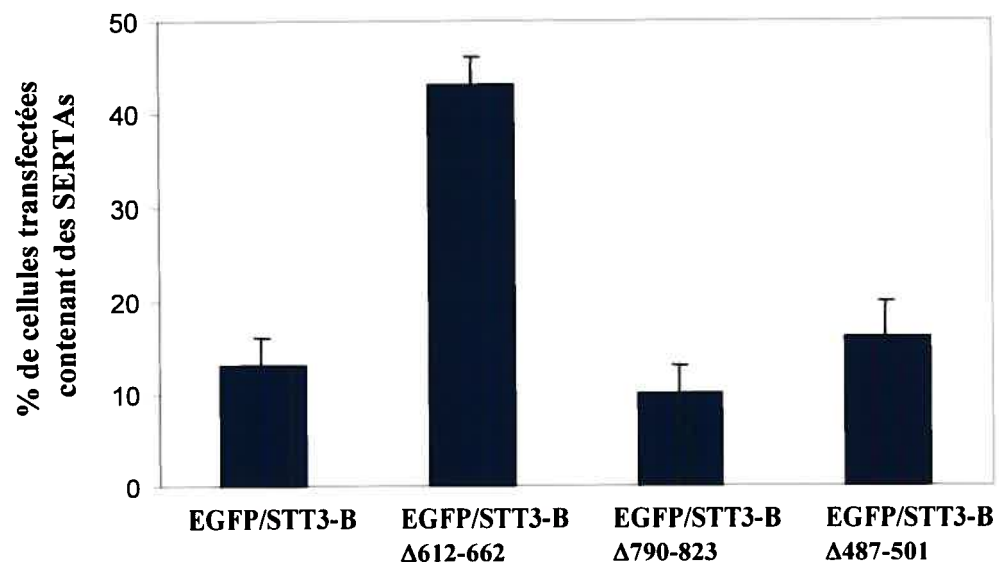
Figure 14. Délétion de la région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂

A) Évaluation de la quantité de protéine EGFP/STT3B-SIINFEKL et de EGFP/STT3-B_{Δ612-662}-SIINFEKL dans les cellules COS7-K^b. 48h suivant la transfection des cellules, la quantification de l'intensité moyenne de fluorescence provenant de chacune des protéines respectives a été évaluée par cytométrie en flux. L'augmentation de l'intensité de la fluorescence obtenue pour EGFP/STT3-B_{Δ612-662} est statistiquement significative ($p < 0,05$). Ce résultat correspond à une expérience en triplicata représentative de deux expériences indépendantes. Des résultats comparables ont été obtenus dans les cellules HEK293 (deux expériences indépendantes en triplicata).

B) Quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL. 48h suivant la surexpression des deux protéines sources du peptide SIINFEKL, les cellules COS7-K^b ont été marquées avec l'anticorps 25-D1.16 et analysées par cytométrie en flux. La différence observée entre la protéine native et la protéine mutante est statistiquement significative ($p < 0,005$). Ce résultat correspond à une expérience en triplicata représentative de deux expériences indépendantes.

C) Visualisation des SERTAs formés à partir de EGFP/STT3B et EGFP/STT3-B_{Δ612-660}. 48h suivant la transfection des cellules HEK293.

D) Quantification de la formation des SERTAs par différents mutants de STT3-B. 48h suivant la transfection des cellules HEK293, la proportion de cellules contenant des SERTAs a été évaluée. Pour chacune des constructions, les décomptes ont été effectués à partir de six champs microscopiques pour une moyenne de 100 cellules par champ. Seule la protéine mutante pour la région STT3-B_{Δ612-662} a pour conséquence de provoquer une hausse significative de la proportion de cellules contenant des SERTAs ($p < 0,0001$). Ce résultat correspond à une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

A**B****C****D**

a donc été retirée de EGFP/STT3-B afin de vérifier si sa présence est nécessaire à la dégradation optimale de la protéine. Le peptide SIINFEKL a également inséré dans la construction EGFP/STT3B Δ 612-662, par le remplacement du peptide H7^a (STT3-B₇₇₀₋₇₇₈), afin d'évaluer directement l'efficacité de dégradation de ce mutant par le protéasome. Nos résultats démontrent dans un premier temps que la protéine mutante EGFP/STT3B Δ 612-660-SIINFEKL est présente en plus grande quantité à l'intérieur des cellules COS7-K^b comparativement à EGFP/STT3B-SIINFEKL avec une MFI de 425 et de 362, respectivement (Fig. 14A). De plus, suite à la quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL à la surface, nos résultats démontrent que moins de peptides sont générés par EGFP/STT3B Δ 612-660-SIINFEKL par rapport à EGFP/STT3B-SIINFEKL (Fig. 14B). Conjointement, ces résultats suggèrent fortement que la région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ facilite la dégradation de STT3-B et sa contribution à l'immunopeptome.

Certains des résultats précédents démontrent qu'une diminution du niveau de dégradation de EGFP/STT3-B en présence d'inhibiteur du protéasome provoque une augmentation de la formation de SERTAs (Fig. 11B). Puisque la délétion de la région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ semble influencer la dégradation de EGFP/STT3-B, nous avons déterminé l'effet de cette délétion sur la formation des SERTAs. Notre hypothèse était que la délétion de la région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ provoquerait une induction de la formation des SERTAs. Pour tester cette hypothèse, nous avons quantifié la proportion de cellules transfectées contenant des SERTAs, et ce en comparant la protéine native EGFP/STT3-B, la protéine EGFP/STT3-B Δ 612-660 et deux autres protéines mutantes à titre indicatif, soient EGFP/STT3-B Δ 487-501 et EGFP/STT3-B Δ 790-823. La séquence STT3-B₄₈₇₋₅₀₁ correspond au signal PEST et la séquence STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ correspond à la région riche en lysine (Fig. 6B), deux régions hypothétiquement impliquées dans la dégradation de STT3-B. Nos résultats montrent que seule la délétion de la région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ possède un effet inducteur sur la formation des SERTAs dont elle augmente le nombre de trois fois (Fig. 14C,D). Ces résultats suggèrent fortement que la rétrotranslocation de la protéine mutante EGFP/STT3-B Δ 612-660 est moins efficace que celle de la protéine native parce qu'on observe 1) une

dégradation moins efficace de la protéine EGFP/STT3-B_{Δ612-660} et 2) une induction de la formation de SERTAs suivant sa surexpression.

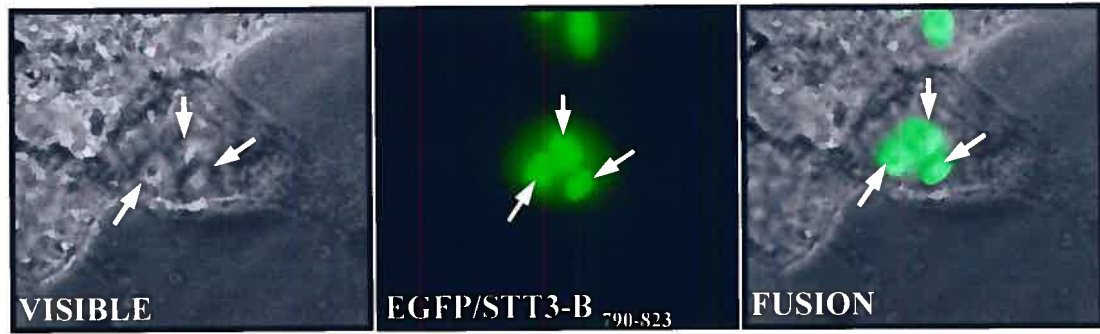
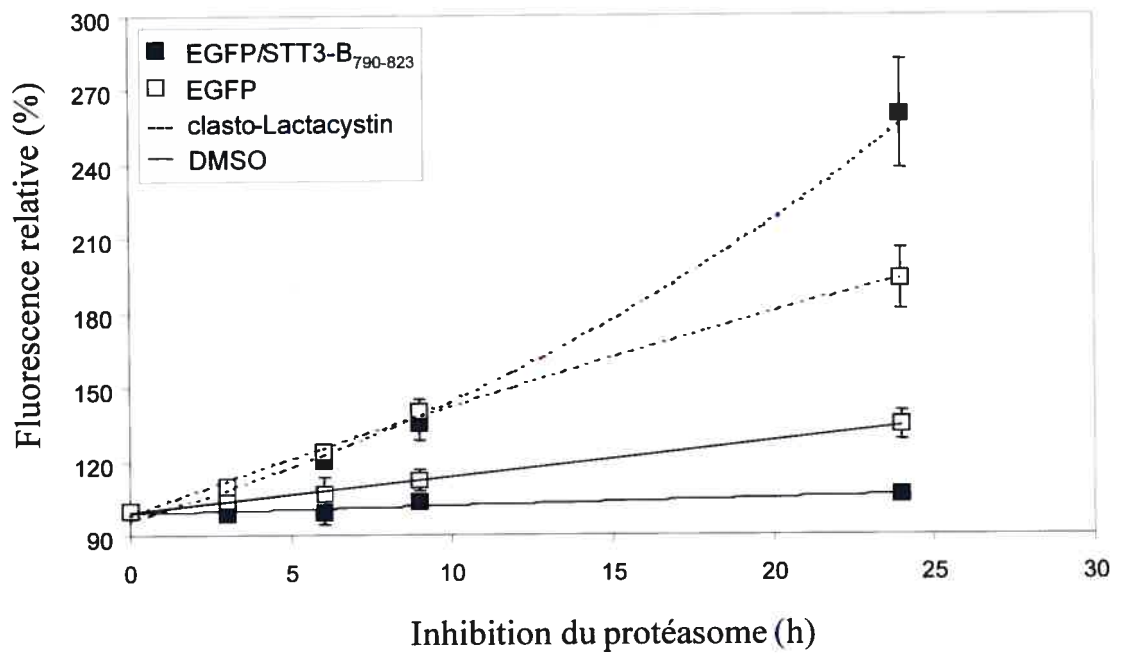
6.2 Influence de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ sur la dégradation par le protéasome

Tel que mentionné précédemment, STT3-B se distingue en partie de STT3-A par la présence à son extrémité C-terminale d'un signal de localisation nucléaire bipartite situé à l'intérieur d'une région riche en lysine. Puisque la lysine correspond à l'acide aminé ciblé pour la liaison d'ubiquitines, la présence d'une telle région en C-terminal pourrait représenter un signal de dégradation pour le protéasome. La région riche en lysine STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ pourrait de ce fait expliquer la forte contribution de STT3-B pour la formation de l'immunopeptome. Nos résultats montrent que la fusion de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ provoque des changements surprenants sur la localisation et la régulation de EGFP par le protéasome. Cette protéine chimérique est de ce fait localisée entièrement à l'intérieur du noyau, davantage au niveau des nucléoles (Fig. 15A). Ceci démontre que la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ est suffisante pour transloquer à l'intérieur des nucléoles une protéine initialement cytoplasmique. La région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ représente donc un signal de localisation nucléolaire fonctionnel. Désirant également évaluer l'influence de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ sur la stabilité de la EGFP, nous avons effectué une cinétique d'intensité moyenne de la fluorescence entre EGFP et EGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃, et ce en absence ou en présence d'inhibiteur de protéasome (Fig. 15B). Nos résultats démontrent que 24 heures suivant l'incubation des cellules avec l'inhibiteur du protéasome, la fluorescence émise par EGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ est 2,5 fois plus élevée qu'en absence d'inhibiteur, soit par une fluorescence relative de 260% et de 106%, respectivement. À titre comparatif, la fluorescence émise par EGFP est 1,4 fois plus élevée sous ces mêmes conditions, soit par une fluorescence relative de 194% et de 134% en présence ou en absence d'inhibiteur, respectivement. L'effet plus prononcé de l'inhibiteur du protéasome sur EGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ démontre une régulation plus prononcée de cette

Figure 15. Influence de la région riche en lysine STT3-B₇₉₀₋₈₂₃

A) Visualisation de la translocation nucléaire de EGFP par la fusion de la région riche en lysine de STT3-B (EGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃). La EGFP est davantage localisée dans les nucléoles du noyau (flèches blanches).

B) Cinétique d'accumulation de la fluorescence. 24h suivant la surexpression de EGFP ou de EGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃, les cellules HEK293 ont été incubées en absence (DMSO) ou en présence de clasto-Lactacystin pour une durée de 24h. Pour chacune des deux protéines, la fluorescence relative a été calculée en divisant l'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) à un temps fixe par la MFI de la protéine au temps zéro. (n = 4 pour chacun des points sur le graphique). Le ratio (clasto-Lactacystin / DMSO) de la fluorescence relative à 24h pour EGFP est plus faible (p < 0,01) que celui de EGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃.

A**B**

protéine chimérique par le protéasome, laissant suggérer que cette région riche en lysine pourrait influencer la régulation d'une protéine par le protéasome. Il reste toutefois à déterminer si la régulation plus efficace de EGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ par le protéasome est une conséquence du changement de localisation ou de nouvelles interactions protéiques. Néanmoins, ces résultats suggèrent que la séquence STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ représente une région candidate pouvant influencer la contribution de STT3-B à la formation de l'immunopeptome.

7. STT3-A et STT3-B, deux protéines modèles pour augmenter la contribution de l'ovalbumine à la formation de l'immunopeptome

7.1 Les régions STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ sont suffisantes pour augmenter l'immunogénéicité de l'ovalbumine

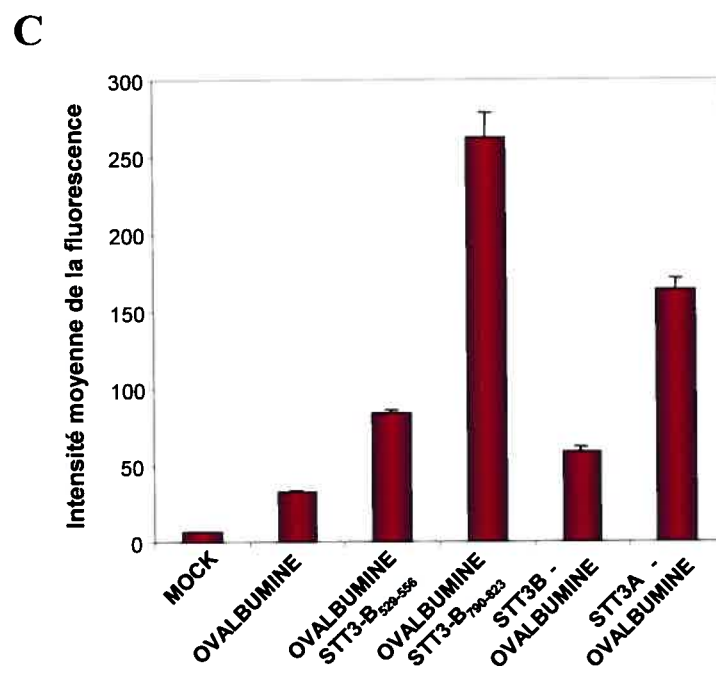
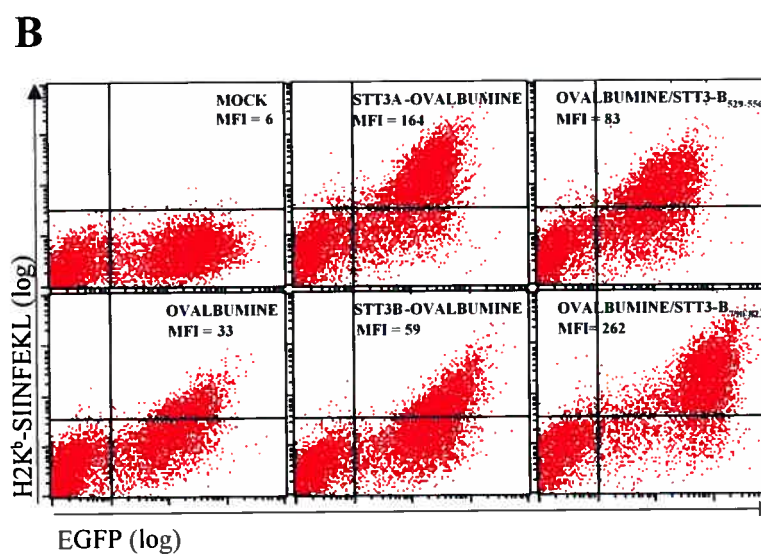
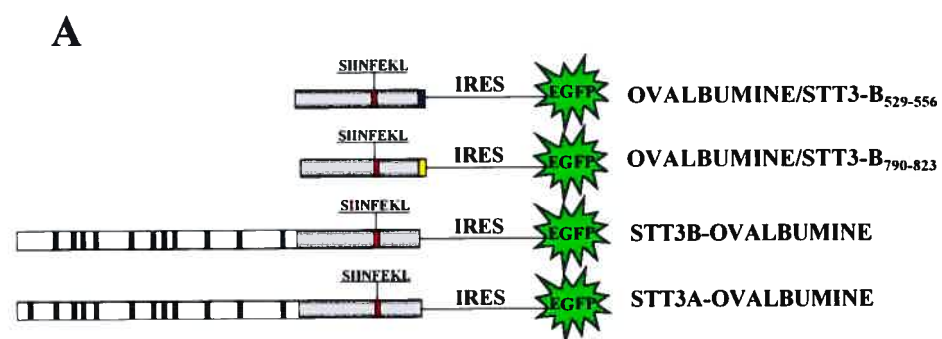
Nos résultats présentés à la figure 12 et 13 suggèrent que la dernière région transmembranaire STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ peut être suffisante pour augmenter la contribution d'une protéine à la génération de peptides. Par son niveau d'hydrophobicité élevé, généralement associé à la formation de DRiPs, et son effet inducteur de SERTAs, cette région pourrait influencer le potentiel "SERTA-forming" d'une autre protéine lui étant fusionnée. En d'autres mots, la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ pourrait augmenter la susceptibilité d'une protéine à devenir une meilleure source de DRiPs et ainsi contribuer davantage à la formation de l'immunopeptome. Représentant un signal d'ancrage, la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ pourrait également provoquer une rétention aberrante de la protéine dans la membrane du R.E. et augmenter sa propension à générer des DRiPs. Afin d'évaluer la capacité de cette région à influencer la quantité de peptides présentés dérivant d'une protéine source, nous l'avons dans un premier temps fusionnée en C-terminal de l'ovalbumine, créant ainsi

Figure 16. Quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL dérivant de différentes protéines sources

A) Schématisation des différentes constructions utilisées pour la synthèse des protéines sources du peptide SIINFEKL. Ce schéma met en évidence les régions transmembranaires (régions noires), la région riche en lysine (jaune) et le peptide SIINFEKL (rouge). L'ovalbumine native et le contrôle MOCK sont schématisés à la Fig. 8A.

B) Analyse de la présentation du complexe H2-K^b/SIINFEKL par cytométrie en flux. 48h suivant la transfection par l'utilisation des différentes constructions, les cellules COS7-K^b ont été marquées par l'anticorps 25-D1.16. et analysées en cytométrie en flux. La MFI indiquée représente l'intensité moyenne de la fluorescence obtenue par le marquage de l'anticorps 25-D1.16 pour la population de cellules exprimant la EGFP.

C) Schématisation graphique de la quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL. Ces résultats correspondent à une expérience en triplicata représentative de trois expériences indépendantes pour les données de MOCK, ovalbumine, STT3B-OVALBUMINE et de deux expériences indépendantes pour OVALBUMINE/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, OVALBUMINE/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ et STT3A-OVALBUMINE. Les valeurs d'intensité moyenne de la fluorescence des différentes protéines chimériques sont toutes statistiquement plus élevées celles de l'ovalbumine.



OVALBUMINE/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆. Par la suite, en comparaison avec l'ovalbumine native, nous avons procédé à la quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL présentés à la surfaces des cellules COS7-K^b. Nos résultats démontrent que l'ajout de la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ à l'ovalbumine a comme effet d'augmenter de 2,5 fois la quantité de peptides SIINFEKL à la surface (Fig. 16). Ce résultat démontre que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ est suffisante pour augmenter l'immunogénicité de l'ovalbumine. La cause exacte de cette augmentation de peptides reste toutefois à être déterminée.

De façon étonnante, nous avons démontré que la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ influençait la régulation de la EGFP par le protéasome et représentait un signal fonctionnel de localisation nucléolaire. Bien que nous n'ayons aucune évidence supportant la localisation nucléaire de STT3-B par l'utilisation exogène de son cDNA, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une telle translocation nucléaire au niveau endogène. Nos résultats suggèrent que STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ peut représenter une région candidate pouvant influencer la contribution de STT3-B à la formation de l'immunopeptome. En créant la protéine chimérique OVALBUMINE/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃, nous avons évalué l'influence de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ sur la génération du peptide SIINFEKL provenant de l'ovalbumine. De façon impressionnante, nos résultats démontrent que l'ajout de ces quelques acides aminés en C-terminal de l'ovalbumine provoque une présentation des complexes H2-K^b/SIINFEKL 8 fois plus élevée que la protéine native, soit par une MFI de 262 et de 33, respectivement (Fig. 16). Ceci démontre que la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ est suffisante pour augmenter l'immunogénicité de l'ovalbumine. Ce résultat pourrait suggérer que la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ contribue en partie à la performance de STT3-B dans la génération de peptides associés aux molécules du CMH I.

7.2 Les multiples domaines transmembranaires de STT3-A et STT3-B sont suffisants pour augmenter la contribution de l'ovalbumine à la génération de l'immunopeptome

STT3-B possède de façon exemplaire les caractéristiques d'une protéine hautement propice à être source de DRiPs, entre autres par son poids moléculaire élevé et la présence de plusieurs régions transmembranaires, lesquelles contribuent à son haut niveau d'hydrophobicité. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la fusion des domaines transmembranaires de STT3-B (STT3-B₁₋₅₇₅) en N-terminal de l'ovalbumine pourrait augmenter la susceptibilité de celle-ci à devenir une protéine source de DRiPs, résultant ainsi en une hausse de la présentation du peptide SIINFEKL. Afin d'évaluer cette hypothèse, le domaine hydrophile en C-terminal de STT3-B a été remplacé par le cDNA de l'ovalbumine (voir Matériel et Méthodes), créant ainsi STT3B-OVALBUMINE, une protéine hautement hydrophobe de 101 kDa (Fig. 16A). La quantification des complexes H2-K^b/SIINFEKL révèle que la protéine chimérique STT3B-OVALBUMINE génère 1,7 fois plus de peptides comparativement à l'ovalbumine native. Il faut cependant considérer que l'efficacité d'expression peu efficace de STT3-B par rapport à l'ovalbumine (Fig. 8D) peut atténuer la quantité de peptides produits. Puisque STT3-A possède les mêmes propriétés biochimiques que STT3-B, mais qu'elle est exprimée 7 fois plus efficacement (Fig. 9B), nous avons émis l'hypothèse que la protéine chimérique STT3A-OVALBUMINE (voir Matériel et Méthodes) serait plus performante comme protéine source du peptide SIINFEKL. De façon intéressante, nos résultats démontrent que ce peptide est présenté en 5 fois plus grande quantité lorsqu'il dérive de la protéine STT3A-OVALBUMINE que lorsqu'il dérive de l'ovalbumine (Fig. 16). À notre connaissance, et pour des raisons qui devront être investiguées davantage, STT3-A et STT3-B représentent deux paralogues dont la capacité à augmenter l'immunogénicité de l'ovalbumine n'a jusqu'à maintenant pas été surpassée.

DISCUSSION

STT3-B est une protéine dont la capacité à générer des peptides antigéniques est supérieure à la moyenne. Trois évidences nous permettent d'appuyer cette forte contribution à la formation du répertoire peptidique : 1) le peptide H7^a provenant de STT3-B est présenté à la surface cellulaire entre 1000 et 100 000 copies par cellule alors que la majorité des peptides sont présentés entre 1 et 100 copies par cellule, 2) trois peptides différents dérivant de la protéine STT3-B ont jusqu'à maintenant été identifiés et 3) nous avons démontré que le peptide SIINFEKL était présenté 5 fois plus efficacement lorsqu'il provenait de la séquence de STT3-B que lorsqu'il provenait de la protéine mère, l'ovalbumine (Fig. 8). Pourquoi STT3-B semble-t-il contribuer davantage à l'immunopeptome? Nos résultats suggèrent que trois paramètres peuvent expliquer que STT3-B génère beaucoup de peptides présentés par les molécules du CMH I : 1) la localisation intracellulaire de STT3-B, 2) sa propension à générer des DRiPs et 3) l'effet spécifique de certains domaines sur la rétrotranslocation et la dégradation de STT3-B.

1. La localisation intracellulaire de STT3-B

À quel point de vue la localisation intracellulaire d'une protéine pourrait-elle influencer sa capacité à devenir un meilleur substrat précurseur de peptides antigéniques? À prime abord, il serait logique de croire qu'une localisation cytoplasmique ou nucléaire permettrait à une protéine d'accéder plus rapidement au protéasome, augmentant ainsi sa contribution à l'immunopeptome. Par une approche bioanalytique, Hickman et al. (2004) ont démontré que la capacité d'une protéine à générer des peptides associés aux molécules du CMH I ne semble en rien être influencée par sa localisation intracellulaire. La localisation intracellulaire de STT3-B

au niveau du R.E. serait donc un critère à exclure. Toutefois, par son intégration dans le complexe OST, STT3-B correspond à une protéine localisée plus précisément au niveau du translocon. Ce dernier, impliqué dans la rétrotranslocation des protéines (Tsai et al., 2002), soulève un aspect important : est-ce que les protéines situées à proximité du translocon Sec61 pourraient être plus rapidement disloquées de la membrane du R.E., devenant ainsi plus rapidement accessibles pour le protéasome? L'étude de la protéine Apoprotein B100 apporte des évidences intéressantes à ce sujet. Bien que cette protéine soit destinée à être sécrétée, celle-ci peut être maintenue à l'intérieur de la membrane du R.E., intimement associé aux protéines du translocon, soit Sec61 α/β (Mitchell et al., 1998) et TRAM (Hegde et al., 1998). De ce fait, cette proximité du translocon permet l'entrée plus rapide de ApoB100 dans la voie de dégradation protéasome-ubiquitine (Pariyarath et al., 2001). Puisque STT3-B représente une protéine intégrée à proximité du translocon, nous ne pouvons exclure la possibilité que cette propriété puisse favoriser le retrait plus rapide de STT3-B de la membrane du R.E. vers le cytoplasme. D'autre part, certaines protéines localisées au niveau du translocon telles que Sec61p et Ribophorin I ont déjà été utilisées comme modèles pour étudier les mécanismes du ERAD (Biederer et al., 1995; de Virgilio et al., 1999). Cependant, aucune investigation n'a permis de mettre en évidence l'importance de la localisation de ces protéines sur l'efficacité de leur dégradation.

2. STT3-B: une protéine source de DRiPs

2.1 Les caractéristiques intrinsèques de STT3-B

Il est maintenant bien accepté que les DRiPs représentent une source préférentielle de peptides associés aux molécules du CMH I, du moins pour les protéines virales (Yewdell et al., 2003). Pour quelles raisons STT3-B serait une protéine propice à être source de DRiPs? Est-il possible de prédire la susceptibilité de

STT3-B à générer des DRiPs? Bien qu'il n'existe aucun logiciel bioinformatique pouvant prédire le potentiel d'une protéine à être source de DRiPs, il a tout de même été proposé que les propriétés biochimiques intrinsèques d'une protéine pouvaient du moins en représenter une bonne indication (Yewdell et al., 2001). Intrinsèquement, STT3-B représente un modèle parfait de protéine fortement propice à générer des DRiPs : un poids moléculaire élevé, de multiples régions transmembranaires, des domaines protéiques de part et d'autre de la membrane du R.E., des interactions protéine-protéine complexes à l'intérieur de l'OST et la présence de sites de N-glycosylation, lesquels jouent un rôle primordial dans le repliement adéquat de la protéine. Considérant l'ensemble de ces caractéristiques, STT3-B représente une protéine "error-prone", soit par des erreurs potentielles de synthèse au niveau de la traduction, une translocation membranaire inadéquate, un repliement inefficace de ses multiples domaines protéiques, des imperfections entre les interactions protéine-protéine, etc. La combinaison de ces critères a sans doute un effet additif considérable sur la quantité de DRiPs contenant STT3-B. À titre d'exemple, CFTR et ApoB100 représentent deux protéines dont les propriétés biochimiques se comparent à celles de STT3-B, soit par un poids moléculaire élevé, la présence de multiples régions transmembranaires, un fort niveau d'hydrophobicité et leur intégration co-traductionnelle dans la membrane du R.E.. CFTR et ApoB100 représentent deux protéines polytopiques dont les propriétés "error-prone" sont très élevées. En effet, 80% des protéines CFTR et de ApoB100 n'atteignent jamais leur conformation native, et sont de ce fait rapidement acheminées vers le protéasome pour y être dégradées (Kopito, 1999; Dixon et al., 1991). CFTR et ApoB100 peuvent ainsi être définies comme des protéines sources de DRiPs. Ces deux protéines polytopiques subissent d'ailleurs le processus de polyubiquitination de manière co-traductionnelle lorsque leur translocation dans la membrane du R.E. est inadéquatement effectuée durant leur synthèse (Sato et al., 1998; Liang et al., 2000). Il a d'ailleurs été démontré que l'ubiquitination co-traductionnelle de protéines augmentait leur contribution à la formation de l'immunopeptome (Princiotta et al., 2003).

STT3-B représente de plus, tout comme CFTR, une protéine fortement propice à s'agréger, du moins en milieu aqueux (Fig. 9; Johnson et al., 1998). L'insolubilité et l'agrégation de cette protéine, fort probablement provoquées par de fortes interactions entre les domaines hydrophobes, correspond d'ailleurs aux caractéristiques biochimiques des DRiPs (Schubert et al., 2000). De telles protéines propices à s'agréger *in vivo* peuvent d'ailleurs avoir des effets considérablement néfastes pour la cellule (Bucciantini et al., 2002), nécessitant ainsi une dégradation rapide et efficace par le protéasome. Le potentiel d'une protéine à s'agréger pourrait de ce fait influencer la proportion de DRiPs générés. Ayant émis l'hypothèse que la grande portion hydrophobe de STT3-A/B pouvait en partie être responsable de leur susceptibilité à générer des DRiPs, nous avons mis en évidence que la fusion des régions transmembranaires de STT3-A/B à l'ovalbumine (STT3A-OVALBUMINE, STT3B-OVALBUMINE) était suffisante pour augmenter la performance de l'ovalbumine à la génération du peptide SIINFEKL (Fig. 16). Au sens strict, ceci nous permet de trancher entre deux hypothèses sur la forte présentation de peptides provenant de STT3-B. Hypothèse #1 : STT3-B peut générer beaucoup de peptides parce que cette protéine est avantagée au niveau de sa dégradation par le protéasome. Hypothèse #2 : STT3-B peut générer beaucoup de peptides associés aux molécules du CMH I parce que ses peptides sont de haute affinité avec le CMH I. L'hypothèse #2 est à exclure puisque les résultats illustrés à la figure 16 ont été obtenus à partir du même peptide (SIINFEKL) associé au même CMH I (H2-K^b). L'ajout des régions transmembranaires de STT3A/B à l'ovalbumine permettrait ainsi de donner un avantage à l'ovalbumine au niveau de sa dégradation par le protéasome. La plus grande susceptibilité des protéines chimériques STT3A/B-OVALBUMINE à être dégradées par le protéasome pourrait s'expliquer par leur plus grande propension à la production de DRiPs. Ceci pourrait s'expliquer par un niveau d'hydrophobicité élevé, une capacité à s'agréger, une translocation membranaire inefficace, de multiples interactions protéine-protéine engendrées, etc. L'implication de chacun de ces facteurs devra donc être investiguée davantage afin de mieux comprendre quelles caractéristiques de ces protéines chimériques contribuent davantage à cette hausse de peptides présentés.

2.2 La formation des SERTAs

Les protéines entrant dans la lumière ou transloquées dans la membrane du R.E. sont sous l'influence d'un "contrôle de qualité", leur permettant d'acquiescer une conformation native (Ellgaard and Helenius, 2003). Les protéines incorrectement repliées, ou DRiPs, peuvent être retenues et même séquestrées à l'intérieur du R.E.. Les protéines ne pouvant être repliées adéquatement sont généralement rétrotransloquées via la voie du ERAD et dégradées par le protéasome (Tsai et al., 2002). À titre d'exemple, la protéine polytopique CFTR chez les eucaryotes, substrat du ERAD, est rétrotransloquée dans le cytoplasme via le canal Sec61 pour ensuite être dégradée par le protéasome (Bebok et al., 1998). Puisqu'elle représente une protéine fortement propice à l'agrégation en milieu aqueux, sa présence dans le cytoplasme engendre la formation d'un amas protéique se localisant au MTOC de la cellule, structure nommée agrésome (Johnston et al., 1998). Bien que STT3-B soit susceptible de s'agréger en milieu aqueux et qu'elle représente un substrat du ERAD, la surexpression de STT3-B engendre la formation de SERTAs, une structure morphologiquement bien distincte de l'agrésome (Fig. 10). Parmi les exemples de structures "SERTAs-like", on retrouve des structures contenant 1) des protéines agrégées (Umebayashi et al., 1997), une prolifération du ERGIC ("ER-Golgi intermediate compartment") ou VTC ("Vesicular-Tubular Clusters") (Rapooso et al., 1995), 2) un sous-domaine du R.E. contenant certaines chaperones résidentes du R.E. (Kamhi-Nesher et al., 2001; Nishikawa et al., 2001; Zhang et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Fu and Sztul, 2003; Snapp et al., 2003; Huyer et al., 2004), et 3) des membranes compactées (Wright et al., 1988; Elgersma et al., 1997; Zimmer et al., 1997; Becker et al., 1999; Snapp et al., 2003; Okiyoneda et al., 2004). Des travaux en cours dans le laboratoire suggèrent que les SERTAs correspondent à l'amplification d'un sous-domaine du R.E. nommé "Quality control compartment" (Kamhi-Nesher et al., 2001; Frenkel et al., 2004). Malgré l'observation de ce type de structure depuis un certain temps, les évidences ne sont pas encore assez concluantes pour élucider la cause et la fonction exacte de ces structures. Le modèle actuel propose que la

génération de ce sous-compartiment du R.E. soit la conséquence du mauvais repliement des protéines (Huyer et al., 2004), soit de la génération de DRiPs.

Pour quelles raisons certains DRiPs polytopiques, tels que provenant de STT3-B, provoqueraient la formation de SERTAs alors que d'autres n'en auraient pas la capacité? Outre les interactions homotypiques entre les domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires (Snapp et al., 2003), l'étude des protéines EGFP/STT3-B et EGFP/STT3-B_{Δ529-556} nous permet de proposer que l'induction de la génération des SERTAs dépend en partie de l'efficacité de rétrotranslocation d'une protéine. Les résultats obtenus suggèrent que la formation des SERTAs par EGFP/STT3-B est dépendante d'une rétention prolongée et d'une vitesse de rétrotranslocation réduite ou insuffisante (Fig. 13; Tableau 1). À ce point de vue, il redevient intéressant de comparer STT3-B aux deux autres protéines polytopiques CFTR et ApoB100. Chez les mammifères, la rétrotranslocation de CFTR ne semble pas être un facteur limitant pour sa dégradation puisque sa forme rétrotransloquée est retrouvée sous forme agrégée au niveau du MTOC. Effectuée en majeure partie de manière "post-rétrotranslocationnelle", la dégradation de CFTR serait limitée par l'activité du protéasome (Bence et al., 2001). Par ailleurs, il a été constaté qu'une rétention prolongée de CFTR au niveau du R.E., par la surexpression de la calnexine, induit une prolifération de membranes du R.E. lisse (Okiyoneda et al., 2004). Ceci supporte ainsi l'idée que la rétrotranslocation moins rapide de DRiPs polytopiques serait en grande partie responsable de la formation de structures "SERTAs-like". Suivant l'expression de CFTR chez la levure, la formation de structures "SERTAs-like" laisse également croire que cette espèce posséderait des mécanismes de rétrotranslocation moins adéquats, probablement moins évolués, pour exercer une dislocation efficace de CFTR à l'extérieur du R.E. (Zhang et al., 2001; Fu et Sztul, 2003).

D'autre part, il a été observé que la protéine ApoB100, lorsque maintenue au niveau du translocon Sec61, s'accumulait de façon juxtanucléaire et en co-localisation avec certaines chaperones résidentes du R.E. (Pariyarath et al., 2001).

Bien qu'aucune investigation n'ait été effectuée sur la formation de la structure morphologique induite par ApoB100, il ne serait pas étonnant d'y constater la présence de structures "SERTAs-like". Dans ce cas, tout comme dans celui de STT3-B, la rétrotranslocation semble plutôt devenir le facteur limitant leur dégradation. Il a été proposé que la dégradation de la protéine ApoB100 s'effectuait durant sa rétrotranslocation (Mitchell et al., 1998), donc de manière co-rétrotranslocationnelle. Il en est d'ailleurs peut-être de même pour STT3-B puisqu'on ne détecte aucune forme rétrotransloquée de la protéine EGFP/STT3-B dans le cytoplasme en microscopie à fluorescence. L'absence de détection de STT3-B dans le cytoplasme pourrait donc s'expliquer 1) par une dégradation par le protéasome de manière co-rétrotranslocationnelle ou 2) par une dégradation très rapide par le protéasome de manière post-rétrotranslocationnelle. Advenant le premier cas, la dégradation co-rétrotranslocationnelle pourrait permettre de contrôler l'accès de STT3-B au protéasome, sans quoi l'activité du protéasome pourrait en être affectée tel que démontré lors de la formation d'un agrésome (Bence et al., 2001). Quoiqu'il en soit, deux types d'accumulation protéique peuvent survenir suivant l'entrée rapide de protéines incorrectement repliées dans le R.E. : la formation d'agrésomes et la formation de SERTAs. L'efficacité de rétrotranslocation de la protéine semble représenter l'élément déterminant dans la formation de l'une ou l'autre de ces structures.

Alors que la composition peptidique d'une protéine peut être responsable de son potentiel "Aggresome-forming" (Milewski et al., 2002), en quoi la composition biochimique d'une protéine pourrait-elle influencer son potentiel "SERTAs-forming"? À ce point de vue, nos résultats démontrent que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ est suffisante pour induire la formation de SERTAs lorsque fusionnée à EGFP (Fig. 12). De cette constatation, Snapp et al. (2003) ont démontré que la fusion à EGFP d'un signal d'ancrage dérivant d'une protéine transmembranaire résidente du R.E. pouvait être suffisante pour induire la prolifération de membranes du R.E.. Nos résultats démontrent d'ailleurs que la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ correspond à un signal d'ancrage de type II. Sur la base des observations de Snapp et al. (2003), l'orientation de EGFP

vers le cytoplasme et ses propriétés intrinsèques seraient responsables de la formation de structures "SERTAs-like" lorsque fusionnée à un signal d'ancrage. Ces observations suggèrent que le potentiel "SERTAs-forming" de STT3-B, une protéine polytopique résidente de R.E., pourrait être influencé par l'effet combiné de ses signaux d'ancrage et des propriétés intrinsèques de ses domaines cytoplasmiques. Il a d'ailleurs été discuté que les signaux d'ancrage pourraient être impliqués dans la rétrotranslocation des protéines en favorisant une association avec le translocon Sec61 (McCormick et al., 2003). Hypothétiquement, le signal d'ancrage STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ pourrait être responsable d'une interaction importante entre STT3-B et Sec61, permettant un contrôle plus adéquat de sa rétrotranslocation. D'autre part, nous avons démontré à la figure 13 que ce signal d'ancrage permettait la rétention complète de STT3-B à l'intérieur du R.E.. Considérant que STT3-B représente une protéine difficile à replier, une rétention prolongée au niveau du R.E., sous l'influence de ce signal d'ancrage, pourrait laisser aux chaperones un temps adéquat pour le repliement optimal de STT3-B. Ce signal d'ancrage pourrait donc jouer un rôle primordial dans le "contrôle de qualité" de STT3-B à l'intérieur du R.E..

Connaissant le potentiel d'agrégation de STT3-B et constatant la dislocation visiblement plus efficace de EGFP/STT3-B_{Δ529-556} du R.E. vers le cytoplasme, il n'aurait pas été étonnant de confirmer le potentiel "Aggresome-forming" de cette protéine. Étrangement, la morphologie des amas protéiques observés à l'extérieur du R.E. semble bien distincte de celle de l'agrésome. En effet, alors que l'agrésome correspond à un amas juxtanucléaire bien défini (Fig. 10), les amas observés suivant la surexpression de EGFP/STT3-B_{Δ529-556} sont retrouvés au pourtour du noyau sans localisation particulière. Pouvant représenter des amas cytoplasmiques libres ou en processus de fusion, il est également possible que ces amas protéiques soient distribués dans des mégavésicules sortant de la voie de sécrétion (Volchuk et al., 2000) ou à l'intérieur de vésicules autophagiques (Petiot et al., 2002), chacune d'elles étant formée suivant la production de protéines sujettes à s'agréger.

2.3 Les SERTAs et la machinerie du ERAD

En quoi les SERTAs pourraient-ils représenter un site spécialisé dans la rétrotranslocation des protéines? Nous avons mis en évidence que l'accumulation juxtanucléaire de STT3-B correspond à un réseau tubulo-vésiculaire de membranes du R.E. (Fig. 10). Considérant ce compartiment tubulaire à une accumulation de ERGIC (ou VTCs), Raposo et al. (1995) ont constaté l'association d'ubiquitines et de "ubiquitin-conjugating enzymes" à ce niveau, suggérant que ce compartiment pourrait être impliqué dans la dégradation des protéines. Morphologiquement comparable aux SERTAs, le "ERAC-like domain" chez la levure est un pré-requis à l'entrée de CFTR dans la voie de dégradation (Fu and Sztul, 2003). Le ERAC correspond à un sous-domaine du R.E. caractérisé par une prolifération des membranes du R.E. et la présence de certaines chaperones résidentes du R.E.. La formation du ERAC est d'ailleurs intimement associée à la voie du ERAD (Huyer et al., 2004) alors que la formation du "Quality control compartment" est sous l'influence de l'activité du protéasome (Kamhi-Nesher et al., 2001). Ces études semblent ainsi suggérer une association importante entre la formation des structures "SERTAs-like" et la dégradation des protéines. Par ailleurs, la protéine p97, lorsqu' associée à Ufd1 et Npl4, joue un rôle primordial dans la rétrotranslocation des protéines (Ye et al., 2001). Par ses propriétés multifonctionnelles (Woodman, 2003), l'étude de p97 suscite beaucoup d'intérêt dans plusieurs branches de la biologie cellulaire. Il a d'ailleurs été démontré que p97 était impliquée dans la biogénèse du R.E. de transition (Roy et al., 2000; Lavoie et al., 2000). Bien que l'identification membranaire exacte des SERTAs ne soient pas précisée, il est à prendre en considération que p97 pourrait représenter une protéine clé dans la formation et la fonction des SERTAs, tant au niveau de la rétrotranslocation des protéines qu'au niveau de l'assemblage du tER ("Transitional Endoplasmic Reticulum") (Paiement et Bergeron, 2001). La masse de membranes retrouvée au niveau des SERTAs se rapproche d'ailleurs du "anastomosing tubules of sER" et d'une portion du "rER parallel cisternae" (Fig. 10B), deux caractéristiques propres au tER (Palade, 1975). La caractérisation récente des SERTAs dans notre laboratoire par immunofluorescence

révèle d'ailleurs la présence de la protéine COPII, un marqueur du tER (Hammond et Glick, 2000), démontrant ainsi la présence de sites de sortie du R.E. au niveau des SERTAs. Alors que la molécule COPII est reconnue pour être impliquée dans la voie antérograde (Barlowe, 2002; Bonifacino et Lippincott-Schwartz, 2003), l'attribution récente de COPII dans la voie rétrograde (Fu et Sztul, 2003) appuie ainsi l'idée que les SERTAs pourraient représenter un compartiment membranaire spécialisé dans la dégradation de certains DRiPs polytopiques. Appuyant cette idée, les travaux en cours dans le laboratoire révèlent la présence de la protéine Sec61 au niveau des SERTAs, suggérant une implication du translocon dans ce sous-domaine du R.E.. De cette constatation, il est plausible de croire que la présence de Sec61 dans ce réseau tubulaire rendrait possible la rétrotranslocation des DRiPs s'y retrouvant.

La localisation juxtanucléaire des SERTAs ou de toute autre structure comparable représente également un aspect intrigant. Nos études ont démontré un effet important du nocodazole sur le regroupement juxtanucléaire de ces membranes (Fig. 11). Étant ainsi sous l'action des microtubules, ce sous-domaine du R.E. se localiserait au MTOC ou au centrosome, un site riche en protéasome (Wigley et al., 1999). La formation de SERTAs pourrait ainsi permettre à STT3-B d'être rétrotransloquée au niveau d'un site spécialisé dans la protéolyse des protéines, assurant de cette façon une régulation optimale du niveau de STT3-B dans la cellule. Il est de plus intéressant de noter que le protéasome s'associe préférentiellement au R.E. lisse, alors qu'on en retrouve très peu associé au R.E. rugueux (Palmer et al., 1996). Il serait donc particulièrement intéressant d'observer l'association du protéasome aux membranes lisses composant les SERTAs. L'isolation de ce sous-domaine (Hobman et al., 1998) combinée à la protéomique nous permettrait probablement d'en apprendre beaucoup plus sur les composantes de ce compartiment. Envisager une telle approche pourrait d'ailleurs rendre les comparaisons morpho-fonctionnelles beaucoup plus faciles entre les SERTAs et les exemples cités ci-bas. Le manque d'homogénéité au niveau de la nomenclature de ce sous-domaine du R.E. complique d'ailleurs davantage son étude. Plusieurs compartiments ayant des caractéristiques semblables ont reçu des appellations différentes : "Quality control

compartiment" (Kamhi-Nesher et al., 2001), "ERAC", "ERAC-like domain" (Huyer et al., 2004), "SEREC" (Hobman et al., 1998), "Expanded ERGIC" (Raposo et al., 1995), "OSER" (Snapp et al., 2003), "Karmellae" (Wright et al., 1988) et maintenant "SERTAs". La nature et la fonction précise de ces membranes devient un aspect important à éclaircir.

Bien qu'il est intéressant de croire que les SERTAs puissent représenter une restructuration morphologique spécialisée dans la machinerie du ERAD, il est cependant important d'apporter un bémol aux limites de sa capacité à gérer la rétrotranslocation et la dégradation des protéines s'y retrouvant. L'observation de ces structures à maintes reprises dans plusieurs lignées cellulaires, tant en microscopie à fluorescence qu'en ME, nous a permis de constater que les cellules eucaryotes semblent posséder des limites physiologiques à cette prolifération continue du R.E.. Des résultats préliminaires dans le laboratoire indiquent d'ailleurs que les cellules induisant la formation massive d'un SERTA seraient sujettes à l'apoptose. L'infrastructure intracellulaire de cellules dont la taille du SERTA est très élevée révèle d'ailleurs une ségrégation prononcée des nucléoles, laissant indiquer l'engagement d'une mort cellulaire (Miller et al., 2001). Ces observations suggèrent que les SERTAs possèderaient des limites à gérer le contenu protéique s'y retrouvant. Une entrée trop rapide et trop massive de DRiPs difficilement rétrotranslocables à l'intérieur de ce compartiment pourrait ainsi servir de signal d'alarme à la cellule, qui amorcerait les mécanismes d'apoptose par son incapacité à rétablir l'homéostasie du R.E.. Un contrôle inadéquat au niveau du UPR ou du EOR ("ER Overload Response") pourrait en grande partie être responsable de l'induction de cette apoptose (Szegezdi et al., 2003). Ceci nous amène donc à proposer que l'initiation de la formation des SERTAs par une accélération de la formation du tER via un mécanisme COPII-dépendant, puisse être la cause d'une rétrotranslocation performante. Suite à une prolifération exagérée du R.E., l'engagement de l'apoptose provoquerait l'interruption des mécanismes de rétrotranslocation et de dégradation. Dans ce même ordre d'idées, lorsque la surexpression de EGFP/STT3-B est insuffisante pour observer la présence de SERTAs, des résultats en microscopie

confocale (non-illustrés; travaux en cours) démontrent que la protéine EGFP/STT3-B ne co-localise que partiellement avec certains marqueurs du R.E.. Cette co-localisation partielle pourraient être causée par l'entrée de EGFP/STT3-B dans la voie de dégradation COPII-dépendante, laquelle exclurait certaines protéines résidentes du R.E.. Dans ce même ordre d'idée, une co-localisation partielle et totale avec le R.E. est d'ailleurs observée suivant la surexpression des protéines EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et GST/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, respectivement (Fig. 12). Contrairement aux capacités de EGFP/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆, GST/STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ n'induit sous aucune condition la formation de SERTAs. La surexpression de ces deux protéines résidentes du R.E. apporte ainsi une corrélation entre le potentiel "SERTAs-forming" d'une protéine et la co-localisation partielle avec le R.E..

2.4 Les SERTAs et la présentation d'antigènes

Le devenir des protéines retrouvées à l'intérieur des structures "SERTAs-like" semble variable et demeure mal compris. Alors que certaines protéines retrouvées dans ce réseau de tubules membranaires peuvent être expédiées dans la voie de sécrétion (Hobman et al., 1998; Kamhi-Nesher et al., 2001; Ferreira et al., 2002), d'autres terminent ultimement dans la voie du ERAD pour y être dégradées (Huyer et al., 2004; Fu and Sztul, 2003). Une étude démontre d'ailleurs que la protéine ApoB100, retrouvée dans une structure "SERTA-like", peut tout de même être sécrétée suivant la stimulation d'une synthèse en lipides (Pariyarath et al., 2001). Des études de FRAP appuient de plus le transport actif des protéines à l'intérieur de ces structures (Snapp et al., 2003). Les évidences actuelles suggèrent donc que les DRiPs accumulés dans ce compartiment seraient sous le contrôle de mécanismes associés à la voie antérograde et rétrograde. De cette constatation, une nouvelle question est soulevée: est-ce que l'induction de la formation des SERTAs pourrait être responsable d'une génération élevée et d'une présentation plus performante de peptides antigéniques? La susceptibilité de STT3-B à générer des DRiPs représente sans aucun doute une caractéristique importante pouvant expliquer sa meilleure

contribution à la formation de l'immunopeptome. Par ailleurs, représentant une "SERTAs-forming protein", sa performance à générer un haut niveau de peptides pourrait aller bien au-delà de cette simple susceptibilité à être une protéine source de DRiPs. Partant du fait que la surexpression de la protéine STT3-B engendre la formation de SERTAs et que cette protéine représente une source impressionnante de peptides, serait-il possible que les mécanismes de la présentation d'antigènes soient davantage sollicités à l'intérieur de ce compartiment du R.E.? La spécialisation des SERTAs dans la machinerie du ERAD aurait sans aucun doute un effet majeur sur la quantité de peptides libérés dans l'environnement de ce compartiment. Cette abondance de membranes permet-elle ainsi aux peptides cytoplasmiques d'être réincorporés plus rapidement dans la lumière du R.E.? Les protéines TAP1/TAP2, nécessaire pour l'entrée des peptides dans la lumière du R.E., sont-elles présentes au niveau des SERTAs? L'association entre les molécules du CMH I et les peptides est-elle encore possible ou même accélérée? Ces questions encore sans réponse devront être investiguées afin de mieux comprendre les conséquences d'une telle modification du R.E. sur le "processing" des peptides. D'autre part, la formation des SERTAs pourrait bien jouer un rôle dans l'induction d'une réponse inflammatoire. En effet, une synthèse constante de "SERTAs-forming proteins" est sans aucun doute responsable d'un stress cellulaire important, lequel pourrait d'ailleurs être communiqué au système immunitaire (Gleimer et Parham, 2003). Il a de plus été démontré qu'une prolifération du R.E. et que l'induction d'un EOR avait comme effet d'augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires via l'activation du facteur de transcription NF κ B (Lawless et al., 2004), un phénomène bien reconnu dans l'induction d'une réponse immunitaire innée. Une étude basée sur l'analyse de puces d'ADN (Szezesna-Skorupa et al., 2004) révèle d'ailleurs que la prolifération de membranes du R.E. provoquerait une hausse marquée du transcrit de l'IL-8 et de CCL20, deux molécules impliquées dans la réponse pro-inflammatoire (Atta-ur-Rahman et al., 1999) et dans la chémotaxie des cellules dendritiques (Furumoto et al., 2004), respectivement. La formation des SERTAs pourrait donc avoir des conséquences considérables tant au niveau de la présentation de peptides qu'au

niveau d'une réponse inflammatoire, activant ainsi le système immunitaire adaptatif et inné, respectivement.

En imaginant que la formation des SERTAs pourrait être responsable de l'efficacité de présentation d'une protéine source de peptides, il devient intéressant d'observer de quelle façon les cellules présentatrices d'antigènes, spécialisées dans la présentation des peptides (Mellman and Steinman, 2001), peuvent modifier leur organisation morphologique. Les macrophages ou les cellules dendritiques auraient-elles la capacité d'induire la formation d'un tel compartiment du R.E. durant leur stade de maturation? Les cellules dendritiques ont l'étrange capacité d'induire la formation de DALIS ("Dendritic cell Aggresome-Like Induced Structures") (Lelouard et al., 2002). Les DALIS correspondent à une accumulation de DRiPs, soit de protéines nouvellement synthétisées incorrectement repliées et ubiquitinées. La formation de cette structure permettrait à la cellule dendritique de réguler de manière très rigoureuse la dégradation des protéines s'y retrouvant (Lelouard et al., 2004). L'implication et l'importance exacte des DALIS au niveau de la fonction de la cellule dendritique n'ont cependant pas encore été élucidées, mais elles pourraient jouer un rôle au niveau du "timing" de la présentation des peptides. Il serait intéressant de mieux comprendre les changements morphologiques engendrés durant la formation des DALIS, c'est-à-dire de déterminer si les DALIS correspondent à des structures "SERTAs-like". Il serait cependant surprenant de constater que les DALIS représentent une accumulation de membrane du R.E. puisque le regroupement de ces protéines ubiquitinées ne dépend pas des microtubules et n'est pas localisé au niveau du centrosome (Lelouard et al., 2002). Par ailleurs, l'infection de cellules dendritiques par le virus de dengue a comme répercussion d'induire une prolifération et une hypertrophie massive du R.E. (Ho et al., 2001), une structure aux caractéristiques de celles du SERTA. Bien qu'aucun lien n'ait été fait entre la formation de cette structure "SERTA-like" et la présentation d'antigènes, cette observation surprenante pourrait supporter notre idée selon laquelle la formation de SERTAs permettrait à la cellule dendritique de présenter des peptides plus efficacement durant son processus de maturation.

3. Régions impliquées dans la localisation, la stabilité et la contribution à l'immunopeptome

3.1 La région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂

Cette région suscite un intérêt particulier par la présence des quatre sites de N-glycosylation de STT3-B et la présence d'une séquence peptidique hydrophobe. D'abord, une perte des sites de N-glycosylation a des conséquences considérables au niveau de l'efficacité de repliement de la glycoprotéine (Helenius and Aebi, 2004). La corrélation entre l'absence des sites de N-glycosylation dans la protéine EGFP/STT3-B_{Δ612-662} et l'augmentation de la proportion de cellules contenant des SERTAs (Fig. 14) laisse suggérer une relation entre l'inefficacité de repliement de STT3-B et la formation des SERTAs. Le modèle actuel propose d'ailleurs que les structures "SERTAs-like" sont formées suite à la synthèse de protéines incorrectement repliées (Huyer et al., 2004). Il est donc possible que les molécules de STT3-B incorrectement repliées, c'est-à-dire les DRiPs de STT3-B, soient retrouvées en proportion plus élevée à l'intérieur des SERTAs. STT3-B pourrait représenter une source de DRiPs parce que 1) elle est sujette à s'agréger et 2) elle induit la formation de SERTAs.

L'absence des sites de N-glycosylation a également des conséquences au niveau de l'efficacité de dégradation d'une glycoprotéine (Helenius and Aebi, 2004). Nous avons démontré que la région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ est nécessaire à la dégradation efficace de EGFP/STT3-B, et par le fait même à une efficacité de présentation peptidique optimale. EDEM est considérée comme étant la protéine responsable des étapes précoces du ERAD par son association au résidu Man₈GlcNac₂ de la "glyco-DRiP". Fait intéressant, un mutant de Stt3p a été identifié comme étant un substrat de Htm1p, l'homologue de EDEM chez la levure (Jakob et al., 2001). L'absence d'interaction entre EDEM et la protéine mutante EGFP/STT3-B_{Δ612-662} pourrait ainsi expliquer cette diminution d'efficacité de dégradation. D'autre part, il a été démontré

que les N-glycans peuvent être reconnus par une "E3 Ubiquitin ligase", étape qui pourrait être nécessaire à la dégradation de certaines glycoprotéines (Yoshida et al., 2002). Le défaut de dégradation observé pour EGFP/STT3-B_{Δ612-662} pourrait ainsi se jouer au niveau de la rétrotranslocation via EDEM et/ou directement au niveau de sa dégradation via cette "E3 Ubiquitin ligase".

Tel que mentionné ci-haut, la région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ possède une séquence peptidique hydrophobe d'environ 20 acides aminés. Le profil d'hydrophobicité révèle d'ailleurs la présence de cette région approximativement entre les acides aminés 640 et 660 (Fig. 6). La présence d'une telle séquence hydrophobe dans le domaine C-terminal hydrophile de STT3-B soulève un point intéressant. Tel que mentionné en introduction, certaines régions hydrophobes peuvent être davantage exposées lors du mauvais repliement d'une protéine, permettant ainsi à la chaperone BiP de s'y lier. Les oligosaccharides reconnus par le cycle calnexine-calréticuline-EDEM en plus de cette région hydrophobe reconnue par BiP représenteraient deux signaux facilitant le recrutement du substrat vers la voie du GERAD ("glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation") (Cabral et al., 2002). À titre indicatif, il serait envisageable d'évaluer le potentiel de BiP à se lier à cette région hydrophobe. L'utilisation d'algorithmes a d'ailleurs permis d'évaluer les régions de gp160 susceptibles d'être reconnues par cette chaperone (Knarr et al., 1999). Nous devons donc prendre en considération que cette séquence hydrophobe pourrait être en partie responsable du défaut de dégradation observé pour la protéine mutante EGFP/STT3-B_{Δ612-662}. L'absence de liaison avec BiP pourrait provoquer un ralentissement de son expédition dans la voie du ERAD, résultant subséquentment à une dégradation moins rapide de la protéine mutante.

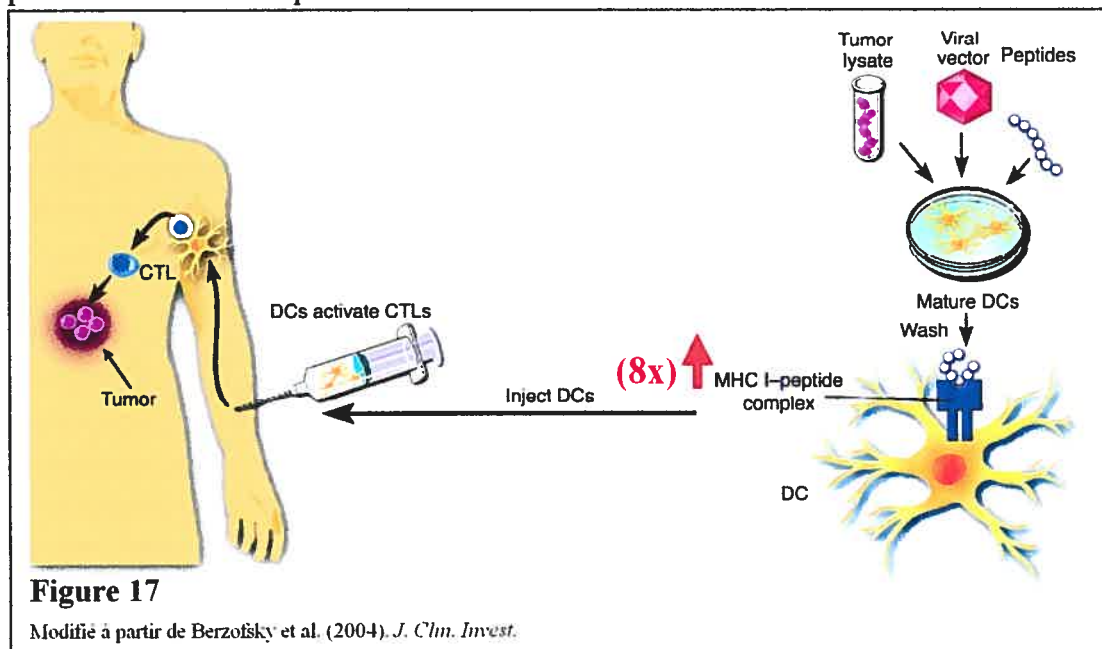
3.2 La région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃

STT3-B se distingue de son orthologue STT3-A en partie par la présence d'une région riche en lysine (STT3-B₇₉₀₋₈₂₃) à son extrémité C-terminale. Lorsque fusionné à EGFP, nous avons démontré que cette région était suffisante pour induire une translocation nucléolaire de la protéine. La fusion de cette région en C-terminal de l'ovalbumine provoque de plus une augmentation spectaculaire de la quantité de peptides SIINFEKL présentés à la surface cellulaire (Fig. 16). Ces observations soulèvent certaines interrogations tant sur le plan fonctionnel de STT3-B que sur le plan de la contribution à l'immunopeptome.

De quelle façon la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ pourrait-elle influencer la contribution de STT3-B à la formation de l'immunopeptome? Les résultats illustrés à la figure 16 démontrent que la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ est suffisante pour augmenter l'immunogénicité de l'ovalbumine. Ceci suggère que cette région peut jouer un rôle au niveau de la contribution de STT3-B pour la formation de l'immunopeptome. Cependant, nous n'avons aucune évidence directe démontrant son influence à l'intérieur de la protéine STT3-B *in toto*. Les résultats à la figure 11 et 14 nous permettent d'établir une corrélation entre le niveau de dégradation de EGFP/STT3-B et l'induction de la formation de SERTAs, c'est-à-dire que la formation de SERTAs serait directement proportionnelle à l'inefficacité de dégradation. Tel que démontré à la figure 14, la proportion de cellules contenant des SERTAs suivant la surexpression de EGFP/STT3-B_{Δ790-823} est comparable à EGFP/STT3-B. Bien que préliminaires, ces résultats pourraient suggérer que la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ n'est pas nécessaire à la dégradation de la protéine. De la même façon que pour la protéine mutante EGFP/STT3-B_{Δ612-662} (Fig. 14B), il serait envisageable d'insérer le peptide SIINFEKL à l'intérieur de la protéine EGFP/STT3-B_{Δ790-823}. Cette construction nous permettrait d'évaluer directement l'influence de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ pour la contribution de STT3-B à la formation de l'immunopeptome.

Nous avons démontré que la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ est suffisante pour augmenter la contribution de l'ovalbumine à l'immunopeptome (Fig. 16). À titre comparatif, Princiotta et al. (2003) ont étudié l'effet de l'ubiquitination co-traductionnelle de la nucléoprotéine virale de l'influenza (Ub-NP_{SIINFEKL}-EGFP) sur l'efficacité de présentation du peptide SIINFEKL par rapport à la protéine native (NP_{SIINFEKL}-EGFP). Ub-NP_{SIINFEKL}-EGFP représente une protéine chimérique dont chaque molécule synthétisée est dégradée par le protéasome. L'utilisation de Ub-NP_{SIINFEKL}-EGFP devrait donc en principe provoquer une augmentation optimale de peptides présentés à la surface cellulaire. Leurs résultats démontrent que le peptide SIINFEKL est présenté trois fois plus efficacement lorsqu'il provient de la protéine Ub-NP_{SIINFEKL}-EGFP par rapport à la protéine NP_{SIINFEKL}-EGFP. Nos résultats démontrent que la fusion de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ en C-terminal de l'ovalbumine est suffisante pour augmenter de 8 fois la présentation du peptide SIINFEKL par rapport à l'ovalbumine. À notre connaissance, aucune autre protéine de fusion n'a permis d'augmenter d'autant de fois la quantité de peptides dérivant de la protéine mère entière. La fusion de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ représente donc une approche intéressante pour augmenter l'immunogénicité d'une protéine sélectionnée. Les protéines d'intérêt au niveau de la cancérologie génèrent des TAAs ("Tumor Associated Antigens"), lesquels sont exclusivement exprimés ou sur-représentés sur les cellules cancéreuses (Berzofsky et al., 2004). Notre approche pourrait ainsi permettre d'augmenter l'immunogénicité d'une protéine tumorale, mais également de protéines virales ou bactériennes. La fusion de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ à la protéine tumorale pourrait être utilisée pour la vaccination *in vivo*. Des cellules dendritiques pourraient être infectées par un virus encodant une protéine tumorale fusionnée à la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃. En présentant un nombre plus élevé de peptides immunogènes à leur surface, les cellules dendritiques injectées chez l'individu permettrait d'activer beaucoup plus efficacement les CTL naïfs (Fig. 17). Alternativement, des cellules dendritiques surexprimant la protéine immunogène pourraient permettre l'expansion *in vitro* de CTLs, lesquels seraient par la suite injectés aux sujets. Bien que les mécanismes menant à une telle présentation de peptides devront être investigués

d'avantage, STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ représente sans aucun doute une région candidate sur le plan de l'immunothérapie.



De quelle façon la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ pourrait-elle influencer la contribution de l'ovalbumine à la génération de peptides? Puisque la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ représente un signal de localisation nucléolaire (Fig. 15), il ne serait pas étonnant que la protéine chimérique OVALBUMINE/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ soit localisée dans un tel compartiment nucléaire. Les nucléoles représentent un compartiment nucléaire contenant 80% de l'ARN cellulaire total (Leary and Huang, 2001). Fait intéressant, il a été démontré que les "RNA-binding proteins" représentaient la seule catégorie de protéines contribuant plus activement à la formation de l'immunopeptome (Hickman et al., 2004). Puisque la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ représente un signal de localisation nucléolaire et qu'elle est fortement chargée positivement, une interaction entre la protéine chimérique OVALBUMINE/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ et l'ARN nucléolaire est envisageable. Dans l'éventualité où OVALBUMINE/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ représenterait une "RNA-binding protein", la forte production du peptide SIINFEKL dérivant de cette protéine chimérique corrèlerait avec les études de Hickman et al. (2004). Outre la localisation intracellulaire, Realini et al. (1994) avaient émis l'hypothèse que certaines régions riches en lysine et en acide glutamique (région

KEKE) à l'intérieur d'une séquence protéique avaient la capacité de promouvoir des interactions directes avec le protéasome et certaines chaperones. Il a d'ailleurs été documenté que l'utilisation d'une région KEKE était suffisante pour augmenter de trois fois la quantité de peptides présentés à la surface cellulaire (Anton et al., 1999). De la même manière que les régions KEKE, la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ pourrait favoriser certaines interactions protéiques responsables d'une plus grande génération de peptides.

Outre l'influence de la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ sur la contribution à l'immunopeptome, la localisation nucléolaire de la protéine chimérique EGFP/STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ soulève une question fondamentale sur la distribution intracellulaire de STT3-B, et par le fait même de sa fonction. Après avoir mis en évidence que la région STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ correspond à un signal de localisation nucléolaire, nous ne pouvons exclure la possibilité qu'au niveau endogène, une portion de STT3-B se retrouve à l'intérieur de ce compartiment nucléaire. Ce signal de localisation nucléolaire est-il fonctionnel *in vivo*? La localisation de STT3-B à l'intérieur des nucléoles *in vivo* pourrait suggérer un rôle multifonctionnel à cette protéine résidente du R.E.. À titre comparatif, la protéine ATF6 se relocalise suite à un stress du R.E.. L'induction du UPR est nécessaire à la survie d'un stress au R.E.. La protéine ATF6 régule le UPR par sa localisation dans le R.E. et le noyau. Lorsqu'on retrouve une quantité abondante de protéines incorrectement repliées à l'intérieur du R.E., ATF6 est libérée vers le Golgi, clivée par les protéases S1P et S2P, et transloquée à l'intérieur du noyau (Kaufman et al., 2002). Une fois dans le noyau, ATF6 permet la transcription de certains gènes nécessaires au rétablissement de l'homéostasie du R.E.. Certaines modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles seraient donc envisageables pour l'initiation de la relocalisation de STT3-B. Quelle pourrait être la relation fonctionnelle entre le R.E. et les nucléoles? Les fonctions de STT3-B peuvent être semblables ou complètement différentes dans le R.E. et les nucléoles. La biosynthèse des ribosomes présents sur le RER (Réticulum Endoplasmique Rugueux) est effectuée à l'intérieur des nucléoles. STT3-B pourrait être impliquée dans la régulation de ce cycle. L'efficacité de la N-glycosylation des glycoprotéines et

l'atténuation généralisée de l'expression des protéines représentent deux mécanismes essentiels lors d'un UPR (Travers et al., 2000). Un modèle pourrait donc être proposé pour mettre en relation le UPR, la N-glycosylation dans le R.E. et la biosynthèse des ribosomes dans les nucléoles. Suivant un stress au R.E., STT3-B pourrait "percevoir" les perturbations au niveau de l'efficacité de la N-glycosylation et subséquemment être transloquée aux nucléoles. Cette relocalisation pourrait permettre à STT3-B de réguler négativement la biosynthèse des ribosomes, résultant ainsi à l'atténuation généralisée de la synthèse protéique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette étude, le modèle STT3-B été utilisé dans le but de mieux comprendre la contribution du protéome à la formation de l'immunopeptome. Nos résultats ont dans un premier temps permis de mettre en évidence que STT3-B représente une protéine possédant certaines caractéristiques particulières. Sa capacité à induire la formation de SERTAs, soit une prolifération massive de membranes du R.E., représente une observation digne de mention qui va bien au-delà de ses simples propriétés intrinsèques. Selon le modèle proposé par Huyer et al. (2004), les structures "SERTAs-like" serviraient de "holding site" pour le repliement optimal des protéines incorrectement repliées et pour leur dégradation via la voie du ERAD. Basé sur le modèle de Huyer et al., ceci suggèrerait que la propension de STT3-B à générer des DRiPs serait en partie responsable de la formation des SERTAs. La restructuration morphologique du R.E. soulève d'ailleurs d'importantes questions tant au niveau de la machinerie du ERAD que du "processing" des peptides antigéniques. L'étude de certaines régions propres à STT3-B nous a de plus permis de constater l'influence d'un signal d'ancrage sur la formation des SERTAs. L'étude de ce signal d'ancrage (STT3-B₅₂₉₋₅₅₆), de la région riche en lysine (STT3-B₇₉₀₋₈₂₃), de la grande portion hydrophobe (STT3-B₁₋₅₇₅) et de la région STT3-B₆₁₂₋₆₆₂ nous a permis de proposer que ces régions pouvaient toutes influencer la forte contribution de STT3-B à la formation de l'immunopeptome.

À ce point de vue, nous avons démontré que la fusion du signal d'ancrage et des portions hydrophobes de STT3-A/B à l'Ovalbumine était suffisant pour en augmenter son immunogénéicité. Les mécanismes engendrant cette hausse de peptides lorsque ceux-ci dérivent des protéines chimériques n'ont cependant pas été élucidés et demanderont davantage d'investigations. L'augmentation de la susceptibilité de l'ovalbumine à être une protéine source de DRiPs représente l'hypothèse #1. Les DRiPs sont définies comme étant des protéines nouvellement synthétisées dégradées

par le protéasome. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions évaluer l'effet de la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, sur la production de peptides dérivant des protéines chimériques par rapport à la protéine mère. Un effet plus marqué de la cycloheximide sur la présentation de peptides dérivant des protéines chimériques suggérerait que celles-ci ont une propension plus élevée à générer des DRiPs. Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'observer si la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ posséderait la capacité d'induire la formation de SERTAs lorsque fusionnée à l'ovalbumine, ce qui pourrait en partie expliquer cette hausse de peptides présentés. Représentant un signal d'ancrage, la région STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ pourrait de plus être responsable d'une association entre la protéine et Sec61, une interaction potentiellement importante pour le contrôle de la rétrotranslocation. Bien que la caractérisation détaillée des motifs STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et STT3-B₇₉₀₋₈₂₃ n'ait pas été effectuée entièrement dans le cadre de cette étude, nous démontrons qu'ils peuvent tout de moins être suffisants pour augmenter la production de peptides dérivant d'une protéine source. Ces résultats suscitent un intérêt majeur au niveau des plus récentes stratégies en immunothérapie du cancer (Berzofsky et al., 2004). Il serait en effet possible, par la fusion des régions STT3-B₅₂₉₋₅₅₆ et STT3-B₇₉₀₋₈₂₃, d'augmenter l'immunogénicité d'une protéine tumorale de la même façon que nous l'avons fait pour l'ovalbumine. La plus grande présentation de peptides tumoraux favoriserait l'activation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs, et de ce fait améliorerait leur capacité cytotoxique envers les cellules tumorales. Dans ce même ordre d'idée, la littérature démontre un effet important de la prolifération du R.E. sur la production de molécules pro-inflammatoires (Lawless et al., 2004). L'induction optimale de la formation de SERTAs combinée à l'effet immunogène des régions identifiées pourrait représenter un outil immunothérapeutique d'autant plus puissant. Les protéines STT3-A/B pourraient donc représenter des outils considérables qui contribueraient forcément à l'avancement des vaccins immunothérapeutiques.

Malgré l'effort considérable de plusieurs équipes de recherche en biologie cellulaire, les causes et les conséquences de la formation des SERTAs ne sont pas encore bien compris. De quelle façon pourrions-nous mettre en évidence

l'implication d'un tel compartiment du R.E. au niveau des mécanismes de la présentation d'antigènes? L'utilisation de l'anticorps reconnaissant le complexe H2-K^b/SIINFEKL pourrait être utilisé en immunofluorescence afin d'observer la présence ou l'absence de ces complexes au niveau des SERTAs. La co-localisation de ce complexe et du SERTA supporterait l'idée que l'association des peptides sur les molécules du CMH I est réelle à l'intérieur de ce compartiment du R.E.. Par ailleurs, l'inhibition de la formation des SERTAs représenterait une approche directe qui nous permettrait de conclure sur leur influence au niveau de la production et de la présentation de peptides. La quantification des complexes CMH I-peptide suivant le traitement des cellules au nocodazole représenterait une expérience importante à ce niveau. D'autre part, basé sur les études de Snapp et al. (2003), l'orientation de la EGFP vers le cytoplasme, lorsque fusionnée au signal d'ancrage (EGFP/STT3-B529-556), joue un rôle important dans l'induction de SERTAs. De ce fait, l'orientation de EGFP vers la lumière du R.E., soit par l'utilisation d'une construction STT3-B529-556/EGFP, n'induirait pas la formation de SERTAs. L'ajout du peptide SIINFEKL à l'intérieur de ces constructions nous permettrait de comparer l'efficacité de présentation du peptide soit en présence ou en absence de SERTAs. D'autre part, tel que décrit par Reits et al. (2000), le déplacement de la protéine chimérique TAP-GFP mesuré par FRAP est inversement proportionnel à la quantité de peptides entrant dans la lumière du R.E.. L'utilisation de la protéine TAP-GFP, nous permettrait ainsi d'évaluer la quantité de peptides entrant dans la lumière du R.E. au niveau des SERTAs. Un ralentissement considérable du déplacement de cette protéine chimérique pourrait appuyer l'idée d'une entrée rapide de peptides à l'intérieur de ce compartiment du R.E.. Considérant une entrée rapide de peptides, les mécanismes de la voie de sécrétion pourraient être engagés pour l'expédition des complexes CMH I-peptide à la surface cellulaire.

L'identification du contenu membranaire et protéique des SERTAs nous apporterait probablement davantage d'indication sur la nature de leur fonction. Des études plus approfondies de ME et de protéomique sont donc envisageables. Outre la fonction des SERTAs, qu'elles peuvent bien être les conséquences de leur formation.

Plusieurs études à ce niveau proposent que leur formation provoque un déséquilibre de l'homéostasie du R.E., soit par une entrée incontrôlée de "SERTAs-forming protein", résultant de ce fait l'induction d'un UPR et d'une apoptose cellulaire (Szegezdi et al., 2003). Par ailleurs, les études de Huyer et al. (2004) chez la levure démontrent une absence d'UPR suivant la formation de ce compartiment. Qu'en est-il suivant la surexpression de EGFP/STT3-B? Suivant une prolifération exagérée du R.E., certains de nos résultats préliminaires nous laisseraient plutôt croire à l'induction d'une apoptose, conséquence probable d'un stress cellulaire intense. L'utilisation de EGFP/STT3-B à titre de modèle pourrait de ce fait éclaircir les mécanismes moléculaires impliqués suivant une telle réorganisation morphologique du R.E..

Nos travaux soulèvent également un intérêt particulier au niveau des fonctions de STT3-B. En plus de son avenir prometteur au niveau de l'immunothérapie, la région riche en lysine représente un signal de localisation nucléaire fonctionnel. Sa capacité à provoquer une translocation nucléaire soulève d'importantes interrogations. Ce résultat pourrait d'ailleurs suggérer des propriétés multifonctionnelles à la protéine STT3-B. Initialement localisé dans le R.E., une localisation nucléolaire d'une portion de cette protéine pourrait hypothétiquement être essentielle au rétablissement de l'homéostasie du R.E. à la suite d'un stress cellulaire. Une communication entre le R.E. et le noyau serait à considérer via la modulation de la localisation de STT3-B. L'étude de la localisation cellulaire de STT3-B nécessitera cependant l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la protéine endogène. L'étude de cette protéine de manière exogène par l'utilisation de son cDNA, tel que nous l'avons effectué, peut apporter certains biais à sa réelle distribution cellulaire. L'influence de son promoteur et des régions 5' et 3' UTR sont d'ailleurs fortement à considérer dans l'étude éventuelle de la régulation de cette protéine.

Bien que STT3-B soit présentes chez tous les eucaryotes et certains procaryotes, nous n'avons investigué qu'une infime partie de son monde. Les

perspectives d'avenir de STT3-B pourraient être basé sur le fait qu'elle établie un lien important entre deux domaines passionnants : l'immunologie et la biologie cellulaire. Il n'en tient donc qu'aux équipes de recherche pour tirer un maximum d'informations de cette mine qui ne demande qu'à être creusée davantage.

RÉFÉRENCES

- Anton, L.C., Schubert, U., Bacik, I., Princiotta, M.F., Wearsch, P.A., Gibbs Day, P.M., Realini, C., Rehsteiner, M.C., Benninck, J.R. and Yewdell, U.W. (1999). Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell. Biol.* 146, 113-124.
- Atta-ur-Rahman, Harvey, K. and Siddiqui, R.A. (1999). Interleukin-8: An autocrine inflammatory mediator. *Curr. Pharm. Des.* 5, 241-253.
- Barlowe, C. (2002). COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14, 417-422.
- Bebok, Z., Mazzochi, C., King, S.A., Hong, J.S. and Sorscher, E.J. (1998). The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic deglycosylated intermediary. *J. Biol. Chem.* 273, 29873-29878.
- Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292, 1552-1555.
- Beninga, J., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N-terminus of an antigenic peptide by inducing leucin aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 273, 18734-18742.
- Berzofsky, J.A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I.M., Ahlers, J.D., Janik, J.E. and Morris, J.C. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin. Invest.* 113, 1515-1525.

- Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1995). Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 15, 2069-2076.
- Blond-Elguindi, S. Cwirla, S.E., Dower, W.J., Lipshutz, R.J., Sprang, S.R., Sambrook, J.F. and Gething, M.J. (1993). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 75, 717-728.
- Bonifacino, J.S. and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 409-414.
- Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B., and Rivett, A.J. (2000). Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *The Biochemistry Journal* 352, 611-615.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M. and Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416, 507-510.
- Cabral, C.M., Liu, Y., Moremen, K.W. and Sifers, R.N. (2002). Organizational diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs. *Mol. Biol. Cell* 13, 2639-2650.
- Cabral, C.M., Liu, Y. and Sifers, R.N. (2001). Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* 26, 619-624.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (2001). 26S proteasome and immunoproteasome produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20, 2357-2366.

- Chen, W., Norbury, C.C., Cho, Y., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R. (2001). Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* 193, 1319-1326.
- Correia, M.A. (2003). Hepatic cytochrome P450 degradation: mechanistic diversity of the cellular sanitation brigade. *Drug Metab. Rev.* 35, 107-143.
- Cox, J.H., Galardy, P., Bennick, J.R. and Yewdell, J.W. (1995). Presentation of exogenous and endogenous antigens is not affected by inactivation of E1 ubiquitin-activating enzyme in temperature sensitive cell lines. *J. Immunol.* 154, 511-519.
- de plaen, E. et al (1988). Immunogenic (turn) variants of mouse tumor P815 : cloning of the gene of turn antigen P91A and identification of the turn-mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2274-2278.
- de Virgilio M, Kitzmuller C, Schwaiger E, Klein M, Kreibich G, Ivessa NE. (1999). Degradation of a short-lived glycoprotein from the lumen of the endoplasmic reticulum: the role of N-linked glycans and the unfolded protein response. *Mol. Biol. Cell* 10, 4059-4073.
- de Virgilio, M., Weninger, H. and Ivessa, N.E. (1998). Ubiquitination is required for the retro-translocation of a short lived luminal endoplasmic reticulum glycoprotein to the cytosol for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 273, 9734-9743.
- Dick, T.P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., Koszinowski, U.H., Stevanovic, S., Schild, H. and Rammensee, H.G. (1996). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86, 253-262.

- Dixon, J.L., Furukawa, S. and Ginsberg, H.N. (1991). Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J. Biol. Chem.* 266, 5080-5086.
- Driscoll, J., Brown, M., Finley, D. and Monaco, J. (1993). MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 365, 262-264.
- Elkabetz, Y., Shapira, I., Rabinovich, E. and Bar-Nun, S. (2003). Distinct step in dislocation of luminal ERAD substrates: roles of ER-bound p97/Cdc48p and proteasome. *J. Biol. Chem.* 279, 3980-3989.
- Ellgaard, L and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 181-191.
- Esquivel, F., Yewdell, J. and Bennink, J. (1992). RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175, 163-168.
- Fabunmi, R.P., Wigley, W.C., Thomas, P.J. and DeMartino, G.N. (2001). Interferon-gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J. Cell Sci.* 114, 29-36.
- Fehling, H., Swat, W., Laplace, C., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, U. and Von Boehmer, H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265, 1234-1237.
- Fernandez, S., Giraud, A., Lanet, J. and Franc, J.L. (2002). Association of the thyrotropin receptor with calnexin calreticulin and Bip. Effects on the maturation of the receptor. *Eur. J. Biochem.* 269, 4930-4937.

- Ferreira, T., Mason, A.B., Pypaert, M., Allen, K.E. and Slayman, C.W. (2002). Quality control in the yeast secretory pathway: a misfolded PMA1 H⁺-ATPase reveals two checkpoints. *J. Biol. Chem.* 277, 21027-21040.
- Ferris, R.L., Hall, C., Sipsas, N.V., Safrit, J.T., Trocha, A., Koup, R.A., Johnson, R.P. and Siliciano, R.F. (1999). Processing of HIV-1 envelope glycoprotein for class I-restricted recognition: dependence on TAP1/2 and mechanisms for cytosolic localization. *J. Immunol.* 162, 1324-1332.
- Flierman, D., Ye, Y., Dai, M., Chau, V., Rapoport, T.A. (2003). Polyubiquitin serves as a recognition signal, rather than a ratcheting molecule, during retrotranslocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 37, 34774-34782.
- Fontaine, P., Roy-Proulx, G., Knafo, L., Baron, C., Roy, D.C. and Perreault, C. (2001). Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 7, 789-794.
- Frenkel, Z., Shenkman, M., Kondratyev, M. and Lederkremer, G.Z. (2004). Separate roles and different routing of calnexin and ERp57 in endoplasmic reticulum quality control revealed by interactions with asialoglycoprotein receptor chains. *Mol. Biol. Cell* 15, 2133-2142.
- Fu, L. and Sztul, E. (2003). Traffic-independent function of the Sar1p/COPII machinery in proteasomal sorting of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Cell Biol.* 160, 157-163.
- Furumoto, K., Soares, L., Engleman, E.G. and Merad, M. (2004). Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *J. Clin. Invest.* 113, 774-783.

- Gaczynska, M., Rock, D.L. and Goldberg, A.L. (1993). Interferon-gamma and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365, 264-267.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E.J. and Sztul, E.S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J. Cell Biol.* 146, 1239-1254.
- Gardner, R.G., Shearer, A.G. and Hampton, R.Y. (2001). In vivo action of the HRD ubiquitin ligase complex: mechanisms of endoplasmic reticulum quality control and sterol regulation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4276-4291.
- Gillece, P., Luz, J.M., Lennarz, W.J., de la Cruz, F.J. and Romisch, K. (1999). Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J. Cell. Biol.* 147, 1443-1456.
- Gleimer, M. and Parham, P. (2003). Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity* 19, 469-477.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol. Biol. Rep.* 26, 21-28.
- Goder, V. and Spiess, M. (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett.* 504, 87-93.
- Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T. and Rock, K.L. (2002). The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* 39, 147-164.

- Grant, E., Michalek, M., Goldberg, A.L. and Rock, K.L. (1995). Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J. Immunol.* 155, 3750-3758.
- Haas, A.L. and Bright, P.M. (1985). The immunochemical detection and quantitation of intracellular ubiquitin-protein conjugates. *J. Biol. Chem.* 260, 12464-12473.
- Hammond, A.T. and Glick, B.S. (2000). Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 3013-3030.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2004). Role of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 1019-1049.
- Hickman, H.D., Luis, A.D., Buchli, R., Few, S.R., Sathiamurthy, M., VanGundy, R.S., Giberson, C.F. and Hildebrand, W.H. (2004). Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J. Immunol.* 172, 2944-2952.
- Hickman, H.D., Luis, A.D., Bardet, W., Buchli, R., Battson, C.L., Shearer, M.H., Jackson, K.W. Kennedy, R.C. and Hildebrand, W.H. (2003). Cutting Edge: Class I presentation of host peptides following HIV infection. *J. Immunol.* 171, 22-26.
- Ho, L.J., Wang, J.J., Shaio, M.F., Kao, C.L., Chang, D.M., Han, S.W. and Lai, J.H. (2001). Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J. Immunol.* 166, 1499-1506.
- Hobman, T.C., Zhao, B., Chan, H. and Farquhar, M.G. (1998). Immunoisolation and characterization of a subdomain of the endoplasmic reticulum that concentrates proteins involved in COPII vesicle biogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 9, 1265-1278.

- Hong, G., Deleersnijder, W., Kozak, C.A., Van Marck, E., Tylzanowski, P. and Merregaert, J. (1996). Molecular cloning of a highly conserved mouse and human integral membrane protein (*Itm1*) and genetic mapping to mouse chromosome 9. *Genomics* 31, 295-300.
- Hung, C., Cheng, W., He, L., Ling, M., Juand, J., Lin, C. and Wu, T. (2003). Enhancing major histocompatibility complex class I antigen presentation by targeting antigen to centrosomes. *Cancer Res.* 63, 2393-2398.
- Huppa, J.B. and Ploegh, H.L. (1997). The alpha chain of the T cell antigen receptor is degraded in the cytosol. *Immunity* 7, 113-122.
- Huyer, G., Longsworth, G.L., Mason, D.L., Mallampalli, M.P., McCaffery, J.M., Wright, R.L., Michaelis, S. (2004). A striking quality control subcompartment in *Saccharomyces cerevisiae*: the endoplasmic reticulum-associated compartment. *Mol. Biol. Cell.* 15, 908-921.
- Jakob, C.A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y. and Aebi, M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep.* 2, 423-430.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H. and Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat. Cell Biol.* 4, 134-139.
- Jonhston, J.A., Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143, 1883-1898.

- Kabani, M., Kelley, S.S., Morrow, M.W., Montgomery, D.L. Sivendran, R., Rose, M.D. Gierasch, L.M. and Brodsky, J.L. (2003). Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol. Biol. Cell* 14, 3437-3448.
- Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Vigodman Fromm, S., Ehrlich, R. and Lederkremer, G.Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 10, 1711-1723.
- Kaufman, R.J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y. and Arnold, S.M. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 411-421.
- Kelleher, D.J., Karaoglu, D., Mandon, E.C. and Gilmore, R. (2003). Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol. Cell* 12, 101-111.
- Khan, S., de Giuli, R., Schmidtke, G., Bruns, M., Buchmeier, M., van den Broek, M., and Groettrup, M. (2001). Cutting edge: neosynthesis is required for the presentation of a T cell epitope from a long-lived viral protein. *J. Immunol.* 167, 4801-4804.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1999). Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J.* 18, 2970-2981.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, D.M. and Goldberg, A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 S and 20S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 274, 3362-3371.

- Knarr, G., Modrow, S., Todd, A., Gething, M.J. and Buchner, J. (1999). BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of bip. *J. Biol. Chem.* 274, 29850-29857.
- Knauer, R. and Lehle, L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426, 259-273.
- Koiwa, H., Li, F., McCully, M.G., Mendoza, I., Koizumi, N., Manabe, Y., Nakagawa, Y., Zhu, J., Rus, A., Pardo, J.M., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (2003). The STT3a subunit isoform of the Arabidopsis oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *Plant Cell* 15, 2273-2284.
- Koopmann, J.O., Albring, J., Huter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hammerling, G.J. and Momburg, F. (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13, 117-127.
- Kopito, R.R. (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol. Rev.* 79, S167-S172.
- Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10, 10524-30.
- Lacaille, V.G. and Androlewicz, M.J. (2000). Targeting of HIV-1 Nef to the centrosome: implications of antigen processing. *Traffic* 1, 884-891.
- Lauemoller, S.L., Kesmir, C., Corbet, S.L., Fomsgaard, A., Holm, A., Claesson, M.H., Brunak, S. and Buus, S. (2000). Identifying cytotoxic T cell epitopes from genomic and proteomic information: "the human MHC project". *Rev. Immunogenetics* 2, 477-491.

- Lavoie, C., Chevet, E., Roy, L., Tonks, N.K., Fazel, A., Posner, B.I. and Paiement, J., Bergeron, J.J. (2000). Tyrosine phosphorylation of p97 regulates transitional endoplasmic reticulum assembly in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13637-13642.
- Lawless, M.W., Greene, C.M., Mulgrew, A., Taggart, C.C., O'Neill, S.J. and McElvaney, N.G. (2004). Activation of endoplasmic reticulum-specific stress responses associated with the conformational disease Z alpha 1-antitrypsin deficiency. *J. Immunol.* 172, 5722-5726.
- Leary, D.J. and Huang, S. (2001). Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett* 509, 145-150.
- Lelouard, H., Gatti, E., Cappelio, F., Gresser, O., Camosseto, V. and Pierre, P. (2002). Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* 417, 177-182.
- Lelouard, H., Ferrand, V., Marguet, D., Bania, J., Camosseto, V., David, A., Gatti, E. and Pierre, P. (2004). Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J. Cell Biol.* 164, 667-675.
- Leonhard, K., et al. (2000). Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria : extraction of substrates from either membrane surface. *Mol. Cell* 5, 629-638.
- Li, Y., Dinsdale, D. and Glynn, P. (2003). Protein domains, catalytic activity, and subcellular distribution of neuropathy target esterase in Mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 278, 8820-8825.

- Liang, S., Wu, X., Fisher, E.A. and Ginsberg, H.N. (2000). The amino-terminal domain of apolipoprotein B does not undergo retrograde translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Proteasomal degradation of nascent apolipoprotein B begins at the carboxyl terminus of the protein, while apolipoprotein B is still in its original translocon. *J. Biol. Chem.* 275, 32003-32010.
- Lilley, B.N. and Ploegh, H.L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-840.
- Liu, Y. (2004). Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 81-127.
- Lu, M., Echeverri, F. and Moyer, B.D. (2003). Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory g-protein coupled receptors. *Traffic* 4, 416-433.
- McBride, K., Baron, C., Picard, S., Marin, S., Boismenu, D., Bell, A., Bergeron, J. and Perreault, C. (2002). The model B6^{dom1} minor histocompatibility antigen is encoded by a mouse homolog of the yeast *STT3* gene. *Immunogenetics* 54, 562-569.
- McCormick, P.J., Miao, Y., Shao, Y., Lin, J. and Johnson, A.E. (2003). Cotranslational protein integration into the ER membrane is mediated by the binding of nascent chains to translocon proteins. *Mol. Cell* 12, 329-341.
- McCracken, A.A. and Brodsky, J.L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J. Cell Biol.* 132, 291-298.
- Mellmann, I. and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.

- Michalek, M., Grant, E., Gramm, C., Goldberg, A. and Rock, K.L. (1993). A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554.
- Mitchell, D.M., Zhou, M., Pariyarath, R., Wang, H., Aitchison, J.D., Ginsberg, H.N. and Fisher, E.A. (1998). Apoprotein B100 has a prolonged interaction with the translocon during which its lipidation and translocation change from dependence on the microsomal triglyceride transfer protein to independence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 14733-14738.
- Miller, M.L., Andringa, A., Dixon, K. and Carty, M.P. (2001). Insights into UV-induced apoptosis: ultrastructure, trichrome stain and spectral imaging. *Micron* 33, 157-166.
- Milewski, M.I., Mickle, J.E. Forrest, J.K., Stanton, B.A. and Cutting G.R. (2002). Aggregation of misfolded proteins can be a selective process dependent upon peptide composition. *J. Biol. Chem.* 277, 34462-34470.
- Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P. and Paganetti, P. (2003). Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299, 1397-1400.
- Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G. and Neefjes, J. (1994). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J. Exp. Med.* 179, 1613-1623.
- Monaco, J.J. and McDevitt, H.O. (1982). Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A.* 79, 3001-3005.

- Mosse, C.A., Meadows, L., Luckey, C.J., Kittlesen, D.J., Huczko, E.L., Slingluff, C.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Engelhard V.H. (1998). The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *J. Exp. Med.* 187, 37-48.
- Murata, S., Udono, H., Tanahashi, N., Hamada, N., Watanabe, K., Adachi, K., Yamano, T., Yui, K., Kobayashi, N., Kasahara, M., Tanaka, K. and Chiba, T. (2001). Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. *EMBO J.* 20, 5898-5907.
- Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (1999). Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng.* 12, 3-9.
- Nilsson, I., Kelleher, D.J. Miao, Y., Shao, Y., Kreibich, G., Gilmore, R., von Heijne, G. and Johnson, A.E. (2003). Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J. Cell Biol.* 161, 715-725.
- Nishikawa, E.I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L. and Endo, T. (2001). Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J. Cell Biol.* 153, 1061-1070.
- Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I. and Nagata, K. (2003). EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299, 1394-1397.
- Okiyoneda, T., Harada, K., Takeya, M., Yamahira, K., Wada, I., Shuto, T., Suico, M.A., Hashimoto, Y. and Kai, H. (2004). Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol. Biol. Cell.* 15563-15574.
- Paiement, J. and Bergeron, J. (2001). The shape of things to come: Regulation of shape changes in endoplasmic reticulum. *Biochem. Cell Biol.* 79, 587-592.

- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358.
- Palmer, A., Rivett, A.J., Thomson, S., Hendil, K.B., Butcher, G.W., Fuertes, G. and Knecht, E. (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* 316, 401-407.
- Pareek, S., Notterpek, L., Snipes, G.J., Naef, R., Sossin, W., Laliberte, J., Iacampo, S., Suter, U., Shooter, E.M. and Murphy, R.A. (1997). Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin. *J. Neurosci.* 17, 7754-7762.
- Pariyarath, R., Wang, H., Aitchison, J.D., Ginsberg, H.N., Welch, W.J., Johnson, A.E. and Fisher, E.A. (2001). Co-translational interactions of Apoprotein B with the ribosome and translocon during lipoprotein assembly or targeting to the proteasome. *J. Biol. Chem.* 276, 541-550.
- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P. and Bouvier, M. (2001). Newly synthesized human δ -opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated and degraded by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 276, 4416-4423.
- Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P. (2002). Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell. Struct. Funct.* 27 431-441.
- Pilon, M., Schekman, R. and Romisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.* 16, 4540-4548.
- Pion, S., Fontaine, P., Desaulniers, M., Jutras, J., Filep, J.G. and Perreault, C. (1997). On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 27, 421-430.

- Pion, S., Christianson, G.J., Fontaine, P., Roopenian, D.C. and Perreault, C. (1999). Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 93, 952-962.
- Plempner, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891-895.
- Preckel, T., Fung-Leung, W.P., Cai, Z., Vitiello, A., Salter-Cid, L., Winqvist, O., Wolfe, T.G., Von Herrath, M., Angulo, A., Ghazal, P., Lee, J.D., Fourie, A.M., Wu, Y., Pang, J., Ngo, K., Peterson, P.A., Fruh, K. and Yang, Y. (1999). Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28^{-/-} mice. *Science* 286, 2162-2165.
- Princiotta, M.F., Shu-Bing Qian, D.F., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Bunnik, J.R. and Yewdell, J.W. (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354.
- Purcell, A.W. and Gorman, J.J. (2004). Immunoproteomics: mass spectrometry based methods to study the targets of the immune response. *Mol. Cell. Prot.* In press.
- Rammensee, H.G., Falk, K. and Rotzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 213-244.
- Raposo, G., van Santen, H.M., Leijendekker, R., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1995). Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Biol.* 131, 1403-1419.

- Realini, C., Rogers, S.W. and Rechsteiner, M. (1994). Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC Class I receptors. *FEBS Lett.* 348, 109-113.
- Rechsteiner, M., Realini, C. and Ustrell, V. (2000). The proteasome activator 11S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem. J.* 345, 1-15.
- Reits, E.A., Benham, A.M., Plougastel, B., Neefjes, J. and Trowsdale, J. (1997). Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J.* 16, 6087-6094.
- Reits, E.A., Vos, J.C., Gremme, M. and Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774-778.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W. and Neefjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18, 97-108.
- Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J.W. and Neefjes, J. (2004). A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 20, 495-506.
- Rivett, A.J., Palmer, A. and Knecht, E. (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1165-1172.
- Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-779.

- Rock, K.L. et al. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Roopenian, D., Choi, E.Y. and Brown, A. (2002). The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol. Rev.* 190, 86-94.
- Roy, L., Bergeron, J.J., Lavoie, C., Hendriks, R., Gushue, J., Fazel, A., Pelletier, A., Morre, D.J., Subramaniam, V.N., Hong, W. and Paiement, J. (2000). Role of p97 and syntaxin 5 in the assembly of transitional endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 11, 2529-2542.
- Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M. and Goldberg, A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3, 1169-1176.
- Sato, S., Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1998). Cotranslational ubiquitination of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in vitro. *J. Biol. Chem.* 273, 7189-7192.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Selby, M., Erickson, A., Dong, C., Cooper, S., Parham, P., Houghton, M. and Walker, C.M. (1999). Hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 originates in the endoplasmic reticulum and requires cytoplasmic processing for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* 162, 669-676.

- Shamu, C.E., Flierman, D., Ploegh, H.L., Rapoport, T.A. and Chau, V. (2001). Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into the cytosol. *Mol. Biol. Cell.* 12, 2546-2555.
- Shastri, N., Schwab, S. and Serwold, T. (2002). Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 463-493.
- Simpson, E., Scott, D. and Chandler, P. (1997). The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 39-61.
- Skipper, J.C.A., Hendrickson, R.C., Gulden, P.H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L., Boon, T., Hunt, D.F. and Engelhard, V.H. (1996). An HLA-A2 restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from post-translational modification and suggests a novel processing pathway for membrane proteins. *J. Exp. Med.* 183, 527-534.
- Snapp, E.L., Hegde, R.S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N. and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* 163, 257-269.
- Szczesna-Skorupa, E., Chen, C.D., Liu, H. and Kemper, B. (2004). Gene expression changes associated with the endoplasmic reticulum stress response induced by microsomal cytochrome p450 overproduction. *J. Biol. Chem.*, 279 13953-13961.
- Szegezdi, E., Fitzgerald, U. and Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 10, 186-194.
- Tanaka K, Ichihara A. (1989). Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 1309-1315.

- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94-102.
- Tobery, T. and Siliciano, R. (1997). Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization. *J. Exp. Med.* 185, 909-920.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S. and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.
- Tsai, B., Ye, Y. and Rapoport, T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 246-255.
- Van Hall, T., Sijts, A., Camps, M., Offringa, R., Melief, C., Kloetzel, P.M. and Ossendorp, F. (2000). Differential influences on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J. Exp. Med.* 192, 483-494.
- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P.G., Eichelberger, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K.L., Goldberg, A.L., Doherty, P.C. and Tonegawa, S. (1994). Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* 1, 533-541.
- Verma, R., and Deshaies, R.J. (2000). A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* 101, 341-344.
- Volchuk, A., Amherdt, M., Ravazzola, M., Brugger, B., Rivera, V.M., Clackson, T., Perrelet, A., Sollner, T.H., Rothman, J.E. and Orci, L. (2000). Megavesicles implicated in the rapid transport of intracisternal aggregates across the Golgi stack. *Cell* 102, 335-348.

- Voo, K.S., Fu, T., Wang, H.Y., Tellam, J., Heslop, H.E., Brenner, M.K., Rooney, C.M. and Wang, R.F. (2004). Evidence for the Presentation of Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Peptides to CD8+ T Lymphocytes. *J Exp Med.* 199, 459-470.
- Walter, J., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T. (2001). Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J.* 20, 3124-3131.
- Wang, J. and White, A.L. (2000). Role of calnexin, calreticulin, and endoplasmic reticulum mannosidase I in apolipoprotein intracellular targeting. *Biochemistry* 39, 8993-9000.
- Wang, Y., Chen, D. and Androlewicz, J. (1999). The role of endoplasmic reticulum-associated protein degradation in MHC class I antigen processing. *Immunol. Rev.* 172, 67-72.
- Wang, Y. and Androlewicz, J. (2000). Oligosaccharide trimming plays a role in the endoplasmic reticulum-associated degradation of tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 271, 22-27.
- Ward, C.L., Omura, S. and Kopito, R.R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83, 121-127.
- Wheatley, D.N., Grisolia, S. and Hernandez-Yago, J. (1982). Significance of the rapid degradation of newly synthesized proteins in mammalian cells: a working hypothesis. *J. Theor. Biol.* 98, 283-300.
- Wiertz, E.J., Jones, R.R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84, 769-779.

- Wigley, W.C., Fabunmi, R.P., Lee, M.G., Marino, C.R., Muallem, S., DeMartino, G.N. and Thomas, P.J. (1999). Dynamic Association of proteasomal machinery with the centrosome. *J. Cell Biol.* 145, 481-490.
- Wójcik, C., Schroeter, D., Wilk, S., Lamprecht, J. and Paweletz, N. (1996). Ubiquitin-mediated proteolysis centers in HeLa cells: Indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Eur. J. Cell Biol.* 71, 311-318.
- Woodman, P.G. (2003). p97, a protein coping with multiple identities. *J. Cell Sci.* 116, 4283-4290.
- Xiong, X., Chong, E. and Skach, W.R. (1999). Evidence that endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is linked to retrograde translocation from the ER membrane. *J. Biol. Chem.* 274, 2616-2624.
- Yao, Z., Tran, K. and McLeod, R.S. (1997). Intracellular degradation of newly synthesized apolipoprotein B. *J. Lipid. Res.* 38, 1937-1953.
- Yan, Q. and Lennarz, W.J. (2002). Studies on the function of oligosaccharyltransferase subunits. Stt3p is directly involved in the glycosylation process. *J. Biol. Chem.* 277, 47692-47700.
- Ye, Y., Meyer, H.H. and Rapoport, T.A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.
- Ye, Y., Meyer, H.H. and Rapoport, T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J. Cell Biol.* 162, 71-84.

- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D. and Rapoport, T.A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-847.
- Yeager, M., Carrington, M. and Hughes, A.L. (2000). Class I and class II MHC bind self peptide sets that are strikingly different in their evolutionary characteristics. *Immunogenetics* 51, 8-15.
- Yewdell, J.W., Anton, L.C. and Bennink, J.R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs). A major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* 157, 1823-1826.
- Yewdell, J.W. (2001). Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* 11, 294-297.
- Yewdell, J.W., Schubert, U. and Bennink, J.R. (2001). At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.* 114, 845-851.
- Yewdell, J.W., Reits, E. and Neefjes, J. (2003). Making sense of mass destruction: quantitative MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 952-961.
- York, I.A., Mo, A.X.Y., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C.R., Saric, T., Goldberg, A.L. and Rock, K.L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 18, 429-440.
- Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K. and Tai, T. (2002). E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418, 438-442.

Zhang, Y., Nijbroek, G., Sullivan, M.L., McCracken, A.A., Watkins, S.C., Michaelis, S. and Brodsky, J.L. (2001). Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 12, 1303-1314.

Zufferey, R., Knauer, R., Burda, P., Stagljar, I., te Heesen, S., Lehle, L. and Aebi, M. (1995). *STT3*, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity *in vivo*. *EMBO J.* 14, 4949-4960.