

Université Catholique de Louvain
Faculté de Médecine
Unité de Génétique Cellulaire
de Duve Institute
Ludwig Institute for Cancer Research



Production d'un peptide antigénique par l'insulin-degrading enzyme

Nicolas Parmentier

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques

Promoteur : Professeur Benoît Van den Eynde

2012

Promoteur :

Professeur Benoît Van den Eynde
Ludwig institute for Cancer Research
de Duve Institute
Université catholique de Louvain

Président du jury :

Professeur Pierre van der Bruggen
Ludwig institute for Cancer Research
de Duve Institute
Université catholique de Louvain

Membres du jury :

Professeur Peter van Endert
INSERM U1013
Université Paris Descartes

Professeur Emile Van Schaftingen
de Duve Institute
Université catholique de Louvain

Professeur Patrick Henriët
de Duve Institute
Université catholique de Louvain

Professeur Jacques Van Snick
de Duve Institute
Université catholique de Louvain

« Ce soir c'est reparti.
Tu t'enfermes chez toi.
Tu vas finir ta thèse, ta décision est ferme
Ou au moins une partie, ou bien le petit trois
Ou bien la parenthèse qu'il faut que tu refermes
Tu dois finir ta thèse !!!
(...)
Et doucement tu rejoins le mouvement des sans-thèse... »

Le Minotaure par Simon Berjeaut

Et bien non ! (Quoique je n'en suis pas passé bien loin)

Arrivé au terme de ce long périple, je tiens tout d'abord à adresser ma reconnaissance au promoteur de ce travail, **Benoît Van den Eynde**. Pour m'avoir accordé sa confiance ainsi qu'une grande autonomie durant toutes ces années. Pour m'avoir permis de concrétiser ce travail de thèse par une prestigieuse publication et m'avoir, plus récemment, convaincu que rejoindre le *mouvement des sans-thèse* aurait été ma plus belle connerie. Merci.

J'adresse ma profonde gratitude aux membres du jury, les Professeurs **Peter van Endert, Patrick Henriet, Emile van Schaftingen, Jacques Van Snick**, ainsi qu'à son Président, le Professeur **Pierre van der Bruggen**. Leur expertise, leur justesse, leur flexibilité et leur patience ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit.

Dix ans, c'est long. Les rencontres ont été nombreuses et déterminantes. Je tiens ici à remercier l'ensemble des membres de l'Institut Ludwig et, plus particulièrement, ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail :

Luc Pilotte (le formateur) pour son soutien, ses conseils et pour m'avoir initié au bench ; **Vincent Stroobant** pour ses conseils et ses FMOC/MS/C18/MALDI-TOF - *hein dis !-* ; **Didier Colau** pour ses conseils en purifications, agrémentés de « *tu vas voir, c'est simple* » ; **Benoit Guillaume** (béta-fäif-haï) qui, en plus d'être plus rapide et plus complet que Wikipédia pour les questions sur le protéasome, a été un efficace défouloir durant les moments de pression ; Les actuels et anciens membres de la BVDE-team (la Dream-Team) que j'ai pu côtoyer durant ces 10 ans.

J'aimerais remercier les Professeurs **Pierre van der Bruggen** et **Pierre Coulie** pour leurs conseils, leur grande disponibilité et leur soutien.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à **Suzanne Depelchin** et **Julie Klein**. Sans la qualité de leur travail, leur souci du détail, leur énorme disponibilité, je n'aurais pu produire qu'un pré-manuscrit de thèse et un brouillon de publication.

Je remercie ensuite **Nathalie Krack** pour ses encouragements, sa playlist premium et son efficacité à dénicher des papiers introuvables. Elle est donc tout aussi coupable que moi du nombre de références citées dans ce manuscrit. And *-last but not least-*, celui sans qui le manuscrit qui suit n'aurait jamais vu le jour : le Professeur **Etienne de Plaen**. Merci à lui aussi pour ses innombrables conseils.

Je remercie aussi les *non-Ludwigiens* :

Le Professeur **Peter van Endert** dont la double expertise en apprêtement et en IDE, associée à une grande disponibilité, m'a permis d'avancer plus efficacement dans ce travail ; **Philippe de Diesbach** pour avoir consacré des journées entières à m'initier au fractionnement subcellulaire, une technique qui ne s'apprivoise ni ne s'improvise pas aussi simplement qu'une extraction d'ARN par kit ; Et, enfin, le Professeur **Pierre Courtoy**. Par la qualité de son enseignement, son approche singulière et son goût de la science, sa capacité à simplifier la complexité apparente de certaines choses, il est, sans nul doute, la personnalité qui m'a le plus marqué durant cette formation universitaire.

Je remercie aussi, le FRIA, le Télévie et l'Institut Ludwig pour leur soutien financier.

Une si longue thèse augmente la chance de pouvoir faire de grandes découvertes comme **Pierre Remacle**, **Chrystel Pretto**, **Franco Scaramuzza**, **Ivan Théate**, **Marjorie Mercier**, **Alexandre Dalet**, **Grégory Parvizzy**, **Marina Mattiussi**, **Pierre Larieux**, **Antonia Busse** et **Alexandre Michaux** (courage !). Merci à chacun d'eux.

Enfin, l'essentiel, ma famille. Je remercie mes parents ainsi qu'Adrien et Benoît pour leur confiance inoxydable et leur soutien galvanisant. Merci de m'avoir aidé à y croire...

Index

INDEX	1
PRINCIPALES ABREVIATIONS	5
RESUME	6
SUMMARY	7
INTRODUCTION	9
I. PEPTIDASES, PROTEASES, PROTEINASES, HYDROLASES DE LIENS PEPTIDIQUES	10
<i>I.1. Nomenclature basée sur les substrats</i>	10
<i>I.2. Nomenclature basée sur le mécanisme réactionnel : le type</i>	14
I.2.1. Enzymes pourvues d'un acide aminé catalytique	15
I.2.2. Enzymes dépourvues d'acide aminé catalytique	21
<i>I.3. Classifications officielles</i>	24
<i>I.4. Insulysin, insulinase, Insulin-degrading enzyme, IDE</i>	25
I.4.1. Historique	25
I.4.2. Expression de l'IDE	26
I.4.3. Distribution subcellulaire de l'IDE	27
I.4.4. Substrats naturels, spécificité, sélectivité et mécanisme de l'IDE	30
I.4.5. Régulations de l'IDE	39
I.4.6. Fonctions naturelles de l'IDE	41
II. DEGRADATION DES PROTEINES CELLULAIRES	50
<i>II.1. Recyclage continu des protéines cellulaires</i>	50
<i>II.2. Autophagie</i>	51
II.2.1. De la protéolyse cellulaire au lysosome :	51
II.2.2. Du lysosome à l'autophagie via le glucagon:	51
II.2.3. Différents modes d'autophagie	53
<i>II.3. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)</i>	57
II.3.1. Des autophagosomes au système ubiquitine-protéasome :	57
II.3.2. La polyubiquitination :	59
II.3.3. Le protéasome :	61
<i>II.4. Protéolyse cellulaire : protéasome versus autophagie</i>	67
<i>II.5. Cross-talk entre le protéasome et l'autophagie</i>	69
<i>II.6. Organisation de la protéolyse cellulaire</i>	71

III. APPRETEMENT DES PEPTIDES ANTIGENIQUES	75
<i>III.1. La voie classique</i>	75
III.1.1. Les complexes antigéniques de classe I	75
III.1.2. La production de la majorité des peptides antigéniques dépend du protéasome	78
III.1.3. Pas 1 ¹⁹⁸⁷ ni 2 ¹⁹⁹⁰ ni 3 ²⁰⁰⁷ mais 5 ²⁰¹⁰ protéasomes : l'apprêtement différentiel	79
III.1.4. Production de l'extrémité C-terminale des antigènes par le protéasome	82
III.1.5. Maturation/Destruction des peptides antigéniques	84
<i>III.2. Voies alternatives</i>	90
III.2.1. Apprêtement protéasome-indépendant et TAP-indépendant.	90
III.2.2. Apprêtement protéasome-indépendant et TAP-dépendant.	91
III.2.3. Autophagie et apprêtement.	93
<i>III.3. Les antigènes MAGE</i>	94
BUT DU TRAVAIL	97
MATERIEL ET METHODES	99
Cellules et milieux de culture.	101
Réactifs	102
Etude comparative du rôle du protéasome standard et de l'immunoprotéasome dans l'apprêtement des peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ , Melan-A ₂₆₋₃₅ , MAGE-A3 ₁₁₄₋₁₂₂	102
Traitement de lignées de mélanomes avec des inhiteurs du protéasome.	103
Traitement d'une lignée d'un mélanome avec des inhibiteurs de peptidases.	104
Inhibition du transporteur TAP	104
Fractionnement subcellulaire.	105
Mise en évidence de l'activité produisant le peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆	106
Séparation par filtration sur gel	107
Déplétions par immunoaffinité du protéasome et de l'IDE	108
Dégradation du précurseur du peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ (18-mer) par des protéasomes humains (20S) purifiés.	109
Production du peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ , profiles d'inhibition de la fraction cytosolique et de l'IDE.	109
Dégradation du précurseur du peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ (20-mer) par l'IDE recombinante humaine	111
Production du peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ , profiles d'inhibition de la fraction cytosolique et de l'IDE.	111
Apprêtement du peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ par électroporation de précurseurs peptidiques.	112

Inhibition de l'expression de l'IDE par siRNA.	112
Comparaison de l'apprêtement des peptides MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ et MAGE-A3 ₁₁₄₋₁₂₂ par une lignée de mélanome.	113
Etude de la dégradation de la protéine MAGE-A3 dans une lignée mélanome.	114
Comparaison de l'apprêtement des peptides MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ et MAGE-A3 ₁₆₇₋₁₇₆ .	115
RESULTATS	117
I. LE PEPTIDE MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ EST PRODUIT PAR UNE VOIE ALTERNATIVE INCONNUE.	119
<i>I.1. Le protéasome n'est pas impliqué dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.</i>	119
<i>I.2. L'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ dépend du transporteur TAP.</i>	123
<i>I.3. La production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ne dépend pas de la tripeptidylpeptidase</i>	
II.	125
II. IDENTIFICATION DE LA PEPTIDASE PRODUISANT LE PEPTIDE MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ .	129
<i>II.1. Stratégie.</i>	129
<i>II.2. Caractérisation de l'activité produisant MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆</i>	131
II.2.1. Seule la fraction cytosolique peut produire le peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ .	131
II.2.2. La production du peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique n'implique pas le protéasome (ni TPPII).	133
II.2.3. MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ est produit par une métallopeptidase cytosolique.	133
II.2.4. La métallopeptidase nécessaire à l'apprêtement de MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ est une endopeptidase	135
II.2.5. En condition native, l'activité produisant le peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ a une masse moléculaire comprise entre 100 et 450 kDa.	141
II.2.6. Recherche de candidats potentiels	141
<i>II.3. Implication de l'IDE dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.</i>	147
II.3.1. L'IDE est capable de produire le peptide antigénique.	147
II.3.2. Rôle critique de l'IDE dans la production du peptide MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique.	149
III. LA PROTEINE MAGE-A3 EST DEGRADEE PAR DEUX VOIES DIFFERENTES, LE PROTEASOME ET L'IDE.	153
<i>III.1. MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ et MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂, deux peptides antigéniques apprêtés par deux voies différentes.</i>	153
<i>III.2. Le protéasome et l'IDE participent conjointement à la dégradation de MAGE-A3.</i>	157
III.2.1. L'approche par les inhibiteurs pharmacologiques.	157
III.2.2. L'approche par les siRNA spécifiques de l'IDE.	159

DISCUSSION	161
I. PRINCIPALES CONCLUSIONS DE CE TRAVAIL	163
II. L'APPRETEMENT DU PEPTIDE MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆	163
II.1. <i>Peut-on définitivement exclure l'implication du protéasome ?</i>	163
II.2. <i>Quels seraient les rôles de l'IDE dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ?</i>	167
II.3. <i>Par quoi se distinguent les deux systèmes de dégradation de MAGE-A3 ?</i>	168
III. CONTRIBUTION DE L'IDE AU REPERTOIRE ANTIGENIQUE	171
III.1. <i>Recherche de peptides antigéniques potentiellement produits par l'IDE</i>	171
III.2. <i>Etude de la contribution de l'IDE au répertoire antigénique de classe I.</i>	175
BIBLIOGRAPHIE	181

Principales abréviations

BH :	Bleomycin hydrolase
CMA :	Chaperone-mediated autophagy
CTL :	Cytotoxic T-lymphocyte
DPP9/8 :	Dipeptidyl peptidase 9/8
ER :	Endoplasmic reticulum
ERAD :	ER-associated degradation
ERAP 1/2 :	ER aminopeptidase 1/2
HLA :	Human leukocyte antigen
HPLC :	High performance liquid chromatography
IDE :	Insulin-degrading enzyme
IP :	Immunoprotéasome
LAP :	Leucin aminopeptidase
MAGE :	Melanoma antigen gene
MHC-I :	Major histocompatibility complex I
MS :	Mass spectrometry
PLC :	Peptide loading complex
POP :	Prolyl oligopeptidase
PS :	Protéasome standard
PSA :	Puromycin-sensitive aminopeptidase
siRNA :	Small interfering ribonucleic acid
TAP :	Transporter associated with antigen processing
TOP :	Thimet oligopeptidase
UPS :	Ubiquitin proteasome system

Résumé

La majorité des peptides antigéniques reconnus par les lymphocytes T cytolytiques sont produits à partir de la dégradation des protéines cellulaires qui implique principalement le protéasome. Certains peptides antigéniques sont cependant produits par une voie qui ne dépend pas du protéasome. Le peptide antigénique dérivé de la protéine tumorale MAGE-A3 (₁₆₈EVDPIGHLY₁₇₆) et présenté par le HLA-A1 a été utilisé dans de nombreux essais de vaccinations chez des patients souffrant de mélanomes métastatiques. Au cours de ce travail, nous avons observé que ni l'inhibition du protéasome ni celle de la tripeptidyl peptidase II ne compromettait la présentation de l'antigène par des cellules tumorales. La présentation de l'antigène étant dépendante du transporteur TAP, cela indiquait que MAGE-A3/HLA-A1 était produit dans le cytosol. Nous avons caractérisé l'activité produisant le peptide à partir d'un précurseur de 20 acides aminés comprenant la séquence du peptide antigénique. Nous avons observé que seule la fraction cytosolique était capable de produire le peptide antigénique. La fraction cytosolique traitée avec un inhibiteur de métallopeptidases, l'orthophénanthroline, ne produisait plus le peptide antigénique. Ce même inhibiteur diminuait la présentation du peptide antigénique par des cellules tumorales. La présentation de l'antigène dans des cellules HLA-A1⁺/ MAGE-A3⁻ à partir du précurseur de 20 acides aminés ou d'un autre modifié à ses deux extrémités indiquait que la production de l'antigène dépendait d'une endopeptidase. La caractérisation de la présentation de l'antigène indiquait que l'insulin-degrading enzyme (IDE) était vraisemblablement la peptidase qui produisait le peptide. Nous avons ensuite observé qu'une IDE recombinante était capable de produire le peptide antigénique et qu'une déplétion de l'IDE abolissait la capacité de production du peptide antigénique par la fraction cytosolique. Le rôle de l'IDE dans la production du peptide antigénique a finalement été confirmé en observant une inhibition de la présentation de l'antigène dans des cellules transfectées avec des siRNA spécifiques de l'IDE. Enfin, nous avons étudié la dégradation intracellulaire de MAGE-A3 et observé que l'IDE et le protéasome représentaient deux voies de dégradation parallèles qui ensemble contribueraient à la diversité des peptides.

Summary

Most antigenic peptides recognized by CD8 T lymphocytes are produced through degradation of intracellular proteins by the proteasome. However, some antigenic peptides are produced by a proteasome-independent pathway, which is poorly characterized. MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ is a tumor antigenic peptide presented by HLA-A1 and widely used for vaccination of melanoma patients. We observed that proteasome and tripeptidyl peptidase inhibitors failed to block presentation of the antigen by tumor cells. However, processing of this peptide occurred in the cytosol because TAP-inhibition prevented its presentation. To characterize the cytosolic peptidase producing MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ we setup an in vitro digestion assay using a 20-mer precursor peptide encompassing the sequence of the antigenic peptide. We observed that only the cytosolic fraction was able to produce the antigenic peptide from this precursor. This production was abolished by treating the cytosolic fraction with o-phenanthroline, a broad-spectrum inhibitor of metallopeptidases. This inhibitor also blocked the presentation of MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ by tumor cells. Processing of the antigenic peptide was observed in HLA-A1 cells electroporated by the 20-mer precursor or by a precursor modified at the C- and N-terminus to exclude exopeptidase activity. With both precursors, the processing was inhibited by treating cells with o-phenanthroline concluding to a major role of a cytosolic metalloendopeptidase. One such enzyme is insulin-degrading enzyme (IDE). We observed that depletion of IDE abolished the capacity of a cytosolic fraction to produce the antigenic peptide. Furthermore, recombinant IDE was able to produce the peptide in vitro from the 20-mer peptide. Using a siRNA approach we observed that a reduction of IDE expression in tumor cells resulted in a reduced capacity of MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ presentation. Lastly, half-life studies revealed that in melanoma cells proteasome and IDE act as parallel ways for the degradation of MAGE-A3 contributing together to a different set of peptides.

Introduction

I. Peptidases, protéases, protéinases, hydrolases de liens peptidiques

Théodor Schwann est notamment connu pour être à l'origine de la théorie cellulaire. C'est à lui aussi que l'on doit le terme « métabolisme ». Avant d'être professeur à l'université de Louvain et par la suite à celle de Liège, il identifia l'une des premières enzymes du règne animal (si ce n'est la première). Vers 1830, travaillant sur ce que l'on appelait à l'époque « ferment gastrique », il identifia une protéine qui, combinée à l'acidité gastrique, dégradait les protéines du bol alimentaire. Il baptisa cette protéine pepsine (*pepsis*, digestion). Cette même peptidase sera, près de cent ans plus tard, l'une des premières enzymes à être cristallisée par Northrop.

I.1. Nomenclature basée sur les substrats

Au départ, l'attribution d'un nom à une peptidase était souvent une forme d'hommage à l'organisme ayant servi de base à l'isolement de l'enzyme. Ceci explique des noms tels que « thermolysine » (*Bacillus thermoproteolyticus*), « subtilisine » (*Bacillus subtilis*). Cette nomenclature n'était pas pratique. D'une part, dans chaque organisme, la diversité des peptidases est relativement importante (2-4% des gènes codent des peptidases), et d'autre part, certaines peptidases peuvent être fortement conservées¹. C'est pourquoi dès le début du XXème siècle, la nomenclature et la classification se sont basées sur les caractéristiques enzymatiques. Initialement, la caractérisation se focalisait sur le type de substrats dégradés par l'enzyme. Les substrats disponibles à cette époque étaient de type naturel, des protéines purifiées (gélatine, caséine, hémoglobine) ou des fragments (peptides) de celles-ci, produits par la trypsine ou la pepsine. Deux grands types d'activités ont été mis en évidence. Les enzymes restreintes à la digestion de peptides, *des peptidases*, ciblaient généralement des liens peptidiques proches d'une des deux extrémités des substrats, activités exopeptidasiques. A la différence, les enzymes capables de cliver des protéines entières, *des protéinases*, libéraient de longs fragments témoignant d'une préférence

pour les liens internes, activités endopeptidasiques. L'école allemande avec Grassmann proposa que la nomenclature distingue les protéinases des peptidases. L'école américaine avec Bergmann proposa de ne pas faire cette distinction car dans les deux cas, l'activité consistait à rompre un lien peptidique. Les protéines purifiées (prédigérées ou non) utilisées comme substrats avaient des inconvénients. Parmi eux citons notamment la reproductibilité des observations, le caractère fastidieux de la digestion *in vitro* de protéines entières ainsi que la lourdeur de l'analyse des produits. Dans les années trente, la possibilité de produire des peptides synthétiques et de les modifier permit de caractériser plus facilement et plus précisément les activités peptidasiques. Contrairement à l'hypothèse de Grassmann, on observa que les « protéinases » comme la trypsine étaient en mesure de dégrader des dipeptides ayant (ou non) les extrémités N- ou C- modifiées. L'extrémité aminoterminal était souvent modifiée par un benzoate ou un carboxybenzoate tandis que l'extrémité carboxyterminale l'était par amidation ou par un ester d'éthyle. A l'inverse, les « peptidases » ne pouvaient dégrader que des peptides comportant au moins une extrémité libre; aminoterminal pour les aminopeptidases et carboxyterminale pour les carboxypeptidases ²⁻⁴ (**Figure 1**). Bergmann conclut que ces peptidases devaient comporter à proximité de leur site catalytique un domaine interagissant avec le NH₂ du peptide (aminopeptidases) ou le COOH (carboxypeptidases) ^{5,6}. Dans la même ligne, il fut observé que les aminopeptidases et les carboxypeptidases étaient incapables de cliver respectivement en aval et en amont d'un acide aminé de configuration *D* ^{2,7}. Cette observation renforça la théorie de l'existence d'un domaine d'interaction avec l'une ou l'autre extrémité des substrats nécessitant non seulement une extrémité non modifiée, mais aussi une orientation particulière de celle-ci. Ces domaines sont de nature très variée. Citons le cas de la leucine aminopeptidase qui utilise un ion Zn²⁺ pour attirer l'extrémité NH₂ de ses substrats à proximité de son site catalytique ou encore l'aminopeptidase M attirant le NH₂ terminal d'un peptide via la chaîne latérale d'un aspartate (D405) dans son centre catalytique ^{8,9}. Le recours aux peptides synthétiques a permis à Bergmann de mettre en évidence deux autres classes d'enzymes, les dipeptidases et les prolidases ¹⁰ (**Figure 1**). Les dipeptidases sont des enzymes agissant uniquement sur des dipeptides dont les deux résidus doivent absolument être de configuration *L*.

I. Exopeptidases

Dipeptidases

The diagram shows a dipeptide structure. The first amino acid has a central carbon bonded to two hydrogen atoms (H) and a side chain (R₁). Its carbonyl group (C=O) is highlighted with a red bond to the nitrogen of the second amino acid. The second amino acid has a central carbon bonded to two hydrogen atoms (H) and a side chain (R₂). Its carboxyl group (C=O) is shown with a hydroxyl group (OH) attached to the oxygen.

Amino peptidases

The diagram shows a dipeptide structure similar to the one above. However, the carboxyl group of the second amino acid is represented by a blue 'X' instead of a hydroxyl group, indicating the site of cleavage for an amino peptidase.

Carboxypeptidases

The diagram shows a dipeptide structure similar to the one above. However, the amino group of the first amino acid is represented by a blue 'Y' instead of two hydrogen atoms, indicating the site of cleavage for a carboxypeptidase.

II. Endopeptidases



The diagram illustrates the hydrolysis of a peptide bond. A peptide chain is shown with a red line indicating the cleavage site between the carbonyl carbon (C=O) of one amino acid and the nitrogen (N-H) of the next. The amino acid on the left has a side chain R_1 and is attached to a blue 'Y' group. The amino acid on the right has a side chain R_2 and is attached to a blue 'X' group. The cleavage occurs between the carbonyl carbon (C=O) and the nitrogen (N-H).

III. Hydrolases d'amides déprotonés

Dipeptidases (prolidase)

The diagram shows the chemical structure of a dipeptide, which is a substrate for dipeptidases (prolidase). It consists of two amino acids linked by a peptide bond (highlighted in green). The first amino acid has a hydrogen atom (H) attached to its nitrogen (N) and a hydrogen atom (H) and a side chain (R₁) attached to its carbon (C). The second amino acid has a side chain (R₂) attached to its nitrogen (N) and a hydrogen atom (H) and a carboxyl group (COOH) attached to its carbon (C). The peptide bond is highlighted in green.

Amino

The diagram shows the chemical structure of an amino acid, which is a substrate for amino

[illegible]

Fig 1. Schématisation des spécificités d'activités peptidasiques.

Dans les différents substrats *types* ci-dessus, seuls les acides aminés de part et d'autre du clivage (traits rouges pour une liaison CO-NH et vert pour une liaison CO-N) ont été représentés. R1 et R2 symbolisent respectivement les chaînes latérales des acides aminés en amont et en aval du site de clivage. Ri symbolise la chaîne latérale de l'acide aminé C-terminal d'un peptide. X, Y représentent soit une chaîne peptidique, soit un groupement modifiant l'extrémité carboxylique d'un substrat par amidation (X), soit une molécule acylant l'amine N-terminale du substrat (Y).

Elles ne sont donc ni des endopeptidases ni des carboxypeptidases pas plus que des aminopeptidases et ne doivent pas être confondues avec les dipeptidylpeptidases (ex : les dipeptidyl peptidases 8 et 9 (§ II.6). Ces dernières sont des exopeptidases clivant en aval du second acide aminé depuis l'extrémité NH_2 libre d'un peptide (aminopeptidases) ou en amont du second acide aminé depuis l'extrémité COOH d'un peptide (carboxypeptidases). Les prolidases ont la caractéristique de cibler des liens peptidiques dont l'amine n'est pas protonée ¹¹. C'est le cas du motif aminoacyl-proline ou aminoacyl-sarcosine (forme N-méthylée de la glycine). Ce genre de motifs peut être hydrolysé soit à la manière d'une aminopeptidase (ex : l'aminopeptidase P membranaire) ou bien à la manière d'une dipeptidase (ex : la prolidase).

Au final, c'est lors d'un symposium que l'on trancha entre les deux visions des écoles allemande et américaine. Comme préconisé par l'école américaine, on accorda la priorité à l'activité commune d'hydrolyse de liens peptidiques. On décida de distinguer les endopeptidases des exopeptidases selon la capacité des enzymes à dégrader des peptides ayant les deux extrémités modifiées. Toutefois, bien qu'il n'existe aucune recommandation en la matière, une distinction supplémentaire a été faite au niveau des endopeptidases. La plupart des endopeptidases cellulaires, bien que capables de cliver des peptides modifiés à leurs deux extrémités, ne peuvent dégrader que des oligopeptides et non des protéines entières. Elles sont pour cela souvent qualifiées d'oligopeptidases (§ II.6).

Afin d'être complet, mentionnons le cas particulier des isopeptidases. Parmi les modifications post-traductionnelles que peuvent subir les protéines cellulaires, deux d'entre elles font appel à ces liaisons isopeptidiques, l'ubiquitylation et la SUMOylation (§ II.3.2). L'ubiquitine et SUMO (small ubiquitin-like modifier protein) sont deux polypeptides dont l'extrémité C-terminale forme un lien isopeptidique avec l'amine de la chaîne latérale de lysine ¹². Les déubiquitylases sont un exemple d'isopeptidases. Ces peptidases cytosoliques, par leur capacité à modifier le niveau d'ubiquitination de protéines cellulaires, jouent un rôle clé notamment dans la protéolyse cellulaire et l'endocytose ¹³. Ces peptidases ne ciblent pas le carbonyle lié au carbone α d'un acide aminé mais un carbonyle C-terminal

d'un polypeptide (ex : ubiquitine) lié à l'amine ε d'une lysine d'un autre polypeptide (Figure 1.IV, le trait rouge).

I.2. Nomenclature basée sur le mécanisme réactionnel : le type

Il y a au moins deux points communs à toutes les peptidases. D'une part, constituant une sous-classe d'hydrolases, l'eau est un partenaire indispensable au clivage du lien peptidique. D'autre part, l'hydrolyse est invariablement initiée par une attaque nucléophile menée sur le groupement carbonyle du lien peptidique. Dès la fin des années soixante, les études des mécanismes réactionnels principalement basées sur l'utilisation d'inhibiteurs, ont permis d'identifier quatre types d'attaques nucléophiles. A la fin des années 80, avec la découverte du protéasome, un cinquième et dernier mécanisme a complété cette liste.

Selon la nature du nucléophile, on distingue deux grandes stratégies d'attaques du lien peptidique. Le nucléophile peut être soit un acide aminé de la peptidase, appelé acide aminé catalytique, soit une molécule d'eau. Dans le premier cas, le nucléophile est soit le groupement sulfhydryle de la chaîne latérale d'une cystéine, soit l'hydroxyle de la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine. Au niveau de la nomenclature on distingue les sérine peptidases (ex : la trypsine), les cystéine peptidases ou thiol-peptidases (ex : les caspases) et les thréonine peptidases (ex : les sous-unités catalytiques du protéasome). Dans le second cas, où l'eau réalise l'attaque du carbonyle, la nomenclature indique le moyen par lequel l'eau est rendue nucléophile. Les aspartyl peptidases (ex : les presenilines) utilisent un couple d'aspartates et les métallopeptidases (ex : les métalloprotéinases matricielles), un ion métallique ; le Zn^{2+} le plus souvent. Pragmatiquement, ces mécanismes réactionnels ont pu être mis en évidence suite à la découverte d'inhibiteurs dits « à large spectre » ou « diagnostiques » et l'étude de leur mécanisme d'action.

1.2.1. Enzymes pourvues d'un acide aminé catalytique

Nous décrirons le mécanisme des enzymes à acide aminé catalytique par le biais de la chymotrypsine, une sérine peptidase.

Afin d'être catalytique, une sérine doit être située au sein d'une structure particulière lui permettant d'interagir avec certains acides aminés du centre catalytique de la peptidase. Cette structure particulière est connue sous le nom de triade catalytique ¹⁴ (**Figure 2**). Dans le cas de la chymotrypsine (ou de la trypsine, de l'élastase etc.), elle est constituée par les résidus Ser-195, His-57 et Asp-102 ¹⁴. Il fut observé que le diisopropyl fluorophosphate (DFP), un inhibiteur utilisé initialement pour bloquer les estérases, bloquait l'activité de la trypsine et de la chymotrypsine. Cette inhibition était stoechiométrique et modifiait de façon irréversible un résidu sérine de l'enzyme ^{15,16}. L'utilisation d'autres inhibiteurs comme le PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) a confirmé ces observations ¹⁷. La sérine catalytique ciblée a finalement été identifiée notamment par dégradation d'Edman et mutagenèse dirigée. Le second membre de la triade catalytique (His-57) a lui aussi été identifié par l'approche des inhibiteurs. Le TPCK (tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone), un analogue de substrat de la chymotrypsine, bloquait lui aussi de façon covalente et stoechiométrique l'enzyme. La chymotrypsine possède 2 histidines (H-54 et -57). Seule H-54 restait identifiable après traitement au TPCK et l'utilisation d'une forme radioactive de l'inhibiteur permit d'identifier le second membre de la triade catalytique comme étant H-57 ^{18,19}. Le dernier membre de la triade (Asp-102) a été identifié par une approche différente ²⁰. La cristallographie de la chymotrypsine permit de voir que l'H-57 était à un pont hydrogène d'un aspartate (D-102). C'est dans cette même étude que l'on identifia pour la première fois la triade catalytique et que l'on proposa le premier mécanisme réactionnel d'une peptidase ²⁰. Des résultats similaires étant observés notamment pour la trypsine et l'élastase, on en déduisit le mécanisme commun des sérine peptidases ^{14,21}. L'histidine est la pierre angulaire de la triade. Un premier pont hydrogène (3 Å) relie l'azote ($\epsilon 2$) de H-57 à l'oxygène (δ) de S-195 alors qu'un second pont (2.8 Å) relie l'azote ($\delta 1$) de H-57 à l'oxygène ($\delta 2$) de D-102 (**Figure 2 et 3**).

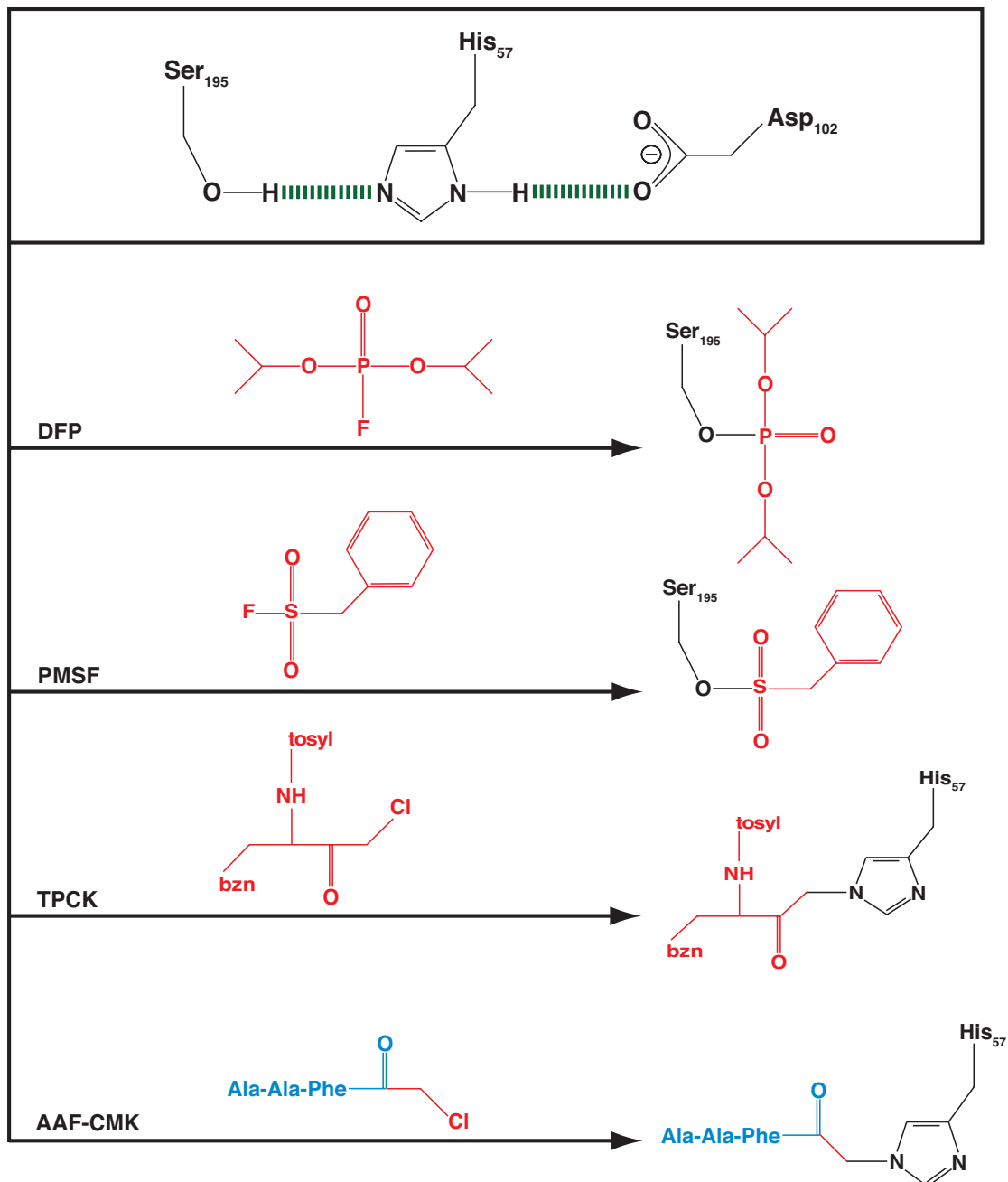


Fig 2. Triade catalytique de la chymotrypsine et inhibiteurs de sérine peptidases.

Un premier pont hydrogène (3 Å) relie l'azote ($\delta 2$) de His-57 à l'oxygène (δ) de Ser-95 alors qu'un second pont (2.8 Å) relie l'azote ($\delta 1$) de His-54 à l'oxygène ($\delta 2$) de Asp-102. Le pK de la chaîne latérale de Asp-102 est de 4, son groupe carboxylique COO⁻ a tendance à attirer le proton de His-57. Ce faisant, His-57 attire le proton de l'hydroxyle de Ser-195 faisant acquérir à cette dernière sa capacité de nucléophile. Ci-après, 4 types d'inhibiteurs de sérine peptidases ont été représentés. Les deux derniers, des dérivés chlorométhyl cétones ciblent aussi certaines cystéine peptidases. Les peptidyl chlorométhyl cétones, comme l'AAF-CMK, sont fréquemment utilisés pour restreindre le spectre d'inhibition en se basant sur les spécificités de clivages. *Abréviations* : DFP (diisopropylfluorophosphate), PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), TPCK (tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone), AAF-CMK (alanyl alanyl phenylalanyl chloromethyl ketone, un inhibiteur synthétisé pour bloquer la tripeptidyl peptidase II).

Le pK de la chaîne latérale de D-102 est de 4, son groupe carboxylique COO^- a tendance à attirer le proton de H-57. Ce faisant, H-57 attire le proton de l'hydroxyle de S-195 faisant acquérir à cette dernière sa capacité de nucléophile (**Figure 3**). Le lien entre la structure de la triade et sa fonction fut définitivement démontré dans l'étude cristallographique du mutant D102N. Dans ce mutant, la forme tautomérique de H-57 favorise l'acceptation d'un proton cédé par la chaîne latérale de N-102, empêchant l'acceptation du proton de S-195 par H-57²². Au niveau fonctionnel, cela affecte autant l'activité enzymatique de la trypsine que sa capacité de fixation du DFP, toutes deux diminuées de 4 unités logarithmiques²³.

La réaction se déroule en **cinq étapes (Figure 3)**. La sérine catalytique, dont l'hydroxyle est déprotoné grâce à la triade catalytique, réalise une attaque nucléophile du carbonyle du lien peptidique à cliver. Cette attaque donne lieu à une liaison directe de l'enzyme à son substrat appelé intermédiaire tétrahédrique. Au cours de cette étape très furtive, l'oxygène du carbonyle lié à S-195 est sous forme O^- . Cette forme électronégative de l'oxygène est stabilisée par les amines α de S-195 et G-193. Cette poche est appelée « trou oxyanionique »²⁴. La forme relativement instable de l'intermédiaire tétrahédrique est rapidement convertie en intermédiaire acyle-enzyme. Au cours de cette étape, la partie NH du lien peptidique est libérée par l'enzyme sous forme NH_2 (**Figure 3, étape 2**). Les électrons de l'oxygène du carbonyle sont redistribués et augmentent l'électronégativité de l'amine du lien peptidique. De ce fait, ce groupe peut délocaliser le proton lié à l'azote ϵ_2 de H-57. Ce même azote récupère un proton à une molécule d'eau, augmentant la nucléophilie de cette dernière (**Figure 3, étape 3**). L'eau s'attaque alors au carbonyle de l'intermédiaire acyle-enzyme, induisant la formation d'un second intermédiaire tétrahédrique stabilisé, une fois encore, par le trou oxyanionique (**Figure 3, étape 4**). Tout aussi instable que le premier intermédiaire, sa dissociation permet de libérer la partie carboxylique du substrat sous forme COOH , restaurant l'état initial de l'enzyme (**Figure 3, étape 5**). Si la triade catalytique est utilisée par la plupart des sérine peptidases, il n'en est pas de même pour les autres protéases à intermédiaire acyle-enzyme.

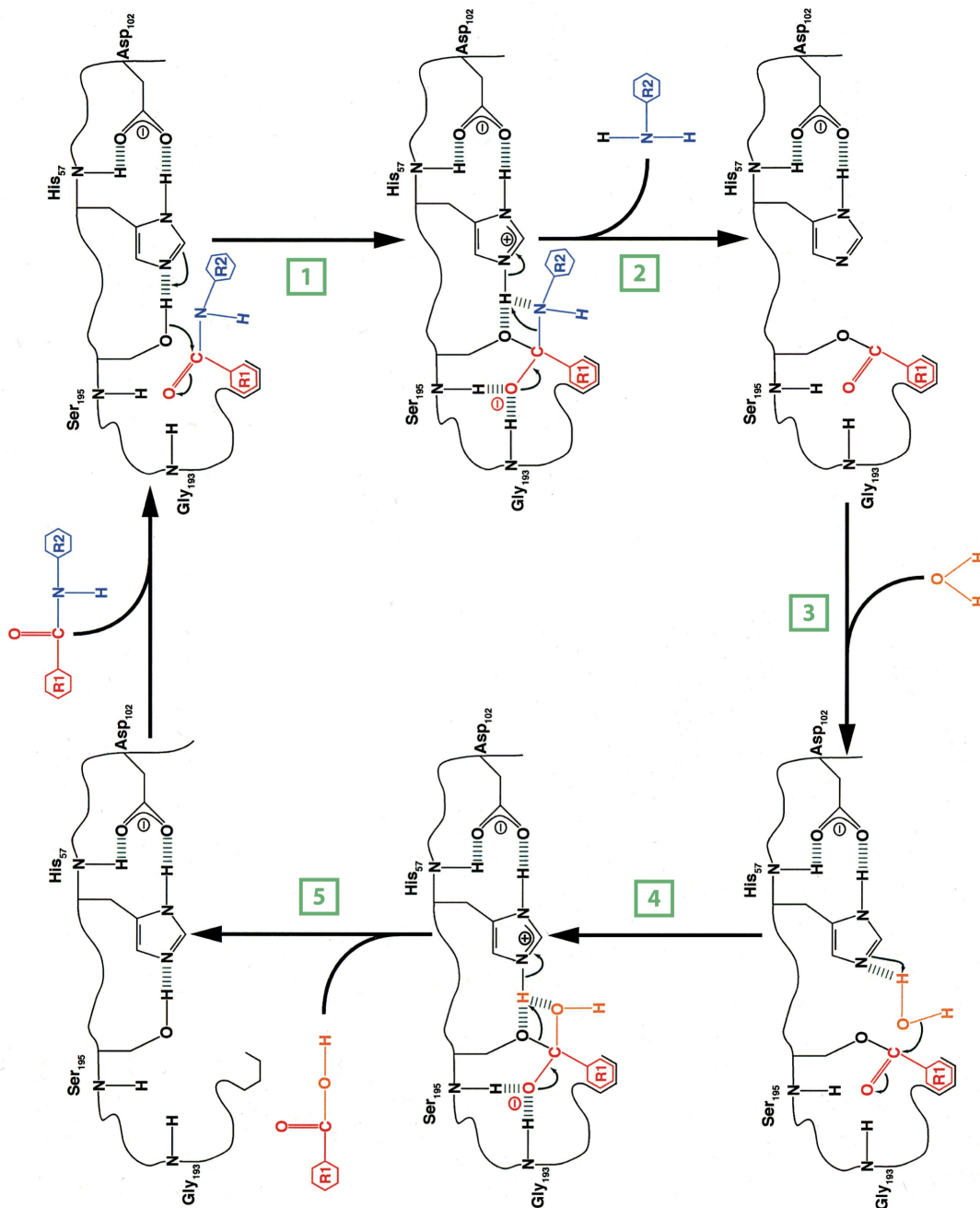


Fig 3. Etapes de l'hydrolyse d'un lien peptidique par une sérine-peptidase, la chymotrypsine.

Le carbonyle du lien peptidique fait l'objet d'une première attaque nucléophile (1) par l'hydroxyle de Ser-95. Cela mène à la formation d'un premier intermédiaire tétrahédrique stabilisé par le trou oxyanionique où des ponts hydrogène sont réalisés entre l'oxyanion du carbonyle et les amines a de Gly-193 et Ser-195. La rupture de la liaison peptidique (2) fait suite à la captation, par le NH du lien peptidique, d'un proton cédé par l'imidazole de His-57. La conversion de l'intermédiaire tétrahédrique permet la libération de l'extrémité NH du lien peptidique alors que la partie CO de celui-ci reste liée à la sérine catalytique sous forme d'acyle-enzyme (2). L'espace laissé vacant par l'élimination de l'extrémité NH du lien peptidique clivé est investi par une molécule d'eau dont un proton est attiré par l'imidazole de de His-57 (3). L'eau rendue nucléophile réalise une seconde attaque nucléophile sur le carboxylate de l'acyle-enzyme, ce qui mène à la formation d'un second état tétrahédrique (4). La dissociation de cet intermédiaire permet la libération de l'extrémité CO du lien peptidique sous la forme d'un carboxylate et restaure l'état initial de l'enzyme (5).

Les cystéine peptidases ont recours à une diade catalytique formée d'une cystéine et d'une histidine mais pas d'aspartate²⁵ (**Figure 4, vert**). Cela s'explique par le fait que parmi les différentes formes que peut adopter le sulfhydryle d'une cystéine en condition aqueuse, la forme déprotonée est la plus favorable. Qu'ils soient diagnostiques comme l'E64 (**Figure 4, rouge**), ou produits naturellement par la cellule comme les cystatines qui inhibent les cathepsines, les inhibiteurs ciblant les cystéines peptidases forment un pont disulfure avec la cystéine catalytique²⁶.

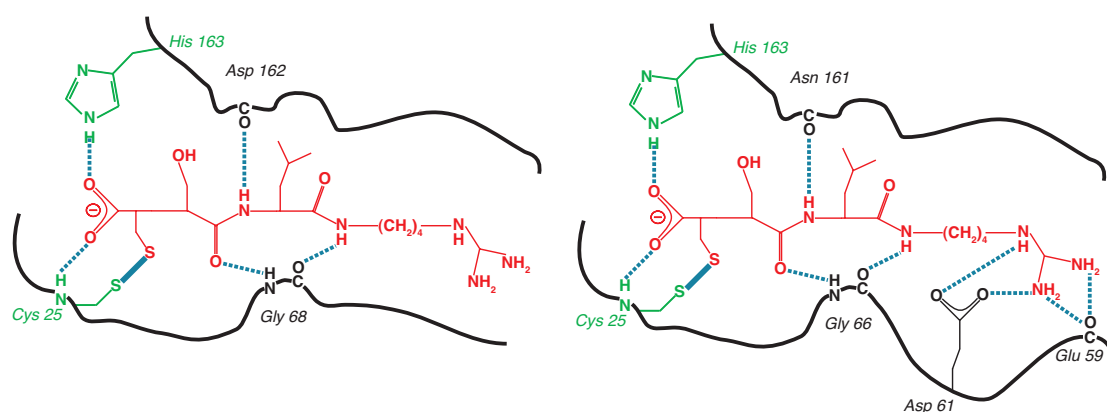


Fig 4. Diade catalytique de cystéine peptidases et l'inhibiteur E64.

Schématisation de deux centres catalytiques de cystéine peptidases, la cathepsine L (gauche) et K (droite). Les cystéines (résidus catalytiques) et les histidines (échangeurs de protons) des deux diades ont été représentées en vert. L'E64 (rouge) inhibe les cystéine peptidases en formant un pont disulfure avec la cystéine catalytique. L'interaction l'inhibiteur avec le centre catalytique est renforcée par des ponts hydrogènes. L'affinité de l'E64 pour les cystéine peptidases varie en fonction du nombre de ponts hydrogènes établis.

Modifié à partir de Matsumoto, K. 1999²⁶.

Toutefois, le sulfhydryle peut aussi être irréversiblement modifié par des inhibiteurs de sérine peptidases comme le PMSF et des dérivés chlorométhyle-cétones (ex : AAF-CMK)^{27,28}. Les thréonine peptidases forment le dernier groupe d'hydrolases dont le mécanisme implique la formation d'un intermédiaire acyle-enzyme. Pour ces dernières, qui chez les eucaryotes ne sont représentées que par les sous-unités catalytiques du protéasome, il n'y a besoin ni d'aspartate ni même d'histidine (§ II.3.3).

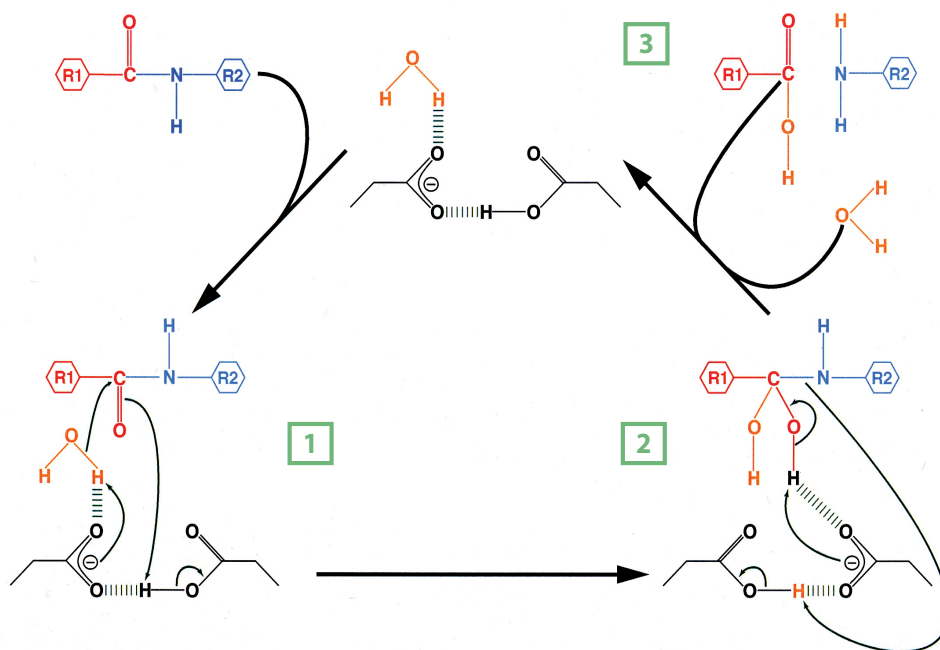


Fig 5a. Hydrolyse d'un lien peptidique par les aspartyl peptidases.

Dans ce mode d'hydrolyse, le carbonyle du lien peptidique fait l'objet d'une attaque nucléophile unique (1) menée par l'eau donnant lieu à la formation d'un intermédiaire tétraédrique (2). Très instable, la dissociation de celui-ci, permet la libération en une seule étape des extrémités NH et CO du lien peptidique (3). L'espace laissé vacant suite à l'élimination des produits de l'hydrolyse est ré-investi par une molécule d'eau, restaurant l'état initial de l'enzyme.

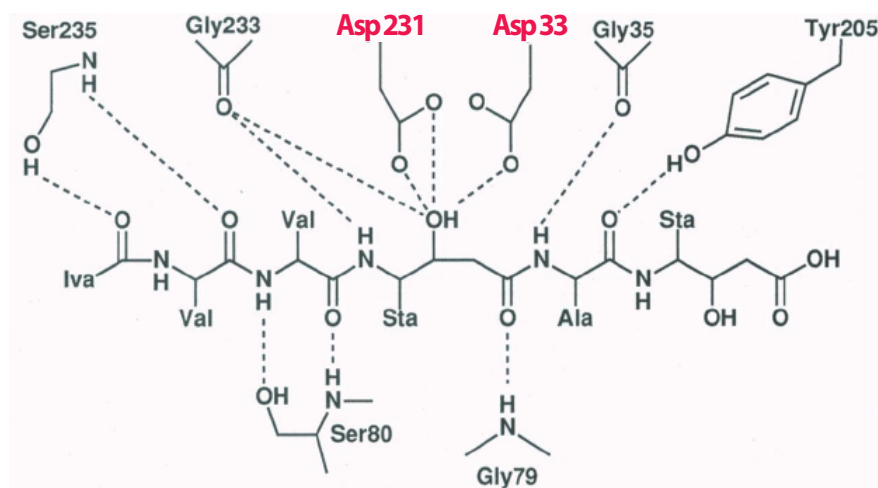


Fig 5b. Inhibition des aspartyl peptidases par la pepstatine A.

Le groupe hydroxyle central prend la place de la molécule d'eau qui, dans la forme native de l'enzyme, interagit avec- et est activée par- les deux aspartates du centre catalytique. Bien que non-covalent, son interaction avec le centre catalytique est cependant renforcée par la formation de ponts hydrogènes. *Reproduit de Baldwin, E. 1993.*²⁹

1.2.2. Enzymes dépourvues d'acide aminé catalytique

Cela concerne les aspartyl peptidases et métallopeptidases. Pour ces peptidases, comme ce n'est pas un acide aminé catalytique qui réalise l'attaque nucléophile du carbonyle du lien peptidique, il n'y a donc pas d'étape intermédiaire acyle-enzyme au cours de la réaction.

- Les aspartyl peptidases

Le centre catalytique des aspartyl peptidases est caractérisé par la présence de deux aspartates dont les chaînes latérales sont séparées d'environ 3 Å, ce qui permet d'accueillir et d'activer une molécule d'eau (**Figure 5a**). Les aspartates sont, dans le clan principal des aspartyl peptidases (clan AA), présents dans un motif consensus Hy-Hy-**D**-T/S-G-T/S/A (Hy pour acide aminé hydrophobe), présent en double exemplaire dans les aspartyl peptidases à la suite d'une duplication génique³⁰. Les aspartyl peptidases sont inhibées par un composé naturel isolé de bactéries *Actinomyces*, la pepstatine A (**Figure 5b**). Cet inhibiteur non-covalent est un analogue de substrat^{29,31}. Parmi les aspartyl peptidases, citons la peptide-signal peptidase (PSP), dégradant le peptide signal clivé par la signal-peptidase (SP) au cours de la synthèse des protéines transmembranaires de type I. Citons aussi les présénilines (PSEN) impliquées notamment dans la biogenèse des peptides β -amyloïdes accumulés dans la maladie d'Alzheimer. Appartenant à un clan particulier d'aspartyl peptidases (le clan AD), ces peptidases comportent un autre motif consensus G-Hy-G-**D**-Hy. Le fonctionnement de ces deux peptidases constitua durant longtemps une énigme car leur activité hydrolytique s'exerçait au niveau des feuillettes lipidiques membranaires³². Une des différences entre ces deux peptidases est l'orientation des polypeptides transmembranaires qu'elles ciblent. PSP cible les peptides dont l'extrémité N-terminale est orientée du côté cytosolique alors que PSEN cible les peptides dont le C-ter est orienté au niveau cytosolique. Cette différence de sélectivité de substrats s'explique par l'orientation des hélices transmembranaires formant le centre catalytique³³.

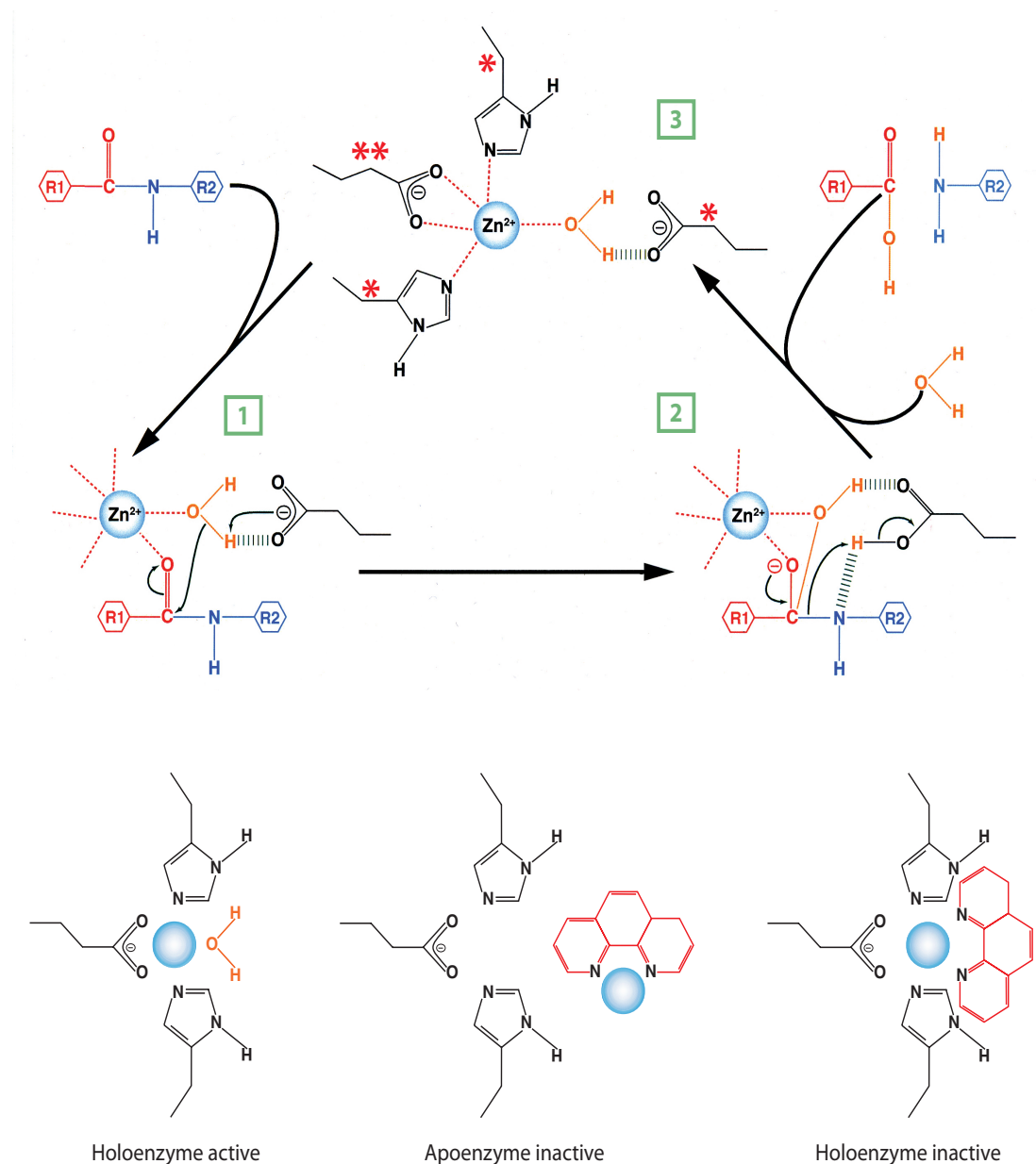


Fig 6. Hydrolyse d'un lien peptidique par les métallopeptidases.

Le carbonyle du lien peptidique fait l'objet d'une attaque nucléophile unique (1) menée par l'eau donnant lieu à la formation d'un intermédiaire tétrahédrique (2). Très instable, la dissociation de celui-ci permet la libération en une seule étape des extrémités NH et CO du lien peptidique (3). L'espace laissé vacant suite à l'élimination des produits de l'hydrolyse est ré-investi par une molécule d'eau, restaurant l'état initial de l'enzyme. Les résidus du motif consensus HEXXH des métallopeptidases sont indiqués par une simple astérisque alors que le résidu distant de chélation (glutamate) est indiqué par une double astérisque.

La partie inférieure de la figure représente l'orthophénanthroline, un inhibiteur à large spectre des métallopeptidases. Il est communément considéré que l'orthophénanthroline (chélateur de cations bivalents) modifie la peptidase en apoenzyme. Toutefois, certains suggèrent que l'orthophénanthroline et le zinc l'inhibiteur puissent cohabiter dans le centre catalytique. Dans les deux cas, l'eau n'est pas maintenue dans le centre catalytique. Le premier scénario (apoenzyme inactive) est soutenu par des expériences utilisant l'orthophénanthroline comme agent de titration. Le second scénario (holoenzyme inactive) est soutenu par des expériences de cristallographies montrant la présence du zinc au sein du centre catalytique.

- Les métallopeptidases

Il existe au moins deux caractéristiques communes aux métallopeptidases. La première est la présence au sein du coeur catalytique d'un ion métallique, le plus souvent du zinc (Zn^{2+}) chez les eucaryotes (**Figure 6**). La seconde caractéristique commune est la présence, au niveau de la structure primaire de la peptidase, d'une séquence consensus de fixation du Zn^{2+} . Cette séquence comprend deux histidines (H) et un glutamate (E) qui se présentent dans un motif HEXXH (X étant n'importe quel acide aminé). Certaines peptidases comme la leucine-aminopeptidase (LAP) possèdent un double centre de fixation du Zn^{2+} . Dans ce cas, on considère que le premier active l'eau tandis que le second distant de 3 Å, est un motif d'interaction avec le NH_2 des peptides ciblés et déterminerait l'activité mono-aminopeptidase de LAP^{34,35}. Certaines métallopeptidases, comme l'insulin-degrading enzyme (§ I.4.2), possèdent une séquence consensus inversée, HXXEH. C'est la raison pour laquelle de telles peptidases sont souvent appelées *inverzincines* par opposition aux *zincines* HEXXH³⁶. L'influence d'un motif *inverzincine* sur l'activité enzymatique est inconnue mais une étude ayant pour but de « designer » des inhibiteurs spécifiques de l'IDE, montre que la majorité des dérivés hydroxamates non-peptidiques synthétisés affectaient les *zincines* testées mais pas l'IDE³⁷. La présence d'un atome de zinc au niveau du centre catalytique explique que les inhibiteurs les plus couramment utilisés soient des chélateurs de zinc tels que l'EDTA ou l'orthophénanthroline (**Figure 6**). A des pH proches de 7, l'orthophénanthroline n'est capable que de cibler le Zn^{2+} . L'EDTA, à ces mêmes pH, cible aussi le Ca^{2+} et Mg^{2+} qui sont des cofacteurs enzymatiques utilisés par bon nombre d'enzymes. Son utilisation dans la détermination du type mécanistique d'une peptidase est une source de biais non-négligeable.

I.3. Classifications officielles

Le dégradome représente l'ensemble des gènes codant des peptidases ou homologues de celles-ci dépourvues d'acides aminés clés à l'activité peptidasique³⁸. Avec ses 569 gènes, le dégradome humain ne représente pas moins de 2% du génome mais selon les espèces ce pourcentage fluctue entre 2 et 4%¹. A l'heure actuelle, deux classifications sont acceptées. La première est la classification officielle des protéines à activité enzymatique qui attribue un numéro EC (Enzyme Commission number) aux peptidases ayant fait l'objet d'une caractérisation relativement avancée. Elle tient à la fois compte du type de substrats dégradés par l'enzyme et du type mécanistique de l'enzyme (**Figure 7**).

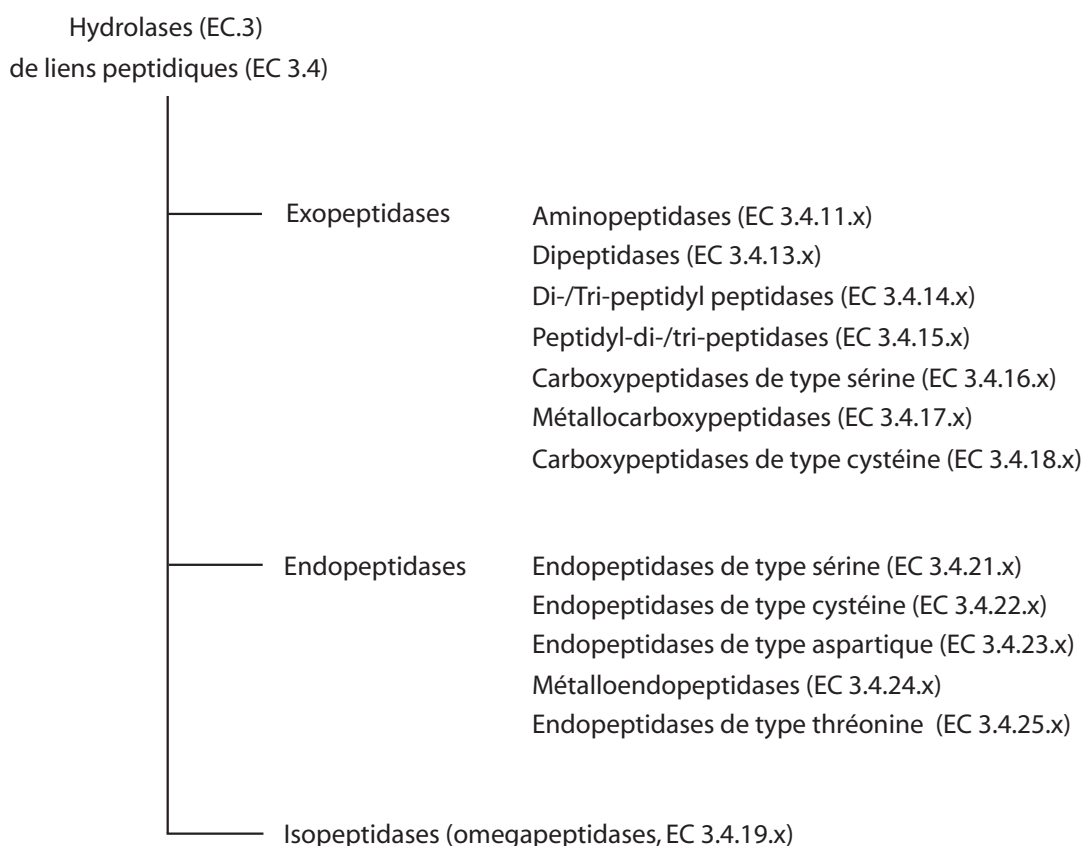


Fig 7. Classification officielle des enzymes protéolytiques

La classification EC (Enzyme Commission number) attribue un code de 4 nombres aux peptidases ayant fait l'objet d'une caractérisation jugée satisfaisante. <http://www.brenda-enzymes.org>

La seconde classification est celle de la banque de données MEROPS proposée par Rawlings et Barrett à partir des années nonante³⁹. Cette classification est basée sur le

degré d'homologie entre deux peptidases. Les peptidases sont associées à des familles qui sont elles mêmes associées à des clans. Deux peptidases sont associées à une même famille lorsque leurs séquences primaires sont partiellement homologues. Deux peptidases de familles différentes appartiennent à un même clan lorsque les structures tertiaires de leurs centres catalytiques sont semblables. Néanmoins, si la structure tertiaire n'est pas connue, une peptidase est associée à un clan lorsque la séquence primaire de son site catalytique est relativement homologue à celles de peptidases de ce clan. Grâce aux programmes de séquençages de génomes, la banque MEROPS contient actuellement plus de 140.000 séquences potentielles provenant de plusieurs espèces parmi lesquelles seules 3.200 correspondent à des protéines pour lesquelles l'activité peptidasique a été démontrée. Elles sont réparties en 208 familles qui elles-mêmes sont regroupées en 52 clans ³⁹. En plus d'être la banque de données la plus complète, cette classification en familles/clans permet de prédire quels pourraient être les substrats et inhibiteurs d'une peptidase encore peu caractérisée.

I.4. Insulysin, insulinase, Insulin-degrading enzyme, IDE

I.4.1. Historique

Fin des années quarante, étudiant la biodisponibilité de l'insuline, Mirsky met en évidence que, rapidement après sa libération dans le sang, l'hormone est détruite principalement au niveau du foie et du rein par un procédé enzymatique qu'il nomme *insulin-inactivating system* ⁴⁰. L'insuline est éliminée par voie endosomale après activation de son récepteur spécifique ⁴¹⁻⁴³. Parallèlement, Duckworth identifie une peptidase cytosolique responsable de l'essentiel de l'activité insulinase d'homogénats de foies ⁴⁴⁻⁴⁶.

Initialement baptisée *neutral insulinase* ⁴⁶, en opposition à *acidic insulinase* caractérisant l'élimination endosomale de l'insuline ⁴⁷⁻⁴⁹, l'enzyme est ensuite appelée *Insulin-degrading enzyme (IDE)* ⁵⁰. Rien ne remet en cause que l'insuline soit le meilleur substrat naturel de l'IDE. Cependant, que l'insuline soit physiologiquement détruite par l'IDE est une extrapolation des capacités enzymatiques de l'IDE sujette à

polémiques depuis 30 ans ; *substrat naturel* et *fonction naturelle* sont deux caractéristiques bien distinctes.

I.4.2. Expression de l'IDE

L'IDE (EC 3.4.22.11) fait partie de la famille des inverzincines (M16) appartenant au clan ME. Ce clan se distingue dans l'évolution par le fait que le motif de fixation du zinc est inversé (HEXXH) par rapport à celui de la plupart des métallopeptidases (HXXEH)⁵¹. On la retrouve notamment chez le rat (95% d'homologie avec la forme humaine)⁵²⁻⁴⁶, la souris (95%)⁵³, mais aussi chez la drosophile (45%)⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁶, les nématodes (39%)⁵⁶, la levure (SteY23p, 35%) et les plantes (39%)⁵⁷. Ces formes ont des caractéristiques structurales et fonctionnelles très semblables à celles de la forme humaine⁵⁸⁻⁶². L'identification d'une enzyme semblable (24% d'identité) dans le périplasme d'*E. coli*, la pitrilylsine (PTR, chef de file de la famille M16), témoigne du haut degré de conservation du gène au cours de l'évolution^{36,63,64} (**Figure 8**).

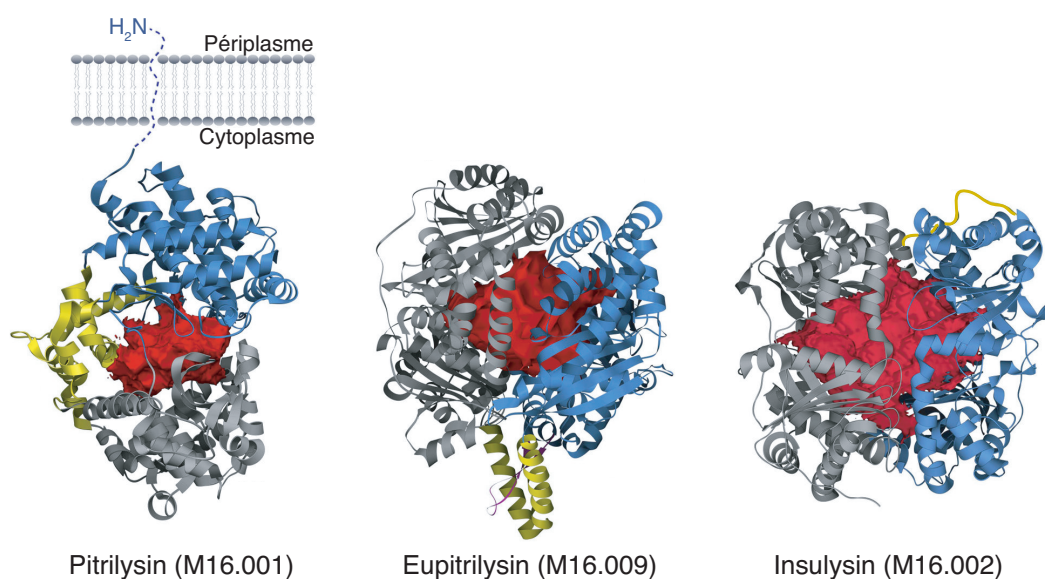


Fig 8. Représentation de la structure tridimensionnelle de 3 inverzincines (conformation fermée).

De gauche à droite sont représentées, la pritrilysine d'*E. coli* (M16.001), l'eupitrilysine (PreP, M16.009) et l'insulin-degrading enzyme (IDE, M16.002). Les domaines N-ter (bleus) comportent le centre catalytique. Les domaines C-ter (gris) comportent le domaine d'interaction avec le substrat. En jaune, la zone charnière permettant aux enzymes de pivoter entre la conformation fermée (active) et ouverte (inactive). Le volume d'acceptation, lorsque l'enzyme est en conformation fermée, a été représenté en rouge.

Reproduit de Malito E. 2008.⁶⁵

Bien que distantes dans l'évolution, PTR et IDE partagent un certain nombre de substrats et ont des profils d'inhibition relativement proches⁶³. Toutefois, au contraire de l'IDE, PTR n'existe que sous la forme monomérique et est insensible aux agents modifiant les cystéines comme le NEM (N-éthylmaléimide)⁶⁶⁻⁷⁰.

Chez les mammifères, l'IDE est exprimée de façon ubiquitaire au niveau de tissus sains ou tumoraux⁷¹⁻⁷³. Le gène codant l'IDE est situé sur le chromosome 10 (10q20-q25) chez l'homme et sur le chromosome 1 chez le rat^{53,74}, deux chromosomes ayant été associés à un risque génétique de développement d'un diabète de type 2⁷⁴⁻⁷⁶ et de la maladie d'Alzheimer^{77,78}. L'IDE est certes ubiquitaire mais son niveau d'expression diffère selon les types cellulaires. Le cerveau et les testicules expriment les plus hauts niveaux d'IDE alors que paradoxalement, les tissus sensibles à l'insuline ou responsables de sa destruction comme le foie, le rein, les muscles et la peau expriment des niveaux beaucoup plus modérés⁷². Toutefois, les niveaux d'expression varient au cours du développement de l'embryon (diminution pour les muscles et la peau, augmentation pour le cerveau et les testicules)⁷¹. L'identification de différents transcrits pourrait expliquer ces différences de niveaux d'expression. Des études chez le rat ont montré qu'en plus des transcrits ubiquitaires de 3,7 et 5,5 kb, le testicule exprimait deux autres transcrits de 4,1 (le plus abondant) et de 6,1 kb⁵². Ces deux derniers transcrits sont surexprimés durant la période de différenciation des spermatozoïdes (14 à 28 jours après la naissance), suggérant une implication de l'IDE dans la différenciation cellulaire^{52,54}. Des facteurs régulant la transcription de l'IDE pourraient eux-aussi, contribuer à ces différences de niveaux d'expression (§ 1.4.5). Bien que le promoteur de l'IDE ne soit pas clairement caractérisé, on considère qu'il est essentiellement de type « CpG, » ce qui est en concordance avec l'expression constitutive de l'enzyme par l'ensemble des tissus⁷⁹.

1.4.3. Distribution subcellulaire de l'IDE

Une littérature aussi foisonnante que divergente traite de la localisation de l'IDE. La question est d'un intérêt particulier car lorsque les divergences concernent les cellules principalement en charge de l'élimination de l'insuline, c'est le rôle physiologique principal de l'IDE qui devient polémique^{80 81 82} (§ 1.4.6). Ces divergences peuvent

s'expliquer par la diversité à la fois des types cellulaires étudiés et des techniques utilisées. Toutefois, personne ne conteste que l'IDE soit, majoritairement et avant tout, une enzyme cytosolique (85-95% de l'IDE totale) ⁸³. L'autre localisation incontestée de l'IDE est la matrice des peroxysomes qui en contient la plus forte concentration (5% de l'IDE totale) ^{80,84-86}. L'association de l'IDE au peroxysome est déterminée par la présence, à l'extrémité C-terminale, d'un motif d'interaction PTS1 (peroxysome targeting sequence 1) avec la péroxine 5 ⁸⁷. La mutation de cette séquence (L1019V) abroge la localisation péroxisomale de l'IDE mais cela n'altère ni l'activité de l'enzyme ni la destruction intracellulaire de l'insuline ⁸⁵. Dans les cellules musculaires ou d'hépatome, l'IDE peut former des hétéromères, entre autres avec une protéine de 70 kDa ^{84,88}. Cette association n'est possible qu'au niveau du cytosol de sorte qu'il est proposé que cette protéine, non-identifiée à ce jour, influencerait la répartition de l'IDE entre le cytosol et le péroxysome ⁸³.

En marge de ces deux localisations ubiquitaires et principales, l'IDE peut avoir des localisations complémentaires, d'apparences histospécifiques, qui restent inexpliquées pour la plupart.

- La membrane plasmique :

On retrouve systématiquement de l'IDE associée à la membrane plasmique des neurones (non différenciés) tant chez l'homme que chez les rongeurs ⁸⁹⁻⁹¹. Cette localisation est également observée au niveau de l'endothélium cérébrovasculaire (pôle basolatéral) et des plexi choroïdes (pôle apical) ; des localisations compatibles avec l'élimination des peptides β -amyloïdes ^{92,93}. Cette localisation membranaire a aussi été observée au niveau de cellules musculaires squelettiques ⁹⁴ et des acini pancréatiques ⁹⁵. Concernant les neurones, l'IDE membranaire est associée au feuillet externe de la membrane plasmique ^{96,97}. L'IDE ne possédant pas de séquence-signal potentielle et n'ayant jamais été détectée dans la voie de sécrétion, cette association reste mystérieuse ^{90,91}. L'IDE serait préférentiellement associée aux microdomaines rafts malgré qu'elle ne soit ni modifiée par un palmitoyle ni par un GPI (glucosyl-phosphatidyl-inositol) ⁸⁹.

- L'espace extracellulaire :

L'IDE peut être sécrétée par des lignées de cellules microgliales et neuronales ainsi que par les plexi choroïdes^{90,98,99}. Ceci est en accord avec sa présence dans le liquide céphalorachidien ou son association aux plaques séniles extracellulaires des patients souffrant d'Alzheimer et de souris transgéniques surproduisant le peptide β -amyloïde¹⁰⁰⁻¹⁰². En plus d'être sécrétée sous forme libre, l'IDE serait aussi associée à des exosomes produits par des lignées neuronales et microgliales à la suite du recyclage de la forme membranaire¹⁰³⁻¹⁰⁵.

- La mitochondrie :

Si les localisations membranaires et extracellulaires s'observent mais ne s'expliquent pas, l'inverse est vrai pour la localisation mitochondriale. L'ARNm de l'IDE contient deux sites d'initiation de la traduction (ATG₁ et ATG₁₂₃) situés dans une même phase de lecture. L'expression forcée à partir de ATG₁₂₃, produit une IDE active dans la matrice mitochondriale^{79,106}. L'ATG₁₂₃ n'étant cependant pas dans un motif kozakien favorable, cela explique pourquoi cette forme n'est quasiment pas détectable lorsque l'expression de l'IDE est constitutive^{106,107}.

- Le noyau :

Dans des extraits de prostates de rats, il a été montré que l'IDE était présente au niveau du cytosol mais aussi au niveau du noyau¹⁰⁸. Sa surexpression serait associée non seulement à une augmentation quasi proportionnelle de la dégradation de l'insuline ainsi qu'à une diminution de la prolifération cellulaire⁹⁷.

- Les endosomes :

La localisation « talon d'Achille » de l'IDE. L'association endosomale de l'IDE n'a été observée qu'au niveau de neurones et cellules microgliales¹⁰³⁻¹⁰⁵. En ce qui concerne les types cellulaires responsables de l'élimination physiologique de l'insuline, à savoir les hépatocytes et cellules épithéliales rénales, la majorité des études concluent à l'absence de l'IDE dans les endosomes. Les fractionnements subcellulaires de foies de rats de Kirschner établissent que les fractions cytosoliques

et MLP (contenant notamment des péroxysomes et lysosomes) contiennent respectivement 82% et 17% de l'IDE ¹⁰⁹. Avec l'immunoélectromicroscopie comme approche complémentaire, Morita montre les mêmes résultats et Akiyama ne démontre rien de différent à l'aide des deux mêmes approches plus une troisième, l'ELISA en sandwich ^{86,110}. Shii montre que l'insuline ne s'associe à l'IDE qu'au niveau du cytosol ^{111,112}. Citons aussi Kuo qui, à l'aide de transfectants, montre par microscopie confocale et immunoelectromicroscopie que l'IDE n'est présente que dans le cytosol et les péroxysomes ¹¹³. En fin de compte, seul le binôme Hamel-Duckworth a eu la chance d'observer de l'IDE dans des endosomes isolés de foies de rats perfusés avec de l'insuline radioactive ^{114,115}. Fawcett a lui aussi identifié de l'IDE par Western blot au niveau d'endosomes isolés de la zone corticale du rein ¹¹⁶. Cependant, la faible quantité détectée pourrait correspondre à une contamination soit par le cytosol (faible activité LDH détectable dans la préparation), les peroxysomes (non vérifiée), ou encore de l'IDE cytosolique adsorbée sur le feuillet limitant des endosomes (non vérifié) ¹¹⁶. Par ailleurs, le profil de la dégradation de l'insuline par ces extraits ¹¹⁶ différerait de celui de l'IDE ^{59,60,117}. L'autophagie peut aussi être à l'origine d'une interprétation biaisée d'une forme endosomale de l'IDE. Kuo, par immunoélectromicroscopie observe que l'IDE peut être associée à des vésicules (peu nombreuses), ressemblant à de larges endosomes au contenu hétérogène comportant de la catalase (marqueur peroxysomal) ¹¹³. Il ne s'agirait donc pas d'IDE endosomale à proprement parler mais d'IDE peroxysomale recrutée au sein d'un (endo)lysosome par pexophagie (autophagie des peroxysome, § II.2.3) ^{113,118}.

1.4.4. Substrats naturels, spécificité, sélectivité et mécanisme de l'IDE

Substrats naturels :

La purification de l'activité responsable de l'inactivation cellulaire de l'insuline mènera à l'identification de l'IDE, une des rares peptidases cellulaires capable de dégrader cette hormone. Si le nombre de substrats naturels de l'IDE n'a cessé de croître durant ces trente dernières années, l'insuline reste de loin le meilleur. Le Km de l'IDE pour l'insuline varie entre 20 et 120 nM selon les niveaux de pureté des préparations ^{46,119}. A l'image de la dégradation endosomale de l'insuline, l'IDE cible un nombre restreint de liens peptidiques préférentiellement localisés au sein de la

chaîne B (**Figure 14.B**)^{60,117,119-121}. Par ailleurs, bien que la proinsuline ne soit pas un bon substrat de l'IDE, elle est un efficace compétiteur de la dégradation de l'insuline^{46,119}. Avec l'insuline, les peptides β -amyloïdes ($A\beta$) sont les deux autres substrats phares de l'IDE. Deux d'entre eux, $A\beta$ 1–40 et $A\beta$ 1–42 que l'on retrouve associés aux plaques séniles dans les cerveaux des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, sont efficacement dégradés par l'IDE¹²²⁻¹²⁴. Le glucagon est aussi un bon substrat de l'IDE^{119,125,126} mais au contraire de l'insuline ou des peptides $A\beta$, on considère que son élimination naturelle ne dépend pas de l'IDE mais de la cathepsine B¹²⁷. Toutefois, l'IDE pourrait convertir le glucagon en mini-glucagons 18-29 et 19-29, deux antagonistes de la pompe membranaire à Ca^{2+} (Mg-dependent Ca-ATPase) des hépatocytes, respectivement 100 et 1000 fois plus puissants que le glucagon 1-29¹²⁸¹²⁹. Si la relevance physiologique des mini-glucagons a pu être établie, le rôle de convertase de l'IDE dans leur production reste à établir¹³⁰.

L'IDE dégrade aussi une série de peptides naturels tels que l'IGF-II (insulin-like growth factor)¹³¹⁻¹³³, les peptides natriurétiques¹³⁴, l'amyline^{135,136} (**Figure 14b**). Alors que le transforming growth factor- α (TGF- α) est un bon substrat, l'épithelial growth factor (EGF), qui lui est relativement homologue et pour lequel l'IDE a une bonne affinité, ne l'est pas (k_d : 10^{-9} M (TGF α), 10^{-7} M (insuline), 10^{-6} M (EGF))¹³⁷⁻¹³⁹. Plus récemment, l'ubiquitine¹⁴⁰ qui pendant longtemps a été considérée en tant que « simple » modulateur allostérique^{141,142}, et les chimiokines MIP-1 α et -1 β (pour Macrophage inflammatory proteins 1)¹⁴³ sont venus compléter la liste des substrats de l'IDE.

En plus des substrats cités ci-dessus, l'IDE est aussi en mesure de dégrader des protéines, une capacité peu fréquente pour une peptidase cytosolique. Elle dégrade notamment les formes endommagées par oxydation du lysozyme, de l'hémoglobine et ainsi que la BSA (albumine bovine sérique)^{86,144-146}.

Spécificité des clivages :

L'étude des motifs ciblés par l'enzyme dans ses différents substrats naturels semblait montrer que l'enzyme clivait préférentiellement en aval de résidus basiques (surtout Arg) ou hydrophobes encombrants (Phé, Tyr)^{59,80,147-149}.

Substrats naturels de l'IDE ^a	Structures amyloïdes naturelles ^b	Références
A β ₁₋₄₀ A β ₁₋₄₂	Plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer	Kurochkin, I. 1994 ^a Irvine, G. 2008 ^b Tycko, R. 2003 ^b
Insuline iatrogène	Dépôts amyloïdes dans les sites d'injection	Duckworth, W. 1972 ^a Storkel, S. 1983 ^b Shikama, Y. 2010 ^b
Amyline	Dépôts cytotoxiques dans les îlots de Langerhans	Bennett, R. 2000 ^a Engel, M. 2008 ^b Khemtemourian, L. 2008 ^b
Calcitonine	Dépôts dans le carcinome médullaire de la thyroïde	Kirschner, R. 1983 ^a Sletten, S. 1976 ^b Kamihira, S. 2000 ^b
ANP	Dépôts amyloïdes séniles altérant la conduction cardiaque	Muller, D. 1992 ^a Johansson, B. 1987 ^b Rocken, C. 2002 ^b
MIP-1	Polymères hélicoïdaux activateurs de polymorphonucléaires	Ren, M. 2010 ^a Graham, G. 1994 ^b
Glucagon	Structures amyloïdes dans les solutions iatrogènes	Duckworth, W. 1975 ^a Andersen, C. 2010 ^b Ghodke, S. 2011 ^b

Fig 9. Amyloïdogénicité des substrats comme critère de sélection de l'IDE.

Certains substrats naturels de l'IDE ^a peuvent naturellement former des structures amyloïdes dans certaines conditions physiologiques et physiopathologiques ^b. N.B. Dans le cas du glucagon, les structures amyloïdes n'ont pas été observées in vivo mais après la resuspension de glucagon thérapeutique lyophilisé.

Abréviations : A β (peptide b-amyloïde), ANP (atrial natriuretic peptide), MIP-1 (Macrophage inflammatory proteins 1).

Plus récemment, une analyse combinatoire d'une banque de peptides de séquences aléatoires a conclu que ce n'est pas tant le résidu en amont du clivage qui semble déterminant mais plutôt les premier et second acides aminés en aval ³⁷. De plus, malgré la différence minime entre les peptides Aβ40 et Aβ42, l'IDE ne cible pas les mêmes liens peptidiques au sein de ces deux substrats ¹⁵⁰. En conclusion, on considère que l'IDE n'a pas de spécificité apparente. Si ce n'est pas rare, c'est toutefois aux antipodes de la nardilysine, une autre inverzincine (46% d'identité avec l'IDE). En effet la nardilysine cible spécifiquement des liens peptidiques du côté NH d'une Arginine formant un motif dibasique avec une lysine (d'où son nom) ¹⁵¹⁻¹⁵³.

Sélectivité des substrats :

A partir de l'enzymologie, la sélectivité de l'IDE ne semble guère plus évidente que sa spécificité. En effet, l'IDE a une bonne affinité pour des substrats différant tant par leurs séquences que leurs structures alors qu'elle est paradoxalement incapable de cliver des peptides naturels pourtant très semblables à certains de ses substrats (l'IGF-II mais pas l'IGF-I, le TGF-α mais pas l'EGF, le glucagon mais pas le Glucagon-like peptide I, MIP-1β bien moins efficacement que MIP-1α) ^{82,132,134,135,143,154-156}. Toutefois, l'amyloïdogénicité semble être une caractéristique partagée par beaucoup des substrats de l'enzyme (**Figure 9**). Les peptides Aβ40 et Aβ42 s'accumulent dans les plaques séniles observées dans la maladie d'Alzheimer ¹⁵⁷. Les fibrilles amyloïdes d'insuline iatrogène se forment au niveau du site d'injection des patients diabétiques ¹⁵⁸. Les dépôts amyloïdes du peptide natriurétique auriculaire (ANP) retrouvés chez plus de 80% des personnes de plus de 80 ans sont associés à des troubles de la conduction cardiaque entraînant la fibrillation auriculaire ^{159,160}. L'une des caractéristiques des patients souffrant de diabète est la formation de structures amyloïdes d'amyline aux niveau des îlots de Langerhans qui contribuent à la destruction de cellules α ^{135,137,161}.

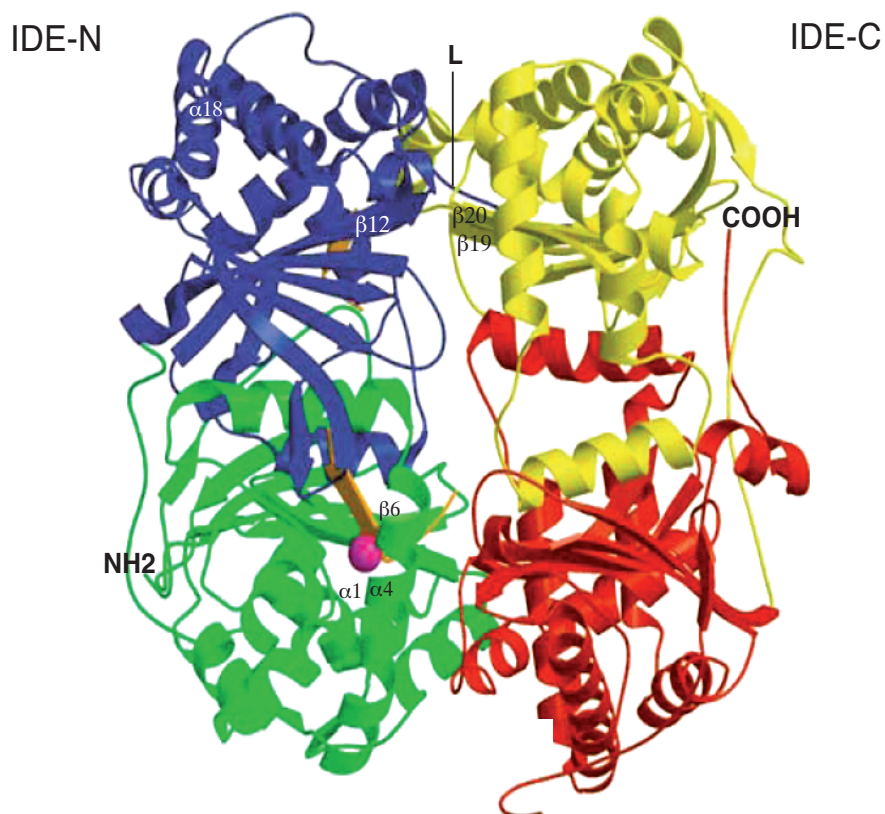


Fig 10a. Structure tridimensionnelle du monomère de l'IDE associé à l'insuline.

L'IDE se divise en 4 domaines (du N-ter au C-ter) : D1 (vert, 284 résidus), D2 (bleu, 243), D3 (jaune, 243), D4 (rouge, 246). D1 s'associe à D2 en formant un sandwich $\alpha\beta\alpha\beta$ (IDE-N) et D3 et D4 s'associent de la même façon (IDE-C). IDE-N et IDE-C sont reliés par une boucle (L) de 28 résidus entre les hélices $\alpha18$ (domaine D2) et $\alpha19$ (domaine D3) qui est masquée dans cette vue par les feuillets $\beta19$ et 20 . Le centre catalytique est formé par les hélices $\alpha1$ et $\alpha4$ du domaine D1. L'insuline et le zinc sont respectivement représentés en orange et magenta. Les cristaux de complexes IDE-substrats (ici avec l'insuline) montrent que les substrats établissent 2 feuillets β avec l'enzyme. Le premier, au niveau du centre catalytique, est formé entre les résidus 13-20 de la chaîne B de l'insuline et le feuillet $\beta6$ de l'IDE. Le second, au niveau d'un exosite, est formé entre les 5 résidus N-ter de la chaîne B de l'insuline et le feuillet $\beta12$ du domaine D2 de l'IDE. Modifié à partir de Shen Y. 2006⁶².

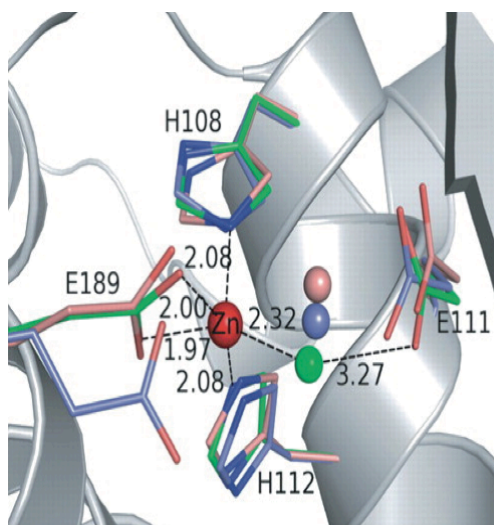


Fig 10b. Centre catalytique de l'IDE.

Le motif canonique inverzincine ($H_{108}XXE_{111}H_{112}$) est présent sur l'hélice $\alpha1$. Le zinc est chélaté par les deux histidines du motif canonique et un glutamate (E189) de l'hélice $\alpha4$. Le glutamate (E111) du motif canonique attire le proton d'une molécule d'eau maintenue au sein du centre catalytique par le Zn^{2+} . Les résidus clés du centre catalytique de l'IDE humaine (vert) ont été superposés à ceux d'autres membres de la famille M16 tels que la pitrylysine d'E. coli (saumon), eupitrylysine de levure (bleu). Les nombres indiquent les distances (Å) des ponts hydrogènes. L'eau responsable de l'attaque nucléophile est représentée par trois sphères. Reproduit de Im H. 2007¹⁶².

De même, on retrouve aussi des fibrilles amyloïdes de calcitonine associées au carcinome médullaire de la thyroïde ^{163,164}. La relation entre la sélectivité de substrats de l'IDE et leur propension à former des fibrilles amyloïdes fut proposée par Kurochkin ¹⁶⁵. Les motifs cruciaux à l'interaction de l'insuline (résidus 24-26) et des peptides A β (résidus 17-24) avec l'IDE sont aussi ceux permettant *in vitro* la formation d'oligomères ^{166,167}. C'est aussi le cas des chimiokines MIP-1 α et -1 β qui s'associent (de façon réversible) en polymères hélicoïdaux pour recruter et activer les polymorphonucléaires ^{143,168}. Cependant, si les sites de clivages de l'IDE couvrent quasi toute la séquence de MIP, aucun n'est observé au sein des motifs critiques à la formation de polymères actifs ^{143,169}. Par ailleurs, l'IDE clive efficacement des peptides a priori non-amyloïdogènes notamment la β -endorphine et des peptides dérivés de la dynorphine ¹⁴⁷.

Structure et mécanisme réactionnel de l'IDE

L'IDE, au même titre que la nardilysine et l'eupitrylsine (autres peptidases ayant fait l'objet d'un intérêt dans notre travail), est qualifiée d'inverzincine en raison de l'inversion du motif d'interaction avec le zinc (HxxEH) ^{51,170-172}. Le motif consensus de l'IDE a été identifié par mutagénèse dirigée (H108, E111, H112) ^{36 173}. Les deux His du motif consensus sont deux des trois résidus chélatant le Zn, le troisième étant plus éloigné dans la séquence primaire (E189) (**Figure 10b**). En conditions dénaturantes, le poids moléculaire de l'IDE est d'environ 110-115 kDa tandis qu'en condition native, celui-ci oscille entre 115 et 400 kDa, suggérant que l'IDE peut former des oligomères ^{109,174}. L'influence de l'état d'oligomérisation de l'IDE semble dépendre des substrats digérés. Ainsi pour des petits substrats (substrats fluorogéniques, chaîne B de l'insuline), on observe que la forme monomérique est la plus active alors que l'état d'oligomérisation n'a aucune influence sur la dégradation de l'insuline ou du peptide A β ¹⁷⁵. Sur base de sa séquence primaire, l'IDE peut être divisée en 4 domaines ayant un degré d'homologie d'environ 20% (**Figure 10a**). La protéinase K ou la trypsine digère l'IDE en 2 fragments (de 55kDa) stables, IDE-N et IDE-C, reliés par une boucle (ciblées par les peptidases) ^{176,177}. La digestion limitée de l'IDE montre que l'IDE-N reste essentiellement monomérique alors que l'IDE-C (acides aminés 542-1019) forme des oligomères.

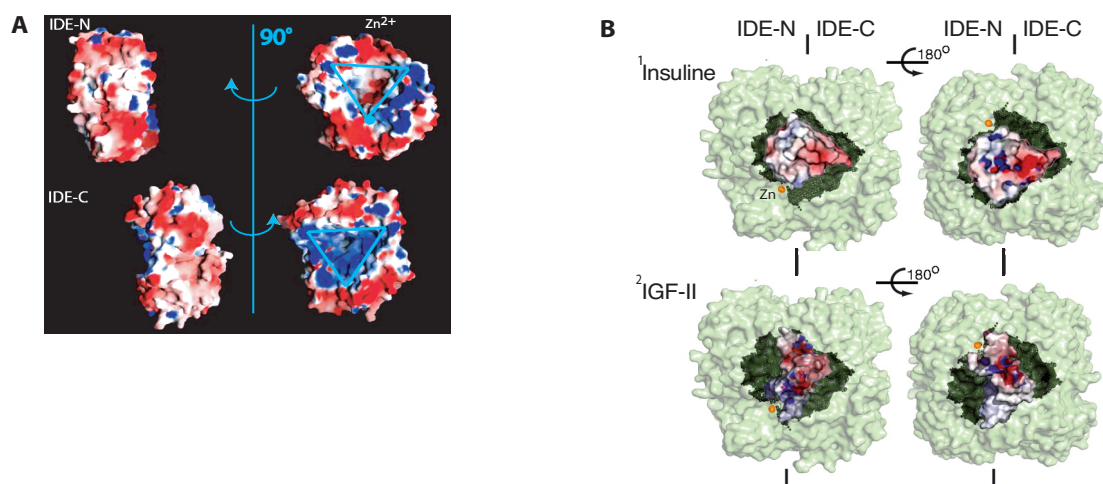


Figure 11. Interaction de l'IDE avec ses substrats, représentation des surfaces électrostatiques.

(A) L'association des domaines IDE-N et IDE-C délimite une cavité ($1.3-1.6 \times 10^4 \text{ \AA}^3$) s'apparentant à un prisme à bases triangulaires (triangles cyans). Dans la vue interne du domaine IDE-N, la position du Zn (disques cyans). La surface interne du domaine IDE-N (catalytique) est relativement chargée négativement (rouge) tandis que la surface interne du domaine IDE-C est clairement chargée positivement (bleu). Reproduit de Shen, Y. 2006 ⁶².

(B) Occupation de la chambre interne de l'IDE (conformation fermée) par deux substrats (l'insuline¹ et l'IGF-II²). L'orientation des substrats au sein de la cavité interne de l'IDE est déterminée par la complémentarité de charges entre les substrats et les surfaces internes des domaines IDE-N et IDE-C.

Reproduit de : (1) Manolopoulou, M. 2009 ¹⁷⁸ et (2) Guo, Q. 2009 ¹³¹.

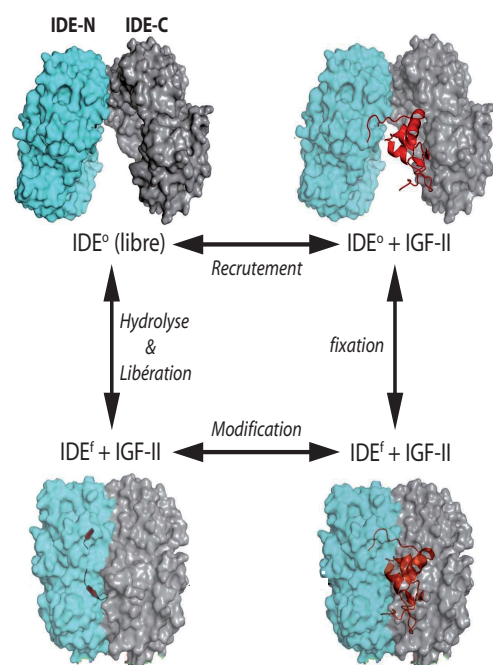


Figure 12. Mécanisme réactionnel de l'IDE.

Les domaines IDE-N (cyan) et IDE-C (gris) sont reliés par une boucle (non représentée sur ce schéma). Selon leurs interactions, l'enzyme adopte une conformation ouverte (IDEo) ou fermée (IDEf). La conformation IDEo permet le recrutement du substrat (ici IGF-II). La cavité interne du domaine IDE-C, chargée positivement, oriente le substrat de manière à interagir avec les charges négatives de ce dernier. L'interaction induit une modification conformationnelle de l'enzyme (IDEo à IDEf). La conformation IDEf permet l'interaction du substrat avec le domaine IDE-N (catalytique). Le substrat subit alors des modifications conformationnelles partielles permettant une interaction enzyme-substrat favorable à l'activité protéolytique ; un feuillet β au niveau de l'exosite (partie supérieure de IDE-N) et un autre avec le centre catalytique (partie inférieure de IDE-N). Les produits sont libérés lorsqu'ils ne favorisent plus la conformation fermée. Modifié de Guo Q. 2009 ¹³¹.

On considère que IDE-C facilite l'interaction du substrat avec le site catalytique de l'IDE-N ainsi que l'oligomérisation de l'enzyme ¹⁷⁶. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse des premiers cristaux de l'enzyme obtenus en présence de différents substrats ⁶². L'IDE peut avoir une conformation soit ouverte (réceptive aux substrats mais inactive), soit fermée, (active) (**Figure 12**). Lorsque le substrat interagit avec le domaine IDE-C, une modification allostérique se produit, promouvant la conformation fermée de l'enzyme. Ce faisant, le substrat se retrouve pris en sandwich dans une cavité de 13000-16000 Å³ formée par les surfaces internes des domaines IDE-C et IDE-N respectivement chargés relativement négativement et positivement (**Figure 11**). A ce niveau deux critères entrent en jeu pour la sélection des substrats. Dans un premier temps, l'IDE exclurait tout substrat de taille significativement supérieure à l'insuline (6 kDa). Les formes oxydées du lysozyme et de l'hémoglobine étant dégradées par l'IDE, cela montre que la conformation fermée n'est pas *sine qua non* à l'activité l'IDE. Dans un second temps, les surfaces internes des 2 domaines de l'IDE sélectionneraient des substrats ayant une répartition bipolaire de leurs charges (**Figure 11**). Ainsi malgré leurs homologues respectives au glucagon, à l'IGF-II et à l'ANP, les résidus basiques C-terminaux du GLP-1 (glucagon-like peptide 1), de l'IGF-I et du BNP induiraient une répulsion électrostatique par le domaine IDE-C globalement chargé positivement ⁶². Au niveau du domaine IDE-N, les cristallographies montrent qu'excepté l'ubiquitine, les substrats de bonne affinité doivent former 2 feuillets β avec l'enzyme : un avec le site catalytique et l'autre avec un exosite situé à quelques 30 Å du premier (**Figures 10,13 et 14**) ^{62,131,140,143,171,178}. La taille des substrats, à nouveau, influencerait la sélectivité de l'IDE. Les deux feuillets β engagent chacun 4 à 6 résidus (**Figure 14B**). De plus, selon les substrats, 4 à 14 résidus couvriraient les 30 Å séparant les 2 sites d'interaction ⁶² (**Figure 14B**). Arithmétiquement, les substrats de l'IDE devraient en moyenne comporter plus de 15 résidus. L'enzymologie apporte une fois encore un bémol aux critères de sélection dérivés de la cristallographie puisque l'IDE dégrade la bradikynine (9 aa), des dérivés de la β -endorphine (8 à 5 aa), ou un peptide fluorogénique (9 résidus) ^{147,176,177}. Par ailleurs, les Km de l'IDE pour la somatostatine (14 aa) et pour le peptide A β 1-40 (41 aa) ne sont guère différents (7,5 et 2,5 μ M) ^{179,180}.

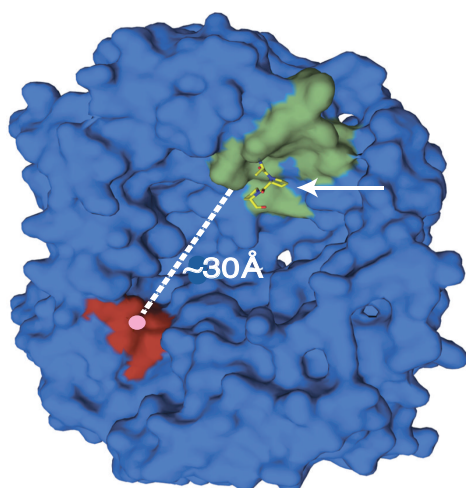


Fig 13. Exosite du domaine IDE-N.

Il s'agit d'une représentation de la surface interne (bleu) du domaine de l'IDE N reconstituée à partir de la cristallographie de l'IDE en complexe avec la bradykinine. Les surfaces d'interactions du site catalytique et de l'exosite ont été représentées en rouge et en vert. La sphère rose symbolise l'ion de Zinc. Les sticks jaunes représentent les résidus de la bradykinine interagissant avec l'exosite. La flèche indique la position des 3 résidus N-terminaux (Ala-Pro-Pro) de la bradykinine. Modifié de Malito, E. 2008 ¹⁷¹.

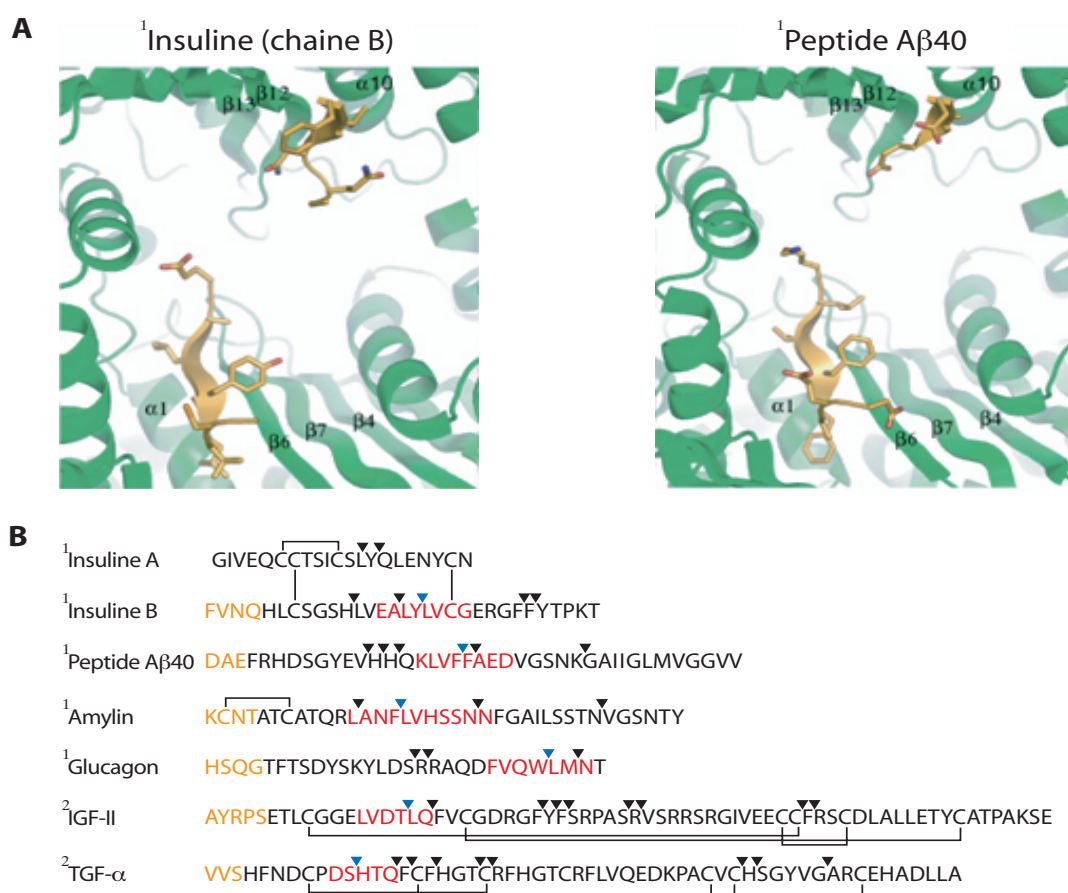


Fig 14. Interaction de l'IDE-N avec ses substrats.

L'étude cristallographique de 6 complexes IDE-substrat permet d'identifier clairement deux segments de ces substrats du domaine IDE-N. Malgré la nature différente des substrats, les deux segments interagissent similairement avec l'enzyme. **(A)** Deux complexes, IDE-insuline et IDE-Aβ40 ont été représentés (IDE : vert, substrat : ocre). Le premier segment, fait face au centre catalytique (hélice α1) et forme un feuillet β avec le feuillet β6 de l'enzyme. Le second est situé à environ 30 Å du centre catalytique et forme feuillet β avec le feuillet β12 de l'enzyme (exosite). **(B)** Ces segments ont été représentés au sein de la séquence primaire de 6 substrats de l'IDE (rouge : interaction avec le site catalytique, orange : interaction avec l'exosite). Les triangles représentent les sites de clivage principaux (bleu) et secondaires (noir) et les accolades entre deux cystéines représentent des ponts disulfures.

Modifié (1) de Shen, Y. 2006 ⁶² et (2) de Guo, Q. 2009 ¹³¹.

Selon Malito, les petits substrats devraient être présents au nombre de deux pour interagir simultanément l'exosite et le site catalytique ¹⁷¹. Cette hypothèse est soutenue par des résultats montrant que de petits oligopeptides (non dégradés par l'IDE) augmenteraient l'affinité et *in fine* le taux de destruction d'autres alors qu'ils diminueraient la conversion des substrats plus volumineux ¹⁷¹. Cependant, cela ne semble pas aussi simple. Alors que de petits peptides comme la dynorphine ou la somatostatine diminuent bien l'affinité et la destruction de l'insuline, ils sont sans effet sur la dégradation du peptide Aβ1-40 ¹⁷⁵.

1.4.5. Régulations de l'IDE

Régulation de l'expression

La régulation transcriptionnelle de l'IDE est peu documentée. Toutefois, il semblerait que la signalisation insulinique augmenterait l'expression de l'IDE (ARNm, protéine) par l'activation de la pi3K/Akt ¹⁸¹. Le promoteur de l'IDE contiendrait une séquence *cis*-activatrice dépendante du facteur PPARγ (peroxysome proliferator activated receptor γ) qui est activé par la pi3K/Akt ¹⁸². Par ailleurs, dans certains tissus, le niveau de l'IDE est corrélé à la prolifération cellulaire ^{108,183}. Ces conclusions ont été obtenues à partir de l'étude de l'expression et de l'activité de l'IDE chez des rats castrés (apoptose de l'utérus et de la prostate) puis traités avec des oestrogènes (augmentation de la masse de l'utérus) ou de la testostérone (augmentation de la masse de la prostate). L'implication des stéroïdes dans l'expression de l'IDE sera confirmée au niveau des femelles non traitées qui montrent un niveau d'expression et d'activité élevés en phase proestrus et très faible en phase metestrus ¹⁰⁸. Plus récemment, un nouveau type de transcrite de l'IDE a été mis en évidence. Alors que les précédents correspondaient à différentes longueurs de la partie 3'UTR (untranslated region), celui-ci correspond à splicing alternatif de l'exon 15 ⁷⁹. L'IDE produite (15B) est inactive mais elle peut former un hétérodimère (15A-15B) ayant une activité inférieure à l'homodimère (15A-15A).

Inhibiteurs naturels :

In vitro, en plus des ions modulateurs de son activité tels le magnésium et le manganèse, il a été montré que l'IDE pouvait être associée à de potentiels inhibiteurs naturels. Mirsky rapportait déjà en 1955 qu'un inhibiteur de l'activité "insulinase" pouvait être extrait à partir d'homogénats de foies bovins ¹⁸⁴. Un inhibiteur (ou plusieurs) de 67 à 120 kDa a (ont) été isolé(s) à partir de muscles squelettiques ou de foies de rat et inhibai(en)t l'activité insulinase de façon non compétitive ¹⁸⁵. Un autre inhibiteur (entre 3,5 et 15 kDa) a aussi été identifié à partir de foies de rats mais celui-ci inhibait l'enzyme de façon compétitive ¹⁸⁰. Des études plus précises ont ensuite montré qu'il s'agissait d'une petite protéine de 11-14 kDa partiellement associée à l'IDE au niveau du cytosol ^{142,186}. A ce jour, on ignore jusqu'à la séquence primaire de ces inhibiteurs. Saric a isolé un autre inhibiteur de plus faible poids moléculaire (environ 6 kDa) et qui, après séquençage, se révéla être l'ubiquitine ^{141,142}. En plus de diminuer l'affinité et la dégradation de l'insuline par l'IDE, l'ubiquitine modifie le pattern de clivages. Durant la mitose, l'IDE s'associe à la nestine et la vimentine lorsque ces constituants majeurs des filaments intermédiaires se désassemblent (après phosphorylation de la vimentine). L'association de l'IDE à l'un de ces deux partenaires (nestine ou vimentine phosphorylée) augmente sa capacité de dégradation de l'insuline tandis qu'elle diminue celle d'un peptide fluorogénique (9 résidus) dérivé de la bradykinine ¹⁸⁷.

L'ATP :

A partir d'IDE érythrocytaire humaine (purifiée 41000 fois), Kirschner a montré que l'ATP n'affectait pas la dégradation de l'insuline ¹⁰⁹. Similairement, Fagan, étudiant l'élimination érythrocytaire des protéines endommagées par stress oxydatif, a conclu que l'ATP n'influencait pas non plus la dégradation de l'hémoglobine oxydée par l'IDE ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. A l'inverse, Camberos avec de l'IDE purifiée (10000 fois) à partir de muscles de rats, montrait que l'ATP, et dans une moindre mesure d'autres nucléotides (ADP, GTP) ainsi que le PPi, diminuait à la fois l'affinité de l'IDE pour l'insuline et sa dégradation ^{188,189}. L'inhibition requérait la présence de Mn^{2+} et Mg^{2+} , cations ayant respectivement pour effet de prolonger et d'augmenter l'activité enzymatique ^{174,180}. Selon Song, l'effet de l'ATP semblerait dépendre des substrats puisqu'il augmente la conversion de petits substrats naturels comme la dynorphine et ce en

toute indifférence du Mg ou du Mn ¹⁹⁰. En plus d'une capacité de fixation de l'ATP, l'IDE serait capable de l'hydrolyser, ce qui annihilerait l'effet inhibiteur du nucléotide sur la dégradation de l'insuline. L'ATP induirait une modification conformationnelle de l'IDE diminuant, d'une part la proportion d'homodimères ^{189 190} et favorisant d'autre part la conformation ouverte de l'enzyme requise à la prise en charge des substrats ¹⁶². Yao observait aussi un effet activateur de l'ATP (ou autres composés triphosphatés) pour la conversion d'un peptide fluorogénique mais au contraire de Song, il n'y aurait pas de modification de l'état d'oligomérisation de l'IDE ¹⁹¹. A l'inverse de l'ATP, le stress oxydatif augmente le niveau d'oligomérisation de l'IDE, favorise et stabilise la conformation fermée (ponts dissulfures entre les domaines N et C de l'enzyme), inhibant la dégradation des peptides A β et de l'insuline ^{192,193}.

1.4.6. Fonctions naturelles de l'IDE

Inactivation et destruction de l'insuline

« *L'insulin-degrading enzyme est la principale enzyme responsable de la dégradation et de l'inactivation de l'insuline* ». C'est là le rôle physiologique le plus souvent associé à l'IDE depuis 30 ans ^{194,195}. Que l'IDE soit présente au sein des compartiments associés à la dégradation de l'insuline, voilà qui ne serait qu'un *minimum minimorum* pour lui prêter une telle fonction physiologique. L'endosome est le principal compartiment de la destruction de l'insuline ^{41,47,49}. Ce même compartiment, au niveau des hépatocytes, de l'épithélium rénal et des muscles (principaux sites d'extraction de l'insuline), est exempt d'IDE (§ I.4.3). Par ailleurs, le pH optimal de l'IDE est de 7-7,5 alors que celui de l'élimination endosomale de l'insuline est de 4,5-6 ^{47-49,94}; pH auquel l'IDE est inactive ¹⁷⁴. Pourtant, un certain nombre d'évidences plaident en faveur d'un rôle de l'IDE dans l'élimination physiologique de l'insuline. Enzymatiquement, l'insuline est **LE** meilleur substrat de l'IDE et peu de peptidases sont en mesure de dégrader l'insuline ^{46,174,196}. L'IDE purifiée, **dans les conditions testées**, serait la principale activité insulinase cellulaire ^{46,186}. Le profil d'inhibition (à l'aide d'inhibiteurs non-spécifiques comme le NEM et la bacitracine) de la dégradation de l'insuline par l'IDE purifiée est similaire à celui de l'élimination l'insuline par les hépatocytes et cellules rénales ^{116,197,198}. Cependant

le NEM inhibe, entre autres choses, la pompe à protons ¹⁹⁹ et la bacitracine induit la séquestration des endosomes ²⁰⁰. De ce fait la sensibilité de la dégradation cellulaire de l'insuline à ces deux agents témoignerait peut-être tout simplement de l'implication des endosomes et non de l'IDE. La microinjection d'un anticorps spécifique et inactivateur de l'IDE dans une lignée d'hépatome diminue le taux de destruction intracellulaire de l'insuline ¹¹². Cependant cette étude conclut aussi qu'après une protéolyse limitée dans l'endosome (par l'hypothétique IDE endosomale), l'insuline serait transférée (par un tout aussi hypothétique transporteur) dans le cytosol où elle serait dégradée par l'IDE. De façon complémentaire, la surexpression de l'IDE a pour effet d'accroître l'élimination de l'insuline ^{97,201} alors que la surexpression d'une isoforme non fonctionnelle (suite à un splicing alternatif de l'exon 15) a l'effet opposé ⁷⁹. Les souris n'exprimant pas le gène de l'IDE ont une insulinémie plus élevée en plus d'une intolérance au glucose ²⁰². Des résultats semblables sont observés au niveau de la souche de rats Goto-Kakizaki (GK) ⁷⁷. Ces rats intolérants au glucose (modèle d'étude du diabète de type 2) expriment une forme de l'IDE doublement substituée (H18R and A890V) qui est 30% moins active que celle produite par les rats congéniques normoglycémiques ⁷⁴. La région 10q (comprenant le gène l'IDE) est un facteur de risque de développement d'un diabète de type 2 ²⁰³. Certains SNP (single nucleotide polymorphism) de la zone chromosomique de l'IDE ont pu être associés à une hyperinsulinémie mais aucun cependant n'étaient associés à une intolérance au glucose ²⁰⁴.

La cathepsine D est l'un des rares concurrents de l'IDE pour la dégradation physiologique de l'insuline ²⁰⁵. Au contraire de la cathepsine B, une cystéine peptidase critique à la dégradation du glucagon mais pas de l'insuline, la cathepsine D est une aspartyl peptidase ¹²⁷. Comme l'IDE, la cathepsine D interagit et cible des liens peptidiques dans la chaîne B de l'insuline, concordant avec les clivages observés dans les endosomes ^{205,206}. Au contraire de l'IDE, elle est principalement localisée dans les endosomes et est active dans une gamme de pH similaire à celle de la destruction cellulaire de l'insuline ^{47,205 47 205}. Au contraire de l'immunodéplétion de l'IDE, celle de la cathepsine D abroge l'activité insulinase d'extraits d'endosomes ²⁰⁵. L'inhibition du taux de destruction intracellulaire de l'insuline est d'environ 15% avec un traitement à l'orthophénanthroline (ciblant les métallopeptidases), alors

qu'elle est quasi complète avec un traitement à la peptistatine A (ciblant les aspartyl peptidases)²⁰⁵.

Pour conclure, l'IDE pourrait dégrader très efficacement l'insuline *in vitro* et jouer un rôle important dans son élimination physiologique qui serait paradoxalement non-protéolytique. L'insuline est principalement éliminée au sein des endosomes qui ne contiennent pas d'IDE. Toutefois, l'IDE étant principalement dans le cytosol, elle pourrait faire partie d'un châssis moléculaire se formant au feuillet limitant d'endosomes contenant de l'insuline. Sa présence aurait une influence négative indirecte sur la stabilité intracellulaire de l'insuline en modulant son trafic vésiculaire. Cette hypothèse n'a toutefois pas encore été investiguée ni même évoquée mais on sait déjà que l'IDE interagit avec l'ubiquitine et la vimentine, deux protéines impliquées notamment dans le trafic et la maturation des endosomes^{142,207}.

Clairance du peptide β -amyloïde et maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une neurodégénérescence caractérisée par la formation de plaques extracellulaires riches en peptides β -amyloïdes ($A\beta$) et de fibres intracellulaires de formes hyperphosphorylées de la protéine Tau²⁰⁸⁻²¹¹. Par défaut, la maturation de la protéine APP est initiée par une activité α -sécrétase assurée par la métallopeptidase ADAM-10 (a desintegrin and metallopeptidases) activée à la membrane plasmique (par ADAM-12 ou -15)^{212,213} (**Figure 15**). Dans la maturation amyloïdogène, l'activité α -sécrétase est concurrencée par une activité β -sécrétase impliquant l'aspartyl peptidase BACE (β -site APP cleaving enzyme) active dans le golgi et les endosomes^{214,215}. Dans les deux voies de maturation, la dernière étape (γ -secretase), est effectuée par un complexe protéique transmembranaire impliquant les aspartyl peptidases préséniline 1 ou 2²¹⁶.

Les peptides sécrétés par le couple α -/ γ -secretases sont solubles et rapidement éliminés. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, cette voie entre en compétition avec la voie amyloïdogène impliquant le couple β -/ γ -secretases. Cette voie mène à la libération notamment des peptides amyloïdes A β 42 (le plus amyloïdogène) et A β 40 (moins amyloïdogène mais 10 fois plus présent que A β 42) qui s'accumulent dans le parenchyme cérébral et se déposent au niveau des vaisseaux sanguins ²¹⁷. Deux formes de maladies d'Alzheimer (AD) existent, la forme familiale héréditaire précoce (2% des AD) et la forme sporadique tardive (la plus fréquente). Les formes précoces et héréditaires (FAD, familial AD) sont dues à des mutations de la protéine APP (25 mutations connues) ou des presenilines (160) augmentant la sécrétion des formes A β 40 et A β 42 et/ou du ratio A β 42/A β 40 ^{216,218}. Les origines des formes sporadiques (LOAD, late onset AD) sont très variées et les différents polymorphismes considérés comme facteurs de risques mènent généralement à un déséquilibre entre la production des A β s et de leur dégradation locale et/ou de leur élimination par les voies hématoencéphalique et céphalorachidienne ^{208,219}.

Les peptides A β 40 et A β 42 ainsi que le variant flamand A β 40Q sont efficacement dégradés par l'IDE *in vitro* et au niveau de milieux cellulaires contenant de l'IDE ^{90,98,99,122-124}. Paradoxalement, les immunomarquages de l'IDE au sein des plaques séniles seraient plus intenses dans des cerveaux AD que dans les cerveaux contrôles ^{100,220}. Certains proposent qu'en plus de dégrader les peptides A β , l'IDE limiterait la formation d'oligomères à la manière d'une chaperonne ²²¹. D'autres proposent que les peptides A β augmenteraient la synthèse et la sécrétion d'IDE par les astrocytes mais qu'ils induiraient en plus une modulation allostérique inactivatrice de l'enzyme ^{101,220}. En plus de l'espace extracellulaire, une partie de la production du peptide A β 42 peut avoir lieu dans la voie de sécrétion. Les protéines produites dans le RER qui sont mal repliées ou amyloïdogéniques (ex: 75% de la production naturelle de l'amyline) sont éliminées au niveau du cytosol par la voie ERAD (ER-associated protein degradation). D'ordinaire, l'élimination de tels substrats dépend du protéasome et de l'autophagie ²²²⁻²²⁴ mais dans le cas présent, c'est l'IDE et le protéasome qui représentent les deux voies d'élimination du peptide A β 42 ²²⁵.

Les principaux arguments permettant de suggérer une implication naturelle de l'IDE dans la destruction des peptides A β viennent des modèles animaux de rats GK et de souris déficientes en IDE ^{77,202}. Comparée à la fraction membranaire d'extraits

cérébraux des souris IDE^{+/+}, celle de souris IDE^{-/-} a une capacité de dégradation des peptides Aβ40 et Aβ42 diminuée de moitié ²⁰². Il en est de même au niveau des surnageants de culture primaire de neurones corticaux. Les souris IDE^{-/-} montrent une accumulation cérébrale du peptide Aβ40 endogène (+ 64 %), une accumulation comparable à celle observée chez les souris n'exprimant pas la neprilysine (NEP^{-/-}) ^{202,226}. De façon moins spectaculaire, les cultures primaires de neurones ou fibroblastes du rat GK dégradent elles aussi moins efficacement l'insuline et le peptide Aβ40 ⁷⁷. Toutefois, le niveau des peptides Aβ40 et Aβ42 endogènes des cerveaux GK n'était pas affecté, ce qui s'expliquerait par une compensation du déficit fonctionnel partiel de l'IDE par d'autres peptidases comme la néprilysine ou l'endothelin-converting enzyme ^{77,226}. Bien que l'on ne sache clairement les effets du peptide intracellulaire AICD libéré la γ-secretase, l'IDE et le protéasome représenteraient les deux voies d'élimination de ce peptide ^{227,228}. Le modèle murin montre aussi que la perte d'expression de l'IDE a pour conséquence d'augmenter le niveau de ce peptide ^{202,229}. Chez l'homme, comme pour le diabète de type 2, un polymorphisme dans la région chromosomique q10 est associé à certaines formes de LOAD et a un niveau sérique Aβ42 significativement plus élevé ^{230,231}. Certains considèrent que des variations génétiques de l'IDE (situé dans la zone q10) seraient un facteur de risque de LOAD ^{232,233}. Toutefois, d'autres considèrent que les variations génétiques de la zone q10 situées dans/ou à proximité du gène de l'IDE ne sont pas corrélées à un risque de LOAD ²³⁴⁻²³⁶. Enfin, d'autres considèrent que l'IDE ne serait un facteur de risque que chez les patients LOAD exprimant aussi le variant allélique ε4 de l'apolipoprotéine (50% des LOAD) ²³⁷.

Par ailleurs, l'IDE n'est pas la seule peptidase impliquée dans l'élimination des peptides amyloïdes (**Figure 16**) ²⁰⁸. Les peptides Aβ40 et Aβ42 libérés dans la matrice extracellulaire s'associent en oligomères neurotoxiques. Ces derniers ne sont pas dégradés par l'IDE mais par la neurolysinase, une métalloendopeptidase essentiellement membranaire dégradant aussi les Aβ monomériques ^{99,227,238}. Les plaques dégénératives (colorables au rouge Congo) se forment à partir de l'association fibrillaire de ces oligomères. Au contraire de la métalloprotéinase matricielle MMP9, ni l'IDE ni la néprilysine ne sont capables (*in vitro*) de dégrader ces fibrilles amyloïdes ²³⁹.

En conclusion, la complexité des LOAD peut être caricaturée comme suit : il y a de multiples causes possibles pour une même conséquence, l'accumulation de fibrilles amyloïdes.

Dégradation cytosolique de protéines non-ciblées par le protéasome

Peu de protéases cellulaires sont capables de dégrader des protéines entières. On considère que le protéasome et dans une moindre mesure l'autophagie sont responsables de la protéolyse cellulaire (§ II.4). Lorsqu'il a caractérisé l'activité enzymatique de l'IDE, Fagan a comparé les taux de dégradation de certaines protéines comme l'hémoglobine (66 kDa), la caséine (29 kDa) ou l'albumine bovine (66 kDa) à ceux de peptides comme le glucagon ou la chaîne B de l'insuline, et a conclu que l'IDE n'était pas une protéinase ¹⁴⁶. Avec le même argument, des conclusions similaires pourraient être tirées pour le protéasome tant la dégradation *in vitro* de protéines entières est beaucoup plus fastidieuse que celle de peptides. Etudiant la protéolyse cellulaire en cas de stress oxydatif, Fagan conclut paradoxalement que les protéines endommagées comme l'hémoglobine n'étaient pas dégradées par le protéasome mais par l'IDE ^{144,145}. Des observations similaires ont été faites concernant la dégradation du lysozyme endommagé par oxydation ^{86,240}. D'autres rapports plaident aussi pour un rôle de l'IDE dans la dégradation de substrats cytosoliques incomplètement dégradés (ou non dégradés) par le protéasome ; l'élimination des espèces non sécrétées du peptide A β 42 ²²⁵ et la dégradation du fragment cytosolique (AICD) de la protéine APP ^{202,227,228}.

Régulation de l'activité protéolytique du protéasome

Parmi les fonctions naturelles potentielles de l'IDE, celle qui consiste à réguler l'activité du protéasome n'est certainement pas la plus crédible. Ce mécanisme nécessiterait une interaction tripartite entre l'IDE, le protéasome et l'insuline. L'IDE et le protéasome sont bel et bien principalement localisés dans le cytosol mais ce n'est pas le cas de l'insuline. Il faut noter que tous les papiers plaident pour cette fonction sont signés par le même duo que celui plaident pour un rôle prépondérant de l'IDE dans l'élimination physiologique de l'insuline, Duckworth W. et Hamel G.

L'insuline a pour effet global d'augmenter la masse protéique cellulaire essentiellement en diminuant la protéolyse protéasomale et autophagique ^{139,241-243}. L'hypothèse de la tripartite tire son origine d'essais de purification de l'IDE par immunoaffinité (glucagon) ²⁴⁴. L'électrophorèse (SDS-PAGE) de la fraction comprenant l'activité maximale de dégradation de l'insuline montrait une bande d'environ 100 kDa (IDE) ainsi que quelques bandes de 20-35 kDa (poids moléculaires des sous-unités du protéasome). Cette même fraction comportait une activité de dégradation du précurseur fluorogénique traditionnellement utilisé pour mesurer l'activité chymotryptique du protéasome (Suc-LLVY-amc). *In vitro*, l'IDE diminue l'activité du protéasome lorsqu'elle est en présence de l'insuline et dans une moindre mesure celle de la proinsuline ²⁴⁵. Les activités tryptique et chymotryptique du protéasome diminuent de moitié alors que l'activité caspase et de dégradation de la caséine ne sont quasiment pas affectées. Par le biais d'un anticorps monoclonal de l'IDE, il sera observé *in vitro* et *in vivo* que l'IDE, par son interaction avec l'insuline, diminue la protéolyse cellulaire protéasomale ^{246,247}. En absence d'insuline, l'IDE potentialiserait l'activité du protéasome alors que l'insuline interagissant avec l'IDE dissocierait le complexe IDE-protéasome réduisant l'activité de ce dernier ¹³⁵. Des analogues de l'insuline non-dégradés par l'IDE n'inhibent pas l'activité du protéasome, suggérant que l'inhibition ne serait pas due à une modulation allostérique de l'IDE ¹³⁶. La tripartite potentielle a finalement été étudiée au niveau cellulaire par l'approche spécifique des siRNA ²⁴⁸. La diminution de l'expression de l'IDE diminue le niveau de dégradation des protéines cellulaires (principalement celles ayant une longue demi-vie). Le traitement à l'insuline diminue bien la dégradation protéique mais le niveau d'expression de l'IDE n'a qu'une influence ténue, « écart-typique » ²⁴⁸. Cette fonction de l'IDE reste donc très obscure comme en témoigne l'absence de son évocation dans les revues consacrées au protéasome au cours des 15 dernières années.

Infection du virus VZV

Cette fonction physiologique potentielle de l'IDE est la plus récente. A la différence des autres fonctions potentielles de l'IDE, celle-ci ne concerne pas l'activité protéolytique. L'IDE dans ce cas servirait de récepteur au virus VZV (varicella-zoster virus). Le virus herpes simplex (HSV) comme le VZV expriment des glycoprotéines virales au niveau de leur enveloppe qui ont notamment pour fonction de permettre la

pénétration du virus dans la cellule hôte. Des études avaient montré que la glycoprotéine E (gE) était indispensable à l'entrée du virus dans la cellule hôte et la formation de syncytium ^{249,250}. C'est par immunoaffinité que l'IDE a été identifiée comme ligand de la protéine gE. L'interaction entre le domaine IDE-N et la partie N-terminale de gE (résidus 24-71) induirait une modification allostérique stabilisante de la glycoprotéine E ^{251,252}. Dans des cellules sensibles au VZV, la diminution de l'expression de l'IDE (siRNA) diminue à la fois l'infectivité et la formation du syncytia alors que la transfection de la forme humaine de l'IDE sensibilise des lignée naturellement résistante au VZV comme la lignée CHO (chinese hamster ovary) ⁹⁶. L'IDE membranaire, bien que capable de dégrader l'insuline, n'est pas capable de dégrader gE et l'inhibition de l'IDE n'affecte pas la stabilité de la glycoprotéine ⁹⁶. Le fait que le mutant catalytique (E111Q) interagissait tout aussi efficacement avec la gE que la forme sauvage démontrait une fois encore que l'interaction de l'IDE avec la gE n'impliquait pas l'activité protéolytique de l'enzyme ²⁵².

II. Dégradation des protéines cellulaires

II.1. Recyclage continu des protéines cellulaires

Jusque dans les années quarante, les peptidases ont presque exclusivement été étudiées sous l'angle de la biochimie. Rattacher une activité à une fonction naturelle comme le *métabolisme protéique*, nécessitait des *traceurs* qui jusqu'alors faisaient défaut. En attendant, les fonctions spéculées reposaient sur des paradigmes. Ainsi, on considérait deux mondes protéiques différents ; celui des *protéines alimentaires* et celui des *protéines tissulaires*. Considérées extrêmement instables, les protéines alimentaires étaient supposées être complètement dégradées dans le tractus digestif pour fournir l'énergie requise à l'anabolisme tissulaire ; au vu du caractère exergonique de l'hydrolyse. Malgré l'identification de protéases tissulaires, on considérait que la protéolyse cellulaire était quasi inexistante ; la cellule ayant essentiellement pour fonction d'assurer le maintien constant de la concentration des protéines cellulaires notamment entre deux divisions. Au début des années quarante, la capacité d'isoler des isotopes (stables ou radioactifs) et la possibilité de les incorporer dans des acides aminés permit d'obtenir des traceurs pour l'étude du métabolisme protéique ²⁵³. Rudolf Schoenheimer entreprit de mettre ce concept au banc d'essais en étudiant le devenir de ¹⁵N-tyrosine ingérée par des rats ²⁵⁴. Il observa qu'uniquement 50 % de l'isotope ¹⁵N ingéré se retrouvait dans les excréments, les 50 % étant retenus par l'organisme (le foie majoritairement) et principalement associé aux protéines cellulaires (précipitables TCA). Au niveau de ces protéines, seuls 20% du ¹⁵N était associé au traceur (Tyr), le reste l'était à d'autres acides aminés. Des résultats similaires ont aussi été observés avec un autre traceur, la ¹⁵N-Glycine ²⁵⁵. L'approche scientifique de Schoenheimer permit de démontrer le concept différenciant les protéines alimentaires des protéines cellulaires. D'autre part, cette même étude mit en lumière trois sources d'acides aminés disponibles à la synthèse des protéines cellulaires. Malgré la qualité de l'étude de Schoenheimer, admettre qu'il existait une dégradation constante des protéines cellulaires ne se fit pas sans difficultés notamment parce que cela soulevait une question philosophique ; *Par quel moyen la cellule ferait-elle coexister deux voies antinomiques (synthèse versus dégradation*

*protéique) en évitant tout « non-sens métabolique » ? C'est la notion de **compartimentation** qui permettra de résoudre cette question. La protéolyse cellulaire est essentiellement assumée par l'autophagie et le protéasome qui assurent une compartimentation de la dégradation respectivement subcellulaire et moléculaire.*

II.2. Autophagie

II.2.1. De la protéolyse cellulaire au lysosome :

L'autophagie est intimement liée au lysosome et tous deux sont indiscutablement reliés à l'équipe du professeur Christian de Duve ²⁵⁶.

Les premières techniques de fractionnement laissaient apparaître que le contenu enzymatique des particules subcellulaires était hétérogène. Le recours à une nouvelle méthode de sédimentation plus résolutive (centrifugation zonale), permettra de conclure que l'apparente hétérogénéité du contenu des particules était due à une hétérogénéité de la distribution des particules au sein des différentes fractions. A partir de la fraction des grandes particules (par opposition aux microsomes), on pourra séparer les particules contenant la phosphatase acide des mitochondries ²⁵⁷⁻²⁶⁰. Les particules associées à la phosphatase acide étant également enrichies en hydrolases acides (cathepsines), de Duve les baptisa **lysosomes** ²⁵⁹. Si le confinement des protéases au sein des lysosomes assurait une protéolyse compartimentée, le recrutement des protéines au sein des lysosomes restait énigmatique.

II.2.2. Du lysosome à l'autophagie via le glucagon:

L'accroissement de la sécrétion d'urée par des foies de rats perfusés avec du glucagon démontrait qu'en plus d'être hyperglycémiant, cette hormone augmentait aussi le niveau de la protéolyse cellulaire ²⁶¹. Les fractionnements montraient que le glucagon diminuait le coefficient de sédimentation des particules à hydrolases acides sans modifier pour autant leurs activités globales dans l'homogénat ²⁶².

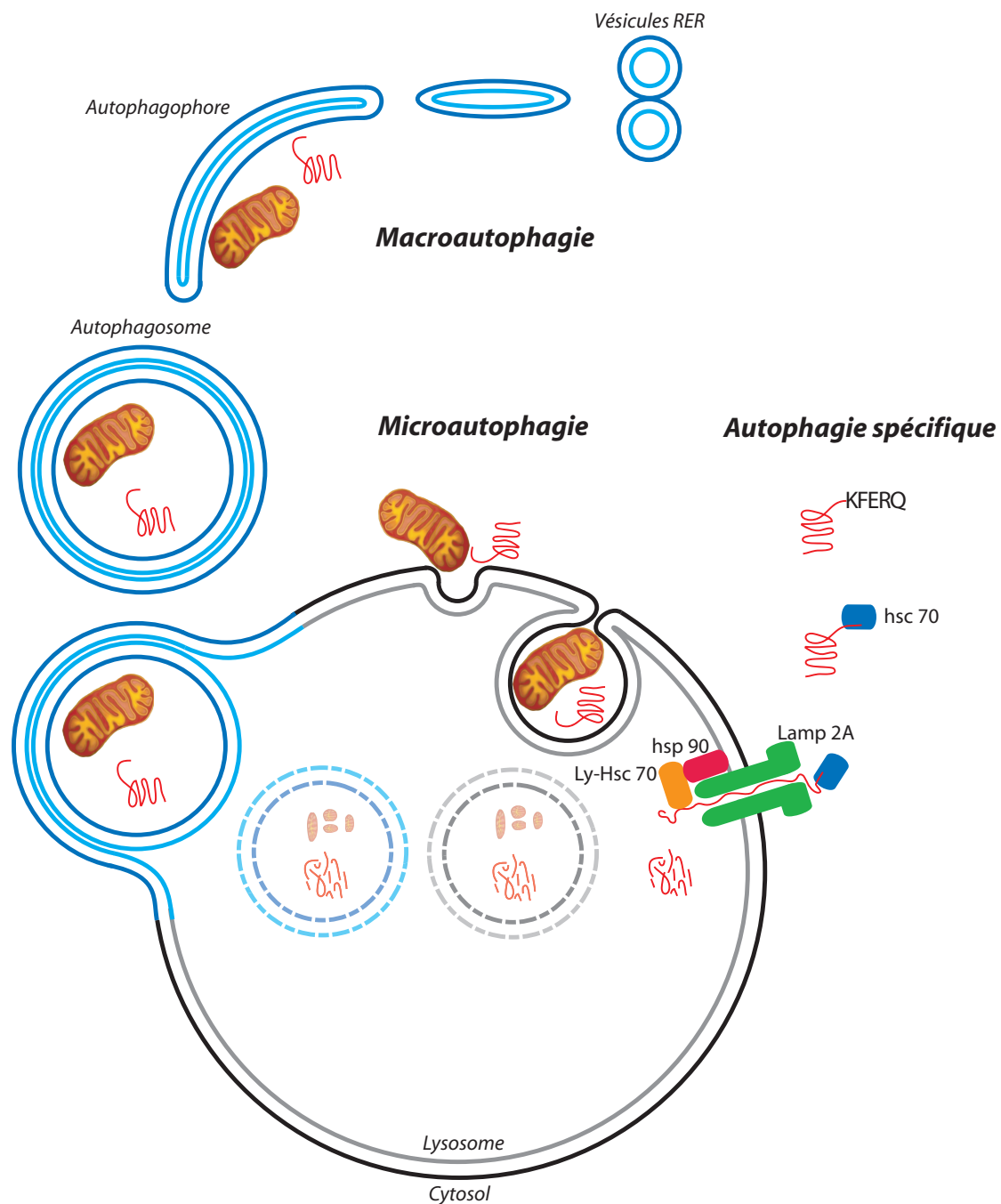


Fig 17. Les trois principaux types d'autophagie.

La macroautophagie est initiée par la séquestration d'une fraction cytoplasmique au sein d'un autophagosome, une vésicule caractérisée par une double membrane. Celle-ci dérive de vésicules réticuliennes fusionnées qui s'étirent autour du matériel à dégrader. La membrane bilipidique externe de l'autophagosome fusionne ensuite avec la membrane du lysosome. La membrane interne de l'autophagosome et son contenu sont alors détruits par les estérases et peptidases lysosomales. **La microautophagie** est une incorporation directe d'une fraction du cytoplasme par invagination de la membrane lysosomale. **L'autophagie spécifique** CMA (chaperone-mediated autophagy) est utilisée pour la destruction de protéines cytosoliques pourvues d'un motif d'interaction avec la chaperone hsc70 à leur extrémité C-terminale (KFERQ). Le complexe s'associe avec d'autres chaperones (non identifiées à ce jour) et interagit avec le transporteur lysosomal Lamp2A assisté par les chaperonne Ly-Hsc 70 et Hsp 90 dans la lumière du lysosome.

Morphologiquement, le glucagon diminue le nombre de petits lysosomes denses et homogènes au profit de particules de plus grandes tailles au contenu moins dense et très hétérogène contenant notamment des mitochondries à différents degrés de délabrement ²⁶³⁻²⁶⁵. Il a été proposé que le glucagon induit un accroissement de la dégradation des protéines cellulaires par un mécanisme impliquant une séquestration initiale d'une portion du cytoplasme (cytosol +/- organites) à l'intérieur d'une vésicule (dénommée plus tard autophagosome) qui par la suite fusionne avec un lysosome pour y être dégradée ^{266,267}. Initialement dénommée *autophagie*, cette protéolyse cellulaire induite par le glucagon a été par la suite rebaptisée *macroautophagie* (Figure 17, et § II.2.3).

II.2.3. Différents modes d'autophagie

Selon le mode de recrutement des substrats (organites et/ou protéines) au sein de la lumière des lysosomes, on distingue trois types d'autophagies : la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie spécifique CMA (chaperone-mediated autophagy) (figure 17).

- La microautophagie :

A ce jour et bien qu'elle n'ait, en plus de 20 ans fait l'objet que de peu de rapports, la microautophagie est considérée (par défaut) comme un mode de dégradation lysosomale basale non-spécifique de fragments du cytoplasme (10-25% des protéines cytoplasmiques) ²⁶⁸⁻²⁷⁰.

A la suite d'un mouvement d'invagination, une partie du cytoplasme est directement mise en contact avec la lumière lysosomale. A ce jour, tant le mécanisme d'invagination que sa régulation restent énigmatiques. Cependant ce mouvement ressemblant à celui de la formation de vésicules internes des MVE (multivesicular endosomes), les protéines ESCRTs (endosomal sorting complex required for transport) pourraient être une piste ²⁷⁰. Cette hypothèse est soutenue par un rapport récent montrant que la microautophagie impliquerait principalement les endosomes tardifs à la différence des deux autres modes qui eux solliciteraient principalement les lysosomes ²⁷¹.

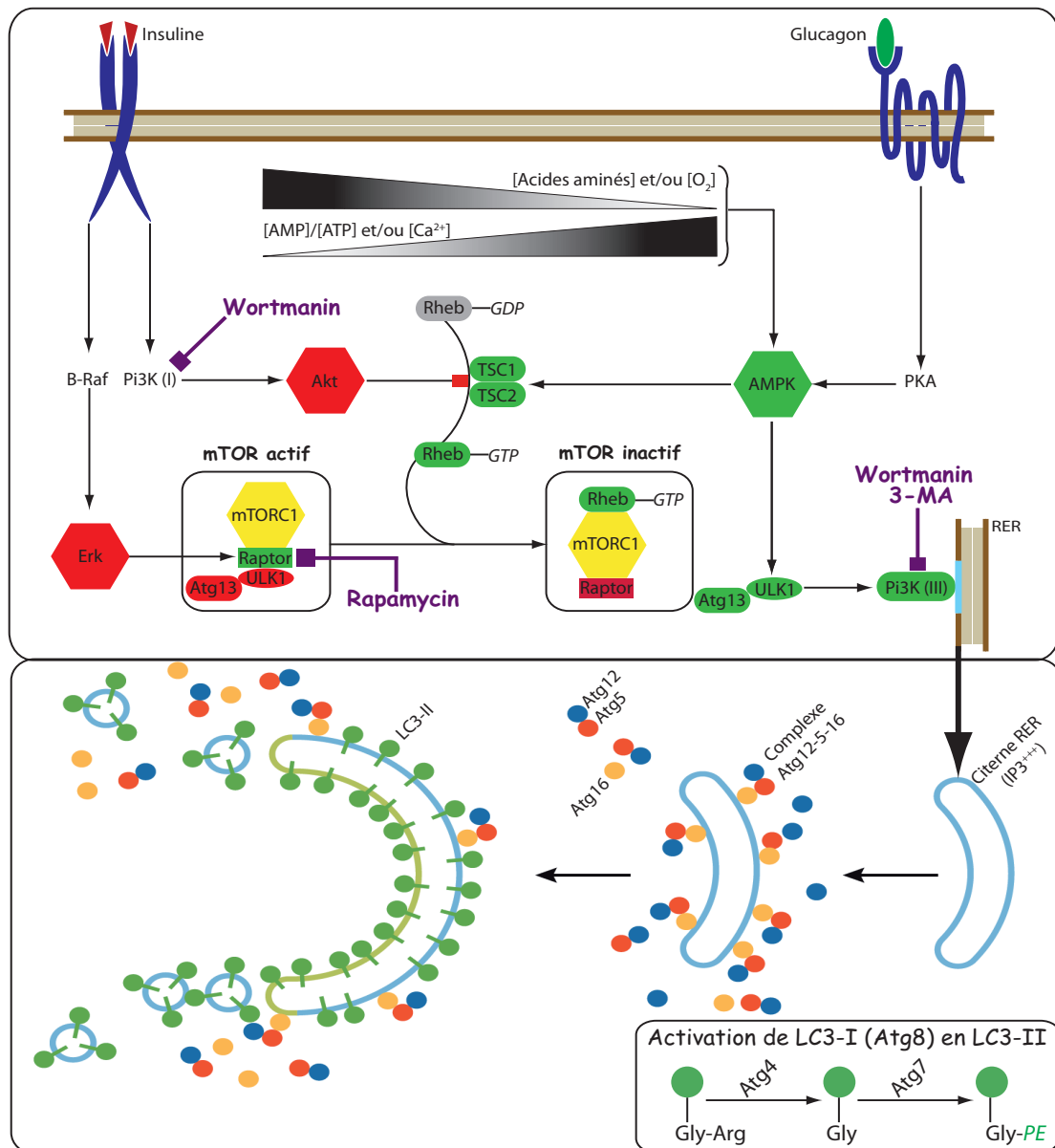


Fig 18. Vue simplifiée de la régulation de la macroautophagie

Réprimée de façon constitutive par le complexe TORC1 de la voie mTOR, la clé de voûte de l'activation de la macroautophagie est l'AMPK. Celle-ci est notamment activée par la diminution des réserves en acides aminés ou hormonalement par le glucagon. L'AMPK promeut la substitution d'un GDP par un GTP sur la protéine Rheb en activant le complexe TSC. A l'opposé du glucagon, l'insuline peut soit renforcer (via Erk) la répression de l'autophagie en suractivant la kinase Raptor du complexe TORC1 soit contrecarrer (via la pi3K de classe I et Akt) la conversion du GDP en GTP du complexe Rheb. En s'associant à TORC1, le complexe TSC-Rheb-GTP, empêche la phosphorylation inhibitrice du complexe Atg13-ULK1 par Raptor. Dissociée de TORC1, la kinase ULK1 activée par l'AMPK, active à son tour la pi3K de classe III associée à des citernes du RER. L'augmentation de la concentration en IP3 membranaire facilite l'ancrage des protéines Atg (16 étant spécifiques de la macroautophagie) qui, sous la forme de complexes, gouvernent la formation de l'autophagosome. Parmi elles, Atg8 (LC3-I chez l'homme) est clivée par la carboxypeptidase Atg4 puis modifiée en C-ter par l'ajout d'un phosphatidylethylamine (LC3-II). L'ancrage de cette protéine à des citernes du RER initie la formation de l'autophagosome et son expansion. LC3-II, par son interaction avec la dynéine, est également nécessaire au transport rétrograde de l'autophagosome et de sa fusion avec le lysosome. C'est pourquoi cette protéine est un marqueur spécifique couramment utilisé pour détecter l'initiation de l'autophagie ainsi que pour étudier la dynamique de la macroautophagie.

Modifié et simplifié de Kim, J. 2011²⁷² & Geng, J. 2008²⁷³.

- La macroautophagie :

Initialement décrite par de Duve observant les effets du glucagon, elle est aussi la forme la plus étudiée. Elle se déroule en 3 phases (**Figure 17**). Un fragment du cytoplasme est initialement séquestré au sein d'un autophagosome, une vésicule à double membrane formée par l'étirement de citernes du RER^{274 275}. Ce cargo, par le biais de la dynéine, entreprend une marche sur microtubules (transport rétrograde) en direction d'un lysosome^{276 277}. Son contenu, *cargo*, y est finalement détruit par les protéases et estérases acides à la suite de la fusion de la membrane externe de l'autophagosome avec celle du lysosome²⁷⁸. Bien que régulée, principalement au niveau des deux premières étapes, elle est considérée aussi peu discriminante que la microautophagie (**Figure 17**). La macroautophagie liée à p62 fait exception en dégradant sélectivement les protéines polyubiquitinées (§ II.5). La macroautophagie est réprimée de façon constitutive par la voie mTOR (mammalian target of rapamycine) qui est activée notamment lorsque la concentration en acides aminés est suffisante (**Figure 18**). Réprimée de façon basale, elle doit en plus être activée, notamment par le glucagon et la pi3kinase de classe III²⁷⁹. A l'opposé du glucagon, qui induit la macroautophagie via l'AMPK, l'insuline (via la pi3kinase de classe I) renforce son inhibition. Cependant, les cellules épithéliales thymiques sont une exception car bien que l'on en ignore l'explication, la macroautophagie semble y être constitutive^{280 281}. En culture, l'effet glucagon^{265 282}, l'inducteur physiologique de la macroautophagie, peut être mimé par le TNF- α , la rapamycine, ou par la déplétion en sérum ou en acides aminés aliphatiques (ou, *a contrario*, un excès en glutamine)^{281,283-287}. Ensemble, ces caractéristiques montrent que la macroautophagie est un mode d'adaptation du métabolisme protéique cellulaire en cas de tarissement des nutriments. Par ailleurs, l'autophagie est généralement considérée comme un mécanisme de survie dans les zones hypoxiques des tumeurs solides²⁸⁸⁻²⁹⁰. Son inhibition restaure la sensibilité de lésions tumorales à la radiothérapie^{291 292} ou à la chimiothérapie²⁹³⁻²⁹⁵ et elle abroge une résistance à l'immunité anti-tumorale²⁹⁶. L'autophagie n'est pour autant pas à considérer comme un mécanisme de survie cellulaire universel puisque dans certains cas, l'induction de la macroautophagie déclenche l'apoptose ou limite le développement tumoral²⁹⁷⁻²⁹⁹.

- L'autophagie spécifique ou CMA (chaperone-mediated autophagy) :

La découverte des lysosomes et l'évidence de leur participation à la protéolyse cellulaire ont amené de Duve à proposer une hypothèse pour répondre à trois énigmes de la protéolyse cellulaire : (1) le mode de recrutement des protéines dans le lysosome, (2) les différences de stabilité des protéines cellulaires, (3) le paradoxal aspect énergivore de la protéolyse cellulaire. Selon son hypothèse, les protéines pourraient être recrutées au sein du lysosome au moyen d'un transporteur (1). La stabilité des protéines serait liée à l'efficacité relative de leur recrutement (1,2). La consommation d'ATP s'expliquerait par un transport actif des substrats et/ou le maintien d'un pH acide luminal optimal par une pompe à proton (non identifiée à l'époque où de Duve formula cette hypothèse) ³⁰⁰ (1,3). Si la caractérisation de la macroautophagie a contredit transitoirement l'hypothèse de de Duve, la découverte de la CMA, trente ans plus tard, pourrait en être une sorte de réhabilitation. La CMA, ne prenant en charge ni les organites ni les complexes protéiques, est considérée par défaut comme une voie d'élimination des protéines dénaturées ³⁰¹. Cette considération est notamment soutenue par l'effet inducteur d'un stress oxydatif ^{302,303}. A l'image de la célèbre *N-end-rule* de la voie ubiquitine-protéasome (**voir § II.4**), on pourrait qualifier la CMA de *C-end rule* ³⁰⁴. La protéine cytosolique Hsc-70 cible spécifiquement les protéines pourvues à leur extrémité C-terminale d'un motif canonique, KFERQ ^{305,306} (**Figure 17**). L'immunoprécipitation spécifique de cette séquence élimine 30% des protéines cytoplasmiques ³⁰⁷. La dénaturation préalable des extraits n'étant pas nécessaire dans 80% des cas, cela suggère que l'élimination des protéines endommagées n'est pas le seul rôle de la CMA ³⁰⁸. Hsc-70 associée à d'autres protéines (non-identifiées à ce jour) mène le substrat au transporteur lysosomal Lamp-2A et induit l'oligomérisation activatrice de ce dernier ³⁰⁹. Le complexe formé et assisté par les formes lysosomales de Hsc-70 et Hsp-90 transfère le substrat dans la lumière du lysosome ³¹⁰. Lamp-2A et/ou sa forme oligomérique sont les facteurs limitants de cette voie ^{303,311}. Alors que l'induction de la macroautophagie à la suite de la diminution de l'apport nutritionnel des hépatocytes est transitoire, celle de la CMA survient plus tardivement mais se maintient jusqu'à restauration de l'apport ^{268,312,313}.

- Autres types :

En parallèle de ces distinctions mécanistiques, il existe des distinctions circonstanciées souvent appelées « autophagies spécifiques ». La **pexophagie** est une voie d'élimination par microautophagie et par macroautophagie des péroxysomes en réponse à leur prolifération (par une hypoglycémie, ou par activation de PPAR α) ³¹⁴. La **mitophagie** est une dégradation macroautophagique observée notamment lors de la maturation des réticulocytes en érythrocytes ³¹⁵, ou encore comme une contre-mesure transitoire à la perte, pro-apoptotique, de l'imperméabilité mitochondriale ³¹⁶. La **xénophagie** permet l'élimination de microorganismes intracellulaires et la surveillance immunitaire en tant que source de peptides antigéniques ³¹⁷. L'**agrégophagie** est une élimination non-spécifique des agrégats protéiques du cytosol. Cependant, lorsqu'elle dépend de la séquestratine p62, elle devient une voie d'élimination spécifique des agrégats polyubiquitinés ne pouvant être pris en charge par le protéasome ³¹⁸. L'**ER-phagie** est une autophagie spécifique du RER déclenchée à la suite d'un stress cellulaire (oxydatif ou par agents de chimiothérapies) afin de pallier à la rétention de protéines endommagées dans le RER ³¹⁹⁻³²¹.

II.3. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)

II.3.1. Des autophagosomes au système ubiquitine-protéasome :

Dès les années septante, il est devenu de plus en plus évident que l'autophagie n'était pas le seul système protéolytique cellulaire. D'une part, des composés inhibant, soit l'acidification des lysosomes (chloroquine ou chlorure d'ammonium), soit l'activité des hydrolases acides (pepstatine, leupeptine, E64) ne bloquaient que partiellement la protéolyse cellulaire. D'autre part, les protéines ayant des demi-vies de quelques minutes et d'autres quelques jours, cela suggérait qu'en plus d'être compartimentée, la protéolyse cellulaire semblait sélective. Or si les études de Deter et de de Duve démontraient que l'autophagie permettait de compartimenter la protéolyse, elles démontraient tout aussi qu'elle ne pouvait être sélective.

A

	Dégradation de l'hémoglobine (%)	
	- ATP	+ ATP
Lysat	1.5	10
Fr I	0.0	0.0
Fr II	1.5	2.7
Fr I + Fr II	1.6	10.6

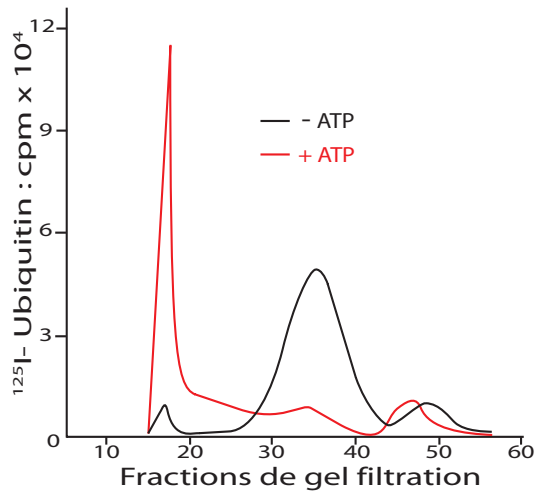
B

Fig 19. Dépendance de la protéolyse à l'hydrolyse de l'ATP.

(A) La dégradation de protéines (ici l'hémoglobine) par un lysat de réticulocytes est dépendante de l'ATP. Le fractionnement du lysat par échangeuse d'anions permet d'isoler deux fractions (Fr I et Fr II) qui doivent être associées en présence d'ATP pour restaurer complètement la capacité protéolytique initiale du lysat. Au contraire de Fr II qui est hétérogène, Fr I ne contient qu'une seule protéine, l'ubiquitine. (B) Le fractionnement par filtration sur gel d'une solution associant Fr II à de l'ubiquitine (Fr I) radiomarquée en absence d'ATP, permet d'éluer l'ubiquitine dans des fractions de bas poids moléculaire. A l'inverse, lorsque l'association se fait en présence d'ATP, l'ubiquitine s'associe de façon covalente à des protéines et s'élue à dans des fractions de poids moléculaires plus importants. Adapté de : Ciechanover, A. 1978 ³²² & Ciechanover, A. 1980 ³²³.

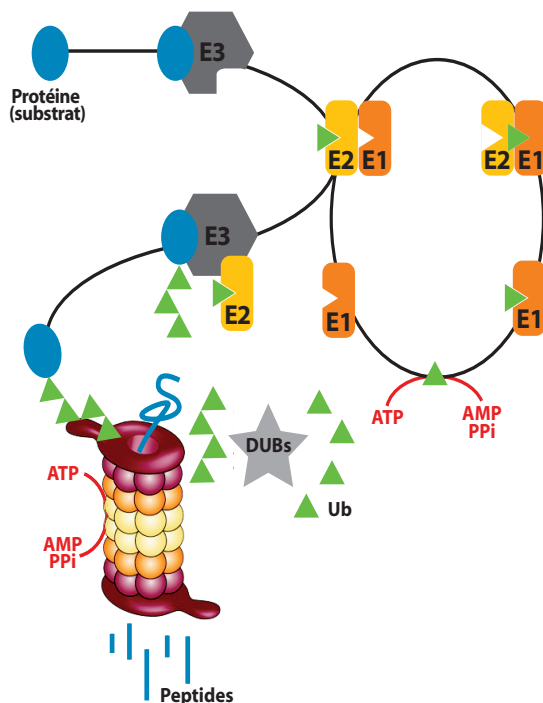


Fig 20. Le système ubiquine-protéasome

Le protéasome cible les protéines ayant été préalablement taguées à l'ubiquitine (Ub). Le couplage de la protéolyse protéasomale à l'ubiquitination assure une dégradation ciblée et contrôlée. Ub est tout d'abord activée par l'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme) avant d'être transférée à l'enzyme E2 (ubiquitin conjugating enzyme). La protéine substrat est ciblée par une enzyme E3 (ubiquitin ligase). L'association des complexes E2 et E3 permet de transférer l'ubiquitine du complexe E2 à la protéine substrat. Il en va de même pour la polyubiquitination, où une ubiquitine est transférée à un résidu ubiquitinyle fixé à une protéine. Une fois polyubiquitinée, la protéine est ciblée, dénaturée puis dégradée en peptides par le protéasome. Le protéasome libère le motif polyubiquitine qui est converti en monomères par des isopeptidases DUBs (deubiquitinases) qui maintiennent le stock cellulaire en ubiquitine.

L'omniprésence des lysosomes au sein des cellules associée au manque d'efficacité des inhibiteurs d'hydrolases acides donnait des allures de *nœud gordien* à la recherche d'un éventuel système protéolytique alternatif à l'autophagie. Etlinger et Goldberg ont apporté une solution à ce problème en s'intéressant aux réticulocytes et érythrocytes qui assurent une protéolyse cellulaire malgré l'absence de lysosome ³²⁴ ³²⁵. A partir d'extraits de ces cellules, ils ont identifié un complexe protéolytique soluble de haut poids moléculaire dont l'activité protéolytique nécessitait l'hydrolyse de l'ATP, **le protéasome**. L'existence d'un système protéolytique soluble a été confirmée au niveau de cellules nucléées par Bigelow qui a montré que la protéolyse cellulaire a lieu principalement dans le cytosol ³²⁶. Bien que ce complexe protéasique soit dans le cytosol, où s'effectue une partie de la synthèse protéique, les risques d'une protéolyse cellulaire non contrôlée et d'une situation métabolique non-sens sont rapidement écartés. En effet, parallèlement à ces travaux, Ciehanover et Hershko identifient que, préalablement à leur dégradation, les protéines sont modifiées par l'ubiquitine et ce de façon ATP-dépendante (**Figure 19**) ³²² ³²⁷. Ensemble ces deux découvertes ont ouvert la voie au **système ubiquitine-protéasome (UPS) (Figure 20)**.

II.3.2. La polyubiquitination :

Le couplage de la dégradation protéasomale (1) à la polyubiquitination préalable des protéines substrats (2) permet au système UPS d'assurer une protéolyse à la fois compartimentée (1), sélective (1, 2) et régulée (2). En outre, ce même couplage permet aussi de comprendre pourquoi la protéolyse cellulaire est à la fois exergonique et paradoxalement énergivore ³²⁸ ³²³. L'hydrolyse de l'ATP, nécessaire tant à l'ubiquitination de la protéine substrat ³²³ qu'à sa prise en charge par le protéasome ³²⁹ ³³⁰, n'est autre que le prix à payer pour assurer les aspects sélectif et régulé de la protéolyse cellulaire (**Figure 20**). L'ubiquitine (76 résidus, 8,5 kDa), est non seulement ubiquitaire mais fortement conservée par l'ensemble des eucaryotes ³³¹. Son association covalente aux protéines ciblées par le protéasome se fait au moyen de 3 activités enzymatiques successives (**Figure 20**) ³³². L'enzyme E1 prend en charge et active (en consommant 1 ATP) l'ubiquitine libre avant de la transférer à l'enzyme E2. Enfin, l'enzyme E3 réalise l'ubiquitination proprement dite en transférant l'ubiquitine

associée à E2 à la protéine substrat ³³³. E3 forme un lien isopeptidique entre le carboxyle C-terminal de l'ubiquitine (Gly76) et l'amine ε d'une lysine de la protéine ciblée ³³⁴. L'ubiquitination n'est pas une modification restreinte à la voie UPS. Ainsi, l'ubiquitination (mono-ubiquitination) des histones (ex : H2A) régule la transcription ³³⁵ et celle de protéines membranaires (mono-/di-ubiquitination) régule le trafic vésiculaire en favorisant notamment la formation d'endolysosomes ³³⁶. La voie UPS cible des protéines polyubiquitinées c'est à dire, comportant un oligomère d'ubiquitine d'au moins 4 résidus ³³⁷. Pour la polyubiquitination, un lien isopeptidique est formé entre le C-terminal d'une ubiquitine et l'amine ε d'un résidu lysyle d'une ubiquitine associée à un substrat. Sur les 7 lysines que compte l'ubiquitine, K48 et K63 sont celles principalement ciblées pour les polyubiquitinations liées respectivement à la voie UPS ³³⁷ et la réparation de l'ADN ³³⁸. La diversité des processus reposant sur l'ubiquitination et la diversité tant séquentielle que structurale des substrats expliquent sans doute pourquoi il y a chez l'homme plus de 500 variants de l'enzyme E3 alors qu'il n'y en a que très peu de l'enzyme E1 ^{339,340}. La polyubiquitination est le facteur limitant de la dégradation par le système UPS. Ainsi on observe que la vitesse de dégradation des protéines cellulaires est proportionnelle au niveau d'ubiquitination de celles-ci ³⁴¹⁻³⁴³. Bien que l'ubiquitine se fixe de façon covalente, le système des isopeptidases de type cystéine, DUBs (deubiquitinases), permet que cette modification ne soit pas irrémédiable. En outre, l'ubiquitine libre étant très limitée, l'activité de ces enzymes ³⁴⁴ ainsi que celle du protéasome ³⁴⁵ représentent les principaux systèmes de mises à disposition d'ubiquitine. Par ailleurs, l'ubiquitination d'une lysine peut entrer en concurrence avec d'autres modifications post-traductionnelles. D'une part, l'acétylation, en prévenant l'ubiquitination notamment du facteur de transcription Foxp3, augmente le niveau cellulaire de celui-ci ³⁴⁶. D'autre part, SUMO (small ubiquitin-like modifier), en plus d'être structurellement semblable à l'ubiquitine, modifie par une voie très similaire à celle de l'ubiquitination les résidus lysines de protéines ^{12,347}. SUMO n'étant pas associée à la dégradation des protéines, une compétition entre la sumoylation et l'ubiquitination d'un résidu lysine influencerait la stabilité d'une protéine ; c'est notamment le cas pour IκBα ³⁴⁸.

II.3.3. Le protéasome :

Bien que l'ubiquitination avait été reliée à la dégradation protéolytique, il ne restait *plus qu'à* identifier la protéase (**Figure 19**). A l'aide de lysozyme ubiquitiné, une activité protéolytique dépendante de l'ATP a été isolée à partir de réticulocytes ³⁴⁹. Waxman et Goldberg ont ensuite purifié et caractérisé ce complexe d'environ 2,5 MDa ayant un coefficient de sédimentation de 26 Svendberg, **le protéasome 26S** ³⁵⁰. En marge de la purification du protéasome 26S, un autre complexe protéolytique de plus petite taille ne nécessitant pas d'ATP a été identifié comme fragment du 26S, **le protéasome 20S** ³⁵¹⁻³⁵⁴.

- La particule protéolytique 20S :

Le protéasome 20S est le corps protéolytique du protéasome (**Figure 21**). L'analyse du 20S par électrophorèse en conditions native et dénaturante montre qu'il s'agit d'un complexe de 700 kDa formé de différentes sous-unités protéiques d'environ 22-35 kDa chacune ³⁵⁴. Chez les eucaryotes, elles sont au nombre de 14 (7 alpha et 7 bêta). Les sous-unités α et β s'associent en 4 anneaux compacts $\alpha 1-7 \beta 1-7 \beta 1-7 \alpha 1-7$ donnant à la particule 20S une allure relativement cylindrique en microscopie électronique ^{355 356}. Toutes appartiennent à la famille T1 des thréonine peptidases mais seules 3 d'entre elles ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) sont protéolytiquement actives et appelées *unités β -catalytiques* ^{357 358}. Selon les types cellulaires ou les conditions microenvironnementales, les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ peuvent être substituées afin de former d'autres particules 20S aux propriétés catalytiques modifiées (ex : **l'immunoprotéasome § III.1.3**). L'assemblage du 20S requiert le complexe protéique PAC (Proteasome assembly complex). Cela débute par la formation de l'anneau α (13S) ³⁵⁹. Les sous-unités β sont ensuite recrutées (séquentiellement : $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 1$ puis $\beta 7$) ce qui donne lieu à la formation d'un hémiprotéasome inactif (16S) ³⁶⁰. $\beta 7$, la dernière incorporée dans le 16S, s'intercale entre les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ d'un autre 16S permettant la formation d'un 20S complet.

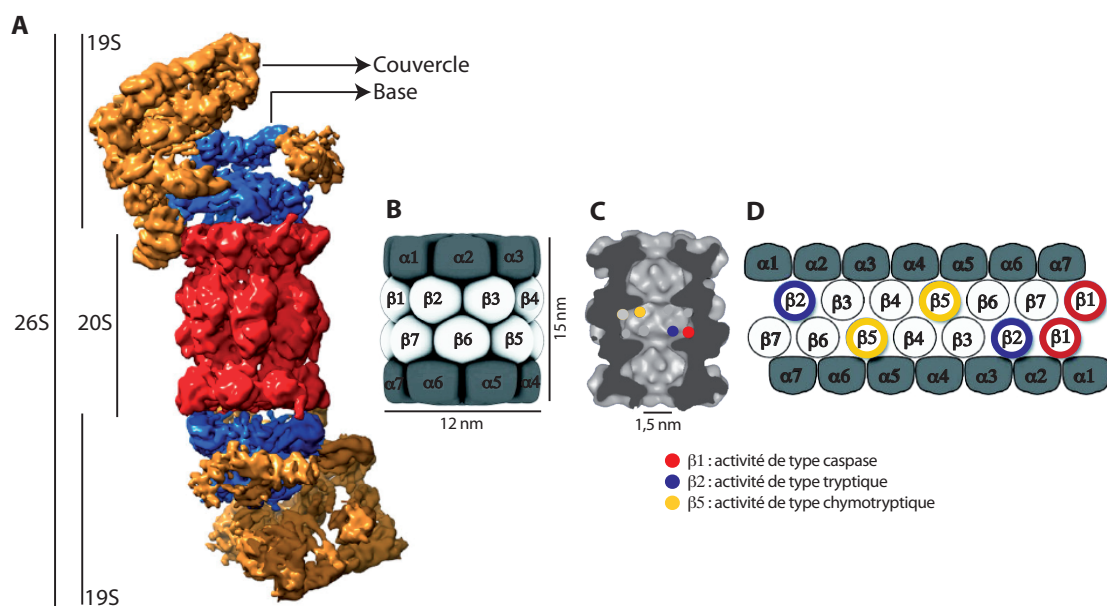


Fig21. Composition du protéasome.

Le protéasome cible et dégrade les protéines polyubiquitinées sous sa forme 26S (particule de 26 Svendberg). Cette particule comporte, au centre, un complexe catalytique central (20S) auquel s'associe, à chaque extrémité, une unité régulatrice 19S (**A**). Le 19S se divise en deux parties, le "couvercle" (doré) qui reconnaît les tags de polyubiquitine et la base (bleu), antichambre du 20S, qui dénature, débubiquitine, ouvre le complexe 20S (en rouge) et y transfère les substrats. Le 20S est un cylindre creux formé par l'empilement de 4 anneaux comportant chacun 7 sous-unités protéiques (**B** vue externe, **C** vue interne). Les anneaux périphériques comprennent les sous-unités structurales α , tandis que les anneaux centraux β comprennent les sous-unités catalytiques. Sur les 7 unités β , seules 3 ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) ont une activité protéolytique dont la nature diffère selon les sous-unités (**C**: coupe du 20S et **D** : vue déroulée de **B**). **Légende:** (**A**) reconstitution de la cryoélectromicroscopie du protéasome 26S modifiée de Lasker, K.2012³⁶¹, (**B&D**) représentation du 20S modifiée de Jung, T. 2009.³⁶², (**C**) reconstitution de la cryoélectromicroscopie du 20S modifiée de Kisselev, A. 2012³⁶³.

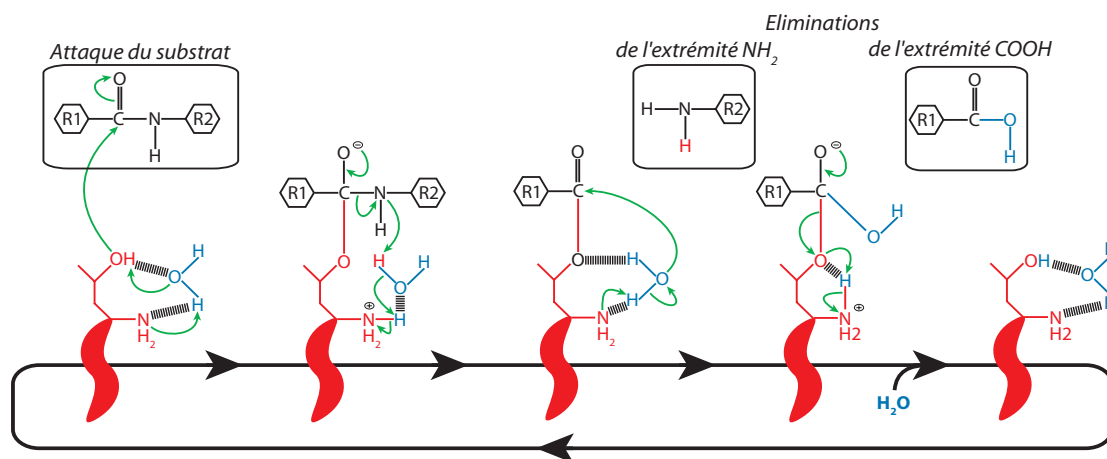


Fig22. Mécanisme réactionnel des sous-unités b-catalytiques du protéasome 20S.

Cointrairement aux sérine- et cystéine-peptidases dont les mécanismes réactionnels reposent respectivement sur une triade et une diade catalytique (cfr Figure 2-4), celui des sous-unités catalytiques du protéasome ne repose que sur une thréonine. L'hydroxyle de la chaîne latérale de la thréonine catalytique est responsable de l'attaque nucléophile. Les sérine et cystéine peptidases, dont l'acide aminé catalytique est inclus dans une séquence peptidique, utilisent l'imidazole d'une histidine comme échangeur de protons. Pour le protéasome, la thréonine catalytique étant en N-terminal des sous-unités catalytiques, c'est son NH_2 qui fait office d'échangeur de protons. Modifié de Osmulski, P. 2009³⁶⁴

Les modifications allostériques induites par l'association de deux hémiprotéasomes activent les sous-unités β -catalytiques par clivage autocatalytique de leur préséquence³⁶⁵. Les chaperonnes du complexe PAC sont ensuite dégradées par le protéasome 20S néoformé. L'architecture du protéasome permet d'assurer une protéolyse compartimentée, *a self-compartmentalizing protease*³⁶⁶. Les sites protéolytiquement actifs sont présents au niveau d'une chambre catalytique formée par la surface interne des anneaux centraux β (**Figure 21**). Les substrats ciblés atteignent la chambre catalytique au moyen d'une des deux antichambres formée par la surface interne des anneaux périphériques α . Leur diamètre étant d'environ 13 Å, cela implique que seules les protéines déstructurées peuvent atteindre la chambre catalytique³⁶⁷. La nature de l'acide aminé catalytique (une thréonine), et sa position à l'extrémité N-terminale des sous-unités catalytique, rend le mécanisme d'hydrolyse unique^{357 368} (**Figure 22**). Comme pour les sérine peptidases, l'attaque nucléophile des thréonine peptidases est initiée par l'hydroxyle de la chaîne latérale. Toutefois, la thréonine étant aminoterminal, son NH₂ libre fait office d'échangeur de protons ; un rôle effectué par l'imidazole d'une histidine chez les sérine et cystéine peptidases (**Figure 22 vs 3**). La caractérisation de l'activité du protéasome à l'aide de peptides fluorogéniques suggère que chaque sous-unité est associée à une activité particulière (**Figure 21 C-D**). Les clivages sont préférentiellement exercés en aval d'un glutamate (activité PGPH : *post-glutamyl-peptide hydrolase*) ou d'un aspartate (activité caspase) pour β 1, d'un résidu basique pour β 2 (activité tryptique), et d'un résidu hydrophobe surtout aromatique pour β 5 (activité chymotryptique)^{369 370}. L'association d'une sous-unité à une activité n'est cependant pas « rigide » car β 1 et β 2 sont aussi douées d'activités chymotryptiques et les clivages en aval de résidus hydrophobes à chaînes latérales branchées sont associés à β 5 mais également à β 1^{369 371}. Les peptides fluorogéniques posent quelques limitations. Le fluorochrome, par sa position C-terminale, exclut l'étude de l'influence des résidus en aval du clivage et sa nature hydrophobe influence potentiellement la nature des clivages. De plus, de taille relativement courte (3-4 résidus), ces précurseurs ne permettent pas d'étudier l'influence (individuelle ou combinée) de résidus situés à distance d'un site de clivage. Ainsi les digestions d'oligopeptides ou de l'énolase dénaturée ont montré notamment les influences positives de petits résidus neutres ou d'une proline occupant respectivement les position 1 en aval et 4 en amont du site de clivage³⁷²⁻³⁷⁴.

Le nombre d'inhibiteurs du protéasome ne cesse de croître ^{375 363}. Toutefois, si certains sont plus spécifiques que d'autres, aucun ne semble capable de bloquer efficacement l'activité globale du protéasome. Trois d'entre eux ont été utilisés dans ce travail. La **lactacystine**, produite naturellement par les *Streptomyces*, est l'inhibiteur le plus populaire. Estérifiant irréversiblement $\beta 5$ bien plus efficacement que $\beta 2$ et $\beta 1$, elle inhibe efficacement l'activité chymotryptique et tryptique du protéasome et 30% de l'activité PGPH ³⁷⁶⁻³⁷⁸. Cependant, en plus de l'hydroxyle des thréonines catalytiques du protéasome, elle ciblerait aussi celui de sérine peptidases notamment la cathepsine A (lysosome) et la tripeptidyl peptidase II (cytosol) ^{379 380}. L'**époxomicine**, isolée elle aussi d'*Actinomyces*, est l'inhibiteur le plus spécifique. Elle forme un lien covalent morpholino entre l'hydroxyle de la chaîne latérale et l'amine α de la thréonine ³⁸¹. La sélectivité de l'époxomicine s'explique par le fait que les seules N-terminale thréonine peptidases du dégradome eucaryote sont les sous-unités du protéasome. *In vitro* et à forte concentration (20 μ M), l'époxomicine assure une inhibition complète du protéasome ³⁸². A plus faible dose (2 μ M) au niveau cellulaire, elle bloque complètement et irréversiblement les activités tryptique et chymotryptique mais quasi pas la PGPH ³⁷⁸. Enfin, le dérivé peptidique vinyle-sulfone, **Ada-(Ahx)₃-(Leu)₃-VS** est un inhibiteur synthétique ciblant de façon irréversible et équivalente les 3 sous-unités catalytiques ³⁸³. A l'instar de la lactacystine qui cible aussi certaines sérine peptidases, les dérivés vinyl sulfones ciblent certaines cystéines peptidases dont des cathepsines lysosomales ³⁸⁴. Les effets de ces inhibiteurs sur les différentes activités du protéasome ont principalement été obtenus à l'aide de substrats fluorogéniques. *In vitro*, les inhibitions individuelles des activités chymotryptique, tryptique et PGPH occasionnent des diminutions du taux de dégradation respectivement de 11 à 50 %, 12 à 22% et de 3 à 35% selon les protéines étudiées ^{378 382}. L'inhibition de l'activité chymotryptique associée à l'inhibition d'une des deux autres activités occasionne une diminution de 50-80% du taux de dégradation ³⁷⁸. En faisant coexister au sein d'une même cavité 3 activités endoprotéolytiques ³⁸⁵ de spécificités différentes en double exemplaire, cela permet au protéasome de débiter des protéines en fragments de 3 à 30 acides aminés, soit environ 20 clivages pour la caséine (209 aa) ³⁸⁶⁻³⁸⁹. Toutefois, conclure que le débitage des protéines est strictement déterminé par l'architecture de la chambre catalytique ou la disposition des sous-unités les unes par rapport aux autres, *molecular*

*ruler*³⁹⁰, serait caricatural. Que le protéasome soit purifié de levures (2x3 sous-unités catalytiques différentes)³⁷³ ou d'archaebactéries (2x7 sous-unités catalytiques identiques)³⁹¹, que l'une de ses sous-unités soit mutée³⁶⁹ ou que l'une de ses activités soit inhibée³⁸⁸, cela n'affecte pas significativement la distribution de taille des produits libérés.

- La particule régulatrice 19S :

Bien qu'existant naturellement sous cette forme, on considère que le 20S ne peut dégrader les protéines cellulaires que lorsqu'il est associé à au moins une particule 19S et forme le protéasome 26S. La particule 19S est un complexe de 19 protéines réparties en deux régions, la base, associée à l'anneau α , et le couvercle, à l'autre extrémité (**Figure 21A**). Le couvercle comporte 9 protéines dont deux protéines, Rpn10 et Rpn13, qui participent conjointement à reconnaissance des protéines polyubiquitinées^{337 392} (**Figure 23**).

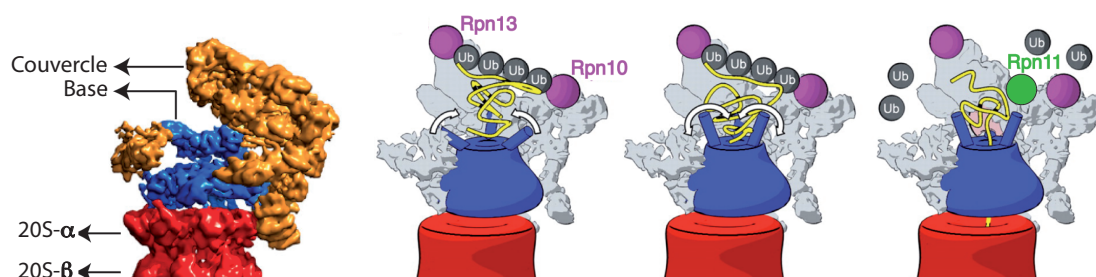


Fig23. Reconnaitement et prise en charge des protéines polyubiquitinées par le 26S. Au niveau du couvercle du 19S, deux sous-unités (Rpn10 et 13) reconnaissent conjointement le tag de polyubiquitine (minimum 4 résidus) d'une protéine substrat. L'interaction permet une association plus étroite avec le complexe ATPase hexamérique de la base du 19S qui transfère la protéine substrat au protéasome 20S. Une interaction plus étroite a lieu de manière concomitante avec la déubiquitinase Rpn11 du couvercle qui clive le tag au niveau du lien isopeptidique formé entre le substrat et le premier résidu d'ubiquitine. Modifié de Lasker, K. 2012³⁶¹.

Les quelques 100 Å qui séparent ces deux protéines expliqueraient pourquoi le tag reconnu par le 26S doit au moins comporter 4 ubiquitines³⁶¹. Contenue aussi dans ce complexe, l'isopeptidase Rpn11 clive le tag polyubiquitine. Elle est essentielle, parce que d'une part le 20S prend difficilement en charge des protéines associées à des résidus d'ubiquitine³⁹³ et que d'autre part, associée aux autres DUBs du cytoplasme, elle permet de régénérer le stock d'ubiquitine cellulaire^{393 394}. La base, par sa localisation, est un siège d'intégrations entre la polyubiquitination et la dégradation protéasomale (**Figure 23**). Le contraste entre l'hydrophobicité globale des extrémités

N-terminales des sous-unités α délimitant le pore du 20S et l'hydrophilie du cytosol, induit une obstruction naturelle de l'accès à l'antichambre du protéasome³⁹⁵.

Les extrémités C-terminales hydrophobes du complexe hexamérique des ATPase Rtp de la base s'intercalent entre les extrémités N-terminales des sous-unités α ; notamment Rpt2: $\alpha 3/\alpha 4$, Rpt3: $\alpha 1/\alpha 2$ et Rpt5: $\alpha 5/\alpha 6$ ^{396 361 397}. Le second poste de consommation en ATP de la voie UPS est centré sur le complexe hexamérique Rpt. Ce complexe, en plus de participer à la formation du 26S et d'ouvrir le pore du 20S, est aussi impliqué dans la dénaturation et la translocation du substrat au sein de l'antichambre du 20S³⁹⁸ **(Figure 23)**.

La particule 19S (appelée aussi PA700) n'est pas la seule particule régulatrice du protéasome 20S. Chez les vertébrés, 3 gènes, particulièrement bien exprimés au niveau des tissus lymphoïdes, codent 3 protéines d'environ 28kDa, PA28 α , PA28 β et PA28 γ ^{399 400}. Les deux premières, cytosoliques, forment des hétéromères (3 α 3 β ou 3 α 4 β) tandis que la troisième, nucléaire, forme des homo-heptamères^{401 402}. Contrairement au 19S, les particules PA28 (ou 11S) ne requièrent pas d'ATP pour s'associer au 20S. *In vitro*, on note que l'association de PA28 augmente la taille du pore du 20S et accroît la vitesse de dégradation de peptides fluorogéniques^{403 404 405}. Alors que PA28 $\alpha\beta$ augmente la vitesse de conversion des substrats (en facilitant la translocation des substrats et/ou la sortie des produits)^{405 406}, PA28 γ , modifie en plus la nature des clivages en favorisant ceux de nature tryptique⁴⁰⁷. Cependant les protéasomes PA28-20S semblent incapables de dégrader des protéines entières. Ne pouvant être attribuée à une augmentation de la source en peptides antigéniques (protéolyse accrue), l'augmentation de l'expression de certains complexes antigéniques liée à l'induction de PA28 (ex : IFN- γ) serait associée à une maturation particulière de précurseurs d'antigènes libérés par le 26S⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰. Par ailleurs, favorisant l'association du protéasome au RER, PA28 faciliterait l'apprêtement de certains complexes antigéniques en optimisant la translocation des peptides antigéniques produits dans le cytosol dans le compartiment de chargement⁴¹¹. Dans le noyau, le 20S peut former un complexe avec PA200 qui lui aussi est dénué de toute capacité protéolytique⁴¹². Comme PA28 γ , PA200 augmente et modifie l'activité du 20S mais dans ce cas en favorisant l'activité PGPH⁴¹³. Bien que seul le 19S permette le ciblage de protéines entières, la symétrie du 20S permet la formation naturelle de

complexes hybrides^{414 408}. Dès lors l'association d'une autre particule régulatrice ne condamnerait pas directement la capacité protéolytique du protéasome^{408 415}.

II.4. Protéolyse cellulaire : protéasome versus autophagie

Aidés par la découverte d'inhibiteurs du protéasome capables de franchir la membrane plasmique, Rock et Goldberg proposeront une vue pour le moins tranchée de la protéolyse cellulaire^{416 376}. Selon eux, la toute grande majorité des protéines cellulaires (au moins 85%) serait dégradée par le protéasome ; restreignant le rôle des hydrolases acides à la dégradation des protéines extracellulaires ou membranaires. Cependant, la plupart des études ont une vue moins extrême des rôles respectifs des systèmes protéolytiques. Plus généralement, on considère que le protéasome dégrade préférentiellement les protéines de courtes demi-vies et l'autophagie celles de longues demi-vies^{268,417,418}. Cette formulation, bien que fréquente, est une vue inversée de la réalité. En effet, c'est essentiellement le taux d'ubiquitination d'une protéine et sa prise par le système UPS qui influence négativement sa demi-vie^{324,329,337,341}. Environ 95% des protéines synthétisées sont dégradées dans les 10 min^{419 420}. Bien que les protéines de courtes demi-vies ne constituent qu'environ 1% des protéines totales, leur grande instabilité contribue à ce qu'elles représentent 30% de ce que dégrade le protéasome à chaque instant⁴²¹. C'est dans cette même idée que s'inscrit la fameuse *N-end rule* de Varshavsky⁴²². En plus de liens isopeptidiques, l'ubiquitine forme aussi des liens peptidiques entre son carboxyle C-terminal et l'amine α du premier résidu d'une protéine. Certains acides aminés (R, K, F, L, W, H, D) favoriseraient plus que d'autres (C, A, S, T, G, V, M) le recrutement de l'ubiquitine ligase UBR1 à l'extrémité N-terminale des protéines^{423 424}. Par conséquent, le niveau d'ubiquitination aminoterminal des protéines serait inversement corrélé à leur demi-vie. Le protéasome dont la demi-vie est estimée à 5 jours (cellules HeLa) et 15 jours (foie de rat) est une protéine dont la stabilité coïncide avec une destruction lysosomale⁴²⁵⁻⁴²⁷. En conditions basales, il serait dégradé par la microautophagie et/ou la CMA à laquelle s'ajoute la macroautophagie en condition de déprivation de sérum^{425 428}.

Comme évoqué plus haut, la majorité des études établissent que le rôle de l'autophagie dans la protéolyse cellulaire serait moins anecdotique que ne le considère Goldberg. Fuertes, à partir de fibroblastes, estime à 40-60% en moyenne la protéolyse protéasomale et montre que l'autophagie n'est pas restreinte à la dégradation des protéines de longues demi-vies ⁴¹⁸. Toutefois les contributions respectives du protéasome et de l'autophagie seraient à circonstancier notamment en fonction de la qualité du milieu extracellulaire et du niveau de confluence ^{268 418}. Dans les macrophages, les fibroblastes et les acini pancréatiques, environ 30% de la protéolyse cellulaire serait compromise par des agents (chloroquine, chlorure d'ammonium) affectant l'acidité lysosomale ⁴²⁹⁻⁴³¹. Des conclusions similaires ont aussi été obtenues à partir de fibroblastes. Cependant, dans cette étude, il est observé que si la chloroquine compromet bien l'activité de la cathepsine B, elle n'affecte pas celle de la cathepsine D suggérant que cette approche sous-estimerait le rôle de l'autophagie ^{432 433}. Une sous-estimation similaire serait également faite avec des inhibiteurs de cystéine peptidases (leupeptine ou E64) puisqu'à la différence des cathepsines B/L/K, la cathepsine D est une aspartyl peptidase ^{417 434 435}.

On ne peut s'empêcher de constater que la découverte de la voie UPS et l'idée d'une grande sélectivité qu'on lui a prêtée ont largement contribué à une certaine déconsidération de l'autophagie ⁴³⁶⁻⁴³⁸. Les rares cas de protéines dégradées par le protéasome sans ubiquitination préalable ont longtemps fait office d'exceptions « confirmant » la règle dogmatique de la sélectivité de la voie UPS : l'ornithine-decarboxylase ⁴³⁹, p53 ⁴⁴⁰ la chaîne α du récepteur du lymphocyte T (TCR α) ⁴⁴¹, le facteur c-FOS ⁴⁴² ou encore p21 ³⁸⁵. Attardons nous sur p21, puisque sa demi-vie a été étudiée dans ce travail. Dans les cellules traitées avec des inhibiteurs du protéasome, on note une accumulation de formes polyubiquitinées et non-ubiquitinées de p21 ^{443 444}. D'autre part, la stabilité cellulaire de la forme sauvage de p21 ou d'un mutant non-ubiquitinable (six substitutions K/R) sont similaires et ce, que le protéasome soit inhibé ou non, ou que la polyubiquitination soit possible ou non (mutation des 7 lysines en arginine de l'ubiquitine) ⁴⁴⁵. Le fait que l'ubiquitination n'influence pas le niveau de p21 suggérerait qu'il puisse aussi être pris en charge par le 20S ⁴⁴⁶. Par conséquent, si au départ il ne semblait s'agir que de quelques exceptions, la grande sélectivité traditionnellement prêtée à la voie UPS apparaît actuellement quelque peu

outrancière puisqu'environ 20% des protéines cellulaires seraient dégradées par le protéasome en toute indifférence de leur niveau d'ubiquitination^{447 448}. Cette voie, baptisée IPDP (intrinsic proteasome degradation pathway) impliquerait probablement une reconnaissance de régions désordonnées au sein de substrats⁴⁴⁷.

II.5. Cross-talk entre le protéasome et l'autophagie

Si la polyubiquitination n'est pas une condition *sine qua non* à la dégradation protéasomale, il semblerait en plus que l'élimination des protéines polyubiquitinées ne soit pas la chasse gardée du protéasome. Ces protéines peuvent alternativement être dégradées par un mode particulier de la macroautophagie (seul mode, avec la CMA, reconnu comme étant spécifique). Cette voie implique une protéine adaptatrice, la séquestratine p62, qui possède à la fois un domaine d'interaction avec l'ubiquitine et un autre avec la protéine LC3-II de l'autophagosome (**Figure 18**)^{449 450}. La surexpression de p62 diminue la dégradation des protéines polyubiquitinées par le protéasome au profit de la macroautophagie. Cette observation est corroborée par l'observation d'une accumulation de protéines ubiquitinées au niveau des mutants défectifs conditionnels de la macroautophagie (Atg 7^{-/-} ou Atg 5^{-/-})⁴⁵¹⁻⁴⁵³. Capable d'éliminer les agrégats proapoptogènes s'accumulant en cas d'une perte d'activité du protéasome, l'autophagie serait un mécanisme de résistance tumorale aux bortésomide, inhibiteur du protéasome utilisé dans certaines chimiothérapies⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁸. Si une perte de dégradation protéasomale des protéines ubiquitinées peut être compensée par l'induction de la macroautophagie, une déficience de celle-ci ne semble pas être compensable par le protéasome^{451 452}.

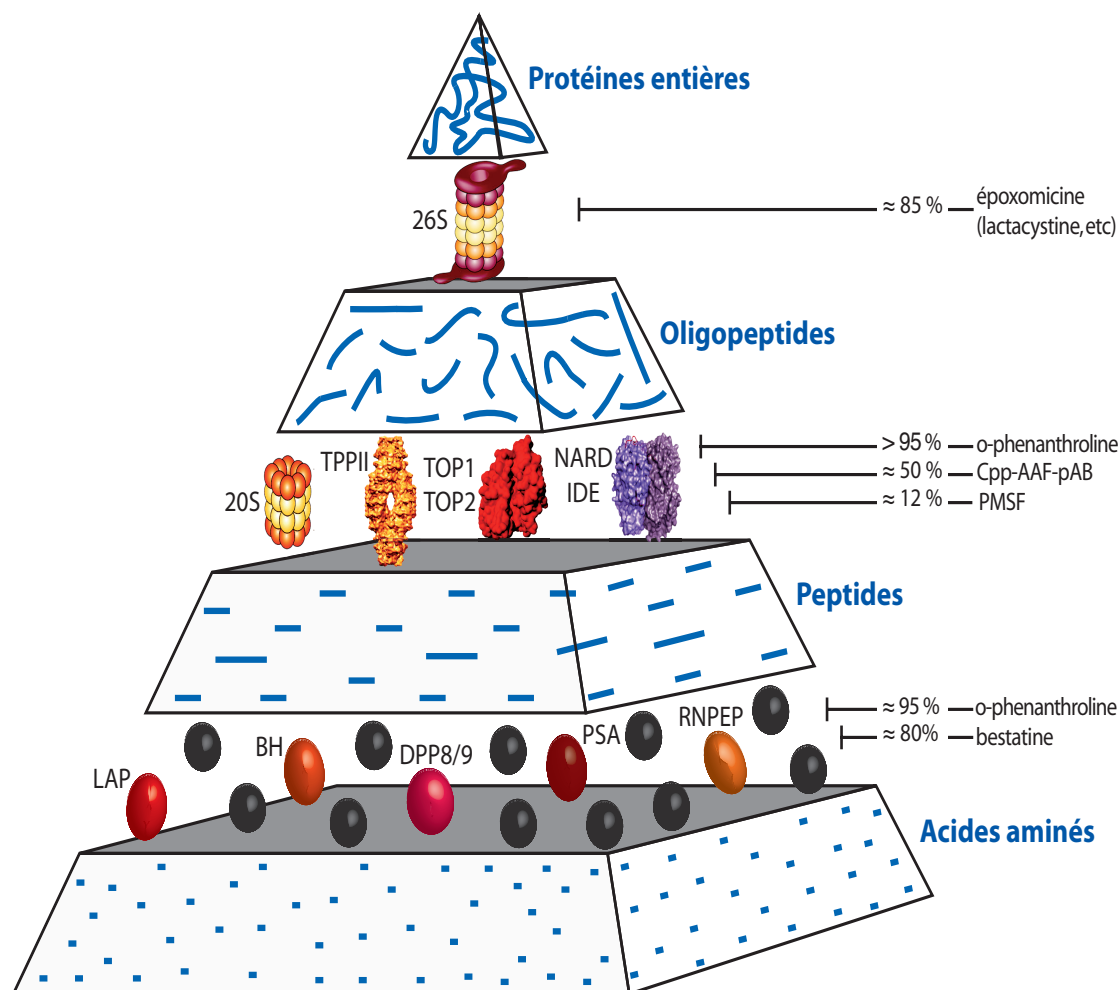


Fig 24. Organisation hiérarchique de la protéolyse cellulaire.

La protéolyse cellulaire est un processus faisant appel à différentes activités peptidasiques intervenant séquentiellement et dont la diversité croît à mesure que la taille des substrats diminue. Dans le cytosol, seul le protéasome est en mesure de s'atteler à des protéines entières. Les oligopeptides de 10 à 25 résidus qu'il libère sont pris en charge par un nombre relativement restreint d'oligopeptidases. Celles-ci libèrent à leur tour des petits peptides de 2-5 résidus pris en charge par différentes aminopeptidases, dipeptidases et tripeptidases dont la diversité (qui n'a pas été établie) est considérée importante. Abréviations : 26S et 20S (protéasomes 26S et 20S), TPPII (tripeptidylpeptidase II), TOP1 (thimet oligopeptidase), TOP2 (neurolysine), NARD (nardilysine), IDE (insulin-degrading enzyme), LAP (leucine-aminopeptidase), BH (béomycin-hydrolase), DPP9 (dipeptidyl-peptidase 9), PSA (puromycin-sensitive aminopeptidase), RNPEP (arginyl-aminopeptidase cytosolique). *N.B* : Les sphères noires représentent des exopeptidases non-identifiées.

II.6. Organisation de la protéolyse cellulaire

Qu'elle soit lysosomale (non-discutée ci-après) ou cytosolique, la protéolyse cellulaire est un processus séquentiel organisé en pyramide (**Figure 24**)⁴⁵⁹. Sur base des travaux de Goldberg, le protéasome ciblerait environ 85% des protéines cellulaires. Le protéasome ne débite pas les protéines en acides aminés mais en oligopeptides comprenant 3 à 30 acides aminés, dont 90% sont très rapidement convertis en acides aminés. Cela explique que les précipitations à l'acide trichloroacétique (TCA) ne permettent d'observer que les deux extrémités du recyclage protéique: le précipité, contenant des protéines, et la fraction soluble, négative à la ninhydrine, ne contenant que des acides aminés. Le *peptide*, chaînon manquant du recyclage des protéines cellulaires, a été mis en évidence par Véronica Botbol en 1979 ; soit 5 ans après l'australopithèque Lucy, célèbre chaînon manquant découvert par l'équipe d'Yves Coppens^{460 461}. Le traitement de cellules ou de lysats à la bestatine (inhibiteur de métalloaminopeptidases), permet d'accumuler des petits peptides d'une taille maximale de 5 acides aminés au sein de la fraction soluble d'une précipitation TCA. Les tri-/penta-peptides semblent donc être les substrats de prédilection des aminopeptidases en charge de l'étape finale du recyclage protéique. Bien qu'insondées, la diversité des aminopeptidases cytosoliques ainsi que la redondance de leurs activités respectives sont considérées comme relativement importantes⁴⁶². Environ 50% des produits libérés par le protéasome 26S ont une taille supérieure aux substrats convertis de façon optimale en acides aminés libres par les aminopeptidases^{463 388}.

L'année de la découverte de Toumai, un hominidé 3 fois plus vieux que Lucy, Saric et Goldberg ont mis en évidence l'*oligopeptide*, un intermédiaire plus précoce du métabolisme protéique 3 fois plus long que les peptides identifiés par Botbol⁴⁶⁴. D'une part, ils ont observé que l'inhibition à l'orthophenanthroline des métallopeptidases d'une fraction cytosolique annihile presque intégralement la conversion des produits libérés par le protéasome^{464 465}. Enfin, ils ont observé que contrairement aux aminopeptidases impliquées dans la régénération des acides aminés libres, l'activité oligopeptidasique du cytosol reposait substantiellement sur une métalloendopeptidase, la thimet oligopeptidase (TOP)^{464 465}. La structure de TOP⁴⁶⁶ la contraint à ne prendre en charge que des peptides de 7 à 16 acides aminés⁴⁶⁷ qui représentent environ 30% des produits libérés par le protéasome 26S^{463 388} (§ III.1.5).

Il a été proposé que les produits de longues tailles libérés par le protéasome qui ne peuvent être convertis par TOP, le soient par la tripeptidylpeptidase II (TPPII). TPPII est un complexe protéique cytosolique de 1-10 MDa en apparence « autocompartimenté » comme le protéasome³⁸⁰. C'est une sérine aminopeptidase éliminant des tripeptides depuis l'extrémité N-terminale de polypeptides⁴⁶⁸⁻⁴⁷¹. Cependant, elle peut agir comme une endopeptidase (500 fois moins importante que l'activité exopeptidasique)³⁸⁰. Sa capacité à dégrader des polypeptides d'au moins 41 résidus, fait d'elle un candidat potentiel à l'oligopeptidolyse cytosolique⁴⁷². Malgré tout, en plus que de si longs peptides soient peu représentatifs des produits de l'activité du protéasome^{463 388}, les étapes protéolytiques en aval du protéasome sont essentiellement à la charge des métallopeptidases^{464 465}. Par conséquent, l'implication de TPPII à l'oligopeptidolyse ne serait que relativement marginale. De façon très controversée, il a aussi été proposé qu'elle puisse être une alternative au protéasome pour la protéolyse cellulaire voir même qu'elle puisse compenser la perte d'activité de celui-ci^{380,473-476}.

Les endopeptidases cellulaires sont essentiellement des oligopeptidases. La neurolysine, la nardilysine, l'eupitrylisine et l'IDE étant avec TOP les seules métallendopeptidases du cytosol, elles pourraient ensemble contribuer à l'essentiel de l'oligopeptidolyse en aval du protéasome et fournir des substrats de tailles idéales aux métalloaminopeptidases libérant les acides aminés libres. Hormis certaines exceptions comme la nardilysine, la plupart des peptidases ont une spécificité de clivages (très) relative. La proline est un acide aminé très fréquent au sein des protéines (pour *H. sapiens*: L :10%, **Pro** : 6%, W :1%), qui impose des contraintes à la majorité du dégradome^{477 478}. En plus d'être éventuellement liée au carbonyle de l'acide aminé la précédant dans un peptide, l'amine α de la proline forme aussi un cycle pyrrolidine avec la chaîne latérale. Cela coude de façon rigide le peptide, diminuant l'adaptabilité de celui-ci aux sites d'interactions des peptidases⁴⁷⁹. Par ailleurs, l'absence de groupe fonctionnel dans le cycle pyrrolidine ainsi que l'absence de proton sur l'amine α de la proline empêchent la formation de ponts hydrogènes avec l'une des poches d'interaction jouxtant le nucléophile de la plupart des peptidases (en amont pour un motif X-Pro et en aval pour un motif Pro-X)^{479 478}. Toutefois, certaines peptidases, regroupées principalement dans la famille S9 des sérine peptidases, ciblent

spécifiquement les résidus prolyle^{480 481}. Avec 3 autres métallopeptidases cytosoliques, les peptidases de la famille S9 évitent l'accumulation d'intermédiaires métaboliques de la protéolyse cytosolique et assurent le recyclage cellulaire de la proline¹¹ (**Figure 25**). La prolyl oligopeptidase (POP), une sérine endopeptidase capable de dégrader des peptides de 30 acides aminés, contribue vraisemblablement à l'oligopeptidolyse cytosolique échappant à TOP (résistante au CppAAFpAB mais sensible au PMSF). En plus de POP, pour l'oligopeptidolyse, la famille S9 avec la Dipeptidylpeptidase 9 (et la 8 dans une moindre mesure) contribuerait aussi aux étapes finales du recyclage protéique en assistant les métalloaminopeptidases sensibles à la bestatine⁴⁸² (§ III.1.5).

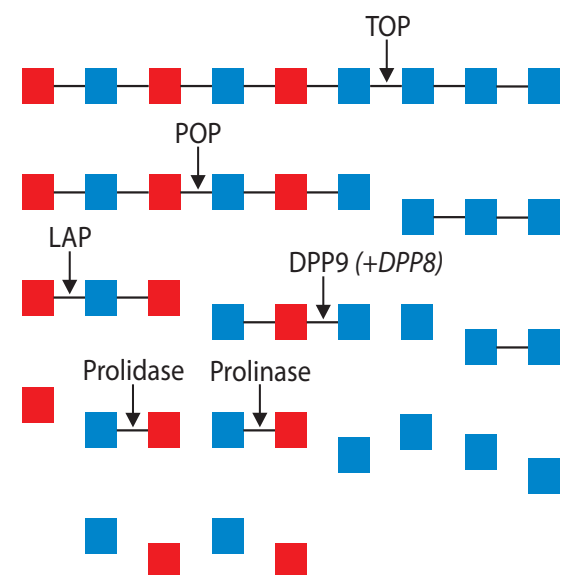


Fig 25. Arsenal peptidasique cytosolique pour le recyclage des prolines.

Réprésentation d'un oligopeptide type de 9 résidus produit par le protéasome pris en charge par la thimet oligopeptidase (TOP). Les carrés rouges représentent des prolines et les bleus tout autre acide aminé. La conversion du fragment C-terminal peut être effectuée par une diversité d'exopeptidases non-spécifiques. La conversion du fragment N-terminal, au contraire, nécessite des prolyle peptidases qui ne sont qu'au nombre de 4 dans le cytosol. La prolyl-oligopeptidase (POP), est une sérine peptidase et est l'unique post-prolyl endopeptidase cytosolique. La leucine aminopeptidase (LAP) est une métalloaminopeptidase qui,

bien que peu spécifique, est la seule activité mono-aminopeptidasique post-prolyle du cytosol. DPP8 et 9 sont des sérine amino-peptidases ayant une activité post-prolyle dipeptidase. Enfin les plus petits fragments clivables contenant encore une proline peuvent être pris en charge par deux dipeptidases. La prolidase et la prolinase sont deux métallopeptidases clivant respectivement les motifs X-Pro et Pro-X.

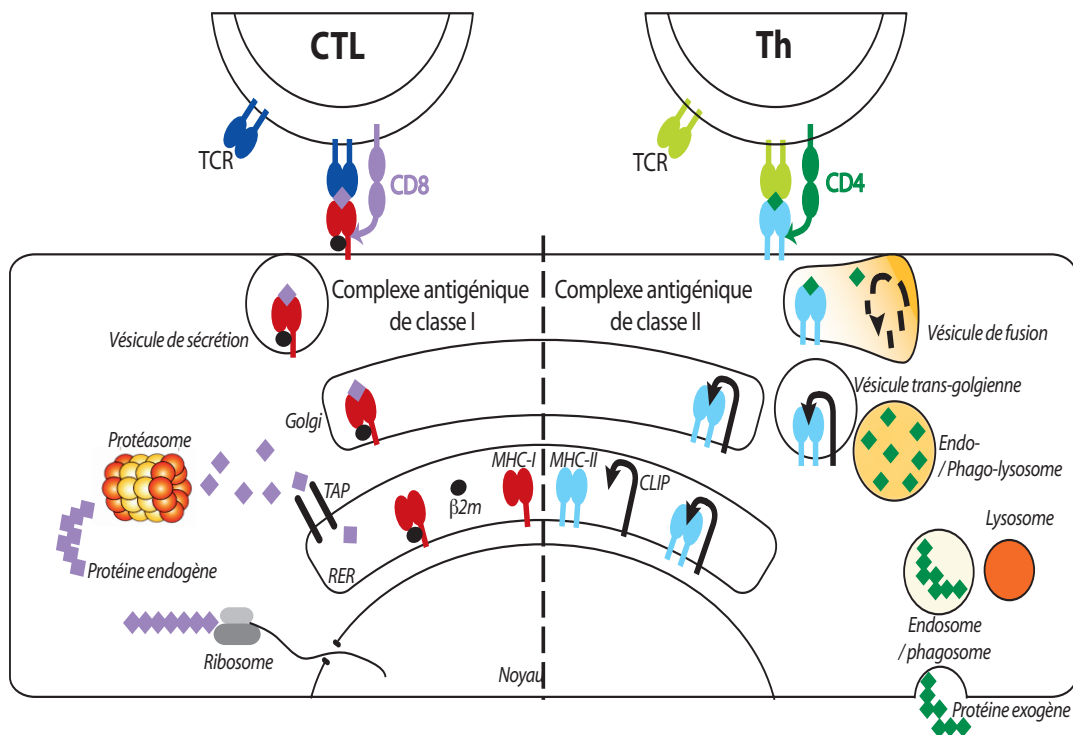


Fig 26. Présentation des peptides antigéniques aux lymphocyte Cytolytiques (CD8, CTL) et auxiliaires (CD4, Th).

Les lymphocytes CD8 (CTL) reconnaissent des peptides antigéniques présentés par le complexe MHC de classe I alors que les CD4 reconnaissent des peptides présentés par le MHC de classe II. La majorité des peptides reconnus par les CD8 sont issus de protéines synthétisées et dégradées par la cellule présentatrice. A la différence, la majorité des peptides reconnus par les CD4 sont issus de protéines exogènes internalisées et dégradées en peptides par la cellule présentatrice. Les complexes antigéniques de classe I sont composés d'un peptide associé à une molécule de présentation du MHC-I et de la β 2-microglobuline (β 2m). Les complexes antigéniques de classe II sont composés d'un peptide associé à un hétérodimère formé par les molécules du CMH-II α et β . L'apprêtement d'un antigène regroupe les étapes de production intracellulaire du peptide et de son expression à la membrane plasmique. Les peptides de classe I sont principalement produits dans le cytosol par le protéasome. Les peptides de classe II sont quant à eux produits au niveau des endosomes/phagolysosomes par les hydrolases acides. Les peptides class I sont transférés (via le transporteur TAP) dans le réticulum (RER) et associés aux MHC-I nouvellement synthétisés. Les MHC-II sont synthétisés dans le RER et empruntent la voie de sécrétion associés à la chaperonne CLIP. Lors de la fusion de la vésicule golgienne avec un endolysosome (ou phagolysosome), la diminution du pH dissocie CLIP du MHC-II (qui est dégradée par les hydrolases lysosomales) au profit du chargement d'un peptide. *Abréviations : CLIP (Class-II associated invariant chain), TAP (Transporter associated with antigen processing).*

III. Apprêtement des peptides antigéniques

Qu'ils soient cytolytiques ($CD8^+$, CTL) ou auxiliaires ($CD4^+$, Th), les lymphocytes T sont les principaux garants de l'intégrité cellulaire dans l'organisme. Ils discriminent les cellules saines des cellules ayant subi une transformation tumorale ou une infection. L'activation des deux types de lymphocytes se fait par la reconnaissance de peptides antigéniques **précis** présentés à la surface des cellules ciblées sous formes de *complexes antigéniques* qu'ils reconnaissent par le biais d'un récepteur **spécifique**, le TCR (T-cell receptor) (**Figure 26**). Les CTL reconnaissent des peptides dérivés de protéines **endogènes** qui sont présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I). Les Th reconnaissent des peptides dérivés de protéines **exogènes** qui sont présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC-II). A la différence du MHC-I, qui est présent à la surface de toutes les cellules nucléées, le MHC-II n'est présent qu'à la surface de cellules *professionnelles de la présentation d'antigènes* (cellules dendritiques, macrophages, cellules de Langerhans du derme et lymphocytes B principalement).

III.1. La voie classique

III.1.1. Les complexes antigéniques de classe I

Le MHC-I, dénommé HLA-I chez l'homme (pour human leukocyte antigen), se compose de deux protéines: une chaîne lourde (HC) qui est polymorphe et une chaîne légère, la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) qui est monomorphe. Les chaînes lourdes sont codées à partir de 3 gènes (A, B et C) situés sur le chromosome 6, ce qui permet à un individu d'en exprimer jusqu'à 6 différentes à la surface de ses cellules. Il s'agit d'une glycoprotéine de type I dont la partie extracellulaire se divise en 3 domaines, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (**Figure 27, gauche**). Les deux premiers forment un sillon dans lequel vient se loger le peptide. La taille du sillon détermine la taille optimale des peptides antigéniques à 8-10 résidus ⁴⁸³ (**Figure 27, droite**).

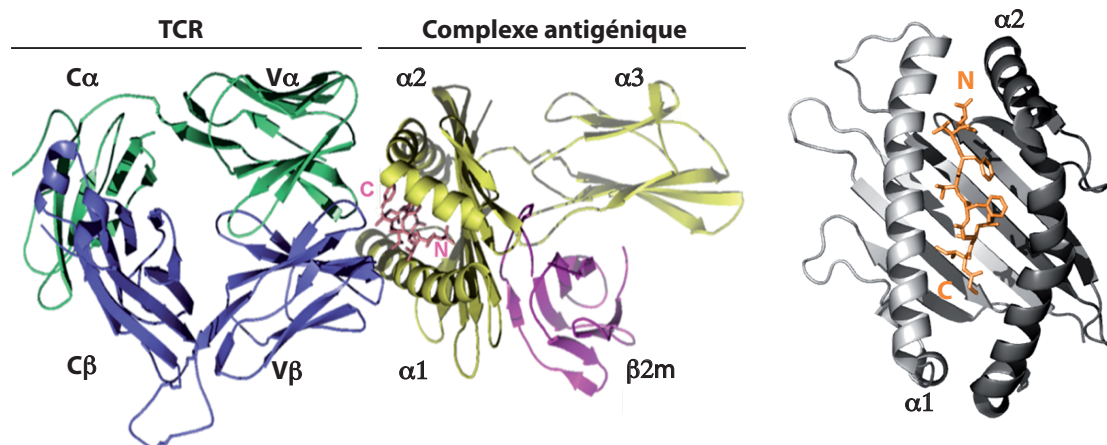


Fig 27. Association du complexe CMH de classe I (MHC-I) et d'un TCR de CTL.

Il s'agit du peptide Tax11-19 de HTLV-1 (human T-lymphotropic virus) présenté par le l'HLA-A2. Le TCR est formé de l'association hétérodimérique des chaînes TCR α et TCR β . Leurs domaines C-terminaux sont appelés domaines constants (C α /C β) car leur composition varie peu d'un TCR à l'autre. Leurs domaines N-terminaux (V α /V β) sont très variables d'un TCR à l'autre et contribuent à la diversité du répertoire antigénique reconnu par l'ensemble des lymphocytes T de l'organisme. Ils sont en interaction avec le peptide antigénique et les domaines α 1/2 du MHC-I (V α / α 2 et V β / α 1). La chaîne lourde du MHC-I (jaune), est divisée en 3 domaines α . Les domaines α 1 et α 2 sont très variables d'une chaîne lourde à l'autre et contribuent à la diversité du répertoire peptidique pouvant être présenté aux lymphocytes de l'organisme. La β 2-microglobuline (β 2m) s'associe aux trois domaines α et contribue à stabiliser la structure tertiaire de la chaîne lourde. A droite, une vue plus précise de la cavité logeant le peptide antigénique Tax11-19. Les domaines α 1/2 forment le plancher en feuillets β qui est surmonté par 2 hélices α . Cette structure limite la taille idéale des peptides antigéniques à 8-10 acides aminés. Modifiés de : Garboczi, D. 1996 ⁴⁸⁴ & Duroux, P. 2008 ⁴⁸⁵.

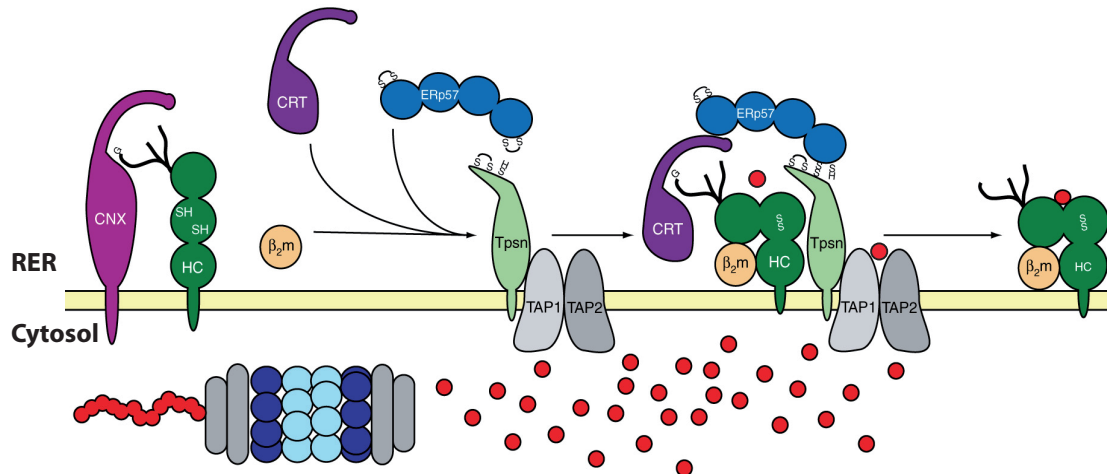


Figure 28. Assemblage des complexes antigéniques dans le réticulum.

L'apprêtement de la plupart des peptides antigéniques implique deux compartiments, le cytosol où sont produits les peptides et le réticulum (RER) où ceux-ci sont ensuite associés à une molécule de présentation nouvellement synthétisée. Les peptides gagnent le réticulum via TAP (transporter associated with antigen processing). La molécule de présentation est un dimère comprenant une chaîne lourde d'HLA (HC) et la β 2-microglobuline (β 2m). L'association du dimère HC- β 2m est facilitée par la calnexine (CNX), une lectine interagissant avec le glycosyle de HC. CNX est ensuite remplacée par la calréticuline (CRT) permettant l'association du dimère au complexe de chargement du peptide PLC (peptide loading complex). Le PLC optimise l'association des peptides aux molécules de présentation. L'optimisation est non seulement spatiale via la tapasine (Tpsn) qui place la molécule de présentation à proximité de TAP mais aussi temporelle via le couple calréticuline-Erp57 qui retient le dimère HC- β 2m jusqu'à ce qu'il s'associe à un peptide antigénique. Le complexe antigénique (HC- β 2m-peptide) se dissocie du PLC et gagne la membrane plasmique. Modifié de Cresswell, P. 2005 ⁴⁸⁶.

Le sillon ménage aussi des poches d'interactions différant d'une chaîne lourde à l'autre qui sélectionnent les peptides antigéniques sur base de leur séquence. Interagissant également avec les domaines V α et V β des TCR, les exons codant les domaines α 1 et α 2 concentrent l'essentiel du polymorphisme associé à la chaîne lourde, ce qui contraste avec le domaine α 3 dont le seul partenaire d'interaction est la β 2m. La chaîne lourde et la β 2m sont synthétisées dans le réticulum où sont aussi assemblés les complexes antigéniques (**Figure 28**). Après glycosylation, HC interagit avec la calnexine (une lectine) qui facilite la formation du dimère HC- β 2m ainsi que le recrutement de l'isomérase Erp57^{487 488}. Cette dernière modifie la structure tertiaire en catalysant la formation d'un pont disulfure dans le domaine α 3 puis dans l' α 2 de HC. Le remplacement de la calnexine par la calréticuline marque l'entrée du dimère HC- β 2m dans le complexe de chargement du peptide (PLC) (**Figure 28**). A ce stade, le HLA se distingue de la plupart des protéines sécrétées par sa stagnation dans le réticulum due à son association au PLC. Au centre du PLC se trouve TAP, un transporteur actif (ATP) de peptides qui est formé de l'association de deux protéines transmembranaires, TAP1 et TAP2. Sa position de charnière entre le principal compartiment de production des peptides antigéniques (le cytosol) et celui de la formation des complexes antigéniques (le réticulum) fait de TAP l'élément le plus crucial du PLC. En l'absence de peptides, les dimères HC- β 2m ne sont pas jugés propres à la sécrétion. Ils stagnent transitoirement dans PLC avant d'être détruits par le protéasome via la voie ERAD (voie de destruction cytosolique de protéines réticuliennes à structure impropre)⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹. C'est ce qui explique l'effondrement de la densité en complexes antigéniques à la surface de cellules TAP1^{-/-}⁴⁹². Cela explique aussi la diminution (d'un facteur 20) de la population des CD8 périphériques des souris TAP1^{-/-} qui, bien que moins catastrophique, est similaire à celle observée chez les patients souffrant d'un syndrome de déficience en TAP1 ou TAP2^{493 494}. Ces observations démontrent le rôle crucial de TAP tant dans l'apprêtement des antigènes de classe I que dans la diversité du répertoire CD8 périphérique. Au sein du PLC, les dimères HC- β 2m sont indirectement associés à TAP par le biais de la tapasine (**Figure 28**). Cette association est dépendante de la calréticuline liée elle-même Erp57, la première interagissant avec HC et la seconde avec la tapasine. Au sein du PLC, la tapasine aurait une fonction d'édition. Elle permettrait de substituer des peptides déjà associés au dimère HC- β 2m par des peptides plus affins⁴⁹⁵. Elle serait en plus

indispensable à la formation de complexes antigéniques restreints au variant allélique B*4402^{496 497}.

III.1.2. La production de la majorité des peptides antigéniques dépend du protéasome

A la différence des lymphocytes CD4, qui peuvent être stimulés par des cellules incubées avec un virus inactivé (ou une préparation de protéines virales), les CD8 nécessitent que le virus soit capable d'infecter les cellules cibles^{498 499}. Cela démontre que les peptides reconnus par les CD8 dérivent de protéines synthétisées et dégradées dans la cellule cible. L'autophagie et le protéasome constituent les deux systèmes en charge de la protéolyse cellulaire (§ II.4). Le fait que l'inhibition des hydrolases acides n'affecte pas la capacité de cellules cibles à stimuler des CTL, suggère indirectement que la source des peptides antigéniques de classe I soit le protéasome et non l'autophagie⁵⁰⁰. Cette hypothèse est renforcée par un autre argument indirect montrant que la capacité d'apprêtement d'antigènes serait positivement corrélée à l'instabilité des protéines cellulaires, qui est elle-même positivement corrélée à l'ubiquitination des protéines⁵⁰¹⁻⁵⁰³. Ce sont les études basées sur l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques qui ont apporté l'argument majeur de l'implication du protéasome dans la source de complexes de classe I^{416 376}. Rock et Goldberg ont montré que le traitement de cellules avec des inhibiteurs du protéasome compromet la dégradation intracellulaire de l'ovalbumine ainsi que la production du peptide antigénique SIINFEKL dérivé de cette même protéine. De façon plus générale, ces traitements inhiberaient 85% de la protéolyse cellulaire et induiraient une diminution drastique de l'ensemble des complexes antigéniques exprimés en surface. Ces résultats ont été confirmés dans de nombreuses études et à ce jour, on considère toujours que le protéasome est l'étape critique de l'apprêtement de plus de 90% des peptides antigéniques^{376,504-506}.

III.1.3. Pas 1¹⁹⁸⁷ ni 2¹⁹⁹⁰ ni 3²⁰⁰⁷ mais 5²⁰¹⁰ protéasomes : l'apprêtement différentiel

Avant même que ne soit observé le rôle critique joué par le protéasome dans l'apprêtement des antigènes, Brown (notamment) identifia une particule protéolytique structurellement semblable au protéasome standard possédant 3 sous-unités catalytiques différentes, l'**immunoprotéasome**⁵⁰⁷. Les gènes de deux d'entre elles, LMP2 et LMP7, sont sur le chromosome 6 (à proximité des gènes codant TAP1 et 2), tandis que le gène de la troisième, MECL1, est sur le chromosome 16. Toutes trois inductibles par l'IFN- γ ^{508 509} et deux d'entre elles (LMP2 et 7) par le TNF- α ⁵¹⁰, elles remplacent les sous-unités β -catalytiques constitutives durant l'assemblage du 20S ; β 1 est remplacée par LMP2 (β 1i), β 2 par MECL1 (β 2i) et β 5 par LMP7 (β 5i). En plus d'être structurellement semblables, le protéasome standard (PS) et l'immunoprotéasome (IP) dégradent les protéines avec une efficacité semblable⁵¹¹⁻⁵¹³. Toutefois, les produits libérés par le PS et l'IP sont différents, ce qui implique que les deux protéasomes ne ciblent pas les mêmes liens peptidiques au sein d'une même protéine^{514 374}. De façon très générale, on considère que l'IP a des activités chymotryptiques, tryptiques et Braap (en aval d'acides aminés branchés) exacerbées et une activité post-acidique diminuée par rapport au PS⁵¹¹⁻⁵¹³. La différence qualitative de la dégradation de protéines par les deux types de protéasomes imposa un nouveau domaine d'études, celui de l'**apprêtement différentiel** ; ou quelle forme de protéasome est préférable à la production de peptides antigéniques ? D'une part, les résidus C-terminaux des peptides antigéniques sont généralement hydrophobes (Y/F le plus souvent, L/V/I quelques fois) ou basiques mais très rarement acides⁵¹⁵. D'autre part, occupant une position centrale dans l'apprêtement, TAP intervient dans la sélection des peptides antigéniques en favorisant le transfert de peptides pourvus d'extrémités C-terminales hydrophobes ou basiques^{516 517}. Pour ces deux premières raisons, l'IP fut initialement considéré comme favorisant l'apprêtement d'antigènes. La cytokine inductrice des sous-unités immunocatalytiques étant produite durant les infections virales⁵¹⁸, cela expliqua qu'au départ l'apprêtement différentiel fut essentiellement étudié dans le cadre de l'immunologie virale. Ces études semblaient conclure à un rôle globalement favorable de l'IP dans l'expression des antigènes de classe I⁵¹⁹⁻⁵²¹.

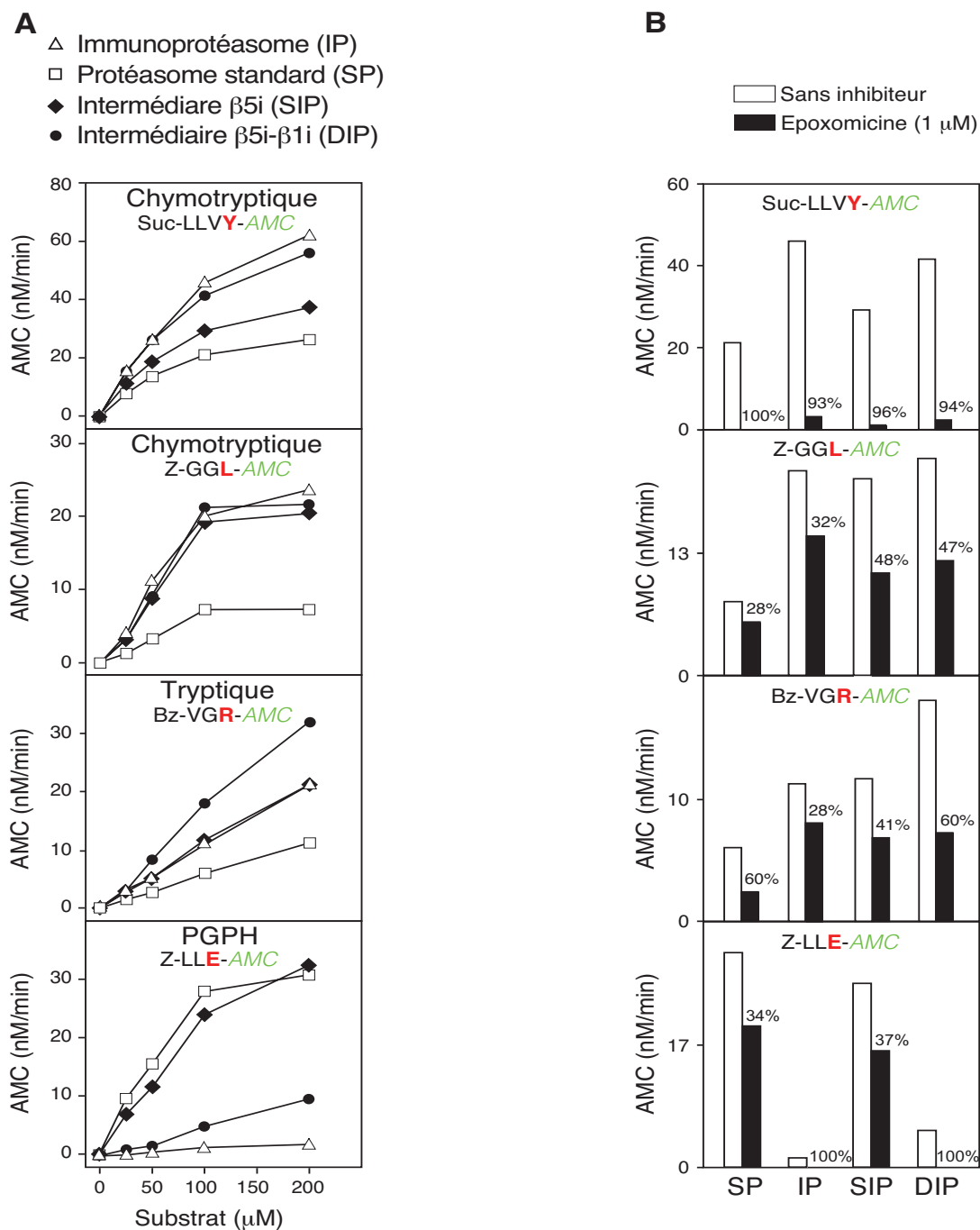


Fig 29 : Activités peptidasiques de 4 protéasomes.

(A) Les activités de protéasomes 20S purifiés à partir de 4 transfectants de 293-EBNA produisant soit le protéasome standard (PS) soit l'immunoprotéasome (IP), soit l'intermédiaire β5i (SIP) soit l'intermédiaire β5i β1i (DIP), ont été mesurées à l'aide de peptides fluorogéniques.

(B) Ces mêmes activités ont en parallèle été testées en présence d'un inhibiteur spécifique du protéasome (époixomicine); les % d'inhibition ont été indiqués. Abréviations : AMC (fluorochrome, 4-méthylcoumarine), Suc (succinyle), Z (benzoylocarbonyle), Bz (benzoyle). Adapté de Guillaume, B. 2010. PNAS (107): 18599.

Par ailleurs, la réponse immunitaire au virus LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis) de souris $\beta 1i^{-/-}\beta 5i^{-/-}$, ne semble pas différente de celle des souris congéniques ⁵²². L'étude de l'apprêtement différentiel dans le cadre de l'immunologie tumorale aboutit à un constat tout aussi peu manichéen ⁵²³. Ces travaux, initiés au sein de notre laboratoire par Sandra Morel, ont montré que si certains antigènes sont effectivement mieux produits par l'IP ⁵²⁴⁻⁵²⁶, d'autres en revanche sont mieux, voir même exclusivement, produits par le PS ⁵²⁷⁻⁵²⁴. Au sein d'une même protéine, les clivages respectifs du PS et de l'IP qui favoriseraient la production de certains antigènes seraient en même temps défavorables voir même délétères à la production d'autres ^{524,528-530}.

Plus récemment dans notre laboratoire, les travaux de Benoît Guillaume ont mené à l'identification et à la caractérisation de deux autres formes de protéasome ⁵³¹. Ils ont été baptisés **protéasomes intermédiaires** en raison du fait qu'il s'agit de protéasomes standards incorporant soit une sous-unité immunocatalytique ($\beta 5i$ à la place de $\beta 5$) pour le protéasome simple-intermédiaire (SIP) ou deux ($\beta 5i$ et $\beta 1i$ à la place de $\beta 5$ et $\beta 1$) pour le protéasome double-intermédiaire (DIP). Ces protéasomes ont été identifiés dans des tissus sains, des lignées tumorales, et des cellules dendritiques en l'absence d'un traitement à l'IFN- γ . Malgré le caractère ubiquitaire de leur expression, leur abondance relative varie entre 10 et 30% dans les lignées cellulaires testées, de 5 à 50% dans les tissus sains testés et de 50 à 60% dans des monocytes fraîchement isolés de patients. Leurs activités, à partir de peptides fluorogéniques, apparaissent relativement différentes de celles de l'IP et du PS (**Figure 29**). Il n'est donc pas surprenant que des antigènes tumoraux comme MAGE-A3/HLA-B40 puissent être produits dans des cellules contenant soit de l'IP ou l'une des deux formes intermédiaires, alors que d'autres comme MAGE-A3/HLA-A2, ne puissent être produits que dans des cellules contenant (au moins) du SIP ^{531,532}.

Enfin, le **thymoprotéasome** clôture la diversité de protéasomes connus à ce jour ⁵³³. Il correspond à un immunoprotéasome dans lequel l'unité $\beta 5i$ est substituée par une unité, $\beta 5t$, qui est exclusivement exprimée dans les cellules épithéliales du cortex du thymus (cTEC) ⁵³⁴. En plus du thymoprotéasome (TP), ces cellules contiennent aussi du PS. Les cTEC sont responsables de la sélection positive des lymphocytes T. La réduction de l'activité chymotryptique inhérente à l'incorporation de $\beta 5t$ diminuerait la production de peptides antigéniques d'affinité relativement plus faible.

L'effondrement des CD8 périphériques des souris $\beta 5t^{-/-}$ pourrait être lié à une augmentation de la proportion de lymphocytes T de plus forte affinité sélectionnés par les cTEC éliminés dès lors par la sélection négative^{533 535}.

Si l'identification de l'immunoprotéasome a introduit la question de l'apprêtement différentiel, celle des protéasomes intermédiaires et du tymoprotéasome nous montre une vue plus fidèle de sa grande complexité.

III.1.4. Production de l'extrémité C-terminale des antigènes par le protéasome

Au vu de l'effet de son inhibition sur la présentation de la majorité des antigènes, il est incontestable que le protéasome représente une étape **critique** à l'apprêtement des antigènes de classe I. L'apprêtement débute par la dégradation des protéines parentales de ces antigènes. Le rôle essentiel du protéasome dans l'apprêtement tient avant tout du fait qu'il est en charge de 65 à 85% de la protéolyse cellulaire globale et considéré être le seul système ciblant des protéines entières dans le cytosol où sont produits 95% des peptides antigéniques³⁷⁰.

Mais quel(s) rôle(s) joue-t-il ? Environ 70% des produits libérés par le protéasome à partir de protéines ont une taille inférieure à la taille optimale (8-10 résidus) des peptides antigéniques³⁸⁸. Au niveau de ces digestions *in vitro*, les peptides antigéniques sont généralement des produits très minoritaires apparaissant souvent à des taux de dégradation très avancés de la protéine parentale^{527 524}. De plus, la digestion de l'ovalbumine montre qu'environ 90% des clivages réalisés par l'IP ou le PS ont lieu dans la séquence de l'épitope immunodominant SIINFEKL⁵³⁶. Entre 10 et 25 % des produits libérés par le protéasome ont une taille supérieure à 10 acides aminés³⁸⁸. Les digestats contiennent toute une série de peptides comportant l'une des deux extrémités de l'antigène, *des précurseurs potentiels d'antigènes*^{391,530,536-538}. L'étude de l'apprêtement différentiel du peptide SIINFEKL montrait que les cellules contenant l'IP produisaient plus efficacement l'antigène. *In vitro*, les deux protéasomes produisaient l'antigène sous forme de précurseurs comportant une des deux extrémités matures. Toutefois, les digestats de l'IP contenaient 2 fois plus de précurseurs comportant l'extrémité C-terminale mature que ceux du PS. Au niveau cellulaire, tant les précurseurs immatures du côté C-terminal que du côté N-terminal

permettent la présentation de SIINFEKL. Toutefois, seuls ceux comportant l'extrémité C-terminale correcte permettent la présentation de l'antigène en cas d'inhibition du protéasome. Des résultats similaires à SIINFEKL⁵⁰⁴ ayant été obtenus pour deux antigènes viraux, il n'en fallut pas plus pour considérer que les extrémités N- et C-terminales de la majorité des peptides antigéniques sont produites par deux activités protéolytiques distinctes^{505 370}. L'étape limitante est effectuée par le protéasome dont les clivages au sein de la protéine parentale d'un antigène produisent l'extrémité C-terminale de celui-ci. Si elle n'est pas produite par le protéasome, l'extrémité N-terminale peut alternativement l'être par une activité aminopeptidasique du cytosol ou du réticulum. L'unique maturation possible de l'extrémité aminoterminal des précurseurs antigéniques repose sur 2 observations complémentaires. D'une part, l'acétylation du NH₂-terminal de précurseurs comportant l'extrémité C-terminale de SIINFEKL ou de 2 antigènes viraux diminue la présentation de ces antigènes^{504 505}. D'autre part, les traitements de cellules à la bestatine ou à la leucinethiol, deux inhibiteurs de métalloaminopeptidases, compromettent respectivement la présentation de SIINFEKL^{539 540} et la densité de certaines MHC-I à la membrane plasmique⁵⁴¹.

Complémentairement, Goldberg considérait qu'il ne pouvait y avoir de maturation de l'extrémité C-terminale car selon lui, le cytosol et le réticulum seraient tous deux dépourvus d'activité carboxypeptidasique^{376 539}. Par la suite, plusieurs membres de la famille des métallocarboxypeptidases M14, ont été identifiés dans le cytosol et/ou le réticulum^{542 543}. Par ailleurs, l'élimination d'un fragment C-terminal de 3-10 résidus est une activité pouvant être réalisée par une endopeptidase dont le cytosol ne manque assurément pas. Cette hypothèse a récemment été démontrée en substance dans la caractérisation de l'apprêtement de deux antigènes tumoraux PRAME/HLA-A3 et Melan-A/HLA-A2⁵⁴⁴. Bien que le protéasome soit indispensable à l'apprêtement, l'extrémité C-terminale de ces deux antigènes est produite par la thimet oligopeptidase et/ou la nardilysine, deux métalloendopeptidases cytosoliques. Par ailleurs la maturation de l'extrémité N-terminale du peptide PRAME ne dépendrait pas d'une aminopeptidase mais bien de la nardilysine. Notons que l'apprêtement de ces deux peptides réunit pas moins de 3 exceptions aux règles de l'apprêtement conventionnel des antigènes proposées par Goldberg.

III.1.5. Maturation/Destruction des peptides antigéniques

L'idée que le rôle principal du protéasome soit de produire l'extrémité C-terminale des peptides antigéniques poussa certaines équipes à identifier différentes peptidases, principalement des aminopeptidases, impliquées dans la **maturation** des peptides produits par le protéasome. Par ailleurs, la demi-vie des peptides étant très courte, ils sont rapidement dégradés vraisemblablement pour éviter d'interférer dans les interactions protéiques^{545 546} (**Figure 30**). Ces activités cytosoliques limitant fortement la source en peptides antigéniques, d'autres équipes ont alors cherché à identifier les peptidases responsables de la **destruction** massive des peptides du cytosol.

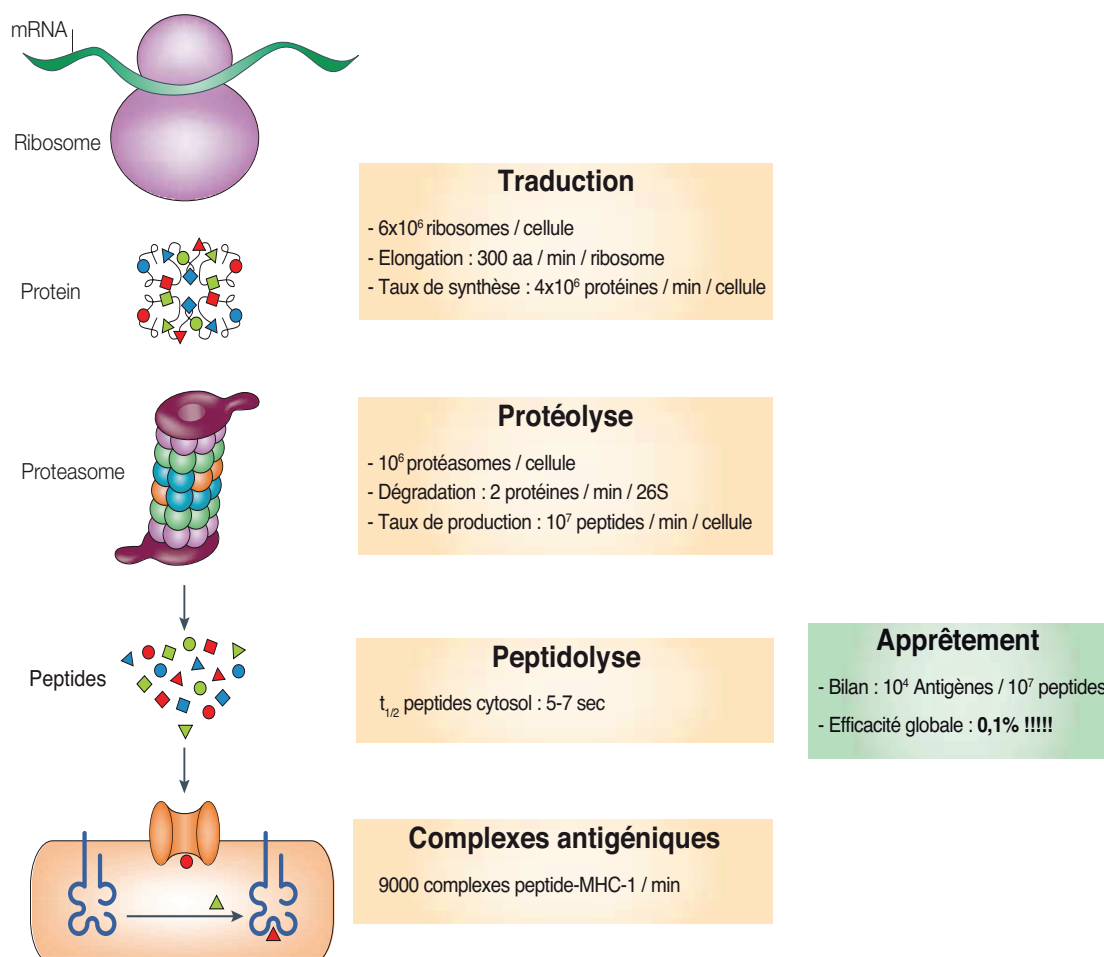


Fig.30. Efficacité stochastique de l'apprêtement.

L'efficacité de l'apprêtement des antigènes a été estimée en comparant les bilans de la synthèse protéique, de la dégradation protéique et de la formation de complexes antigéniques pour une protéine humaine hypothétique de taille moyenne (466 acides aminés EMBL). Modifié de Yewdell, J. 2003.⁵⁴⁷

Maturation par des peptidases cytosoliques :

Les premières peptidases à avoir été étudiées dans l'apprêtement des antigènes étaient des aminopeptidases, la leucine aminopeptidase (LAP), la puromycin sensitive aminopeptidase (PSA), et la bleomycin hydrolase (BH) (**Figure 31**). Outre le fait d'être des aminopeptidases, elles ont au moins trois points communs. Toutes trois sont localisées dans le cytosol, une localisation que l'on considérerait idéale pour la maturation des extrémités N-terminales des antigènes. D'autre part, toutes trois sont surexprimées en cas de traitement à l'IFN- γ , une cytokine qui en surexprimant notamment l'IP, les HLA, la β 2m, TAP, la tapasine, augmente le niveau des complexes antigéniques en surface. Enfin, toutes les trois ont été impliquées dans l'apprêtement d'antigènes en particulier produits par le protéasome, LAP dans celui du peptide immunodominant de l'ovalbumine ⁵⁴⁸, TPPII et PSA dans celui d'un antigène du carcinome rénal (RU1/HLA-B51) ⁵⁴⁹. Ces caractéristiques poussèrent à développer des modèles murins afin d'évaluer le rôle global de ces peptidases dans l'apprêtement des complexes de classe I. Il en ressortit une 4^{ème} caractéristique commune, un déficit d'expression de ces peptidases ne modifiait pas le niveau global des complexes en surface et ne diminuait pas la réponse immune à un virus ^{550 551}. Cependant on notait que l'absence de la PSA réduisait la présentation de MHC-I en surface de cellules dendritiques ⁵⁵¹. Le manque de spécificité de ces peptidases et la redondance de leur activités respectives expliqueraient que le déficit de l'une soit compensable par l'ensemble des autres aminopeptidases ^{28 550}. Kim, étudiant l'influence de PSA et BH au niveau humain, observa que l'expression de ces deux peptidases influençait le niveau des complexes humains de façon différente selon les variants alléliques étudiés ⁵⁵². La diminution de l'expression de la PSA diminue l'expression des complexes restreints à l'HLA-A68 mais augmente ceux restreints à B8 et B15. En plus d'avoir les mêmes effets sur les complexes A68 et B15, la diminution de l'expression de BH augmente quant à elle les complexes A3 et non les B8. TPPII est une autre aminopeptidase ayant été impliquée dans la maturation des précurseurs antigéniques. Son rôle est abordé dans le point consacré à l'apprêtement alternatif (§ III.2.2).

Maturation dans le réticulum endoplasmique :

On estime à 95% la proportion de peptides antigéniques dépendant de TAP pour leur apprêtement. TAP transportant efficacement des peptides 8 à 22 acides aminés, cela supposait que les peptides antigéniques atteignaient le compartiment de chargement soit sous leur forme mature soit sous forme de précurseurs nécessitant une maturation dans le réticulum^{553 554}. L'apprêtement d'un antigène à partir de l'expression dans le réticulum de cellules déficientes pour TAP de précurseurs allongés du côté N-terminal, démontrait les capacités de maturation aminopeptidasique du réticulum⁵⁵⁵. La stabilité des peptides incubés avec des extraits de microsomes étant plus grande que celle de ceux incubés avec des extraits de cytosol, indiquait que le réticulum possédait une diversité moindre de peptidases⁵⁵⁶ (**Figure 31**). L'essentiel de l'activité aminopeptidasique du réticulum serait assuré chez l'homme par deux peptidases, ERAP1⁵⁵⁷ et ERAP2 (ER-aminopeptidases)^{558 559}, et par une seule chez la souris qui ne possède pas de gène équivalent pour la seconde⁵⁶⁰. Comme LAP, BH et PAS, ces deux métalloaminopeptidases sont aussi surexprimées en présence d'IFN- γ ^{561 562}.

Les spécificités de clivages de ERAP 1 et 2 sont relativement complémentaires, ERAP1 clivant préférentiellement en aval de résidus hydrophobes et ERAP2 en aval de basiques. Cependant l'utilisation de peptides naturels et non de fluorogéniques montre des spécificités de clivages beaucoup moins restrictives ; à l'exception toutefois de l'incapacité de clivage en aval de résidus prolyles ou acides^{541,563,564}. La spécificité très frappante d'ERAP1 concerne la taille de ses substrats et de ses produits. Elle clive plus efficacement des oligopeptides de plus de 8 résidus possédant généralement une extrémité C-terminale hydrophobe et libère majoritairement des peptides de 8 à 9 résidus⁵⁶⁵. Plébiscitant tout comme TAP et les MHC-I, des peptides pourvus d'extrémités C-terminales hydrophobes, ERAP1 favoriserait la maturation des précurseurs et limiterait la destruction des formes matures⁵⁶⁵⁻⁵⁶⁷. Ainsi, les cellules murines ERAP1^{-/-} ont un niveau de présentation des MHC-I diminué (20-50% selon les allèles) ; une diminution d'autant plus marquée en présence d'IFN- γ qui augmente la proportion de précurseurs antigéniques allongés du côté NH2 par induction de l'IP⁵⁶⁸⁻⁵⁷⁰. Cependant si ERAP1 est bien indispensable à la maturation de certains antigènes, elle est aussi délétère à la production d'autres⁵⁶⁷. D'autre part, la déficience en ERAP1 n'altère pas la réponse à l'infection du LCMV⁵⁶⁸. De façon simplifiée, on considère que l'impact majeur d'ERAP1 dans le répertoire antigénique

est surtout d'ordre qualitatif. Les transferts adoptifs entre souris ERAP1^{-/-} et ERAP1^{+/+} induisent des réponses CTL dans les deux sens⁵⁷¹. En plus d'être moins stables, les complexes MHC-I exprimés par les cellules ERAP1^{-/-} semblent plus immunogènes que ceux des cellules congéniques. Bien que leurs séquences primaires soient relativement semblables, l'activité peptidasique de ERAP2 ne diminue pas face à des substrats ayant (atteint) une taille optimale pas comme celle de ERAP1⁵⁶⁶. Toutefois, la perte de son expression diminue d'environ 10% le niveau des complexes antigéniques en surface⁵⁶³. Par ailleurs, l'apprêtement de certains peptides dépend de ERAP2 et non de ERAP1 tandis que l'apprêtement d'un autre nécessite qu'elles forment un complexe hétérodimérique. En conclusion, ces deux peptidases exercent donc un rôle majeur dans l'apprêtement des peptides antigéniques.

Destruction des peptides antigéniques

En marge des équipes cherchant à identifier des peptidases responsables de la maturation des peptides antigéniques, Saric et Goldberg, partant de la notion de base que 90% des peptides produits dans le cytosol sont recyclés en acides aminés, essaieront d'identifier des activités cytosoliques limitant naturellement la production d'antigènes. Ils observeront que 90-95% de l'oligopeptidolyse du cytosol peut être bloquée par l'inhibition des métallopeptidases (o-phenanthroline)⁴⁶⁴ (**Figure 24**). Ils identifieront que la thimet oligopeptidase (TOP) est responsable de 50-70% de la dégradation des oligopeptides incubés avec une fraction cytosolique^{464 465}. *In vivo*, la diminution de l'expression de TOP (par siRNA) augmente de 50% le niveau en surface des complexes HLA-A/-B et -C⁵⁷². Complémentairement, sa surexpression réduit notamment l'apprêtement de 3 antigènes dépendant du protéasome mais n'affecte pas celui d'antigènes directement produits dans le réticulum⁵⁷². Ces observations contribueront à considérer l'activité de TOP principalement responsable de la limitation de la source en peptides antigéniques (**Figure 31**). Ce constat est quelque peu surprenant au vu des caractéristiques enzymatiques de TOP. En effet sur base de ses caractéristiques enzymatiques, TOP pourrait être une oligopeptidase de choix pour une maturation C-terminale de précurseurs antigéniques libérés par le protéasome. Archétype de l'oligopeptidase, TOP cible préférentiellement des peptides de 7 à 15 résidus (maximum 17) et libère majoritairement des peptides de 6 à 12 résidus^{467,573-575}.

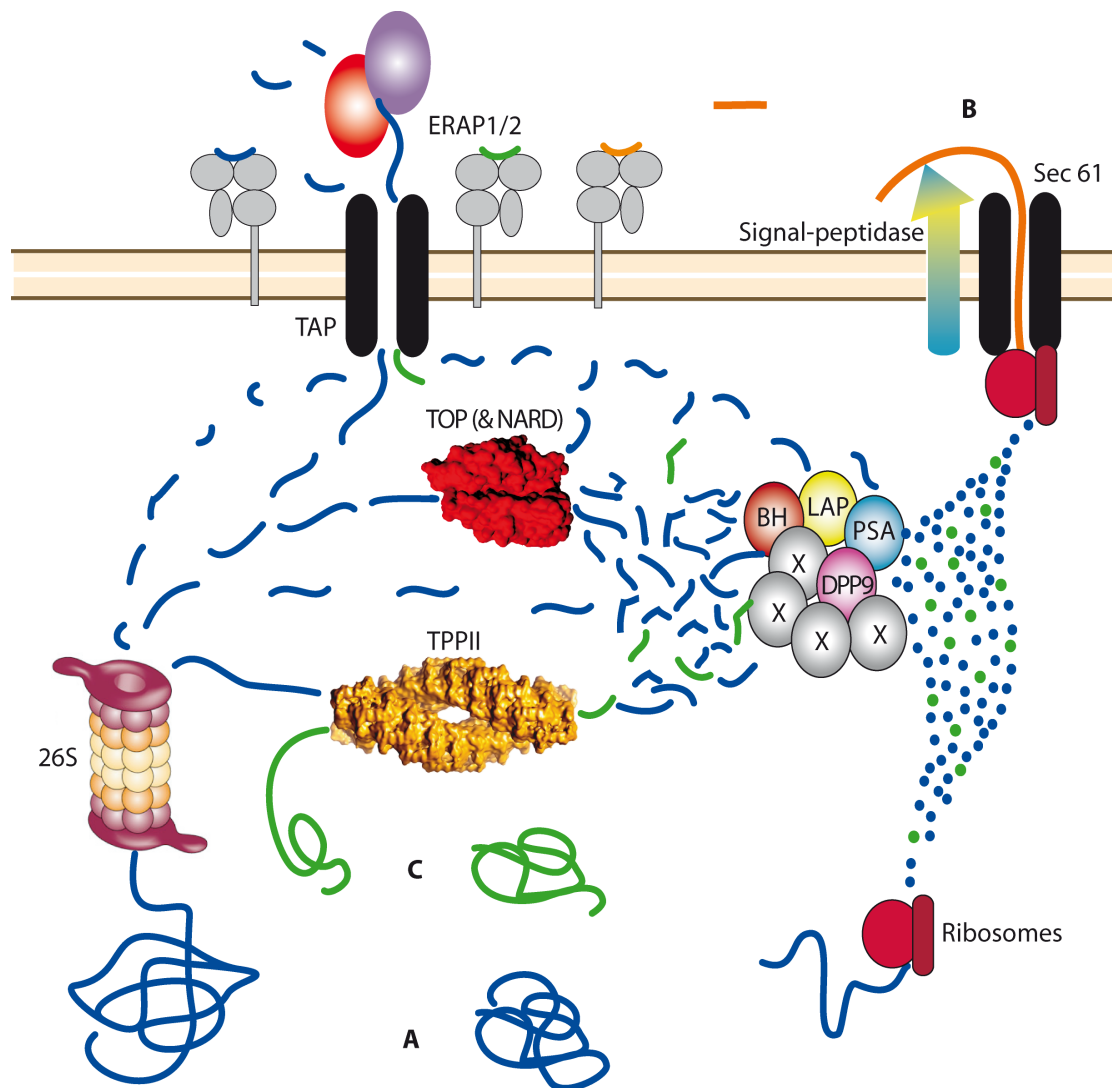


Fig 31. Rôles des différentes peptidases cellulaires dans l'apprêtement des antigènes de classe I.

Plus de 90% des peptides antigéniques sont produits dans le cytosol avant d'être transférés dans le réticulum endoplasmique (RER) via TAP pour y être associés à des molécules HLA nouvellement synthétisées. Pour la grande majorité d'entre eux, l'étape initiale de la production est réalisée par le protéasome (**A**) qui est le principal système protéolytique du cytosol. Environ 90% des produits de l'activité du protéasome sont convertis en acides aminés par l'activité peptidasique du cytosol et sont réinvestis dans la synthèse protéique. Les peptides échappant à la destruction sont associés à des molécules HLA soit directement, s'ils ont une taille comprise entre 8 et 10 acides aminés, soit après une étape de maturation peptidasique, pour les plus longs. Bien que plusieurs peptidases cytosoliques aient été impliquées dans la maturation de certains peptides antigéniques, la majorité de la maturation des précurseurs est réalisée dans le réticulum par les aminopeptidases ERAP1 et/ou ERAP 2. Une minorité de peptides antigéniques peut être produite par **deux** voies alternatives qui n'impliquent pas le protéasome. La première, concerne des peptides antigéniques (3-5% du répertoire antigénique) dont l'apprêtement ne dépend pas de TAP (**B**). La plupart de ces peptides sont produits à partir du peptide signal de protéines transmembranaires ou sécrétées libéré dans le réticulum par la signal-peptidase. La seconde voie alternative concerne des peptides antigéniques produits dans le cytosol par la tripeptidyl peptidase II (TPPII) (**C**). **Abbreviations:** 26S (protéasome 26S), BH (bleomycin-hydrolase), DPP9 (dipeptidyl peptidase 9), ERAP (endoplasmic reticulum aminopeptidases), LAP (leucine aminopeptidase), NARD (nardilysine), PSA (puromycin-sensitive aminopeptidase), TAP (transporter associated with antigen processing), TOP (thimet oligopeptidase), TPPII (tripeptidyl peptidase II), Sec61 (translocon), X (peptidases n'ayant pas encore été impliquées dans l'apprêtement).

Comme beaucoup de peptidases, sa spécificité de clivage est relativement large. TOP cible l'extrémité C-terminale (entre les résidus -3 à -6 depuis le COOH) de peptides et clive le plus souvent en aval d'un acide aminé hydrophobe (ou basique moins fréquemment) ^{467,573,574,576-578}. Avec ces caractéristiques, il n'est donc pas étrange que TOP ait récemment été impliquée dans la maturation C-terminale (considérée peu probable, § III.1.4) de deux peptides antigéniques tumoraux ⁵⁴⁴. Une collaboration avec le laboratoire de Melchior nous a amené à identifier une autre peptidase cytosolique limitant naturellement l'apprêtement de l'antigène tumoral RU1/HLA-B51. La recherche de partenaires moléculaires interagissant spécifiquement avec des protéines modifiées par SUMO-1/-2 (small ubiquitin modifier proteins) avait mené à l'identification de deux aminopeptidases cytosoliques ubiquitaires, DPP8 et DPP9 (dipeptidylpeptidases 8 et 9) ⁴⁸². La spécificité de ces peptidases est très restreinte puisque les clivages ont strictement lieu en aval de prolines présentes en seconde position depuis l'extrémité N-terminale de peptides. En plus de jouer un rôle important dans le recyclage des résidus prolyles en assurant 90% de l'élimination cytosolique, vraisemblablement en partenariat avec la prolidase (**Figure 25**), des motifs X-Pro, l'expression basale de DPP9 limiterait naturellement l'apprêtement du peptide antigénique tumoral RU1/HLA-B51 (VPYGSFKHV) ⁴⁸². Au delà de l'antigène RU1, DPP9 pourrait limiter plus généralement la présentation de complexes HLA-B51 mais aussi -B7 présentant des peptides avec une proline en position 2. Cependant des résultats (non-publiés) montrent que la chute de l'expression de DPP9 n'affecte pas le niveau d'expression des complexes B7 naturellement exprimés par la lignée 293-HEK. Ce n'est cependant pas étonnant car, exception faite de RUI/HLA-B51 qui est produit dans le cytosol ⁵⁴⁹, on considère que de tels peptides antigéniques atteignent le réticulum sous forme de précurseurs car une proline en position 2 (et 1) est défavorable à la translocation par le transporteur TAP ^{579 580}.

III.2. Voies alternatives

III.2.1. Apprêtement protéasome-indépendant et TAP-indépendant.

La plupart des peptides antigéniques sont produits dans le cytosol puis transférés via le transporteur TAP dans le réticulum endoplasmique où ils sont associés aux molécules HLA. Toutefois, au début des années nonante, il fut observé que des cellules déficientes pour l'expression du transporteur TAP comme la lignée T2 (lignée n'exprimant aucune des sous-unités TAP suite à une délétion chromosomique dans la région 6p21.3) avaient certes une faible densité en complexes antigéniques à leur surface mais elles restaient capables d'activer certains clones de CTL^{581 582}. La plupart des peptides TAP-indépendants identifiés à ce jour dérivent de la séquence-signal de protéines membranaires ou sécrétés clivées durant leur synthèse par la signal peptidase^{581 582}. Les cellules T2 exprimant l'HLA-A2, il n'est donc pas étrange que les premiers peptides antigéniques TAP-indépendants soient principalement présentés par ce même HLA⁵⁸². Ce type d'apprêtement n'est toutefois pas restreint à l'allèle A2 car plusieurs peptides présentés par l'HLA-B7 sont eux aussi TAP-indépendants⁵⁸³ tout comme les complexes immunorégulateurs de l'allèle E (allèle de classe Ib) présentant des peptides de la séquence-signal de d'HLA de classe Ia (allèles A, B, C)^{584 585}. Les peptides TAP-indépendants sont relativement peu représentatifs puisque la perte d'1 ou 2 sous-unités du transporteur induit une perte de capacité d'apprêtement de complexes d'environ 90-99%. Par spectrométrie de masse, on a estimé que sur 160 peptides antigéniques élués, 50 étaient TAP-indépendants mais seule une moitié d'entre eux dérivait d'une séquence signale adressant la synthèse de la protéine parentale au réticulum⁵⁸⁶. Malgré leur représentation relativement faible par rapport aux peptides de la voie classique du protéasome, ces peptides ont un intérêt particulier en immunologie virale et tumorale.

Les *herpes viridae* produisent ICP-47, un polypeptide ciblant les 2 sous-unités TAP qui facilite une infection silencieuse par l'inhibition de la présentation des antigènes viraux produits dans le cytosol⁵⁸⁷. Par conséquent, les peptides viraux TAP-indépendants restent un moyen d'informer le système immunitaire d'une infection virale. Parmi la panoplie de mécanismes d'échappement au système immunitaire sélectionnés au cours du développement tumoral, certains consistent à diminuer le

niveau d'expression de complexes antigéniques notamment par la diminution du niveau d'expression de TAP^{588 589}. Là aussi des peptides antigéniques tumoraux TAP-indépendants sont cruciaux pour le maintien d'une immunité anti-tumorale et des cibles d'intérêt pour des vaccinations antitumorales^{590 591 592 593}.

III.2.2. Apprêtement protéasome-indépendant et TAP-dépendant.

Jusqu'à ce travail de thèse, la tripeptidyl peptidase II (TPPII) représentait la seule alternative connue au protéasome dans la production de peptides antigéniques au sein du cytosol. TPPII a été suspectée d'être importante à l'apprêtement des antigènes en y contribuant de deux façons : production de peptides antigéniques n'impliquant pas le protéasome et maturation de précurseurs antigéniques produits par ce dernier. Ces contributions sont cependant l'une et l'autre très controversées⁵⁹⁴. Il avait été observé que des cellules d'un lymphome murin EL-4 avaient la faculté de croître malgré la présence d'inhibiteurs du protéasome dans leur milieu de culture⁵⁹⁵. La recherche de ce système de compensation mena Geier à identifier la tripeptidylpeptidase II (TPPII), un énorme complexe protéolytique de 5-9 MDa auto-compartmenté à l'image du protéasome et dégradant avec aisance le peptide fluorogénique AAF-AMC, dont l'activité de dégradation était accrue dans les extraits des cellules EL4 adaptées³⁸⁰. TPPII est une sérine aminopeptidase trimant de façon régulière des tripeptides depuis l'extrémité aminoterminal de peptides ou de polypeptides d'au moins 41 résidus. En plus de son activité aminopeptidasique, TPPII a aussi une activité endopeptidase mineure (a priori 0,2% de l'activité exopeptidasique). Elle est inhibée efficacement mais peu spécifiquement par l'AAF-CMK (**Figure 2**) et moins efficacement et *a priori* plus spécifiquement par un compétiteur, le butabindide. TPPII a été identifiée comme voie alternative au protéasome à l'apprêtement d'un peptide immunodominant dérivé de la protéine Nef produite par HIV-I⁴⁷⁵. Bien que des antigènes dérivés de cette même protéine soient produits par le protéasome, l'inhibition de ce dernier (époxomicine notamment) n'affectait pas la présentation du peptide Nef₇₃₋₈₂. A l'inverse, l'inhibiteur non spécifique (AAF-CMK) et la diminution de l'expression de TPPII (siRNA) diminuaient bien l'apprêtement. *In vitro*, TPPII, au contraire du protéasome, est capable de produire le peptide antigénique à partir d'un précurseur de 34 résidus. Cette étude ne montre cependant pas si TPPII peut comme le protéasome

cibler et dégrader la protéine Nef entière ; une capacité qui convaincrait de sa capacité à produire des antigènes indépendamment au protéasome. Depuis plus de 10 ans, aucune étude n'a apporté la démonstration d'une éventuelle capacité protéinasique de TPPII ⁴⁷². Bien qu'un rapport récent montre que le traitement à l'AFF-CMK induit une accumulation cytoplasmique de protéines polyubiquitinées, cette accumulation n'est en rien dépendante d'inhibition de TPPII, démontrant (une fois encore) le peu de spécificité de cet inhibiteur ⁵⁹⁶. Plus récemment TPPII a été identifiée dans l'apprêtement de trois autres antigènes, deux produits à partir de la protéine LMP1 du virus EBV (epstein barr virus) et mieux présentés en cas de l'inhibition du protéasome ⁴⁷³, et un troisième LLO₉₁₋₉₉, produit lors de l'infection de *listeria monocytogenes* dont l'apprêtement ne serait pas affecté par l'inhibition du protéasome ⁵⁹⁷. Les complexes antigéniques présentés par les allèles B27 (surtout le variant *2705), A68, B8, B14 et A3 A2 résistent relativement mieux que d'autres comme A1 ou B51 à une inhibition du protéasome ^{598 599}. Les peptides antigéniques présentés par l'HLA-B27 par une voie considérée alternative au protéasome (résistante à l'époxomicine) dérivait d'un protéome particulier caractérisé par des protéines de petite taille (6-16,5 kDa) relativement basiques ⁵⁹⁹. Cependant, le butabindide (ou des siRNA-TPPII) n'affecte pas la présentation des complexes B27 pas plus que celle des complexes A3, A68 et B7, suggérant que TPPII ne soit pas impliquée dans la production de peptides antigéniques produits *a priori* de façon protéasome-indépendante ^{599,600}.

Le rôle de TPPII dans la maturation des peptides antigéniques protéasome-dépendants ne semble pas plus important que son rôle dans l'apprêtement alternatif. Chez la souris, sur 7 antigènes étudiés produits par le protéasome, la présentation de 6 était indifférente au butabindide et celle d'un 7^{ème} était améliorée ⁶⁰¹. Une conclusion similaire a été obtenue à l'aide de siRNA et il en a été conclu que TPPII était éventuellement requise à l'apprêtement de certains peptides antigéniques ainsi qu'à la dégradation d'oligopeptides (> 15 résidus) mais qu'elle n'a pas de rôle majeur dans l'apprêtement des antigènes ⁶⁰². Dans deux modèles murins, KO ⁶⁰³ ou gene-trap ⁶⁰⁴, la perte de TPPII ne semble pas induire de désordres immuns notables, ni d'altération de la réponse antivirale à l'infection du virus LCMV ^{603 604}. On note toutefois une augmentation du niveau des complexes classe I ⁶⁰³, une présentation relativement plus faible d'épitopes du LCMV mais une meilleure présentation de l'antigène SIINFEKL produit soit à partir de la protéine endogène (transfectée) soit après son internalisation

(présentation croisée), associée à une diminution de la destruction cytosolique de l'épitope ⁶⁰³.

En conclusion, que ce soit de façon concertée ou alternative au protéasome, la majorité des études semble montrer que TPPII aurait un rôle mineur ou légèrement délétère à l'apprêtement global des antigènes de classe I ^{603 604}.

III.2.3. Autophagie et apprêtement.

Les peptides présentés aux CD4 sont issus de protéines exogènes dont la dégradation est intravésiculaire (endosomes/endolysosomes) ⁶⁰⁵. Toutefois, Il a été montré par protéomique qu'une partie du répertoire antigénique CD4 dérivait de protéines endogènes ⁶⁰⁶. De façon complémentaire, il a aussi été montré que des clones de lymphocytes CD4 reconnaissaient des peptides dérivés de protéines endogènes d'origine virale ^{607 608} ou tumorale ^{609 610}. L'étude de l'apprêtement de certains montre qu'ils sont produits au niveau du cytosol par une voie dépendant à la fois du protéasome et du transporteur TAP ⁶¹¹. Pour d'autres en revanche, la production est vésiculaire et dépend de la macroautophagie ^{612 613 614} ou de la CMA ⁶¹⁵.

La majorité des antigènes présentés aux CD8 sont issus de la dégradation de protéines endogènes qui implique principalement le protéasome et non les hydrolases lysosomale ; expliquant que le rôle de l'autophagie soit peu documenté ³⁷⁰. Une étude montre que l'autophagie aurait une influence ambivalente sur le niveau d'expression des complexes antigéniques de classe I ⁶¹⁶. Au niveau de macrophages murins péritonéaux, son inhibition augmenterait les MHC-I en surface. Son induction, aurait le même effet au niveau d'une lignée murine de mélanomes sauf en cas de traitement à l'IFN- γ où elle potentialiserait la surexpression des complexes induite par la cytokine. L'apprêtement d'antigènes produits lors de l'infection du HSV impliquerait à la fois le protéasome et une forme atypique d'autophagosomes (quadruple membrane bilipidique au lieu d'une double) contenant des particules virales nouvellement produites ⁶¹⁷. Ces deux études montrent tout au plus que l'autophagie modulerait l'apprêtement classe I mais ne démontrent pas qu'elle soit une source de peptides antigéniques.

III.3. Les antigènes MAGE

L'acronyme MAGE (Melanoma Antigen Gene) fait référence au type histologique de la lignée tumorale à partir de laquelle Pierre van der Bruggen a identifié le premier antigène *spécifique de tumeur*, MAGE-A1₁₆₁₋₁₆₉/HLA-A1⁶¹⁸. Cet antigène a été identifié grâce à une banque d'ADN génomique réalisée à partir d'une lignée tumorale humaine capable de stimuler une population clonale de lymphocytes cytolytiques autologues. Cette banque a été criblée par transfection dans une lignée tumorale autologue incapable de stimuler (mutant défectif) la population clonale de CTL. Le gène MAGE-A1 est présent dans la région Xq28 au sein d'un cluster (MAGE-A) comportant 11 autres gènes dont les séquences ont 65-86% d'identité avec celle de MAGE-A1⁶¹⁹. A l'exception des cellules progénitrices des spermatozoïdes, les gènes MAGE-A sont exclusivement exprimés par des cellules tumorales de différents types histologiques et non par les cellules saines⁶²⁰. Deux autres familles de gènes apparentés, appelées MAGE-B et MAGE-C et localisées aussi sur le chromosome X, ont elles aussi un profil d'expression similaire à celui des gènes MAGE-A {De Plaen, 1999 #1854}. Depuis la découverte de l'antigène MAGE-A1₁₆₁₋₁₆₉/HL-A1, de nombreux peptides antigéniques dérivés de protéines MAGE ont été identifiés⁶²¹ et certains, particulièrement MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1⁶²², ont été utilisés comme cibles dans des essais de vaccinations anti-tumorales⁶²³.

Le profil d'expression des gènes MAGE-A^{624,625} ainsi que la production de peptides antigéniques à partir des protéines qu'ils codent⁶²⁶ sont les principaux domaines d'études consacrés à MAGE. Avec un tel profil d'expression, il est donc étonnant que, plus de 20 ans après la découverte du premier gène MAGE, MAGE-A1⁶¹⁸, l'on ne sache que très peu de choses quant aux rôles joués par les protéines qu'ils codent⁶²⁷. Ces protéines seraient impliquées dans la survie cellulaire. La surexpression (par transfection) de MAGE-A2 et -A6 dans des lignées tumorales diminue leur sensibilité au paclitaxel et à la doxorubicin, deux agents utilisés en chimiothérapie⁶²⁸. Ces protéines seraient aussi impliquées dans la tumorigénèse. Une diminution de l'adhérence due à une faible production de fibronectine favorise la prolifération tumorale, l'invasion et la métastase⁶³⁰. Dans une lignée humaine dérivée d'un carcinome thyroïdien, diminuer l'expression de la fibronectine a pour effet de surexprimer MAGE-A3 et MAGE-A6. Avec cette même lignée, il a été observé *in*

vitro et *in vivo* (par xénogreffes) que MAGE-A3 augmente la prolifération cellulaire, l'invasion et le développement de métastases pulmonaires ⁶³⁰. Il a aussi été montré dans différentes lignées tumorales que l'inhibition de l'expression (siRNA) de MAGE-C2 ou de l'ensemble des membres de la famille MAGE-A, induirait l'apoptose via p53 ⁶³¹. L'inclusion de MAGE-C2 dans un complexe moléculaire comportant notamment des ubiquitine ligases faciliterait l'activation de l'ubiquitine par ces dernières, ce qui diminuerait la stabilité de p53 ⁶³² ainsi que celle de p21 ⁶³⁰.

But du travail

Un certain nombre de peptides antigéniques présents à la surface de cellules tumorales sont produits au cours de la dégradation de protéines singulièrement synthétisées par les cellules tumorales. Depuis la découverte du peptide MAGE-A1₁₆₁₋₁₆₉ / HLA-A1, un nombre croissant de peptides antigéniques de ce type ont été identifiés. Toutefois, l'étude de leur apprêtement n'a été entreprise que pour très peu d'entre eux.

Ce travail a pour but de caractériser l'apprêtement du peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1 qui est utilisé comme cible dans des essais de vaccinations thérapeutiques menés chez des patients souffrant de mélanomes métastatiques. L'intérêt particulier porté à MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1 venait de résultats préliminaires à ce travail qui semblaient montrer que l'apprêtement de ce peptide ne dépendait pas de la voie conventionnelle impliquant le protéasome.

Matériel et Méthodes

Cellules et milieux de culture.

La lignée de mélanome CP50-MEL et la lignée de lymphocytes B transformée par le virus EBV (CP50-EBV) ont été isolées d'un patient « CP50 » souffrant d'un mélanome et phénotypé HLA-A1⁺. Celle du lymphocyte B transformé par EBV (EB81-EBV) a été isolée à partir du patient « EB81 » souffrant d'un mélanome et phénotypé HLA-A1⁺. La lignée LB822-EBV provenant d'un patient HLA-B4403 a été décrite⁶³³. Ces lignées ont été cultivées en milieu Iscove (ID, Invitrogen) complété par 10% (V/V) de sérum de fœtus de veaux (FCS, Hyclone), d'antibiotiques (streptomycine (0.1mg/ml), pénicilline (200 U/ml)) et d'un ajout AAG (L-Arginine 0.116 mg/ml, L-Asparagine 0.036 mg/ml et L-Glutamine 0.216 mg/ml). La lignée de carcinome du colon HT-29 fut obtenue de la banque ATCC et cultivée en DMEM (Invitrogen) complétée de la même façon. Le clone de CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (LB1965-659/12.23), utilisé pour les expériences des **Figures 34 et 40-42**, a été décrit⁶³⁴. Pour toutes les autres expériences, le clone de CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (A10) utilisé provenait d'un patient souffrant de mélanome phénotypé HLA-A1⁺ qui a été vacciné avec un virus recombinant de type canarypox codant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Les clones de CTL 246/15 (Melan-A₂₆₋₃₅), IVSB (Tyrosinase₂₆₉₋₂₇₇), 210-9 (Tyrosinase₁₋₉), 346/8 (MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆), 52 (MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂) ont été décrits^{527 590 635 526}. Ces clones de CTL ont été stimulés toutes les 3 à 4 semaines par 3x10⁵ cellules stimulatrices (CP50-EBV sauf pour le CTL 346/8 qui a été stimulé avec la lignée LB822-EBV) incubées avec le peptide antigénique (5 µg/ml, 30 min) et irradiées (100 Gy) ainsi que 10⁶ cellules nourricières irradiées (100 Gy) et 10⁶ cellules LG2-EBV irradiées. Le milieu de culture Iscove (ID) contenait 50U/ml d'IL-2 recombinante et 200 µM de 1-méthyl-tryptophane (Sigma). Le virus recombinant de la vaccine codant la protéine MAGE-A3 (**Figure 48**) est un don du Pr V Cerundolo (Université d'Oxford). Le transfectant stable 293-HEK exprimant MAGE-A3 (pcDNA3, clone B9) a été produit par Francis Brasseur (LICR, Bruxelles). Les transfectants 293-EBNA surexprimant différents types de protéasome ont été décrits⁵³¹.

Réactifs

Les inhibiteurs E-64 et AEBSF ont été généreusement donnés par le Professeur Pierre J. Courtoy (Unité Cell, de Duvé Institute). A l'exception du butabindide (Tocris), du Cpp-AAF-pAB (Bachem), et de la lactacystine (Biomol Int.), tous les autres inhibiteurs de protéases utilisés dans ce travail venaient de Sigma. L'IFN- γ recombinant venait de Preprotech. Tous les anticorps utilisés étaient des monoclonaux (murins) de type IgG : IDE (clone 9B12.221 fourni par Covance et purifié sur colonne protéine G HiTrap par le Dr D Colau (LICR Bruxelles), TOP (4D6, Upstate), p21 (2946-1, Cell Signaling), Melan-A (A103, Dako), β -actine (AC-15, Sigma), α -tubuline (58666, Santa Cruz). L'anticorps anti-MAGE-A3 (clone 57B) fut fourni par le Dr G Spagnoli (université de Bale, Suisse). Cet anticorps, en plus de MAGE-A3, reconnaît MAGE-A2, -A4, -A6 et -A12⁶³⁶. L'anticorps secondaire, produit chez la chèvre, est spécifique des IgG murines et est couplé à la HRP (2302, Santa Cruz). Les peptides ont été synthétisés sur phase solide basée sur la chimie Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl). Ils ont été purifiés par chromatographie en phase inverse (PepMap C18 0.3/15, LC Packings), lyophilisés puis resuspendus à 10 ou 20 mg/ml dans du DMSO (diméthyl-sulfoxyde). La forme recombinante de l'IDE humaine (rhIDE), produite dans la lignée cellulaire Sf21, avait une pureté garantie supérieure à 95% (R&D Systems).

Etude comparative du rôle du protéasome standard et de l'immunoprotéasome dans l'apprêtement des peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, Melan-A₂₆₋₃₅, MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂

L'étude de l'apprêtement des peptides MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (HLA-A1), Melan-A₂₆₋₃₅ (HLA-A2) et MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ (HLA-B40) montrée dans la **Figure 34**, a été menée dans le modèle 293-TREX⁵²⁴. Les cellules 293 utilisées pour étudier le rôle de l'immunoprotéasome comprenaient un plasmide pCDNA4/TO codant les 3 sous-unités b-catalytiques de l'immunoprotéasome exprimées par induction à la tétracycline. Celles utilisées pour étudier le rôle du protéasome standard comprenaient une forme vide du même vecteur plasmidique. Les cellules (mises en plaque la veille, 55,000 / puits) ont été resuspendues en Optimem/Glutamax (Gibco) et transfectées

par Lipofectamine (1.5 μ L / puits, Invitrogen) avec les couples de plasmides suivants : pCDNA1-MAGE-A3 (17 ou 5.5ng/puits) et pCDNA1-HLA-A1 (50 ng/puits), pCDNA1-Melan-A et pCDNA1-HLA-A2 (50 ng/puits chacun) ou pCDNA3-MAGE-A3 (150 ng/ puits) et pCDNA3-HLA-B40 (50 ng/puits). Après 4h, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu complet. Après 24h, les peptides antigéniques (3 μ g/ml) ont été ajoutés à la moitié des puits durant 1h. Après élimination du milieu, les clones de CTL ont été ajoutés (MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ : 5500 /puits, Melan-A₂₆₋₃₅ : 4500 / puits, MAGE-A₁₁₄₋₁₂₂ : 5000 /puits) en présence d'IL-2 (25U/ml). Après 16h, l'IFN- γ produit a été mesuré par ELISA.

Traitement de lignées de mélanomes avec des inhiteurs du protéasome.

- Les cellules CP50-MEL (**Figure 35**) ont été resuspendues dans un milieu sans FCS (X-vivo 10, Lonza) et traitées 1h avec différentes doses d'époxomicine (voir axe X). Après lavage, elles ont été resuspendues dans un milieu complet (ID + 10% FCS) et cultivées en plaques durant 16h. L'inhibition du protéasome a été poursuivie avec une dose de 0.012 μ M d'époxomicine. Les cellules ont été lavées et transférées en microplaque (96 puits, 30,000/puits) et de la β 2-microglobuline humaine (EMD Biosciences) a été ajoutée (2 μ g/ml). Pour la moitié des puits, les peptides antigéniques MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ et Melan-A₂₆₋₃₅ (5 μ g/ml) ont été ajoutés durant 30 min. Les clones de CTL A10 pour MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ et 246-15 pour Melan-A₂₆₋₃₅ (10^4 / puits) ont été ajoutés pour le test d'activation mené en présence d'IL-2 (25 U/ ml). La quantité d'IFN- γ a été mesurée 16 h plus tard par ELISA (Biosource-Invitrogen).
- Les cellules EB81-MEL 2.7 (**Figure 36**) ont d'abord été resuspendues dans un tampon à pH 3 (glycine 300 mM, BSA 1%) durant 45 sec (37°C) pour éluer les peptides antigéniques présents en surface. Après lavage en milieu complet, elles ont été traitées 1h avec différentes doses d'inhibiteurs du protéasome (voir axe X) et mises en microplaque (après lavage) avec 1 μ M de lactacystin ou d'Ada (Ahx)₃(Leu)₃-vinylsulfone ou bien 0.012 μ M d'époxomicine. Après 16h, 2 μ g/mL de peptides antigéniques ont été ajoutés à la moitié des puits durant 1h. Le milieu a ensuite été remplacé et les CTL ont été ajoutés (10^4 / puits + IL-2, 25 U/ ml). La quantité d'IFN- γ a été mesurée 16 h plus tard par ELISA (Biosource-Invitrogen).

Traitement d'une lignée d'un mélanome avec des inhibiteurs de peptidases.

Tous les traitements ont été appliqués à la lignée CP50-MEL. L'orthophénanthroline (25 à 200 μ M) a été ajoutée aux cellules cultivées en milieu complet durant 16h. Pour les traitements avec l'AAF-CMK, butabindide, bestatine, phosphoramidon, Cpp-AAF-pAB, leupeptine, E64d, PMSF, pepstatine-A, les cellules ont préalablement été maintenues 3 min à température ambiante à pH 3 afin d'éluer les peptides antigéniques (tampon glycine). Après lavage, les cellules ont été cultivées en milieu ID (sans FCS) et exposées aux doses minimales d'inhibiteurs (**Tables 2-4**). Après 16h, les cellules ont été lavées, resuspendues dans du milieu X-vivo 10 et traitées avec les différentes doses d'inhibiteurs mentionnées dans les tables 3 et 4 durant 3h avant le test CTL. Pour la leucinethiol, les complexes antigéniques ont d'abord été élués (pH 3, 3min, température ambiante). Après lavage et resuspension en X-vivo 10, l'inhibiteur a été ajouté durant 5h (**Table 5**). La solution stock de leucinethiol contenait 1mM d'agent réducteur TCEP (Tris (2-carboxyethyl)phosphine). Pour les traitements avec 3-méthyladénine, bafilomycine-A1 et chloroquine, après élution des complexes antigéniques, les cellules ont été traitées durant 1h avec les doses indiquées dans la table 2. Lavées et maintenues 16 h en milieu complet, elles ont été traitées avec la dose minimale de chaque inhibiteur. Après lavage, le test CTL a été réalisé comme décrit plus haut.

Inhibition du transporteur TAP

Les cellules 293-EBNA (Invitrogen) ont été mises en microplaque (1.6×10^4 / puits) la veille de la transfection (milieu complet). Le milieu de culture a ensuite été remplacé par le milieu de transfection (Optimem + Glutamax, Gibco). Les plasmides codant MAGE-A3 (pEF-BOS-puro), HLA-A1 (pCDNA1), tyrosinase (pCDNA3), HLA-A2.1 (dans pCDNA3) ont été transfectés sous forme d'un mélange (un équivalent de 50 ng de chaque/ puits) avec la Lipofectamine (un équivalent de 1.5 μ l/puits, Invitrogen). Dans certaines conditions, un cinquième plasmide codant l'inhibiteur de TAP (ICP-47) fut ajouté au mélange (5 ou 10 ng / puits). Après 4 h, le milieu a été remplacé par de l'ID complet. Après 16h, de la β 2-microglobuline (2.5 μ g/ml) a été rajoutée dans

tous les puits. Chaque condition de transfection a été divisée en 4. Un quart a été incubé avec le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, un autre avec celui de Tyrosinase₁₋₉, un autre avec celui de tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇ (5µg/ml, 30 min) et un dernier auquel rien n'a été ajouté. Après lavage des puits, les CTL ont été ajoutés dans un milieu contenant 25U/ml d'IL-2 : le CTL MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (10⁴/puits), pour le CTL Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇ (clone IVSB, 1.5x10⁴/puits), pour le CTL Tyrosinase₁₋₉ (clone 210-9, 1.5x10⁴/puits). N.B. ICP-47 (cloné dans PBJ-Neo) est un don du Dr H-G Rammensee (Université de Tübingen).

Fractionnement subcellulaire.

Entre 1.5 et 2x10⁸ cellules n'exprimant pas MAGE-A3 (CP50-EBV) ont été homogénéisées dans un tampon de fractionnement (imidazole 3mM, sucrose 250 mM, pH 7) et à l'aide d'un piston de Dounce (B) selon un protocole déjà décrit⁶³⁷. N.B. Ici l'EDTA fut omis afin de préserver l'activité des métallopeptidases. Brièvement, l'extrait post-nucléaire (fraction E) a été séparé des noyaux et débris cellulaires (fraction N) à la suite de 4 cycles d'homogénéisation/centrifugations. Ensuite la fraction E a été centrifugée (112000xg, 1h, 4°C) afin de séparer la fraction cytosolique (fraction S) du culot des particules sédimentables (fraction MLP). Les activités de la lactate-déshydrogénase (LDH) et des cathepsines B et H ont été mesurées dans chacune des fractions solubilisée par 1% de triton X-100 afin d'estimer la qualité du fractionnement. La LDH est un marqueur cytosolique (fraction S) et les cathepsines sont actives dans les lysosomes (fraction MLP). Les grands lysosomes étant les particules les plus sensibles à la pression, le dosage des cathepsines dans la fraction S permet en plus de vérifier si le fractionnement a occasionné un relargage d'hydrolases lysosomales de la fraction MLP dans la fraction S⁶³⁷.

- L'activité LDH : Un prémélange réactionnel a été réalisé en microplaque prérefroidie sur glace. Il contenait 0.05 ml de fractions subcellulaires solubilisées (diluées 5 ou 10 fois dans le tampon de fractionnement) et 0.17 ml de NADH (0.250 mM en PBS). Juste avant lecture au spectrophotomètre, les mélanges furent complétés par 0.033 ml de pyruvate de sodium (10 mM en PBS). La diminution de l'absorbance (340 nm) du NADH a été mesurée en continu durant 5 min à 20°C.

Chaque fraction a été testée en duplicat. L'activité spécifique a été définie arbitrairement comme correspondant à la différence d'absorbance mesurée entre 150 et 300 seconde de réaction (portion linéaire de la cinétique commune à l'ensemble des fractions). Elle a ensuite été normalisée en fonction des concentrations en protéines totales de chaque fraction.

- Les activités cathepsines B et H ont été mesurées par test fluorimétrique à pH 6. Le mélange réactionnel (0.141 ml) comprenait un tampon phosphate pH 6, de l'EDTA (1mM) et de la L-cystéine (2.5mM, ajoutée extemporanément), 5 mg de protéines totales de fractions subcellulaires solubilisées et 1 µg/ml (concentration finale) de peptide fluorogénique BANA (N_α-Benzoyl-DL-arginine β-naphthylamide, Sigma). La digestion a été réalisée à 37°C durant 2h. Elle a ensuite été arrêtée sur glace avec 0.2 ml de méthanol glacial. Après homogénéisation, des aliquots (duplicat) de 0.2 ml ont été transférés dans une microplaque noire (Nunc) et la fluorescence a été mesurée ($\lambda_{\text{excitation}}$: 330 nm, $\lambda_{\text{émission}}$: 460 nm). En parallèle, une droite de calibration a été réalisée avec le produit de la réaction (β-naphthylamine, Sigma). L'activité spécifique a été définie comme étant la concentration de β-naphthylamine (µM) produite en 1h pour 1 µg de protéines totales.

Mise en évidence de l'activité produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆

Un précurseur de 20 acides aminés du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (0.25µg/µl) correspondant aux résidus 162 à 181 de la protéine MAGE-A3 et dont la cystéine₁₈₁ naturelle a été remplacée par une sérine (FGIELMEVDPIGHLYIFATS) a été incubé à 37°C avec les différentes fractions subcellulaires solubilisées (0.25 µg/µl de protéines totales) dans un tampon de digestion (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5) pour un volume final de 140-200 µl. A différents temps d'incubation, des aliquots (20 µl) ont été prélevés en duplicats ; l'un analysé par le test CTL, l'autre pour une éventuelle confirmation de la présence du peptide antigénique par spectrométrie de masse (détaillée plus loin). La réaction enzymatique a été arrêtée par 5% d'acide trichloroacétique (TCA, m/V final). Les protéines ont été éliminées par centrifugation (2x10⁴xg, 20 min, 4°C). Pour l'analyse par test CTL, les surnageants ont été lyophilisés (élimination du TCA) et resuspendus dans du milieu X-vivo 10 (55 µl).

Les cellules CP50-EBV mises en plaques (40,000 / puits) dans du milieu X-vivo 10 (25 µl) ont été incubées (30 min, 37°C) en duplicats avec 25 µl de digestat. Le clone de CTL A10 a ensuite été ajouté (10,000 / puits) en présence d'IL-2 (25 U/ml). Après 16h, la production d'IFN-γ a été mesurée par ELISA. Le type mécanistique de l'activité produisant MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ a été déterminé de façon similaire (**Figure 43**). Pour cela, avant d'ajouter le précurseur peptidique, la fraction a été incubée (30min, 4°C) avec différents inhibiteurs à large spectre, l'orthophénanthroline (1 mM), E-64 (0.1 mM), pepstatine-A (5 µM) et l'AEBSF (0.2 mM). Afin de vérifier d'éventuels effets collatéraux des inhibiteurs sur le test d'activation du CTL, le peptide antigénique EVDPIGHLY (0.25 µg/µl) a été incubé avec les mêmes inhibiteurs (en absence de protéines cytosoliques) et analysé similairement aux digestats.

Séparation par filtration sur gel

La fraction cytosolique (25 mg de protéines) a été incubée (4°C, 2h) avec une solution de sulfate d'ammonium de 40% (V/V final réalisée à partir d'une solution saturée). Les protéines du surnageant ont été concentrées (4°C, 2h) via une seconde précipitation (80% V/V). Le culot protéique fut ensuite équilibré dans le tampon de la filtration sur gel (0.5 mL, Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4). La séparation a été réalisée sur colonne Superdex 200HR 10/30 (Amersham) à un débit de 0.5 ml/min et les fractions (0.5 ou 1 ml) ont été récoltées entre 3 et 21 ml de volume de rétention. Le précurseur de 20 acides aminés (0.3 µg/µl) a été incubé avec chaque fraction (100 µl) à 37°C durant 3h. La production du peptide a été analysée par test CTL. En parallèle, des aliquots (20µl) prélevés entre 6 et 17 ml de volume de rétention et analysés par Western blot dans lequel l'anticorps monoclonal de l'IDE (1/1,000) fut co-incubé avec celui de TOP (1µg/ml). La calibration de la colonne a été effectuée avec des étalons (Amersham, 17-0441) en aval de la séparation des protéines cytosoliques après lavage (2 volumes de colonnes). Le premier mélange d'étalons injecté contenait les protéines suivantes : ferritine de cheval (440 kDa), aldolase de lapin (158 kDa), ovalbumine de poule (43 kDa). Le second contenait les protéines suivantes : thyroglobuline bovine (669 kDa), catalase bovine (232 kDa), albumine bovine (67 kDa), chymotrypsinogène A de boeuf (25 kDa).

Déplétions par immunoaffinité du protéasome et de l'IDE

Pour la déplétion du protéasome (**Figure 42**), la fraction cytosolique (1 ml) a été incubée (4h, 4°C) avec des billes (100 µl) de sépharose 4B activées au CNBr (bromure de cyanogène) saturées avec un anticorps monoclonal ciblant la sous-unité $\alpha 2$ (commune à tous types de protéasome). L'efficacité de la déplétion a été estimée comme variant entre 75 et 87 % par un test ELISA quantitatif déjà décrit⁵²⁶. Pour la déplétion de l'IDE (**Figure 46**), la fraction cytosolique (0.18 ml) a été incubée (2h, 4°C) avec des billes (80 µl) de sépharose fixant la protéine G (Amersham) saturées avec une solution purifiée de l'anticorps monoclonal dirigé contre l'IDE. Les éventuels sites de fixation vacants ont été saturés avec une solution de PBS + BSA 1% (m/V). Les billes utilisées, sélectionnées par filtration sur membrane de nylon, avaient un diamètre supérieur à 40 µm. Après déplétion, les surnageants ont été filtrés au travers d'une membrane de nylon dont les pores étaient de 10 µm. Les surnageants (156 µl) ont été utilisés pour la digestion du précurseur de 20 acides aminés (5µg/point de mesure) et des aliquots (27 µl) ont été prélevés après 30, 60 et 180 min de digestion. Les digestions ont été analysées par test CTL. La déplétion de l'IDE a été vérifiée par Western blot. Les surnageants 10 µl (ou des dilutions de deux en deux) complétés par un tampon Laemmli (5X concentré, 2.5ml) ont été dénaturés (80°C, 10 min) et chargés dans un gel Nu-PAGE 15% Bis-tris (Invitrogen). Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose (C-extra, Amersham), par méthode semi-liquide (Transblot SD, Biorad). Après 1h de saturation (PBS, lait écrémé en poudre 5% (m/V), Tween 20 (0.1%, V/V), température ambiante), la membrane a été exposée (16h, 4°C) à l'anticorps monoclonal anti-IDE (1/1,000 dans la solution de saturation) et révélée par un anticorps secondaire anti-IgG lié à la HRP (Santa Cruz, 2302).

Dégradation du précurseur du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (18-mer) par des protéasomes humains (20S) purifiés.

Le protéasome standard a été isolé à partir d'érythrocytes et l'immunoprotéasome à partir de la lignée LC-721 traitée durant une semaine à l'IFN- γ . Leur purification a déjà été décrite ⁵²⁴. Le précurseur du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ utilisé ne comportait pas 20 acides aminés mais 18 (₁₆₃GIELMEVDPIGHLYIFAT₁₈₀). Le précurseur (2.5 μ g/ point de mesure) a été incubé soit avec du protéasome standard ou de l'immunoprotéasome (1 μ g/point de mesure) dans 100 μ l d'un tampon de digestion différent (Tris 10 mM, pH 7.5). Des aliquots (20 μ l) ont été prélevés à 0, 30, 60, 120 et 160 min. Les digestions ont été arrêtées sur carboglace avec 0.1 % (V/V, concentration finale) d'acide trifluoroacétique. Ils ont été lyophilisés et resuspendus dans 12 μ l d'un tampon eau/acétonitrile (1/1) et analysés par spectrométrie de masse comme décrit plus haut.

Production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, profiles d'inhibition de la fraction cytosolique et de l'IDE.

Le précurseur FGIELMEVDPIGHLYIFATS (0.25 μ g/ml) a été incubé avec la fraction cytosolique (0.25 μ g/ μ l) ou l'IDE recombinante (2.5 ng/ μ l) dans le tampon de digestion (volume final 0.14 ml). Avant digestion, la fraction cytosolique et l'enzyme ont été incubées (30 min, 4°C) avec différents inhibiteurs, o-phénanthroline (1 et 0.1 mM), N-éthylmaléimide (1 et 0.1 mM), phosphoramidon (1 et 0.1 mM), Cpp-AFF-pAB (0.5 et 0.05 mM) et bacitracine (1 et 0.1 mM). Les digestats (30 μ l) ont été analysés par test CTL comme décrit plus haut. La table 4 montre l'activité CTL (production d'IFN- γ) correspondant à des digestats collectés après une heure de digestion.

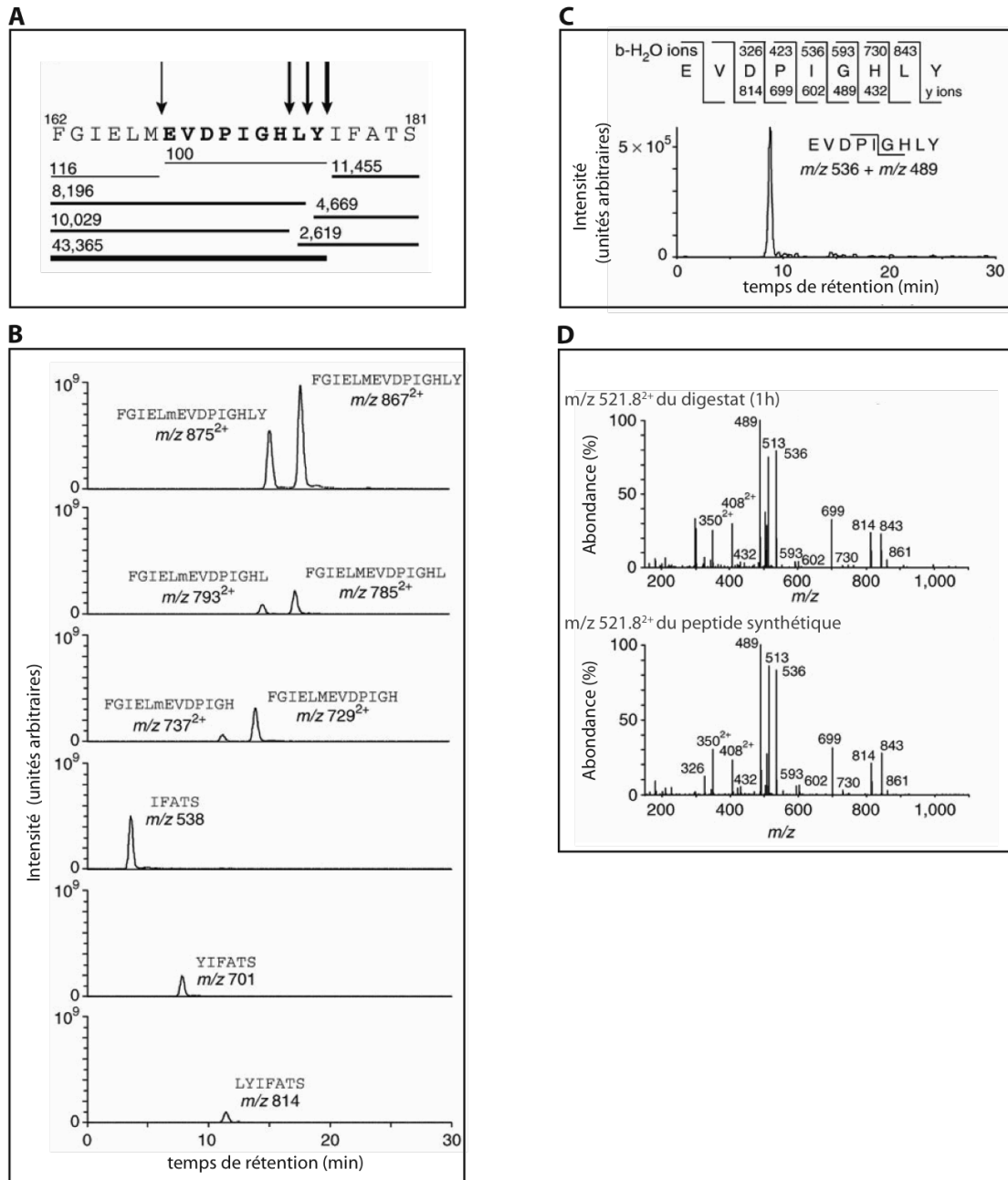


Fig 32. Analyse LC-MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie masse) de la digestion du précurseur FGIELMEVDPIGHLYIFATS par de l'IDE recombinante.

(A) Représentation des peptides (lignes horizontales) détectés après 1h de digestion (taux de dégradation du précurseur 85%). Les nombres figurant sur ces lignes correspondent à l'abondance relative (unités arbitraires MS) des peptides détectés par rapport au peptide antigénique EVDPIGHLY (100 sur le graphe). Les flèches représentent les clivages déduits à partir des couples de peptides détectés. (B) Chromatogrammes obtenus par appel d'ions spécifiques des différents peptides présents dans le digestat et dont les rapports m/z figurent en italique. L'abondance de ces peptides a été estimée par intégration de la surface de leurs pics respectifs. Pour les peptides avec 1 Met, l'abondance correspond à la somme des surfaces des pics de la forme oxydée et réduite de la méthionine respectivement symbolisées par m et M dans la séquence peptidique. (C,D) Estimation de l'abondance du peptide antigénique EVDPIGHLY à partir d'une analyse LC-MS-MS. (C) Chromatogramme obtenu par l'appel des ions m/z 536 et 489 qui sont deux des ions obtenus après fragmentation de l'ion m/z 521.8 qui correspond à la forme doublement chargée du peptide EVDPIGHLY. Ces deux ions ont été choisis pour déterminer l'abondance du peptide EVDPIGHLY dans le digestat (après addition de leurs surfaces respectives) car ils sont les plus abondants (D, inférieur) après fragmentation du peptide antigénique synthétique. (D) Comparaison des spectres de fragmentation de l'ion m/z 521.8 élué à un temps de rétention de 8.8 min à partir du digestat (supérieur) et du peptide synthétique (inférieur).

Dégradation du précurseur du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (20-mer) par l'IDE recombinante humaine

Le précurseur de 20 acide aminés (FGIELMEVDPIGHLYIFATS, 0.25 µg/µl) a été incubé avec de l'IDE recombinante (2.5 ng/µl) dans 140-200 µl de tampon de digestion. La réaction enzymatique des aliquots, prélevés à différents temps d'incubation, a été stoppée sur glace carbonique. Les duplicats de digestats ont été analysés par test CTL et spectrométrie de masse. Pour la spectrométrie de masse, les aliquots ont été injectés dans une colonne de chromatographie en phase inverse (PepMap C8 0.3/15, LC Packings) et élués avec un gradient linéaire eau-acétonitrile (5-50% V/V) contenant 0.05 % (V/V) d'acide trifluoroacétique à un débit de 4 ml/min. L'analyse MS a été effectuée en tandem avec un spectromètre LCQ Deca XP ion-trap (ThermoFinnigan). La **Figure 32** est une vue détaillée de la **Figure 46B** montrée dans la section résultats.

Production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, profiles d'inhibition de la fraction cytosolique et de l'IDE.

Le précurseur FGIELMEVDPIGHLYIFATS (0.25 µg/ml) a été incubé avec la fraction cytosolique (0.25 µg/µl) ou l'IDE recombinante (2.5 ng/µl) dans le tampon de digestion (volume final 0.14 ml). Avant digestion, la fraction cytosolique et l'enzyme ont été incubées (30 min, 4°C) avec différents inhibiteurs, o-phénanthroline (1 et 0.1 mM), N-éthylmaléimide (1 et 0.1 mM), phosphoramidon (1 et 0.1 mM), Cpp-AFF-pAB (0.5 et 0.05 mM) et bacitracine (1 et 0.1 mM). Les digestats (30 µl) ont été analysés par test CTL comme décrit plus haut. La table 4 montre l'activité CTL (production d'IFN-γ) correspondant à des digestats collectés après une heure de digestion.

Apprêtement du peptide $MAGE-A3_{168-176}$ par électroporation de précurseurs peptidiques.

Dans un premier temps les cellules CP50-EBV (1.2×10^7) resuspendues dans de l'X-vivo 10 ont (ou non) été traitées avec de l'o-phénanthroline (1 mM), de la bestatine (0.75 mM), du Cpp-AAF-pAB (0.25 mM) ou un mélange de lactacystine et de butabindide (0.050 mM chacun). Après lavage au PBS, les cellules ont été resuspendues dans 2x0.4 ml d'un tampon à conductivité réduite (Cytoporation buffer, Cyto Pulse Sciences Inc) et transférées dans 2 cuvettes (0.4 cm Gene Pulser, Biorad). Les précurseurs peptidiques (20 ou de 13 acides aminés) ont été électroporés (0.1 mM de peptide, 10 impulsions, 5 ms, 480 V, 1 Hz). Les cellules ont ensuite été reprises en X-vivo 10 (6 ml) avec (ou sans) o-phénanthroline (25 μ M), bestatine (10 μ M), Cpp-AAF-pAB (10 μ M), ou le mélange lactacystine et butabindide (1 μ M chacun). Après 4h, la moitié d'entre elles ont été incubées avec le peptide antigénique (1 μ g/ml, 1h). Après lavage, elles ont été utilisées pour un test CTL (4×10^4 cibles, 8×10^3 CTL et 25U/ml d'IL-2). L'IFN- γ produit a été mesuré par un test ELISA après 16h.

Inhibition de l'expression de l'IDE par siRNA.

- **Rôle de l'IDE dans l'apprêtement du peptide $MAGE-A3_{168-176}$.** Les cellules HT-29 (1.6×10^6) ont été resuspendues dans 0.4 ml d'une solution PBS/Cytoporation buffer (1/1). Elles ont été électroporées (cuvettes 0.4 cm, 300 V, 0.15 mF, 90 Ω) avec soit un mélange de 3 siRNA spécifiques de l'IDE, IDE-HSS105-178, IDE-HSS105-179, IDE-HSS105-180 (150 nM, Invitrogen) ou un siRNA contrôle, D-001210-01-20 (150 nM, Dharmacon). Après 72h, 10^6 cellules (dans 20 μ l de milieu complet) ont été marquées 1h (37°C) via 50 μ l d'une solution de $Na_2^{51}CrO_4$ (20 mCi, Perkin Elmer). Après centrifugation, 50 μ l du surnageant ont été remplacés par la suspension du virus recombinant de la vaccine codant la protéine MAGE-A3 (MOI : 25, 2h d'infection). Pour certaines conditions, de l'o-phénanthroline (1.5 mM) ou de l'époxomicine (1 μ M) a été ajoutée durant les 30 dernières minutes de l'infection. Après lavages, les cellules ont été divisées en deux groupes et le peptide antigénique (1.5 μ g/ml) a été ajouté à l'un des deux. Après lavage, les cellules ont été utilisées comme cibles (10^3

cellules/puits, 0.1 ml) pour tester l'activité lytique du clone de CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ en duplicat (3×10^4 CTL ou dilutions d'un facteur 3 / puits, 0.1 ml). Les surnageants (0.1 ml) ont été récupérés après 4h et déposés sur des plaques contenant un scintillant lyophilisé (Lumaplate, Perkin). La radioactivité (cpm) a été mesurée par un lecteur TopCount NXT (Perkin Elmer). En parallèle, les relargages minimal (cellules cibles + milieu) et maximal (cellules cibles + milieu + 1% de Triton X-100) de radioactivité ont été déterminés pour chaque type de cellules-cible (sexuplicats). La **Figure 48A** représente des pourcentages d'activité lytique. Ils ont été calculés comme suit $(\text{cpm}_{\text{xi}} - \text{cpm}_{\text{min}}) / (\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{min}}) \times 100$. Juste avant de procéder au test de lyse, un aliquot de chaque condition de traitement a été prélevé, lavé en PBS, lysé (10^7 /ml). Les lysats dénaturés (laemmli) ont été chargés (10 µl) dans un gel NuPage Bis-Tris (4-12%). Après transfert la membrane a été incubée avec une solution contenant les anticorps monoclonaux de l'IDE (1/500) et de MAGE-A3 (1/300). Après révélation, les anticorps ont été décrochés de la membrane par élution acide (21063, Thermo) et le niveau de chargement des pistes a été vérifié via un second Western blot avec l'anticorps anti-tubuline (0.1 µg/ml). Tous ces anticorps ont été révélés avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé la HRP (1/2,000).

- **Rôle de l'IDE dans la dégradation de la protéine MAGE-A3.** Les siRNA spécifiques de l'IDE ou le siRNA contrôle ont été électroporés dans une lignée 293-HEK exprimant stablement la protéine MAGE-A3 (clone B9, Francis Brasseur). Après 65h, 0.1 mg/ml de cycloheximide (milieu X-vivo 10) a été ajoutée durant 1h. Après lavages, les cellules ont été remises en culture (milieu complet) et ont été collectées, lavées et analysées par western blot (mêmes conditions que pour HT-29).

Comparaison de l'apprêtement des peptides MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ et MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ par une lignée de mélanome.

A J-4, la lignée CP50-MEL (milieu complet) a d'abord été exposée (ou non) à 100 U/ml d'IFN- γ recombinant. A J-1, les complexes antigéniques en surface ont été dissociés par élution acide (pH 3, 1.5 min, température ambiante). Les cellules ont été lavées et resuspendues (1h) en milieu X-vivo 10 contenant (ou non) de l'o-

phénanthroline (1 mM) et/ou de l'époxomicine (1.5 μ M). Les cellules ont ensuite été lavées et resuspendues en milieu complet avec (ou sans) IFN- γ (100 U/ml), o-phénanthroline (0.025 mM), époxomicine (25 nM). Après 16h, les cellules ont été lavées et utilisées comme cibles pour un test d'activation des clones de CTL spécifiques de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ou de MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂. Un mélange des peptides antigéniques (2.5 μ g/ml final) a été ajouté à la moitié des puits 1h avant le test d'activation des CTL. La production en IFN- γ a été mesurée par ELISA après 16h.

Etude de la dégradation de la protéine MAGE-A3 dans une lignée mélanome.

Les cellules CP50-MEL (confluentes) ont été resuspendues en X-vivo 10 en présence de cycloheximide (0.1 mg/ml) avec ou sans époxomicine (1.5 μ M) et/ou o-phénanthroline (1 mM) durant 1h. Après lavage, les cellules ont été cultivées 4, 8 ou 16h en milieu complet. Elles ont ensuite été lavées au PBS et analysées en Western blot (Nu-PAGE Bis-Tris 4-12%) séquentiellement avec les anticorps suivants : MAGE-A3 (1/300), p21 (1/800), Melan-A (0.025 mg/ml) puis un mélange comprenant les anticorps IDE (1/800), α -tubuline (0.1 μ g/ml), β -actine (0.2 μ g/ml). Tous ces anticorps ont été révélés par l'anticorps anti-IgG couplé à la HRP (1/2000). La chemiluminescence a été détectée par une caméra CCD (G :BOX biolimaging System) et convertie en pixels par le programme Syngene gene tools. La quantification a été réalisée comme suit. Dans le même gel d'électrophorèse où ont été chargés les échantillons, différents volumes de la condition « cycloheximide + epoxomicin + o-phenanthroline » ont déposés en guise de courbe de calibration. Ces courbes ont été réalisées pour MAGE-A3 ainsi que pour les trois contrôles de chargement (tubulin, actine, IDE). Les signaux (pixels) des échantillons ont été reportés à ces courbes de qualibration. Les valeurs calculées pour MAGE-A3 ont été normalisées par rapport aux valeurs calculées pour la tubuline, l'actine et l'IDE. Finalement, les valeurs normalisées de MAGE-A3 pour chaque condition ont été exprimées sous forme de pourcentages relatifs à la valeur normalisée de la condition non-traitée.

Comparaison de l'apprêtement des peptides *MAGE-A3*₁₆₈₋₁₇₆ et *MAGE-A3*₁₆₇₋₁₇₆.

L'étude de l'apprêtement de ces deux antigènes a été réalisée dans 4 transfectants 293-EBNA surexprimant les trios suivants de sous-unités β -catalytiques du protéasome $\beta 1/\beta 2/\beta 5$, $\beta 1/\beta 2/\beta 5i$, $\beta 1i/\beta 2/\beta 5i$, $\beta 1i/\beta 2i/\beta 5i$ (détaillés dans Guillaume B. 2010) ⁵³¹. Ces cellules (1.5×10^6) ont été resuspendues (0.4 ml) dans un tampon d'électroporation composé de PBS et de Cytoporation buffer (1/1). Les cDNA codant *MAGE-A3* (pCDNA1, 1 μ g), *HLA-B4403* (pCDNA3, 2 μ g), *HLA-A1* (pcDNA1, 2 μ g) ont été électroporés (cuvettes 0.4 cm, 300 V, 0.15 mF, 90 Ω). Les cellules ont été cultivées en plaque durant 24 h en milieu complet. Après 24h, elles ont été resuspendues en X-vivo 10 avec (ou sans) époxomicine (1.5 μ M) et/ou o-phénanthroline (1 mM) pendant 1h puis remises en culture 5h de plus (époxomicine 25 nM, o-phénanthroline 25 μ M) en milieu complet. Après lavage, elles ont été mises en microplaque (4×10^4 / puits). Un tiers des puits correspondant à chaque condition a été incubé 1h soit avec le peptide *MAGE-A3*₁₆₈₋₁₇₆, soit avec le peptide *MAGE-A3*₁₆₇₋₁₇₆ (5 μ g/ml chacun) ou rien avant ajout des clones de CTL. Après 16h, la production d'IFN- γ a été mesurée dans les surnageants.

Résultats

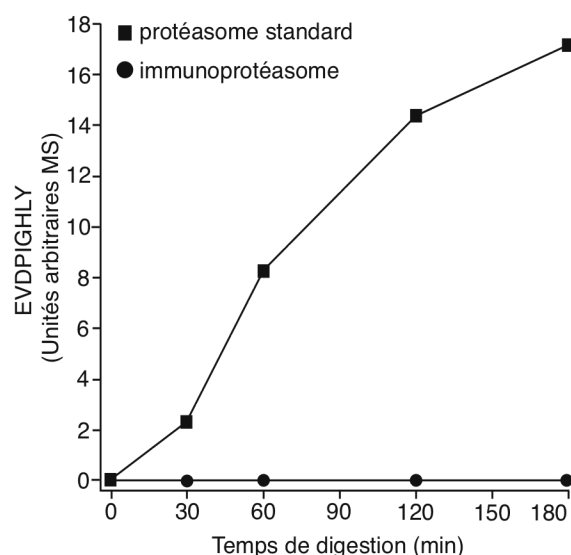


Fig 32 : Production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par le protéasome standard et l'immunoprotéasome.

Un précurseur de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (GIELMEVDPIGHLYIFAT, 2,5 µg / point de mesure) a été incubé avec du protéasome standard ou de l'immunoprotéasome 20S purifié (1µg / point de mesure). Le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (EVDPIGHLY) a été détecté par spectrométrie de masse (MS). (moyenne de triplicats ; représentatif de 2 expériences).

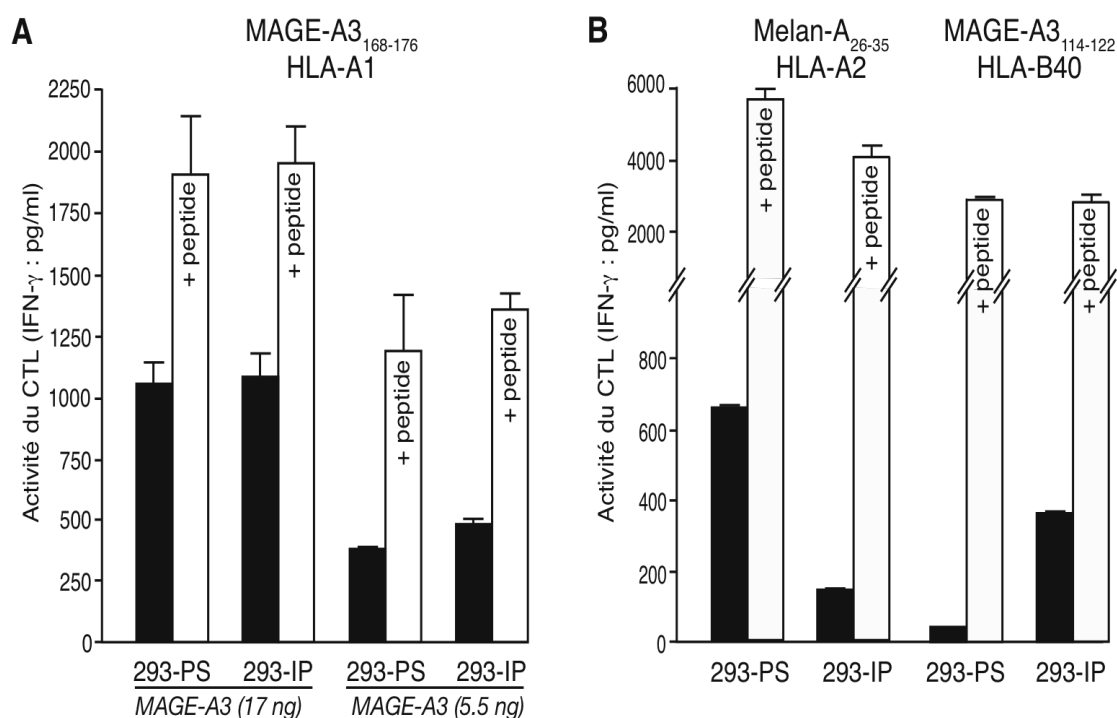


Fig 33 : Rôles respectifs du protéasome standard et immunoprotéasome dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆

Les cellules 293-TREX exprimant soit le protéasome standard (293-PS) ou l'immunoprotéasome (293-IP) ont été transfectées transitoirement (A) avec des ADNc codant pour HLA-A1 (50 ng) et MAGE-A3 (17 ou 5.5 ng) (B) avec les couples de ADNc suivants: HLA-A2 (50 ng) et Melan-A (50 ng) ou HLA-B40 (50 ng) et MAGE-A3 (150 ng). Après 24h, les clones de CTL ont été ajoutés LB1965-659/12.23 (MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆), 246/15 (Melan-A₂₆₋₃₅), CHAX 526/F7.52 (MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂). La production d'IFN-γ a été mesurée après 16h par ELISA. Les barres bâtons représentent les conditions où les peptides antigéniques ont été ajoutés (3 µg/ml, 1h) aux transfectants avant le test CTL. (moyennes ± SEM de triplicats ; représentatif de 3 expériences)

I. Le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ est produit par une voie alternative inconnue.

I.1. Le protéasome n'est pas impliqué dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.

La production de la majorité des peptides antigéniques implique de façon critique l'activité du protéasome ³⁷⁰. A l'origine de ce projet, seuls deux types de protéasomes étaient connus, le protéasome standard et l'immunoprotéasome. Si tous deux dégradent les protéines avec la même efficacité, leurs activités respectives sont qualitativement différentes ⁵¹². De façon simplifiée, par rapport au protéasome standard, l'immunoprotéasome clive plus fréquemment en aval de résidus basiques (activité *tryptic-like*) et hydrophobes (activité *chymotryptic-like*) et moins fréquemment en aval d'acides aminés acides (activité *caspase-like*) ³⁷⁴. Au niveau de l'apprêtement des antigènes, cette différence explique pourquoi certains peptides antigéniques (ex : Melan-A₂₆₋₃₅ / HLA-A2) sont mieux apprêtés par des cellules exprimant le protéasome standard, alors que l'apprêtement d'autres (ex : MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ / HLA-B40) requiert la présence de l'immunoprotéasome ^{527 526 523}. Dans notre laboratoire, la question de l'apprêtement différentiel des peptides antigéniques tumoraux a été abordée principalement par deux approches expérimentales complémentaires ^{527 524}. ⁵³¹. La première a consisté à comparer les produits des digestions *in vitro* de précurseurs de peptides antigéniques obtenus en présence des formes 20S du protéasome standard et de l'immunoprotéasome. La seconde a consisté à comparer la capacité de cellules exprimant soit le protéasome standard soit l'immunoprotéasome, à activer des clones de lymphocytes cytolytiques (CTLs) spécifiques des peptides antigéniques étudiés. A la différence de l'ensemble des peptides antigéniques étudiés précédemment, les résultats des deux approches expérimentales étaient discordants pour le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1. *In vitro*, seul le protéasome standard semblait en mesure de produire le peptide antigénique (**Figure 33**),

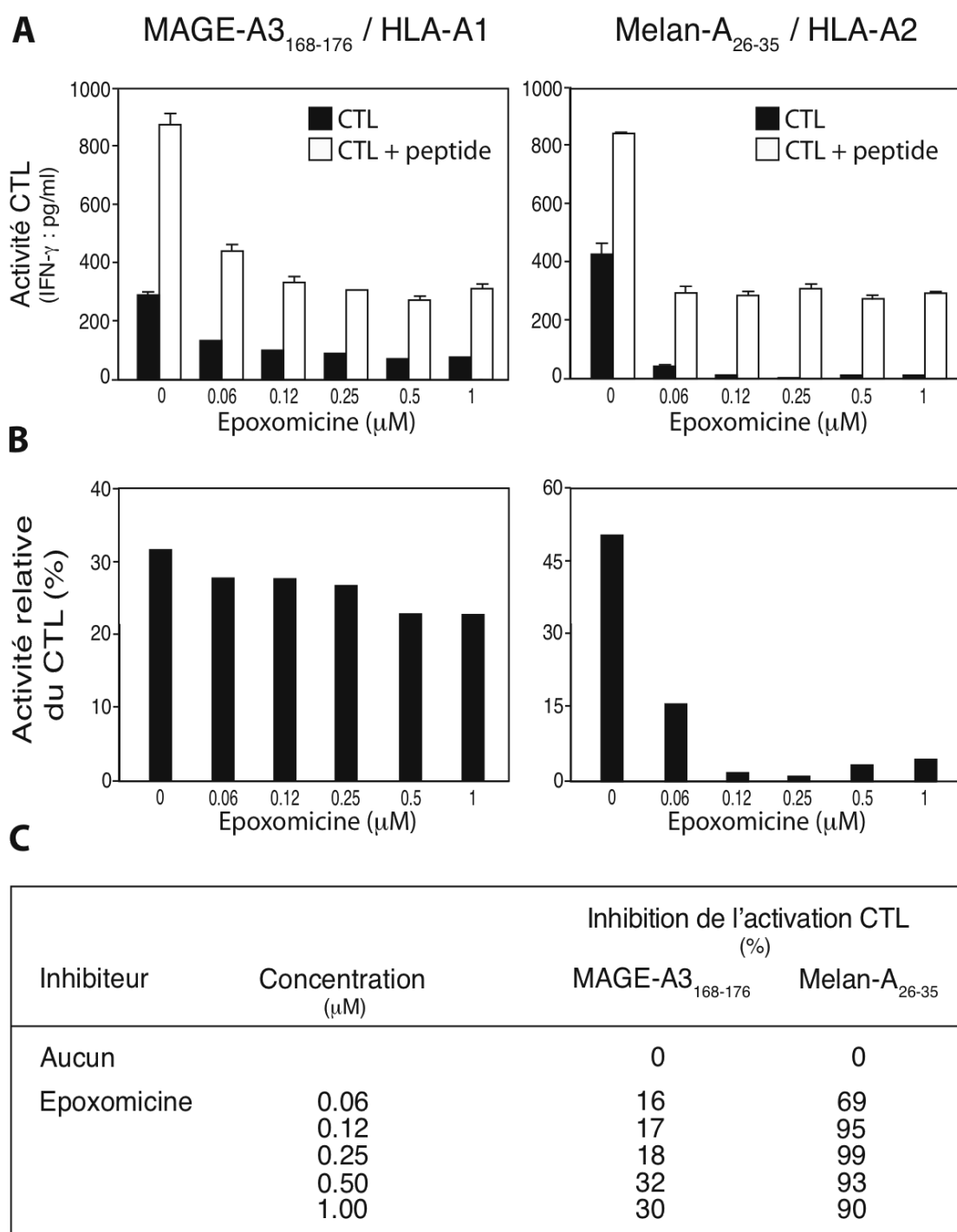


Fig 35 : Apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par une lignée de mélanome.

Les cellules CP50-MEL ont été traitées à l'époxomicine puis testées pour leur capacité à activer des clones de CTLs spécifiques des peptides MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ et Melan-A₂₆₋₃₅. La production d'IFN-γ a été mesurée par ELISA (A). En parallèle, la moitié des cellules a été incubée avec un excès de peptides antigéniques et testée similairement. Les activités CTL ont été présentées de façon relative aux activités obtenues en présence de peptides antigéniques (B). Finalement les pourcentages d'inhibition de l'activation CTL ont été calculés comme suit : $(1 - (\text{activité relative traitées} / \text{activité relative non-traitées})) \times 100$ (C). (A & B: moyennes $\pm$ SEM de triplicats ; représentatif de plus de 40 expériences).

In vivo par contre, des transfectants 293-TREX exprimant soit l'immunoprotéasome soit le protéasome standard, activaient avec la même efficacité des CTL spécifiques de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Figure 34A**). Pour autant, ces mêmes transfectants apprêtaient avec une différence de capacité les peptides antigéniques Melan-A₂₆₋₃₅ et MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ connus pour être mieux produits respectivement par le protéasome standard et l'immunoprotéasome (**Figure 34B**)^{527 526}. Deux hypothèses pouvaient expliquer cette apparente discordance. D'une part, la protéine MAGE-A3 pouvait être dégradée de façon différente selon le type de protéasome présent dans la cellule sans que cela ne porte à conséquence à l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (hypothèse illustrée dans la **Figure 53**). D'autre part, le type de protéasome étant la seule différence entre les deux transfectants 293, une capacité équivalente d'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ pouvait signifier que ce peptide soit produit par une peptidase commune aux deux types de cellules.

Une troisième approche expérimentale fut mise en oeuvre afin d'examiner le rôle éventuel du protéasome dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Nous avons testé si l'époxomicine, un inhibiteur spécifique du protéasome, affectait la reconnaissance de cellules de mélanome (CP50-MEL) par un clone de CTL spécifique du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Figure 35**). Inhiber la protéase qui est au carrefour de nombreuses voies métaboliques cellulaires n'est pas sans conséquence⁶³⁸. Ainsi même lorsque le peptide antigénique est ajouté en large excès aux cellules tumorales préalablement au test d'activation, on observe une chute de la reconnaissance des cellules traitées à l'époxomicine (**Figure 35A**). Afin de mieux apprécier l'effet de l'inhibition du protéasome sur la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, nous avons eu recours à la transformation des activités brutes en % d'activité par rapport aux activités obtenues après ajout du peptide antigénique (**Figure 35B**). Pour encore plus de lisibilité, les résultats ont été présentés sous forme de % d'inhibition d'activation en comparant les activités relatives des conditions traitées à celle de la condition non traitée (**Figure 35C**). Cette transformation permet de voir que l'inhibition du protéasome n'affecte pas la capacité d'apprêtement de l'antigène MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆. Les cellules tumorales traitées expriment aussi de façon constitutive le peptide Melan-A₂₆₋₃₅ produit par le protéasome (**Figure 34**)⁵²⁷.

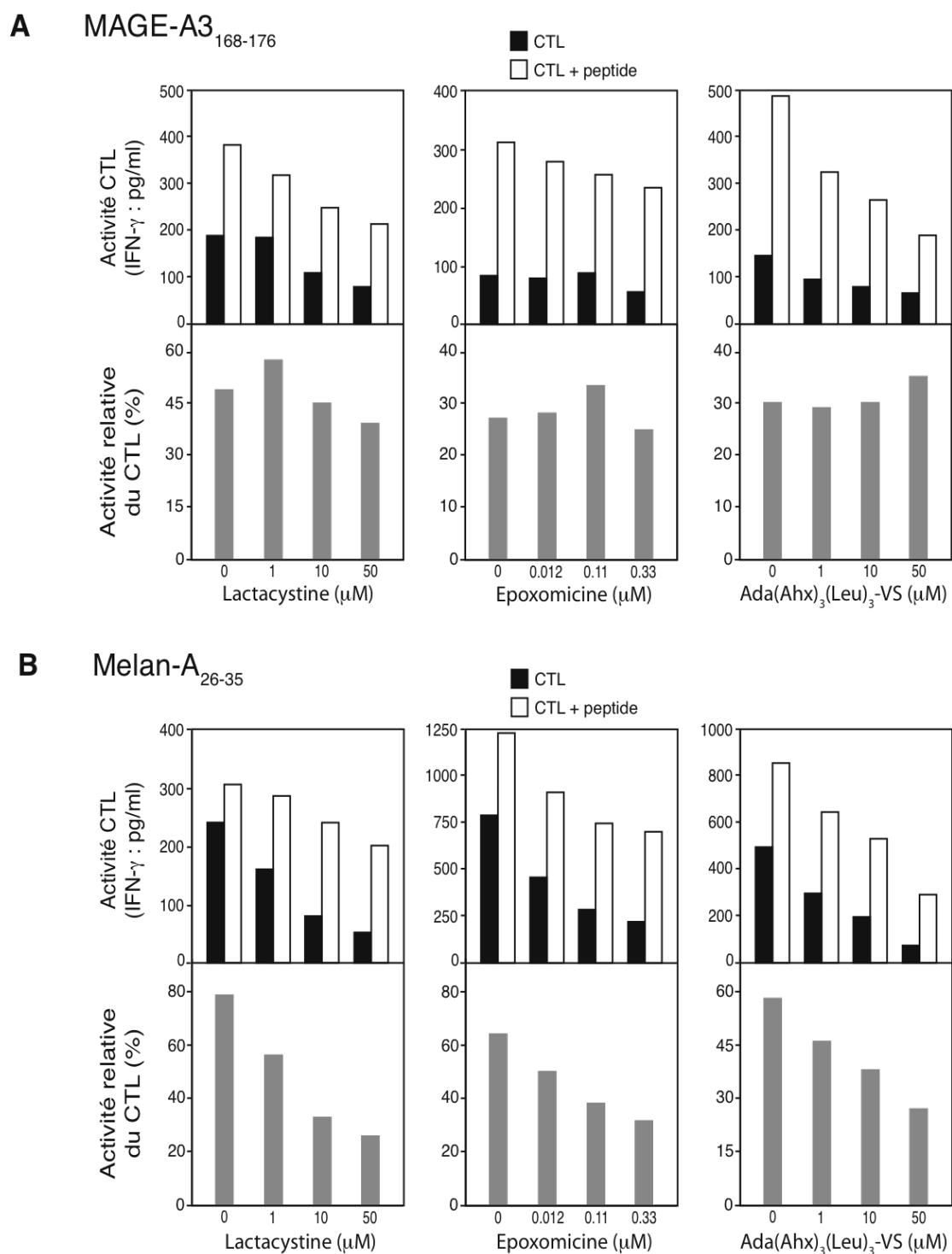


Fig 36 : Apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par une lignée de mélanome.

Les cellules EB86-MEL ont été traitées avec 3 inhibiteurs différents du protéasome (axe X) après élution de leurs complexes antigéniques à pH 3. Elles ont ensuite été testées pour leur capacité à activer des clones de CTL spécifiques de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**A**) ou de Melan-A₂₆₋₃₅ (**B**). En parallèle, la moitié de ces cellules a été incubée avec un excès de peptides antigéniques et testée similairement. Les panneaux supérieurs montrent la production d'IFN- γ mesurée par ELISA. Les panneaux inférieurs représentent les % d'activité CTL (comme expliqué dans la figure 35).

Au contraire de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, l'époxomicine affectait l'apprêtement de Melan-A₂₆₋₃₅, attestant de l'efficacité de l'inhibition du protéasome (**Figure 35, Table 1**). Les inhibiteurs du protéasome n'inhibent pas de façon optimale l'ensemble des activités du protéasome^{639 378}. C'est pourquoi, des expériences similaires ont été réalisées en faisant varier différents paramètres : autres lignées tumorales, autres inhibiteurs du protéasome (la lactacystin et un dérivé vilylsulfone), autres schémas de traitement (**ex : Figure 36**). Dans aucune de ces nombreuses expériences (> 40) nous n'avons pu observer une diminution de la capacité d'activation du CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ consécutive à l'inhibition du protéasome. En conclusion, il semblait plus que probable que le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ soit apprêté par une voie alternative.

I.2. L'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ dépend du transporteur TAP.

La majorité des peptides antigéniques étant produits par le protéasome, leur apprêtement met donc en jeu deux compartiments cellulaires, le cytosol où les peptides sont produits et le réticulum endoplasmique où ils sont transférés afin de s'associer aux molécules de présentation. Leur transfert est assuré au moyen d'un transporteur unique, TAP (pour transporter associated with antigen processing)^{640 641}. Au contraire de cette voie conventionnelle, la première voie alternative mise en évidence, ne met en jeu qu'un seul compartiment cellulaire, le réticulum endoplasmique (RER). Les peptides antigéniques apprêtés par cette voie sont directement produits dans le RER à partir du clivage pérित्रaductionnel de la séquence signal des protéines synthétisées dans ce même compartiment. L'hypothèse que le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ soit produit par cette voie semblait extrêmement peu vraisemblable. D'une part, la protéine MAGE-A3 ne comporte pas de séquence signal. D'autre part, l'analyse immunohistochimique de lignées de mélanomes montre que MAGE-A3 est une protéine cytosolique⁶⁴². Enfin, l'analyse par fractionnement subcellulaire montrait que MAGE-A1 (homologue à 66% de MAGE-A3) était majoritairement

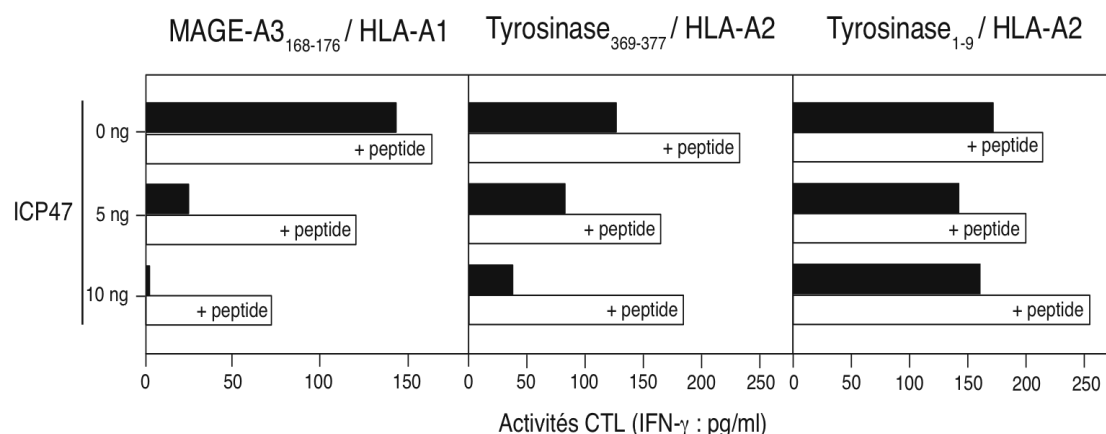


Fig 37. Rôle du transporteur TAP dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.
Des plasmides codant respectivement MAGE-A3, Tyrosinase, HLA-A1, HLA-A2 ont été transfectés transitoirement sous forme d'un mélange dans la lignée 293-EBNA. Comme indiqué, le mélange comportait un cinquième plasmide (ICP47) codant un polypeptide inhibiteur du transporteur TAP. Les cellules ont ensuite été testées pour leur capacité à activer le CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Parallèlement, les mêmes cellules ont été testées pour leur capacité à activer deux autres clones de CTL spécifiques des peptides Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇ (dépendant de TAP) et Tyrosinase₁₋₉ (ne dépendant pas de TAP). (moyennes de triplicats ; représentatif de 2 expériences).

Inhibiteur	Concentration (μM)	Spécificité	Inhibition de l'activation CTL (%)	
			MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆	Melan-A ₂₆₋₃₅
Aucun			0	0
Epoxomicine	0.06	Protéasome	16	69
	0.12		17	95
	0.25		18	99
	0.50		32	93
	1.00		30	90
AAF-CMK	5	Tripeptidylpeptidase II	8	-17
	25		4	-39
	50		17	-14
Butabindide	10	Tripeptidylpeptidase II	5	-24
	100		11	-21
	200		6	-23
3-Methyladénine	500	Autophagie	-1	-11
	5,000		2	-21
	10,000		-6	-18
Bafilomycine-A1	0.025	Autophagie	-2	-12
	0.1		7	-4
	0.5		5	-2
Chloroquine	25	Autophagie	-6	-8
	100		-2	-5
	250		-6	-27

Table 1. Apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par une lignée de mélanome.
La lignée de mélanome CP50-MEL a été traitée par les inhibiteurs listés dans la table. Elle a ensuite été testée pour sa capacité à activer des clones de CTL spécifiques de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ou Melan-A₂₆₋₃₅ (produit par le protéasome) et les % d'inhibition de l'activation des CTL ont été calculés (comme expliqué dans la figure 35).
N.B. Quel que soit le traitement, la viabilité cellulaire (évaluée par l'exclusion du bleu de Trypan) était supérieure à 70%. (Observations représentatives d'au moins 3 expériences)

associée à la fraction cytosolique et dans une moindre mesure à la fraction nucléaire^{643 644 645}. Même si la dépendance au transporteur TAP de l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ semblait évidente, elle fut tout de même vérifiée par le biais de transfectants 293-EBNA exprimant ICP47. ICP47 est un polypeptide produit par les *Herpesviridae* dont l'expression dans la cellule infectée a pour effet de bloquer le transporteur TAP, empêchant toute translocation de peptides depuis le cytosol vers le RER^{641 646}. Afin de contrôler l'inhibition de TAP, nous avons testé en parallèle de l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ celui de deux peptides antigéniques dérivés de l'enzyme tyrosinase⁵⁹⁰. Le premier, Tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇, est produit dans le cytosol par le protéasome, son apprêtement dépend donc du transporteur TAP. Le second, tyrosinase₁₋₉, dérive du peptide signal de l'enzyme et est produit directement dans le réticulum. Son apprêtement ne dépend pas plus du transporteur TAP que du protéasome. Similairement à tyrosinase₃₆₉₋₃₇₇ et contrairement à tyrosinase₁₋₉, l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ était compromis par l'expression de l'ICP47 (**Figure 37**). La dépendance de l'apprêtement au transporteur TAP démontrait qu'une activité peptidasique cytosolique, autre que celle du protéasome, était indispensable à la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.

I.3. La production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ne dépend pas de la tripeptidylpeptidase II.

La seconde et seule autre voie alternative connue concerne les peptides dont l'apprêtement dépend du transporteur TAP, mais pas du protéasome. Dans cette voie, les peptides antigéniques sont produits dans le cytosol par la tripeptidylpeptidase II (TPPII). L'éventuelle implication de TPPII dans l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ fut testée au niveau de cellules de mélanomes traitées par les inhibiteurs AAF-CMK ou butabindide. Le premier, peu spécifique, est un dérivé chlorométhyl cétone modifiant de façon irréversible la sérine catalytique de TPPII. Le second, un analogue de substrat agissant comme compétiteur est par défaut considéré comme étant spécifique dans la mesure où, à ce jour, aucune étude n'a montré son action sur d'autres peptidases.

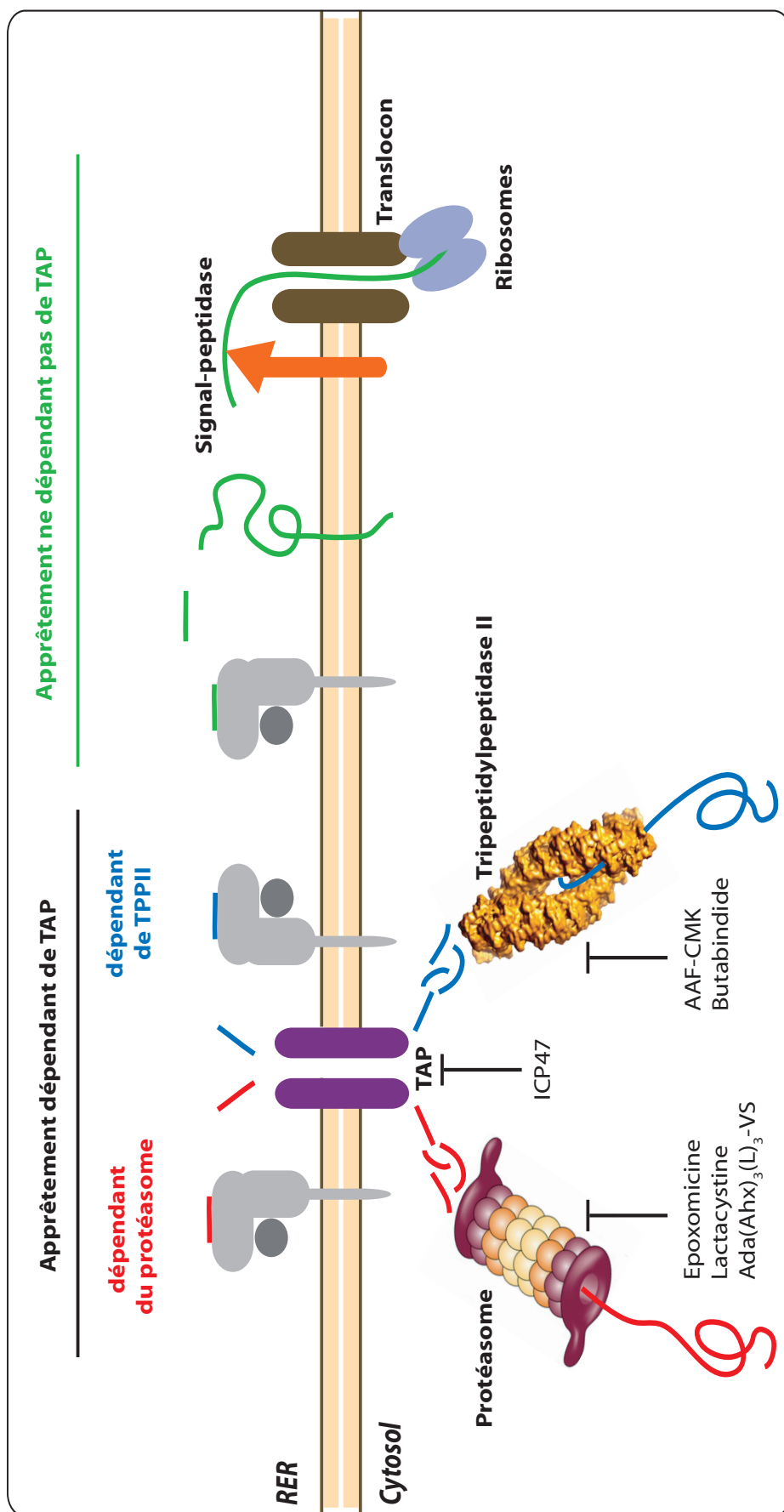


Fig 38. Représentation des trois voies d'apprêtement de peptides antigéniques reconnus par les lymphocytes cytotolytiques.

La plupart des peptides antigéniques sont produits dans le cytosol par le protéasome. La voie principale d'apprêtement est donc non seulement dépendante du protéasome mais aussi du transporteur TAP. Sur base de la dépendance à TAP, on distingue deux voies alternatives. La première ne dépend pas de TAP et concerne les peptides produits à la suite du clivage de la séquence signal des protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique. La seconde dépend de TAP et concerne les peptides produits dans le cytosol non pas par le protéasome, mais par la tripeptidylpeptidase II (TPPII).

Comme observé pour les inhibiteurs du protéasome, les inhibiteurs de TPPII n'affectaient en aucune mesure l'activation du CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par les cellules de mélanome traitées. Comme attendu, ces inhibiteurs n'affectaient pas non plus l'activation du CTL spécifique du peptide Melan-A₂₆₋₃₅ (**Table 1**).

Au sein de la cellule, la dégradation des protéines, un préalable à la production d'un peptide antigénique, est assurée par deux systèmes, le protéasome et l'autophagie. S'agissant de l'apprêtement de peptides antigéniques issus de protéines endogènes, l'implication de l'autophagie n'a été observée que pour ceux présentés par des molécules de classe II et non ceux, comme MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, présentés par des molécules de classe I ^{613 647 648}. Nous avons tout de même testé l'éventuelle implication de l'autophagie dans l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ en utilisant des inhibiteurs. La chloroquine (base faible s'accumulant dans les lysosomes), la bafilomycine-A1 (inhibiteur des pompes à protons vésiculaires V-ATPases), ou la 3-méthyladenine (inhibiteur de la macroautophagie ciblant la PI3-kinase de type III) n'affectaient pas la capacité d'activation du CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ de la lignée CP50-MEL (**Table 1**). Cela indiquait qu'aucune voie autophagique n'était impliquée dans la production du peptide antigénique.

Cette première partie de résultats nous indiquait que l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ n'empruntait ni la voie conventionnelle du protéasome ni aucune des voies alternatives identifiées à ce jour (**Figure 38**).

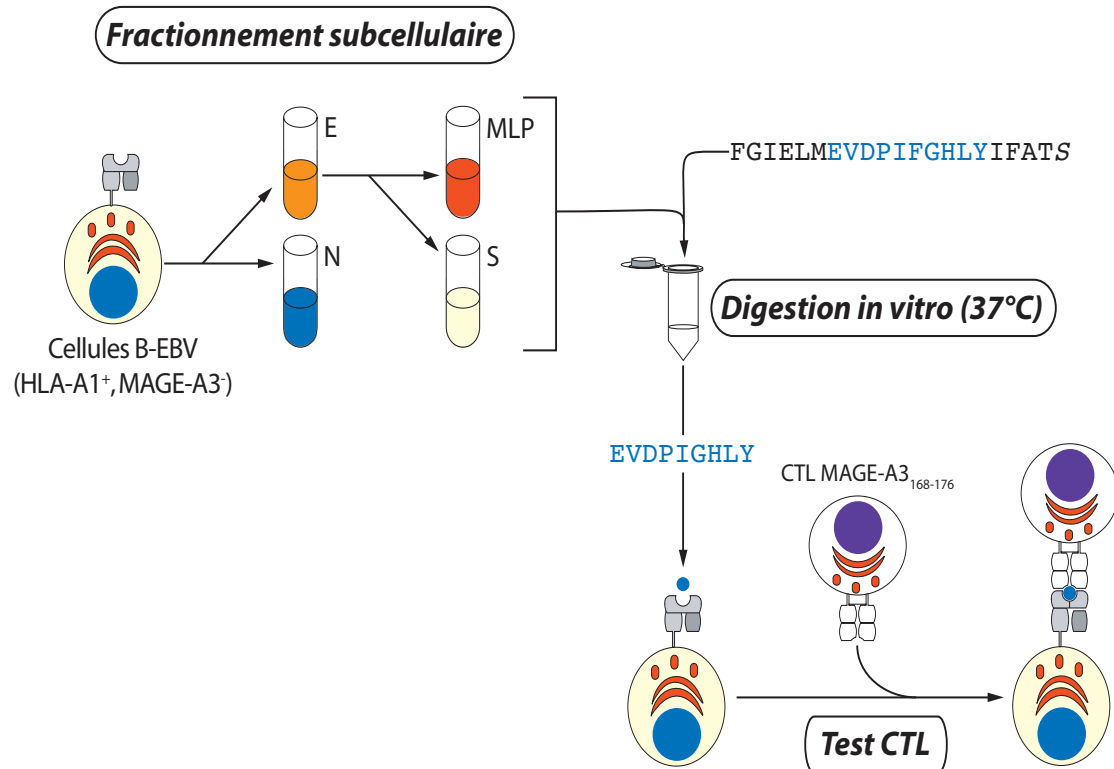


Fig 39. Caractérisation de l'activité peptidasique produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.
 Un précurseur de 20 acides aminés du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ est digéré par des fractions subcellulaires d'une lignée de lymphocyte B transformée par EBV et n'exprimant pas MAGE-A3 (B-EBV). Les différentes fractions ont été obtenues par des cycles d'homogénéisation et centrifugation. La fraction N (noyaux et débris cellulaires) a été séparée de la fraction E (extrait post-nucléaire). Par ultracentrifugation, la fraction E a ensuite été séparée en fraction S (cytosolique) et MLP (particules sédimentables). La production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ est détectée en incubant les digestats avec les mêmes cellules B-EBV (qui expriment l'HLA-A1). Ces cellules sont utilisées comme cible dans un test d'activation d'un clone de CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ dont la production d'IFN-γ est mesurée par ELISA.

II. Identification de la peptidase produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.

II.1. Stratégie.

Afin de caractériser la peptidase cytosolique produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, un test *in vitro* fut mis au point (**Figure 39**). Ce test consistait à incuber un précurseur de 20 résidus d'acides aminés comprenant les 9 du peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (₁₆₂FGIELMEVDPIGHLYIFATS₁₈₁) avec des fractions subcellulaires d'une lignée de lymphocytes B transformés par le virus EBV (pour Epstein-Barr virus) et n'exprimant pas MAGE-A3 (CP50-EBV). Cette même lignée (MAGE-A3⁻, HLA-A1⁺) était ensuite incubée avec les produits de digestion avant d'être testée pour sa capacité à activer un clone de CTL spécifique du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. En parallèle du test CTL, les produits de digestions ont été analysés par spectrométrie de masse afin de confirmer la présence du peptide antigénique (non montré). Il est à noter que dans la séquence naturelle de la protéine MAGE-A3, le résidu 181 est une cystéine et non une sérine comme dans le précurseur utilisé pour les digestions (₁₆₁FGIELMEVDPIGHLYIFATS₁₈₁). Cette substitution fut nécessaire car le même précurseur avec la cystéine naturelle induisait la formation de dimères (plus de 70% dans la solution stock du précurseur) et ne permettait pas de mettre en évidence l'activité produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.

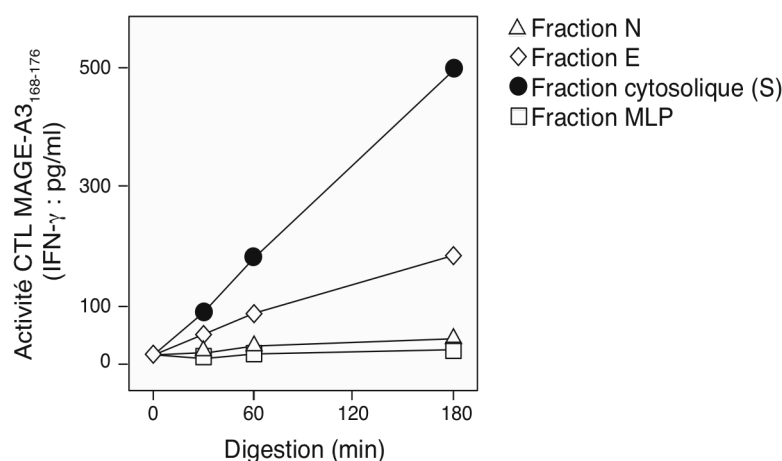


Fig 40. Production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par digestion in vitro.

Le précurseur de 20 acides aminés (FGIELMEVDPIGHLYIFATS) a été digéré par différentes fractions subcellulaires (solubilisées au triton X-100) de cellules CP50-EBV. La production du peptide antigénique EVDPIGHLY a été détectée par test CTL et l'IFN-γ a été mesuré par ELISA. (moyennes ± SEM de duplicats ; représentatif de plus de 5 expériences faites à partir de différents fractionnements)

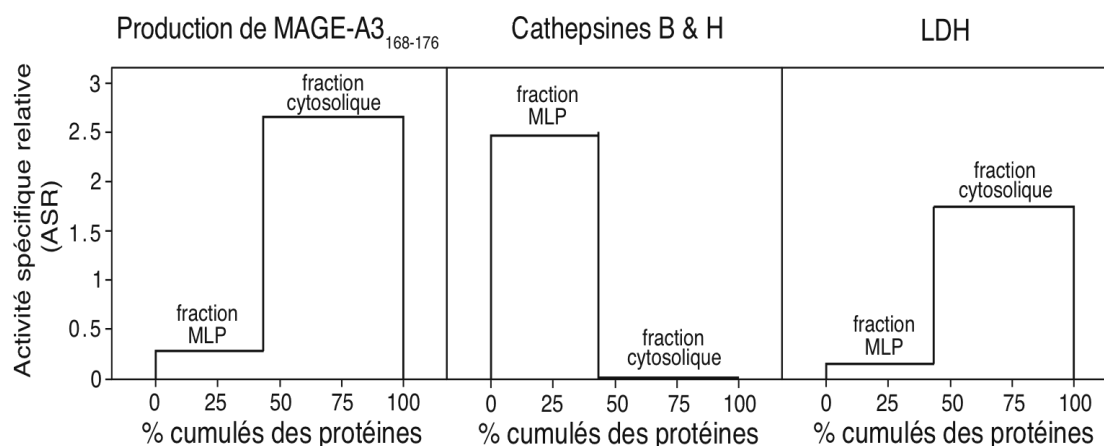


Fig 41. Caractérisation du fractionnement subcellulaire.

Les 3 graphes ci-dessus représentent les distributions des activités spécifiques de la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, de la lactate-déshydrogénase (LDH, marqueur cytosolique) et des cathepsines B/H (marqueurs lysosomaux, MLP). Ces activités spécifiques (AS) ont été définies dans la section Matériel et Méthodes. Les activités spécifiques des fractions MLP, cytosolique (S) et de l'extrait post-nucléaire (E) ont été normalisées par rapport à leurs contenus respectifs en protéines totales. Les activités spécifiques des fractions MLP et S sont représentées de façon relative (ASR) à celle de la fraction E (leur fraction parentale) et mises en graphe par rapport aux % cumulés de leur contenu protéique (% relatifs à la fraction E). Les surfaces représentées sur ces graphes correspondent aux récupérations d'activités : $((AS_{MLP} / AS_E) * (\% \text{ protéines}_{MLP})) + ((AS_S / AS_E) * (\% \text{ protéines}_S))$. (moyennes de duplicats ; représentatif de 5 fractionnements différents).

La récupération de l'activité de production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ est de 160 % alors que celles des cathepsines et de la LDH sont respectivement de 86 % et 100 %.

II.2. Caractérisation de l'activité produisant MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆

II.2.1. Seule la fraction cytosolique peut produire le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆

Dans un premier temps, nous avons analysé la capacité de différentes fractions subcellulaires de la lignée CP50-EBV à produire le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Cette capacité fut testée au niveau de la fraction post-nucléaire sédimentable (MLP, comprenant notamment les lysosomes), de la fraction cytosolique (S), de leur fraction parentale (E, extrait post-nucléaire) ainsi que de la fraction nucléaire (N). L'activité de production du peptide antigénique était détectable dans les digestions réalisées soit à partir de la fraction cytosolique (S) ou de l'extrait post-nucléaire non-fractionné (E) (**Figure 40**). Par contre, les fractions nucléaire (N) et post-nucléaire sédimentable (MLP) semblaient incapables de produire le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Isoler la fraction cytosolique de la fraction E permettait un enrichissement de l'activité spécifique produisant MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ d'un facteur 2,5 (**Figure 41**). Les activités spécifiques des fractions S et MLP représentaient respectivement 145 % et 15 % de l'activité spécifique de la fraction E, soit une récupération ((MLP+S)/E) de 160%. Ce résultat n'était pas dû à un biais expérimental car les activités spécifiques relatives des cathepsines B et H (marqueurs des endosomes et lysosomes) étaient de 77 % pour la fraction MLP et de 9% pour la fraction S (récupération de 86%). De même l'activité spécifique relative de la lactate-déshydrogénase (LDH, marqueur cytosolique) étaient de 5% pour la fraction MLP et 95% pour la fraction S (récupération de 100%) (**Figure 41**). Une récupération de 160 % concernant l'activité spécifique de production de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ pourrait en plus d'un enrichissement, refléter une déplétion d'activités peptidasiques présentes dans la fraction MLP (ex : hydrolases lysosomales) qui seraient délétères à la production et/ou de la stabilité du peptide antigénique. La dépendance de l'apprêtement au transporteur TAP nous apprenait qu'une étape protéolytique localisée dans le cytosol était indispensable à la production du peptide antigénique (**Figure 37**).

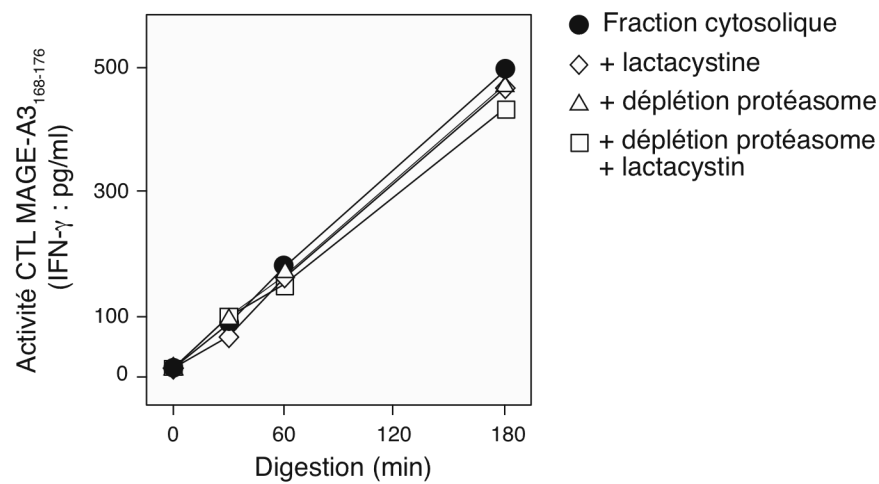


Fig 42. Production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par une fraction cytosolique.

Une digestion du précurseur FGIELMEVDPIGHLYIFATS a été réalisée à partir de la fraction cytosolique préalablement déplétée par immunoaffinité de son contenu en protéasome (efficacité 75-87%) et/ou traitée avec un inhibiteur du protéasome (lactacystine 20 μ M). Les digestats ont été analysés par test CTL et le contenu en IFN- γ a été mesuré par ELISA. (moyennes $\pm$ SEM de duplicats ; représentatif de 3 expériences).

II.2.2. La production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique n'implique pas le protéasome (ni TPPII).

Par deux approches, nous avons pu exclure une éventuelle contribution du protéasome à la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique (**Figure 42**). D'une part, une déplétion par immunoaffinité ciblant la sous-unité $\alpha 2$ du protéasome n'affectait pas la production du peptide antigénique. D'autre part, un traitement préalable de la fraction cytosolique (déplétée ou non) avec la lactacystine était lui aussi sans effet. Il est à noter qu'à la concentration utilisée (20 μ M), la lactacystine affecte significativement l'activité de la TPPII (>70% d'inhibition)³⁸⁰.

Le profil de production du peptide antigénique par la fraction cytosolique étant comparable à celui de l'apprêtement de l'antigène par les cellules tumorales, cela nous encouragea à poursuivre la caractérisation de l'activité produisant MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ à l'aide de ce test de digestion *in vitro*.

II.2.3. MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ est produit par une métallopeptidase cytosolique.

Selon la stratégie utilisée pour attaquer le carbonyle de liens peptidiques, les peptidases peuvent être réparties en 5 catégories appelées « types mécanistiques ». Comme abordé dans l'introduction, c'est le recours à des inhibiteurs dits « à large spectre » qui a majoritairement contribué à leur mise en évidence. Les sérine peptidases (ex : la TPPII) sont inhibées par le PMSF (pour phenylmethylsulfonyl fluoride) ou sa forme plus hydrosoluble AEBSF (pour 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), les cystéine peptidases (ex : les caspases) le sont par l'E64 ou la leupeptine, les aspartyl peptidases (ex : γ -sécrétase) le sont par la pepstatine A et les métallopeptidases (ex : l'insulin-degrading enzyme) le sont par l'orthophénanthroline. Le cinquième type est celui des peptidases à thréonine. Ce type mécanistique avait déjà été évincé dans la mesure où chez l'eucaryote, ses seuls représentants sont les sous-unités (catalytiques ou non) du protéasome (**Figures 36, 42 et Table 1**).

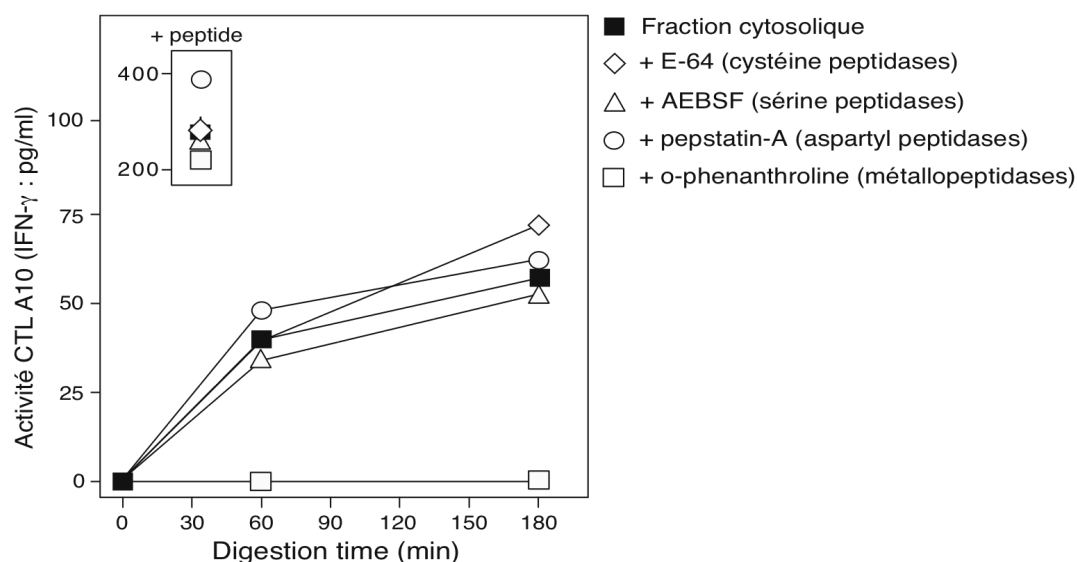


Fig 43. Type mécanistique de la peptidase cytosolique produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.

Le précurseur FGIELMEVDPIGHYIFATS a été incubé avec la fraction cytosolique préalablement traitée avec les 4 inhibiteurs listés. Les digestats ont été analysés par test CTL et l'IFN-γ produit a été mesuré par ELISA. Parallèlement, le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (EVDPIGHLY) a été incubé avec les mêmes inhibiteurs en absence de la fraction cytosolique et testé similairement aux digestats (encart). (moyennes ± SEM de duplicats ; représentatif de 3 expériences)

Inhibiteur	Concentration (μM)	Spécificité	Inhibition de l'activation CTL (%)	
			MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆	Melan-A ₂₆₋₃₅
Aucun			0	0
o-phenanthroline	25	Métallopeptidases	36	-1
	50		57	7
	100		68	3
	200		70	-4
PMSF	25	Sérine peptidases	6	-4
	100		0	-19
	250		-3	-36
E64d	50	Cystéine peptidases	-8	-22
	200		-22	-74
	500		-27	-93
leupeptine	50	Cystéine peptidases	-9	-14
	250		-17	-37
	500		-23	-61
pepstatin-A	10	Aspartyl peptidases	0	-9
	100		-8	5
	200		-11	0

Table 2. Type mécanistique de la peptidase requise à l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ au niveau d'une lignée tumorale.

La lignée de mélanome CP50-MEL a été traitée par les inhibiteurs cités dans la table. Les cellules ont ensuite été testées pour leur capacité à activer les clones de CTL spécifiques de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ou Melan-A₂₆₋₃₅ (produit par le protéasome). Les % d'inhibition de l'activation des CTL ont été calculés comme expliqué dans la Figure 35.

N.B. Quel que soit le traitement, la viabilité cellulaire (évaluée par l'exclusion du bleu de Trypan) était supérieure à 70%.

Les quatre autres types de peptidases ont été testés en incubant la fraction cytosolique avec les inhibiteurs pré-cités préalablement à l'ajout du précurseur peptidique. Nous avons observé que seule l'orthophénanthroline empêchait la fraction cytosolique de produire le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Figure 43**). Ceci semblait montrer, à tout le moins *in vitro*, que l'activité d'une métallopeptidase était nécessaire à la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. La caractérisation du type mécanistique a ensuite été confirmée au niveau de la lignée de mélanome CP-50MEL (**Table 2**). Les sérine peptidases ont été ciblées par le PMSF, les peptidases de type cystéine par de l'E64-d (forme de l'E64 à laquelle les cellules sont perméables) et de la leupeptine, les peptidases aspartiques par la pepstatine A et les métallopeptidases par de l'orthophénanthroline. Seule l'inhibition des métallopeptidases altérait l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Ce même traitement n'avait aucun effet sur l'apprêtement de Melan-A₂₆₋₃₅, suggérant par ailleurs que malgré son manque de spécificité, l'orthophénanthroline n'affectait pas l'activité du protéasome. A noter, les traitements à l'E-64d et à la leupeptine augmentaient significativement l'apprêtement du peptide Melan-A₂₆₋₃₅ (avec des % d'inhibition allant de -14 à -93%), suggérant qu'une cystéine peptidase limiterait naturellement la production de ce peptide antigénique.

II.2.4. La métallopeptidase nécessaire à l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ est une endopeptidase

Le type de substrats (peptides ou larges protéines) et la localisation des liens peptidiques ciblés furent historiquement les premiers critères de caractérisation des peptidases. Les activités endopeptidasiques ciblent des liens peptidiques internes au sein des substrats qui sont soit des peptides soit des protéines. Les activités exopeptidasiques ciblent des liens peptidiques à proximité soit de l'extrémité aminoterminal (aminopeptidases), soit de l'extrémité carboxyterminale (carboxypeptidases) de peptides mais pas de protéines. Les implications tant de métalloaminopeptidases que de métalloendopeptidases avaient déjà été montrées dans le cadre de l'apprêtement des antigènes (§III.1.5 de l'introduction).

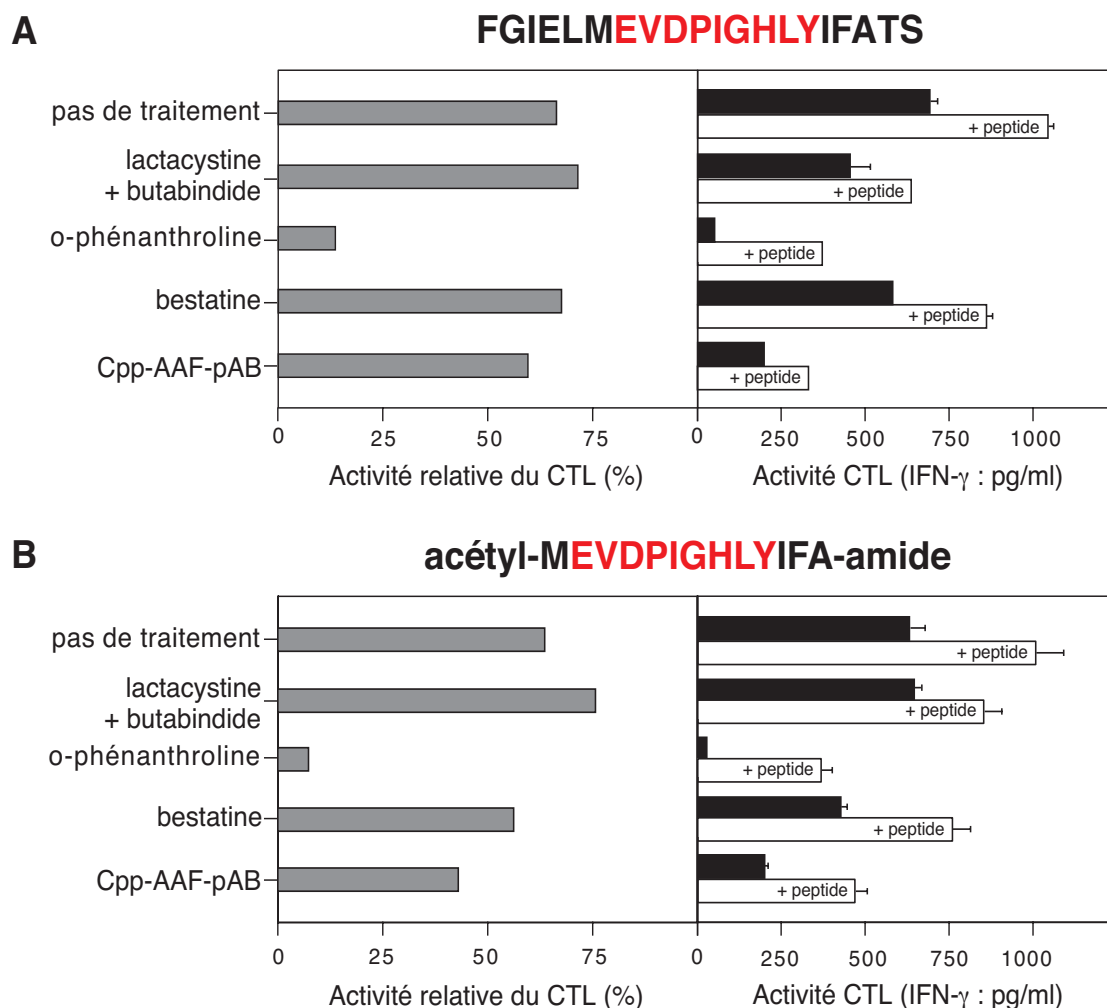


Fig 44. Apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par électroporation de précurseurs peptidiques.

Le précurseur de 20 acides aminés (utilisé pour les digestions in vitro) a été électroporé dans des cellules CP50-EBV (HLA-A1⁺, MAGE-A3⁺) préalablement traitées avec différents inhibiteurs (**A**). Un autre précurseur de 13 acides aminés dont l'extrémité N-terminale a été modifiée par un acétyle et l'extrémité C-terminale par un amide a aussi été électroporé dans ces mêmes cellules (**B**). Elles ont ensuite été testées pour leur capacité à activer un clone de CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Les panneaux de droite montrent les productions d'IFN- γ mesurées par ELISA et ceux de gauche montrent les activités CTL relatives aux conditions où le peptide antigénique a été ajouté avant le test d'activation. (moyennes $\pm$ SEM de triplicats ; représentatif de 4 expériences)

Les inhibiteurs utilisés: lactacystine (protéasome), butabindide (TPPII), o-phénanthroline (métallopeptidases, bestatine (métalloaminopeptidases), CppAAFPAB (certaines métalloendopeptidases dont la thimet oligopeptidase et la neurolysin).

Il s'agissait des aminopeptidases cytosoliques LAP (leucine aminopeptidase) et PSA (puromycin-sensitive aminopeptidase), des aminopeptidases réticuliennes ERAP-1 et -2 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 et 2), et des endopeptidases cytosoliques TOP (thimet oligopeptidase) et nardalysine.

L'apprêtement d'un peptide antigénique peut être observé à partir d'un précurseur peptidique introduit dans le cytoplasme par électroporation^{416 504 649}. Nous avons utilisé cette approche afin de caractériser l'activité métallopeptidasique responsable de l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Les cellules CP50-EBV ont été électroporées avec le précurseur de 20 acides aminés utilisé pour les digestions *in vitro* (**Figure 44A**). Ces cellules étaient en mesure d'activer le clone de CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ et la co-inhibition préalable du protéasome (époxomicine) et de TPPII (butabindide) n'avait aucun effet sur l'apprêtement du peptide. A l'inverse, l'inhibition des métallopeptidases par l'orthophenanthroline diminuait la reconnaissance de ces cellules. La résistance de l'apprêtement à la bestatine semblait indiquer que les métalloaminopeptidases n'étaient pas nécessaires à l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Il faut toutefois noter que cet inhibiteur ne cible pas l'ensemble des métalloaminopeptidases. La bestatine inhibe efficacement LAP, moyennement ERAP-1 (efficace sur l'enzyme pure mais pas sur un extrait microsomal) mais pas du tout ERAP-2 ou la PSA^{561 560}. Afin de pallier à l'efficacité limitée de cet inhibiteur, l'éventuelle implication d'une aminopeptidase fut testée par une autre approche. Les aminopeptidases ne ciblent que des peptides ayant l'extrémité NH₂ libre. Similairement, les carboxypeptidases, considérées absentes du cytosol et du RER selon Goldberg⁵³⁹, ne ciblent que des peptides ayant l'extrémité COOH libre. Nous avons alors électroporé un précurseur de 13 acides aminés ayant l'extrémité aminoterminal modifiée par un acétyle et l'extrémité carboxyterminale par un amide (**Figure 44B**).

Inhibiteur	Concentration (μ M)	Spécificité	Inhibition de l'activation CTL (%)	
			MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆	Melan-A ₂₆₋₃₅
Aucun			0	0
o-phénanthroline	25	métallopeptidases	36	-1
	50		57	7
	100		68	3
	200		70	-4
bestatine	50	métalloaminopeptidases (et nardilysine)	5	-7
	100		-6	-14
	500		-2	-26
leucinethiol	10	aminopeptidases	-8	2
	100		-9	13
	200		-2	16
phosphoramidon	50	métalloendopeptidases (familles M4, M13 et TOP)	4	-13
	100		-4	-31
	200		-10	-44
Cpp-AAF-pAB	50	TOP et Neurolysine	7	-8
	100		1	-9
	200		13	-12

Table 3. Caractérisation de la métallopeptidase responsable de l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ au niveau de cellules tumorales.

La lignée de mélanome CP50-MEL a été traitée par les inhibiteurs indiqués dans la table. Les cellules ont ensuite été testées pour leur capacité à activer les clones de CTL spécifiques de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ou Melan-A₂₆₋₃₅ (produit par le protéasome). Les % d'inhibition de l'activation des CTL ont été calculés comme expliqué dans la Figure 35. (résultats représentatifs de 3 expériences).

N.B. Quel que soit le traitement, la viabilité cellulaire (évaluée par l'exclusion du bleu de Trypan) était supérieure à 70%.

D'une part, ce précurseur permettait une présentation du peptide antigénique équivalente à celle obtenue avec le précurseur non-modifié de 20 acides aminés, ce qui montrait que les aminopeptidases (et hypothétiques carboxypeptidases) n'étaient pas critiques à l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. D'autre part, les profils d'inhibition de l'apprêtement du peptide antigénique à partir de ces deux précurseurs étaient rigoureusement semblables. Enfin, le rôle critique d'une métalloendopeptidase dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ fut confirmé au niveau de la lignée de mélanome CP50-MEL (**Table 3**). Le traitement de ces cellules à la bestatine (ciblant, entre autres, LAP) ou à la leucinethiol (un autre inhibiteur d'aminopeptidases ciblant entre autres ERAP-1, -2 et la PSA) n'affectait pas la présentation du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ni même celle du peptide dépendant du protéasome, Melan-A₂₆₋₃₅ (**Table 3**).

Ensemble, ces deux approches expérimentales indiquaient que la métallopeptidase produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ était une endopeptidase. Des métalloendopeptidases cytosoliques, TOP est celle qui a été la plus étudiée dans le cadre de l'apprêtement. Elle serait l'enzyme majoritairement responsable de la destruction des peptides antigéniques produits dans le cytosol^{650 572}. Toutefois, il semblerait qu'elle ne soit pas impliquée dans la production de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ dans la mesure où le traitement au Cpp-AAF-pAB, un inhibiteur de TOP, n'affectait ni l'apprêtement de l'antigène par la lignée CP50-MEL ni celui de la lignée CP50-EBV électroporée avec des précurseurs du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Figure 44, Table 3**).

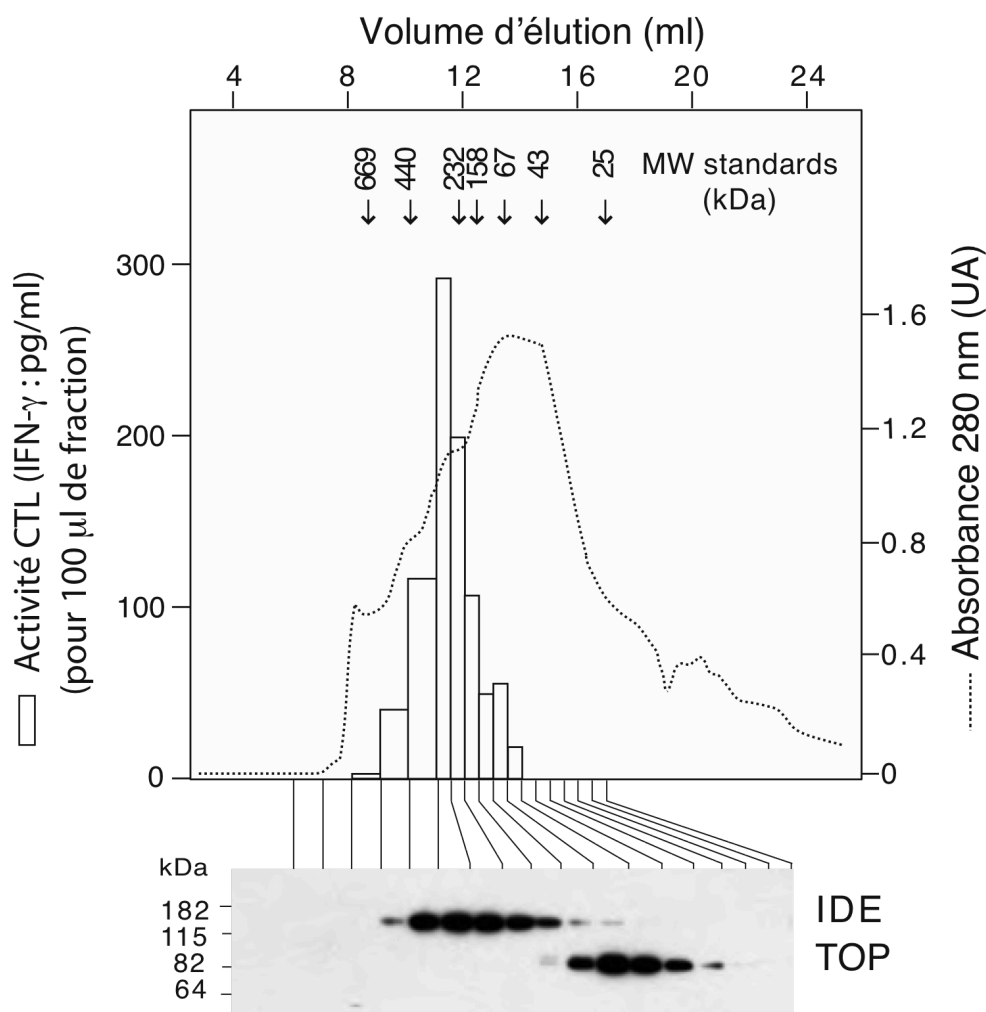


Fig 45. Production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ après séparation du contenu de la fraction cytosolique par filtration sur gel.

La fraction cytosolique a été soumise à une filtration sur gel Superdex 200. Des fractions de 0.5 ou 1 ml ont été collectées. Ces fractions ont été incubées avec le précurseur de 20 acides aminés et la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ a été testée par test CTL (IFN-γ, moyennes de duplicats). Ces mêmes fractions ont ensuite été testées par western blot avec des anticorps monoclonaux spécifiques de l'insulin-degrading enzyme (IDE) et de la thimet oligopeptidase (TOP) ajoutés simultanément. Après lavages, des protéines de poids moléculaires connus ont été séparées dans les mêmes conditions que la fraction cytosolique ce qui a permis d'estimer que les protéines contenues dans les fractions actives avaient un poids moléculaire compris entre 100 et 450 kDa. (Résultats représentatifs de 4 (activités) et 2 (western blot) expériences.

II.2.5. En condition native, l'activité produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ a une masse moléculaire comprise entre 100 et 450 kDa.

Le contenu protéique de la fraction cytosolique a été séparé par filtration sur gel. Des tests préliminaires réalisés sur la fraction cytosolique avaient montré que l'activité produisant MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ précipitait à partir d'une concentration en sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) de 45-50 %. Afin de diminuer la quantité en protéines irrelevantes, la fraction cytosolique a d'abord été débarrassée des protéines précipitant avec une concentration en (NH₄)₂SO₄ de 40%. Les protéines du surnageant ont ensuite été reconcentrées par une seconde précipitation avec 80 % de (NH₄)₂SO₄ avant d'être séparées sur colonne Superdex 200. Des digestions du précurseur de 20 acides aminés avec chacune des fractions collectées ont montré que l'activité produisant MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ était détectable dans 4 fractions contiguës comprenant des protéines de 100 à 450 kDa (**Figure 45**).

II.2.6. Recherche de candidats potentiels

Les résultats de la caractérisation (partielle) de l'activité protéolytique produisant le peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ont ensuite été confrontés aux contenus de trois banques de données afin de cibler différents candidats potentiels. La banque **MEROPS** (<http://merops.sanger.ac.uk>) répertorie l'ensemble du dégradome. Elle regroupe les gènes codant des peptidases avérées (dont les produits de traduction ont été isolés et pour lesquels l'activité protéolytique a été démontrée) et des peptidases potentielles (séquences génétiques apparentées à celles de peptidases avérées). Si elle est de loin la banque la plus complète, elle ne renseigne aucune caractéristique enzymatique. Ces informations sont au contraire largement détaillées dans la banque de données **Brenda** (<http://www.brenda-enzymes.org>) où sont répertoriées les peptidases ayant été suffisamment caractérisées que pour recevoir un numéro d'identification officiel (EC). La banque Genecards (<http://www.genecards.org>) a principalement été consultée pour l'information sur la localisation cellulaire des enzymes.

Ainsi, la banque MEROPS répertorie **56** familles de métallopeptidases (M) dont **27** sont représentées dans le règne animal. Sur ces 27 familles, seules **12** comportent des métalloendopeptidases. Ce nombre de familles d'intérêt est réduit à **11** car l'unique représentant eucaryote de la famille M22 n'est qu'un orthologue inactif d'une peptidase bactérienne (O-sialoglycoprotein peptidase). Grâce à la banque Genecards, le nombre de familles (11) se réduit à **2**. En effet les familles M8 et M10 ne comportent que des métalloendopeptidases matricielles. Les familles M12, M13, M23, M41, M43, M48, M50 ont été exclues car elles ne comportent aucune peptidase cytosolique. Les deux familles restantes étaient les familles **M3** et **M16**. Deux candidats potentiels appartenaient à la famille M3, la thimet oligopeptidase (TOP, M3.001) et la neurolysinine (NLN, M3.002) et 3 candidats potentiels appartenaient à la famille M16, l'insulin-degrading enzyme (IDE, M16.002), la nardilysine (NARD, M16.005) et l'eupitrilysine (PITRM1, M16.009).

Exclusion de la thimet oligopeptidase et de la neurolysinine :

Ces peptidases sont si semblables qu'il est souvent difficile de les distinguer l'une de l'autre sur base de leurs profils d'activité. Elles ciblent des séquences préférentiellement hydrophobes situées à proximité de l'extrémité C-terminale d'oligopeptides ne comprenant pas plus de 15 à 17 résidus. Bien que la séquence bordant l'extrémité C-terminale de l'antigène soit compatible avec une telle préférence de clivage, l'implication de ces deux peptidases dans le test de digestion semblait peu vraisemblable. D'une part le test de digestion était effectué sur base d'un précurseur de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ de 20 acides aminés. D'autre part, on pouvait exclure ces deux peptidases plus pragmatiquement sur base de leurs sensibilités à certains inhibiteurs. Ces peptidases sont en effet sensibles au Cpp-AAF-pAB et dans une moindre mesure au phosphoramidon. Or ces inhibiteurs étaient sans effet tant au niveau de la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique que de son apprêtement par les cellules de mélanome CP50-MEL ou les cellules CP50-EBV électroporées avec des précurseurs de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Tables 3-5**). Un argument pragmatique supplémentaire à l'encontre de TOP venait de l'analyse en Western blot de la filtration sur gel. En effet la protéine TOP était éluée dans des fractions de poids moléculaires inférieurs à celles contenant l'activité de production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Figure 45**).

Exclusion de la nardilysine :

Un premier argument excluant la nardilysine venait de son activité protéolytique limitée à laquelle l'enzyme doit son nom. En effet l'enzyme cible les liens peptidiques situés du côté N-terminal d'une arginine formant un motif dibasique Arg-lys¹⁵². Ce motif, absent tant dans le précurseur de 20 acides aminés que dans la protéine MAGE-A3, rendait peu vraisemblable l'implication de la nardilysine tant dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par digestion *in vitro* que dans l'apprêtement du peptide antigénique par des cellules tumorales. Bien qu'elle soit l'inhibiteur le plus populaire des métalloaminopeptidases, la bestatine inhibe aussi la nardilysine¹⁵¹. Or cet inhibiteur n'affectait pas l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ tant au niveau de la lignée de mélanome CP50-MEL qu'au niveau de la lignée CP50-EBV électroporée avec des précurseurs peptidiques (**Figure 44, Table 3**).

Exclusion de l'eupitrilysine :

L'eupitrilysine fut plus délicate à exclure car, contrairement aux autres candidats, sa caractérisation n'a fait l'objet que de peu d'études, expliquant peut-être son absence de la classification officielle des enzymes (EC). Semblant préférentiellement concentrée dans la mitochondrie, l'implication de l'eupitrilysine dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ semblait très invraisemblable. Par ailleurs, le PMSF, ciblant les sérine peptidases, inhibe partiellement son activité¹⁷². Or cet inhibiteur n'avait pas le moindre effet quant à l'apprêtement du peptide antigénique par des cellules de mélanome (**Table 2**). De même, l'AEBSF, dérivé plus hydrosoluble du PMSF, n'affectait pas non plus la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique (**Figure 43**).

	TOP (M3.001)	NLN (M3.002)	NARD (M16.005)	PITRM1 (M16.009)	IDE (M16.002)	Production MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆
Activité (PM : kDa)	75	75	130	110	110-400	100-450 ^a
o-phénanthroline	S	S	S	S	S	S ^{a,b,c}
Cyp-AAF-pAB	S	S	?	?	?	R ^{a,b,c}
Phosphoramidon	I	I	R	R	R	R ^{a,b}
Bestatine	R	R	I	R	R	R ^{b,c}
PMSF	R	R	R	I	R	R ^{a,b}

Table 4. Comparaison du profil d'activité de production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ à ceux des 5 candidats potentiels.

Ce tableau résume certaines caractéristiques connues des cinq candidats potentiels. S'agissant des profils d'inhibition, ils ont été codifiés comme suit : S (sensible), R (résistante), I (partiellement sensible). Les caractéristiques de l'activité de production du peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ont été observées soit via le test de digestion *in vitro* (**a**), soit au niveau de l'apprêtement de l'antigène par la lignée de mélanome CP50-MEL (**b**) soit au niveau de l'apprêtement du peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ après électroporation de précurseurs peptidiques (**c**).

Considération de l'insulin-degrading enzyme :

Bien plus que le dernier candidat restant, l'IDE était avant tout le candidat le plus probable.

1. Au contraire de la nardilysine dont l'activité est restreinte aux substrats comportant un motif Arg-Lys, la spécificité de l'IDE ne dépend pas de la séquence primaire de ses substrats ; tout au plus, on lui reconnaît une préférence de clivage au sein de domaines relativement hydrophobes ou basiques.

2. Au contraire de la neurolysinase et de la thimet oligopeptidase dont les substrats ont une taille n'excédant pas 15-17 acides aminés, l'IDE dégrade tant des peptides comme le glucagon (29 acides aminés) que des protéines entières comme l'hémoglobine endommagée par oxydation. En d'autres termes, l'IDE serait potentiellement capable de produire le peptide antigénique tant *in vitro* à partir du précurseur de 20 acides aminés qu'*in vivo* dans les cellules tumorales à partir de la protéine MAGE-A3.

3. Au contraire de l'eupitrilysine, principalement localisée dans la mitochondrie, environ 90% de l'IDE est localisée dans le cytosol, un lieu de prédilection pour la production des peptides antigéniques.

4. Des 5 candidats, l'IDE était la seule enzyme ayant un profil d'inhibition globalement compatible avec celui de l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Table 4**).

5. Enfin, à la différence des autres candidats, l'IDE existe sous différentes formes oligomériques actives dont les poids moléculaires se distribuent entre 110 (le monomère) et 400 kDa, c'est à dire une distribution compatible avec celle de l'activité enzymatique produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. Par ailleurs, l'analyse en Western blot des fractions de la filtration sur gel nous a montré que l'IDE et l'activité produisant le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ avaient des profils d'élution rigoureusement semblables (**Figure 45**).

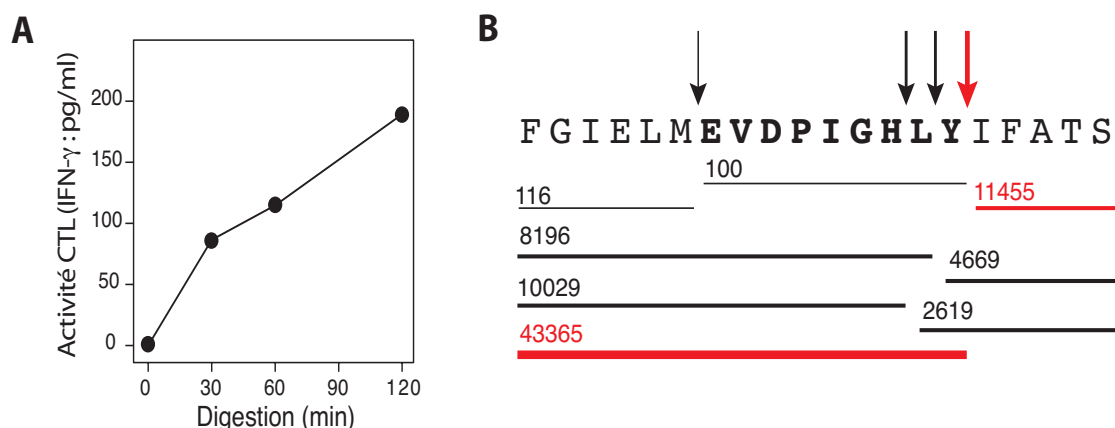


Fig 46. Production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par une forme recombinante de l'insulin-degrading enzyme humaine (rhIDE).

Le précurseur de 20 acides aminés (FGIELMEVDPIGHLHYIFATS) avec la rhIDE. **(A)** La production du peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ a été analysée par test CTL. (moyennes $\pm$ SEM de duplicats) **(B)** Un aliquot prélevé après 1h de digestion (précurseur dégradé à 85 %) a été analysé par spectrométrie de masse (MS). Les lignes horizontales représentent les fragments détectés. Les nombres représentent l'abondance relative des différents fragments (unités arbitraires MS). Les flèches représentent les sites de clivages déduits à partir des couples de fragments détectés. (A & B sont représentatifs de 4 expériences).

N.B. Les détails de l'analyse MS figurent dans la section matériel et méthode.

Inhibiteurs	Concentration (mM)	Activité du CTL (IFN-γ : pg/ml)	
		Fraction cytosolique	rhIDE
Aucun		154	145
o-phenanthroline	0.1	0	4
	1	0	2
N-ethylmaleimide	0.1	27	25
	1	3	0
phosphoramidon	0.1	134	142
	1	321	228
Cpp-AAF-pAB	0.05	156	111
	0.5	191	106
bacitracine	0.1	536	476
	1	681	680

Table 5. Profils d'inhibition de l'activité de production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique ou par l'IDE recombinante.

Le précurseur de 20 acides aminés (FGIELMEVDPIGHLHYIFATS) a été incubé soit avec une fraction cytosolique de cellules CP50-EBV soit avec de l'IDE recombinante après une incubation préalable avec différents inhibiteurs de métallopeptidases. Les digestats (prélevés après 1h d'incubation) ont été analysés par test CTL et la production d'IFN-γ a été analysée par ELISA. *N.B. : L'IDE est considérée comme étant sensible à la bacitracine¹³⁵.* (moyennes de duplicats ; représentatif de 3 expériences).

II.3. Implication de l'IDE dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.

II.3.1. L'IDE est capable de produire le peptide antigénique.

L'IDE semblant être le bon candidat, nous avons tout d'abord testé sa capacité à produire le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. A cette fin, une digestion *in vitro* du précurseur de 20 acides aminés a été réalisée à l'aide d'une forme recombinante de l'IDE humaine (rhIDE). L'analyse des digestats par test CTL montrait que l'IDE était bel et bien capable de produire le peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Figure 46A**). Un aliquot prélevé après une heure de digestion a été analysé par spectrométrie de masse afin de confirmer la production du peptide antigénique ₁₆₈EVDPIGHLY₁₇₆ et d'analyser les clivages produits par l'IDE sur le précurseur ₁₆₂FGIELMEVDPIGHLYIFATS₁₈₁ (**Figure 46B**). Malgré le manque de spécificité notoire de l'IDE, les fragments détectés dans le digestat montraient que l'IDE ne ciblait que 4 liens peptidiques. Le fragment ₁₆₂FGIELMEVDPIGHLY₁₇₆ était de loin le plus abondant. Cela indiquait que le clivage majeur réalisé par l'IDE (₁₇₆Y-I₁₇₇) permettait de libérer l'extrémité C-terminale du peptide antigénique. Bien que la production de cette extrémité soit considérée comme critique pour l'apprêtement des antigènes, la détection du fragment EVDPIGHLY démontrait que l'IDE pouvait aussi produire l'extrémité N-terminale du peptide antigénique.

Le profil d'inhibition de la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par l'IDE recombinante a été comparé à celui de la fraction cytosolique (**Table 5**). Nous avons observé que pour les inhibiteurs testés, ces profils étaient rigoureusement semblables.

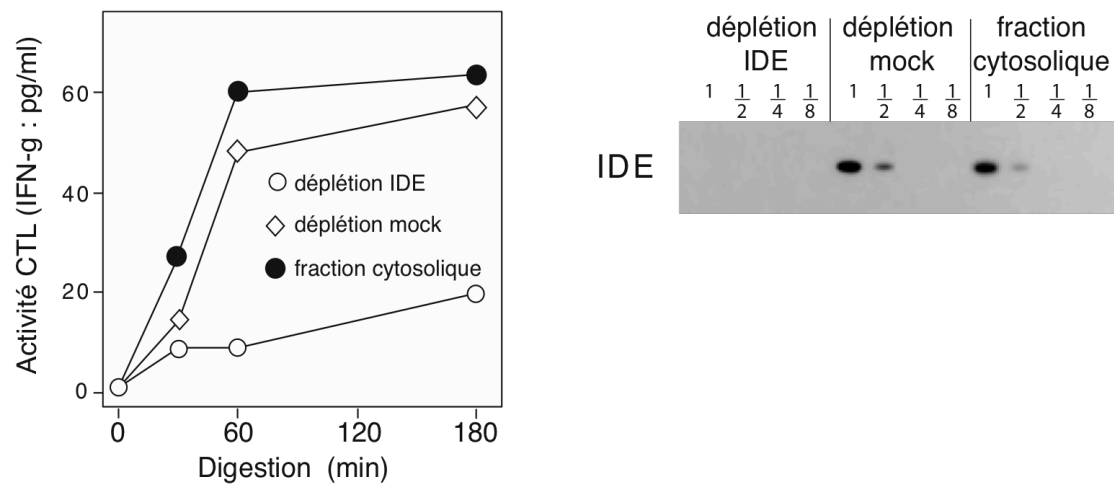


Fig 47. Rôle de l'IDE dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique.

Le précurseur de 20 acides aminés a été incubé avec une fraction cytosolique déplétée (ou non) de son contenu en IDE. La production du peptide antigénique a été analysée par test CTL (ELISA IFN- γ). L'efficacité de la déplétion a été vérifiée par western blot avec le même anticorps que celui fixé aux billes de sépharose utilisées pour la déplétion de l'IDE. La condition "mock" correspond à une fraction cytosolique incubée avec des billes de sépharose sans anticorps. (moyennes $\pm$ SEM de duplicats ; représentatif de 2 expériences).

II.3.2. Rôle critique de l'IDE dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par la fraction cytosolique.

Rôle critique de l'IDE dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆

La capacité de l'IDE à produire le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ne permettait toutefois pas d'extrapoler que l'IDE était responsable de la production de ce peptide antigénique au niveau des cellules tumorales. Pour répondre à cette question, nous avons alors vérifié si le cytosol tenait de l'IDE sa capacité de production du peptide antigénique. Comme nous l'avions fait précédemment pour le protéasome, nous avons déplété le cytosol de son contenu en IDE préalablement à la digestion du précurseur de 20 acides aminés (**Figure 47**). Nous avons observé que la déplétion de l'IDE annihilait la capacité du cytosol à produire le peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ; *une seule peptidase vous manque, et le cytosol est dépeuplé*. Au contraire des résultats obtenus avec la forme recombinante de l'IDE, cette expérience permettait de conclure que l'IDE était l'enzyme cytosolique nécessaire à la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, à tout le moins *in vitro*. En effet, dans ce contexte, la production du peptide antigénique avait lieu dans un tube à partir d'un précurseur peptidique alors que les cellules tumorales produisent le peptide antigénique à partir de la protéine MAGE-A3 entière.

Rôle critique de l'IDE dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆

Pour investiguer une fonction naturelle d'une enzyme au niveau cellulaire, deux approches sont couramment utilisées, soit l'inhibition de son activité par des inhibiteurs pharmacologiques soit l'inhibition de son expression par le biais de siRNA (pour small interfering RNA). En absence d'inhibiteur spécifique, nous avons testé le rôle de l'IDE dans l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par l'approche siRNA. Pour des raisons techniques, la transfection de siRNA n'a pu être réalisée dans une lignée de mélanome exprimant le peptide antigénique de façon constitutive. Deux lignées de mélanome ont été testées (CP50-MEL, EB81-MEL.2) et toutes deux semblaient réfractaires à la transfection par électroporation (15 protocoles), ou par lipides cationiques (5 agents de lipofection).

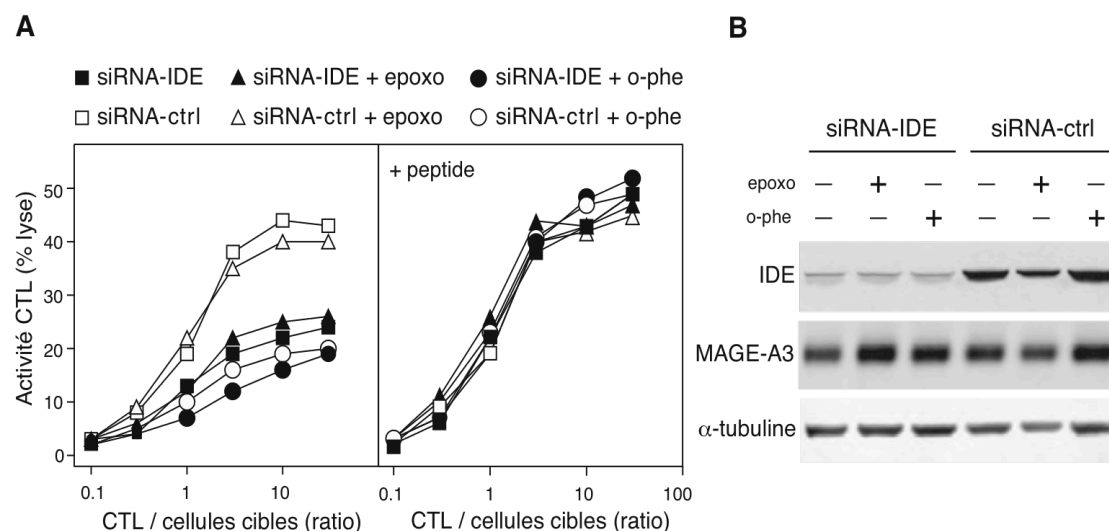


Fig 48. Rôle de l'IDE dans l'apprêtement du peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.

Une lignée d'un carcinome du colon, HT-29 (HLA-A1⁺) a été transfectée soit avec un mélange de 3 duplexes de siRNA spécifiques de l'IDE (siRNA-IDE) soit un duplex ne ciblant aucun mRNA humain (siRNA-ctrl). Après trois jours, l'expression du peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ a été induite par infection d'un virus recombinant de la vaccine codant la protéine MAGE-A3. En fin d'infection, une partie des cellules a été traitée soit avec de l'époxomicine (epoxo) ou de l'orthophenanthroline (o-phe). La reconnaissance de ces cellules par le clone CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ a été testée au moyen d'un test de lyse et la libération du ⁵¹Cr a été mesurée dans les surnageants (**A**). Juste avant le test d'activation du CTL, une partie des cellules cibles a été prélevée pour une analyse en western blot (**B**). La membrane a successivement été incubée avec des anticorps monoclonaux spécifiques de l'IDE, de MAGE-A3 et de l'α-tubuline (utilisée comme contrôle de chargement). (moyennes ± SEM de duplicats ; représentatif de 9 expériences).

Les siRNA ont alors été transfectés dans la lignée HT-29 (HLA-A1⁺, MAGE-A3⁻), une lignée permettant d'obtenir des niveaux d'inhibition d'expression d'IDE raisonnables (entre 65 et 80% selon les expériences). L'expression du peptide antigénique MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ a été induite par infection d'une forme recombinante du virus de la vaccine codant pour la protéine MAGE-A3 au moment (72h après transfection des siRNA) où le niveau protéique de l'IDE était le plus faible (**Figure 48B**). Nous avons observé que la réduction de l'expression de l'IDE d'environ 80% se traduisait par une perte d'environ un facteur 3 de la capacité d'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (**Figure 48A**). Plusieurs facteurs, isolés ou associés, peuvent expliquer que l'inhibition de l'apprêtement ne soit pas complète. Deux d'entre eux ont été envisagés, l'expression résiduelle de l'IDE et un rôle cryptique du protéasome dans l'apprêtement du peptide antigénique. Dans des cellules ayant une expression réduite de l'IDE, l'orthophénanthroline réduisait d'avantage la capacité d'apprêtement du peptide antigénique (**Figure 48A**). Cet effet était compatible avec un apprêtement résiduel de l'antigène correspondant à l'expression résiduelle de l'IDE. Il est à noter que les conditions de traitement avec l'orthophénanthroline n'étaient pas optimales puisque cet inhibiteur était ajouté à la fin de l'infection par le virus. Lorsque l'orthophénanthroline était ajoutée avant l'infection par le virus, l'apprêtement de l'antigène était abrogé mais parallèlement, le niveau d'expression de la protéine MAGE-A3 était lui aussi affecté (**non montré**). Dans l'hypothèse où l'IDE et le protéasome étaient actionnaires respectivement majoritaire et minoritaire de l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, une inhibition du protéasome dans des cellules ayant une expression réduite de l'IDE représenterait une situation idéale pour apprécier un rôle minoritaire (cryptique) du protéasome. Cette hypothèse fut invalidée car au contraire de l'orthophénanthroline, l'époxomicine ne parvenait pas à réduire davantage la capacité d'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par des cellules transfectées avec les siRNA spécifiques de l'IDE (**Figure 48A**).

En conclusion, cette expérience démontrait que l'IDE était la métallopeptidase responsable de l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆.

III. La protéine MAGE-A3 est dégradée par deux voies différentes, le protéasome et l'IDE.

III.1. MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ et MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂, deux peptides antigéniques apprêtés par deux voies différentes.

Si plusieurs peptides antigéniques dérivés de la protéine MAGE-A3 ont été identifiés à ce jour, l'étude de leur apprêtement n'a été entreprise que pour deux d'entre eux: MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ / HLA-B40⁵²⁶ et MAGE-A3₂₇₁₋₂₇₉ / HLA-A2^{651 652}. Il ne fait aucun doute que l'apprêtement de ces deux peptides dépend du protéasome^{526 653 531}. L'absence d'implication du protéasome dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ impliquerait que des antigènes issus de la même protéine parentale puissent être produits par deux voies distinctes. Pour rappel, un tel cas de figure avait déjà été évoqué pour des antigènes dérivés de Nef, une protéine produite lors de l'infection par HIV-1⁴⁷⁵. Si la production de certains peptides dépendait du protéasome, celle du peptide Nef₇₃₋₈₂ présenté par HLA-A3 et -A11 dépendait de TPPII^{654 655 475}.

L'étude initiale de l'apprêtement de MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂, menée à l'époque où seuls le protéasome standard et l'immunoprotéasome étaient connus, démontrait que l'apprêtement de ce peptide dépendait de l'immunoprotéasome⁵²⁶. La découverte faite par Benoît Guillaume de deux nouveaux types de protéasomes résultant de l'incorporation d'une (β 1, β 2, β 5i) ou de deux sous-unités (β 1i, β 2, β 5i) catalytique(s) de l'immunoprotéasome a permis de préciser que tous les protéasomes comprenant la sous unité β 5i étaient capables de produire le peptide antigénique⁵³². Nous avons voulu comparer l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ à celui du peptide MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ dans la lignée tumorale CP50-MEL (**Figure 49**). Comme toujours, l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ était sensible à l'orthophénanthroline et non à l'époxomicine (**Figure 49A**). Le contraire était observé pour le peptide MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂.

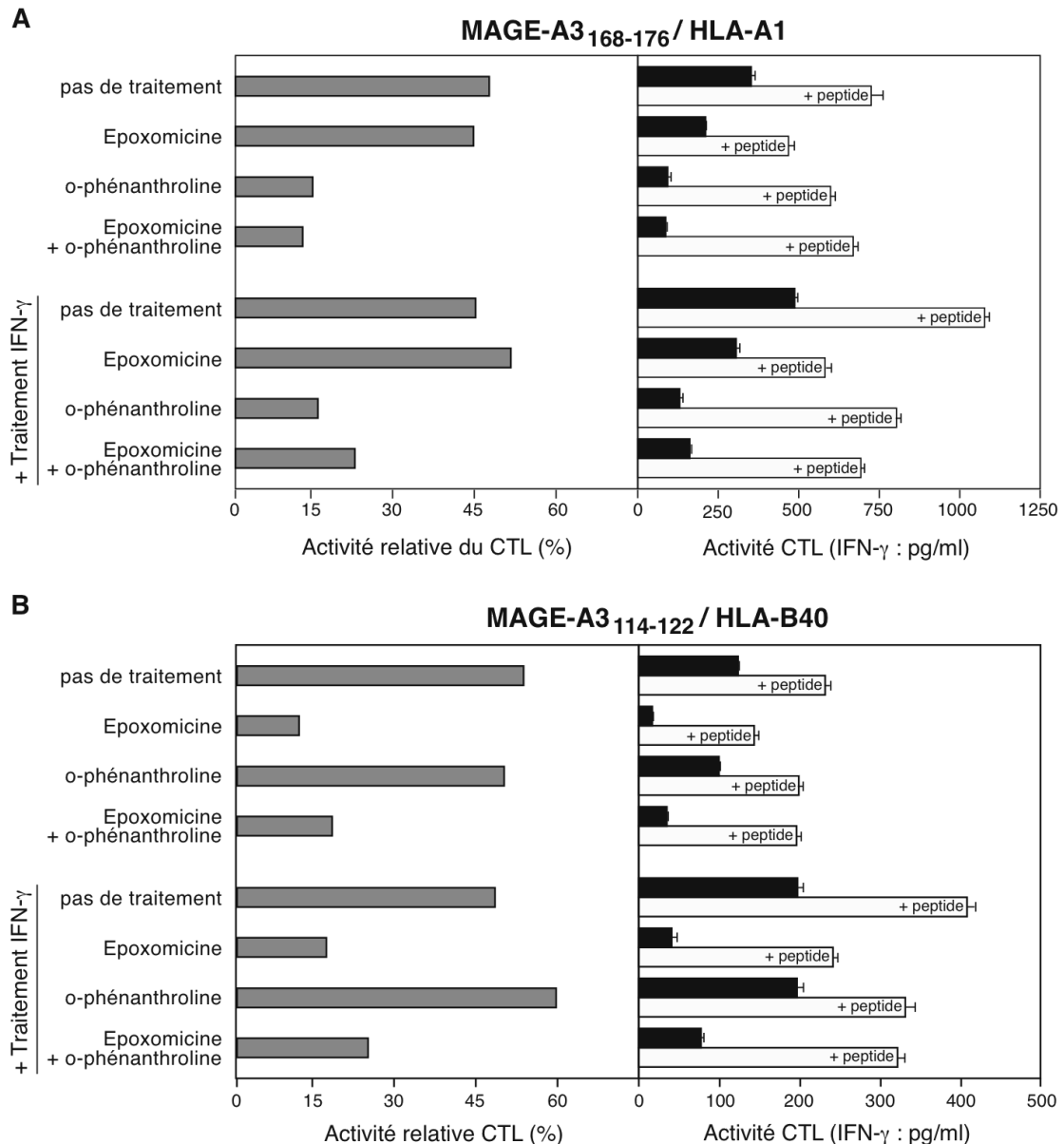


Fig 17. Apprêtement des peptides MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (HLA-A1) et MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ (HLA-B40) par une lignée de mélanome.

La lignée CP50-MEL a tout d'abord été exposée (ou non) durant trois jours à l'IFN-γ pour en modifier le contenu en protéasome. Après élution acide des complexes antigéniques en surface, le protéasome et l'IDE ont été respectivement inhibés par l'époxomicine et l'orthophénanthroline. Ces cellules ont ensuite été testées pour leur capacité à activer le clone de CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (A) ou celui de MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ (B). La production en IFN-γ dans les surnageants a été mesurée par ELISA (panneaux de droite) et les activités relatives des CTL par rapport aux conditions où les peptides antigéniques ont été ajoutés avant le test d'activation ont été calculées (panneaux de gauche). (moyennes ± SEM ; représentatif de 3 expériences).

NB : Quel que soit le traitement, la viabilité cellulaire (évaluée par l'exclusion du bleu de Trypan) était supérieure à 70 %.

Pour les deux peptides antigéniques, une inhibition simultanée du protéasome et des métallopeptidases n'avait pas plus d'effet que l'inhibition isolée soit des métallopeptidases pour MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, soit du protéasome pour MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ (**Figure 49A**). Des résultats rigoureusement similaires étaient observés avec des cellules CP50-MEL préalablement exposées à l'IFN- γ afin d'y induire l'expression de l'immunoprotéasome (**Figure 49B**).

Cette expérience démontrait que deux peptides produits à partir de la même protéine MAGE-A3 étaient apprêtés par deux voies différentes, MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂ par une voie dépendant du protéasome et MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ par une voie dépendant de l'IDE. Si le protéasome est impliqué dans l'apprêtement de la majorité des peptides antigéniques, c'est parce qu'il est le principal système de dégradation des protéines cellulaires ³⁷⁰. Toutefois, des études ont montré que l'IDE était capable de dégrader des protéines entières telles que les formes endommagées par oxydation de l'hémoglobine et du lysozyme ^{144 145 86}. Nos résultats montrant que deux peptides antigéniques issus de la même protéine étaient apprêtés par deux voies différentes, cela suggérait que la protéine MAGE-A3 était naturellement dégradée dans les cellules tumorales par deux voies protéolytiques différentes, soit le protéasome soit l'IDE.

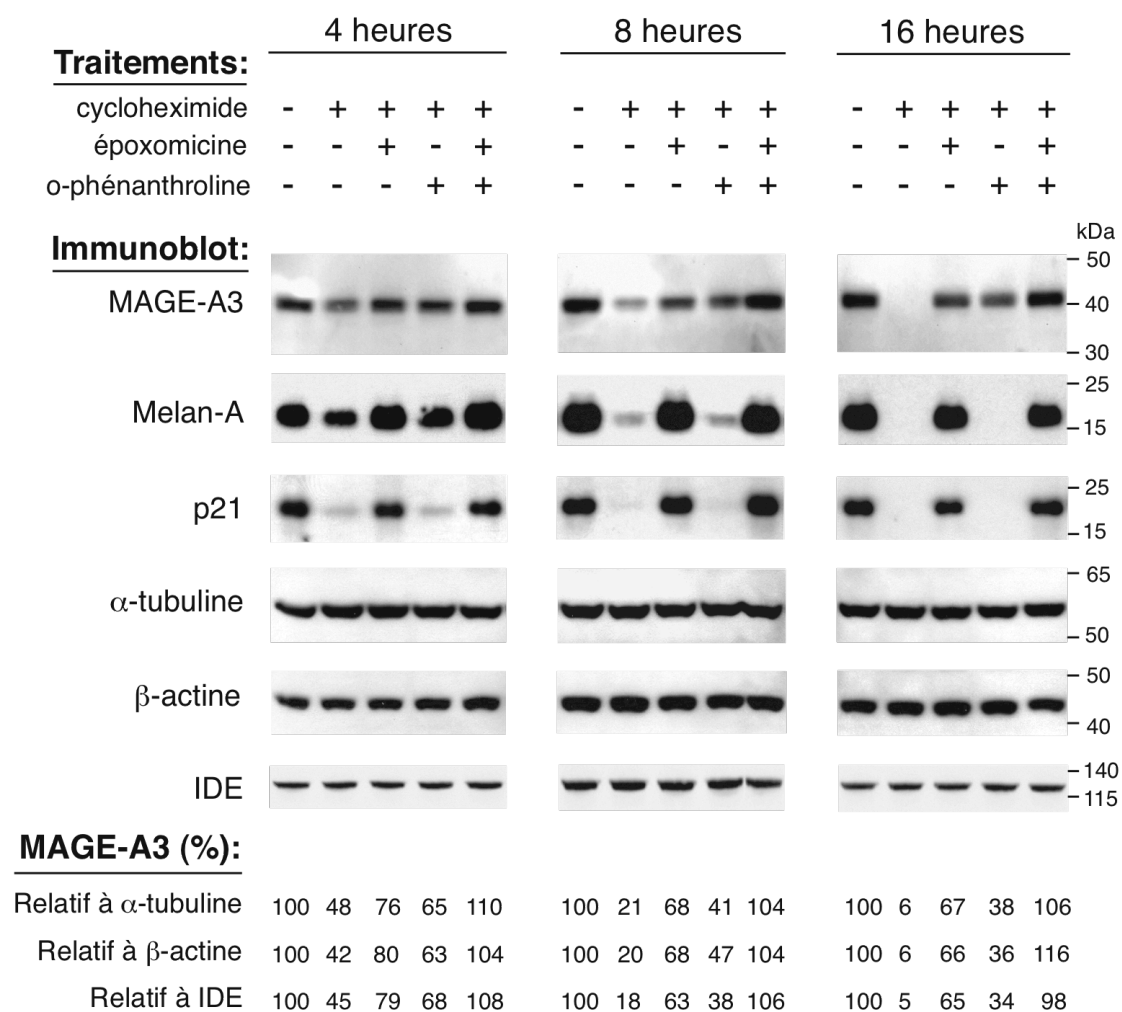


Fig 50. Etude de la dégradation de la protéine MAGE-A3 dans une lignée de mélanome.

L'expression de la protéine MAGE-A3 a été analysée par western blot de lysats de la lignée CP50-MEL. Les cellules ont été traitées à la cycloheximide pour bloquer la synthèse protéique. Dans ces conditions, la dégradation de MAGE-A3 associée au protéasome a été inhibée par l'époxomicine et celle associée à l'IDE par l'o-phénanthroline. Les niveaux de détection de MAGE-A3 ont été normalisés par rapport à ceux de l' α -tubuline, de la β -actine et de l'IDE (utilisés comme contrôles de chargement). Ils ont ensuite été exprimés en % par rapport à la condition non-traitée. Les expressions des protéines p21 (dégradée uniquement par le protéasome) et Melan-A ont été analysées comme contrôles de l'inhibition du protéasome. (Représentatif de 7 expériences dont 4 incluant les contrôles p21 et Melan-A).

N.B. La méthode de quantification est détaillée dans la section Matériel et Méthode.

III.2. Le protéasome et l'IDE participent conjointement à la dégradation de MAGE-A3.

III.2.1. L'approche par les inhibiteurs pharmacologiques.

La concentration d'une protéine cellulaire résulte d'un équilibre entre son taux de synthèse et son taux de dégradation. Une façon d'étudier les voies de dégradation d'une protéine au niveau de cellules vivantes consiste à compenser un arrêt de la synthèse protéique par l'inhibition des voies de dégradation potentielles. Cette approche fut appliquée à la lignée de mélanome CP50-MEL (**Figure 50**). L'arrêt de la synthèse protéique a été induit par un traitement à la cycloheximide, un inhibiteur de l'élongation de la chaîne polypeptidique. Sur base de l'analyse en western blot des lysats de cellules traitées, on observait une diminution notable de la quantité en MAGE-A3 8h après ajout de la cycloheximide et 8h plus tard, et la protéine n'était plus détectable 16h après le traitement. Dans ces conditions, les rôles du protéasome et de l'IDE dans la dégradation de MAGE-A3 ont été investigués respectivement par l'ajout d'époxomicine et d'orthophénanthroline. Nous avons observé qu'individuellement, l'époxomicine et l'orthophénanthroline n'empêchaient que partiellement la dégradation de MAGE-A3. Toutefois une compensation complète était possible lorsque les deux inhibiteurs étaient ajoutés conjointement. L'inhibition du protéasome par l'époxomicine est certes très spécifique mais elle n'est pas optimale ³⁷⁸. Cela pourrait expliquer l'effet partiel de l'époxomicine sur la dégradation de MAGE-A3. Par ailleurs, l'orthophénanthroline, en tant qu'inhibiteur à spectre large pourrait avoir des effets colatéraux sur l'activité du protéasome ; l'implication de l'IDE ou plus généralement d'une métallopeptidase ne serait alors qu'un biais expérimental. Afin de vérifier ces deux éventualités, nous avons aussi étudié la dégradation du régulateur du cycle cellulaire p21, une protéine strictement dégradée par le protéasome ³⁸⁵. Nous avons observé que l'époxomicine isolément empêchait complètement la dégradation de p21 et que l'orthophénanthroline n'avait aucun effet. Enfin, comme nous l'avons observé pour l'apprêtement de l'antigène Melan-A₂₆₋₃₅, la dégradation de la protéine parentale Melan-A était uniquement inhibée par l'époxomicine (l'orthophénanthroline n'ayant aucun effet).

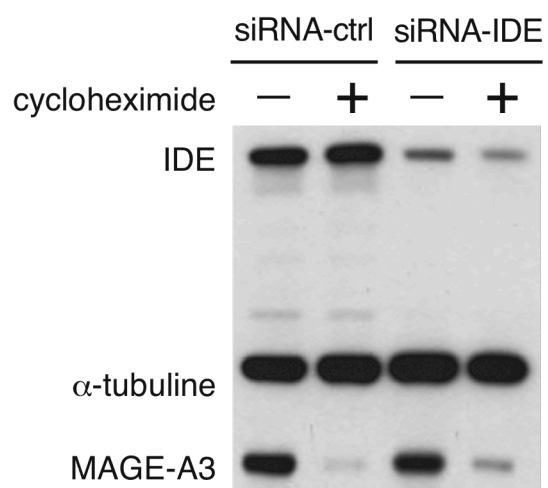


Fig 19. Rôle de l'IDE dans la dégradation de la protéine MAGE-A3.

Des cellules 293-HEK exprimant de façon stable la protéine MAGE-A3 ont été transfectées avec 3 siRNA spécifiques de l'IDE ou un siRNA contrôle. Après 65h, la synthèse protéique a été stoppée par un traitement à la cycloheximide. L'expression des protéines MAGE-A3, IDE et α -tubuline (utilisée comme contrôle de chargement) a été analysée 16h plus tard par western blot. (Représentatif de 2 expériences)

Ces résultats démontraient que le protéasome et qu'une métallopeptidase, vraisemblablement l'IDE participaient conjointement à la dégradation naturelle de la protéine MAGE-A3 au sein des cellules tumorales.

III.2.2. L'approche par les siRNA spécifiques de l'IDE.

L'orthophénanthroline ne permettait pas d'impliquer spécifiquement l'IDE dans la dégradation de la protéine MAGE-A3. C'est pourquoi, comme nous l'avions fait pour l'étude de l'apprêtement de l'antigène MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆, nous avons eu recours à l'approche siRNA (**Figure 51**). Les siRNA spécifiques de l'IDE ont été transfectés dans une lignée 293-HEK exprimant de façon stable la protéine MAGE-A3. Le niveau d'expression de la protéine MAGE-A3 a été analysé 16 h après traitement des cellules à la cycloheximide. La quantité de MAGE-A3 était sensiblement supérieure dans les transfectants ayant un faible niveau d'expression de l'IDE. L'effet d'une inhibition complémentaire du protéasome n'a pu être investigué car l'époxomicine dans ces conditions induisait une mortalité cellulaire de près de 60%. Ces résultats, obtenus avec des transfectants exprimant MAGE-A3, confirmaient spécifiquement le rôle de l'IDE dans la dégradation de MAGE-A3 qui avait été suspecté au niveau de la lignée de mélanome CP50-MEL (**Figure 51**).

Ensemble, ces deux approches expérimentales démontraient que le protéasome et l'IDE participaient conjointement à la dégradation naturelle de la protéine MAGE-A3 au niveau des cellules tumorales.

Discussion

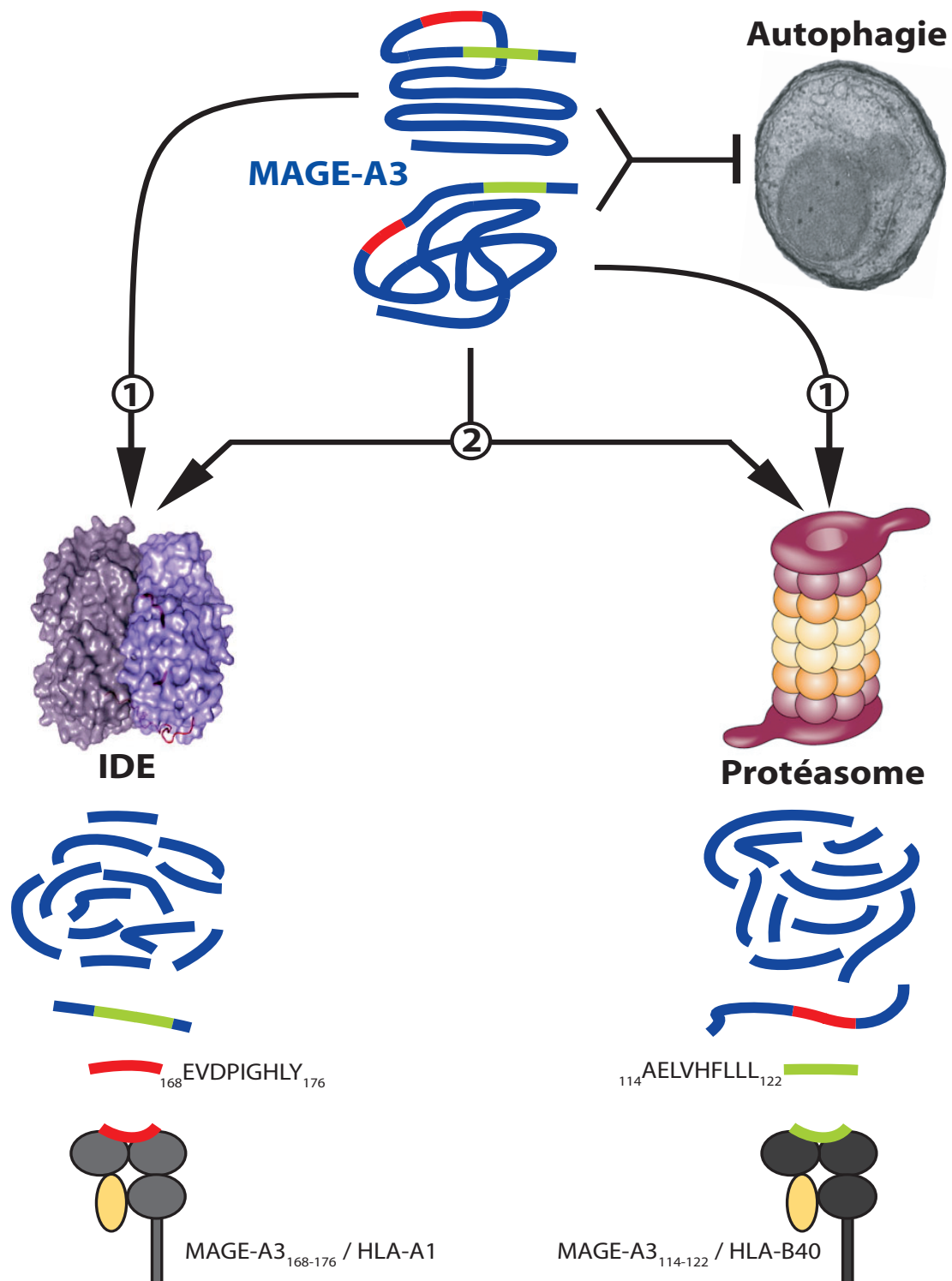


Fig 52. La dégradation différentielle de la protéine MAGE-A3 par l'IDE et le protéasome contribue à la diversité des antigènes exprimés par des cellules tumorales.

Au niveau des cellules tumorales, le protéasome et l'IDE (et non l'autophagie) représentent deux voies de dégradation indépendantes de la protéine MAGE-A3. L'apprêtement du peptide antigénique $\text{MAGE-A3}_{168-176}$ dépend de l'IDE et non du protéasome alors que celui du peptide $\text{MAGE-A3}_{114-122}$ dépend du protéasome et non de l'IDE. Ensemble ces observations suggèrent que la dégradation différentielle de la protéine MAGE-A3 par le protéasome et l'IDE contribuerait à la diversité des peptides antigéniques exprimés par les cellules tumorales. L'IDE dégraderait des formes particulières de MAGE-A3 qui ne seraient adressées au- et/ou dégradées par- le protéasome (1). Par ailleurs, rien n'exclut que le protéasome et l'IDE puissent cibler les mêmes formes de la protéine MAGE-A3 (2).

I. Principales conclusions de ce travail

Ce travail de thèse avait pour but de caractériser la voie d'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1, un peptide antigénique tumoral dont la production semblait ne pas impliquer la voie conventionnelle du protéasome. Après avoir écarté les deux voies alternatives au protéasome connues (la voie TAP-indépendante et la voie TPPII-dépendante), nous avons mis en évidence que l'apprêtement du peptide antigénique dépendait de l'insulin-degrading enzyme (IDE). A la différence de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1, la présentation du peptide MAGE-A3₁₁₄₋₁₂₂/HLA-B40 ne dépend pas de l'IDE mais du protéasome (**Figure 52**). L'hypothèse que l'IDE et le protéasome représentent deux voies distinctes d'apprêtement d'antigènes a ensuite été renforcée par la démonstration que l'IDE et le protéasome représentaient deux voies de dégradation naturelle de la protéine MAGE-A3 (**Figure 52**). L'ensemble de ces résultats suggère que la dégradation différentielle de protéines cellulaires par le protéasome et l'IDE puisse contribuer à la diversité des peptides antigéniques présentés par des cellules tumorales (**Figure 57, partie à gauche**)⁶⁵⁶.

II. L'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆

II.1. Peut-on définitivement exclure l'implication du protéasome ?

Le protéasome est considéré comme étape critique à l'apprêtement de plus de 95% des peptides antigéniques présentés aux lymphocytes cytolytiques (CTL)³⁷⁰. Ce constat vient de nombreuses expériences montrant que le traitement de cellules avec différents inhibiteurs du protéasome abroge la capacité d'activation de CTLs (population mono- ou poly-clonales) et diminue drastiquement l'expression membranaire des complexes antigéniques de classe I^{376 416}. Une expression résiduelle de complexes antigénique a longtemps été considérée comme une signature d'antigènes produits par une voie alternative^{657 598}.

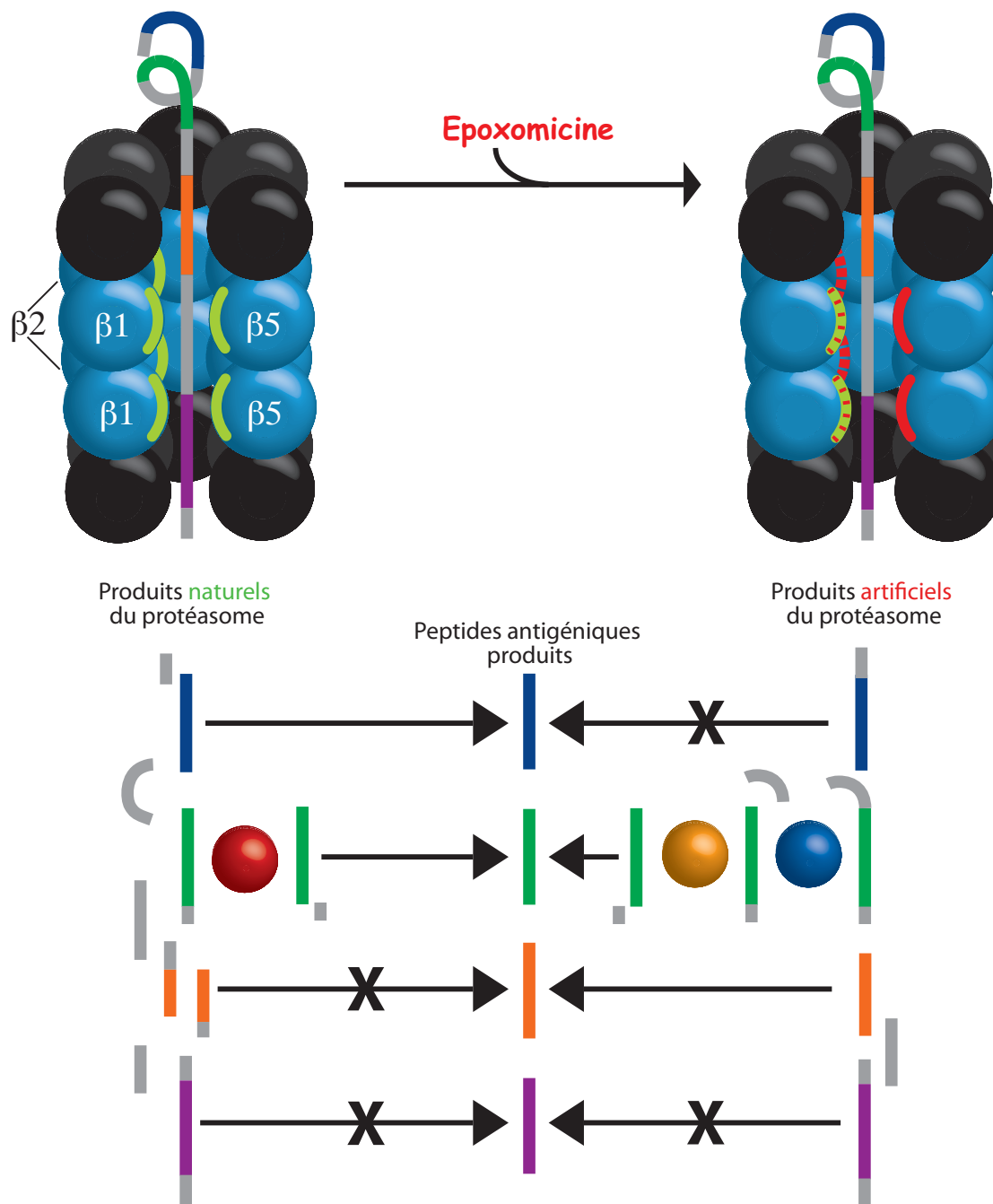


Fig 53. Effets potentiels d'une inhibition imparfaite du protéasome par l'époxomicine.

Les trois centres actifs des sous-unités β -catalytiques d'un protéasome non-inhibé ont été représentés en vert (à gauche). L'époxomicine (à droite) cible l'unité $\beta 5$ (trait rouge continu) très efficacement et les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ (traits rouges discontinus) relativement moins efficacement. Toutefois, si les activités chymotryptique et tryptique sont respectivement inhibées approximativement à 100 et 85%, l'activité PGPH est, quant à elle, épargnée (30% d'inhibition tout au plus). En plus de limiter la source en antigènes protéasome-dépendants, l'inhibition suboptimale du protéasome modifie aussi l'aspect qualitatif de la dégradation d'une protéine et par conséquent la nature des peptides antigéniques produits. Quatre cas ont été représentés. L'antigène **bleu** (ex : Melan-A₂₆₋₃₅⁶⁵⁶) est protéasome-dépendant et sa production est compromise par l'époxomicine. Pour l'antigène **orange**, le protéasome exerce des clivages destructeurs (ex : MAGE-A3₂₇₁₋₂₇₉/HLA-A2 par le protéasome PS⁶⁵³) qui sont inhibés par l'époxomicine. L'antigène **violet** est protéasome-indépendant (ex : MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1⁶⁵⁶). Enfin, l'antigène **vert** est produit sous forme d'un précurseur par le protéasome. Pour ce dernier, l'époxomicine modifie la nature du précurseur qui est *in fine* converti en antigène mature grâce à la diversité des peptidases cytoplasmiques.

Par de nombreuses variations de cette approche, nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle éventuel du protéasome dans l'apprêtement du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1. Les inhibiteurs disponibles affectent différemment les 3 activités de base du protéasome mais aucun n'inhibe de manière complète l'activité protéolytique globale du protéasome ³⁷⁸ (§ II.3.3 de l'introduction). C'est en partie pourquoi il est de plus en plus considéré que l'approche des inhibiteurs surestime vraisemblablement la proportion d'antigènes produits par une voie alternative au protéasome ⁵⁰⁶. Une inhibition **non-optimale**, comme avec la lactacystine ou l'époxomicine, qui préservent relativement l'activité post-acidique du protéasome, modifierait qualitativement le débitage d'une protéine et donc, la nature des peptides produits. La dégradation protéasomale de la protéine MAGE-A3 modifiée pourrait dès lors libérer des précurseurs de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1 différents. Cela ne compromettrait pas automatiquement l'apprêtement de l'antigène dans la mesure où la diversité des peptidases cytoplasmiques pourrait assurer une voie de maturation alternative (**Figure 53, l'antigène vert**). D'autre part l'antigène MAGE-A3₂₇₁₋₂₇₉/HLA-A2 (**Figure 53, l'antigène orange**) qui n'est présenté que par des cellules contenant le protéasome intermédiaire $\beta 1, \beta 2, \beta 5i$ ⁵³¹, peut artificiellement l'être par des cellules contenant du protéasome standard traitées à la lactacystine ⁶⁵³ ou à l'époxomicine (observé durant cette thèse). Ciblant préférentiellement l'unité $\beta 5$ ³⁷⁸, ces inhibiteurs limiteraient les clivages destructeurs du protéasome standard au sein de la séquence antigénique ^{531 532}. Si l'inhibition imparfaite du protéasome modifie l'aspect qualitatif de la dégradation protéique, elle en modifie avant tout son aspect quantitatif. Ainsi des inhibiteurs tels que la lactacystine et l'époxomycine diminuent d'environ 80% la capacité protéolytique globale du protéasome ^{376 378}. Dès lors, si la production de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA1 dépendait du protéasome, l'inhibition de ce dernier compromettrait fortement la source de ce peptide antigénique. L'efficacité de la présentation d'antigènes produits par le protéasome est très influencée par le(s) type(s) de protéasome(s) contenu(s) dans la cellule (§ III.1.3 de l'introduction et **Figure 58**). La caractérisation des protéasomes standard $\beta 1, \beta 2, \beta 5$ (PS), immuno $\beta 1i, \beta 2i, \beta 5i$ (IP), simple intermédiaire $\beta 1, \beta 2, \beta 5i$ et double intermédiaire $\beta 1, \beta 2i, \beta 5i$ montre que la substitution d'une seule sous-unité suffit à modifier à la fois le profil des clivages ainsi que le profil d'inhibition de l'époxomicine ^{531 532} (**Figure 29**).

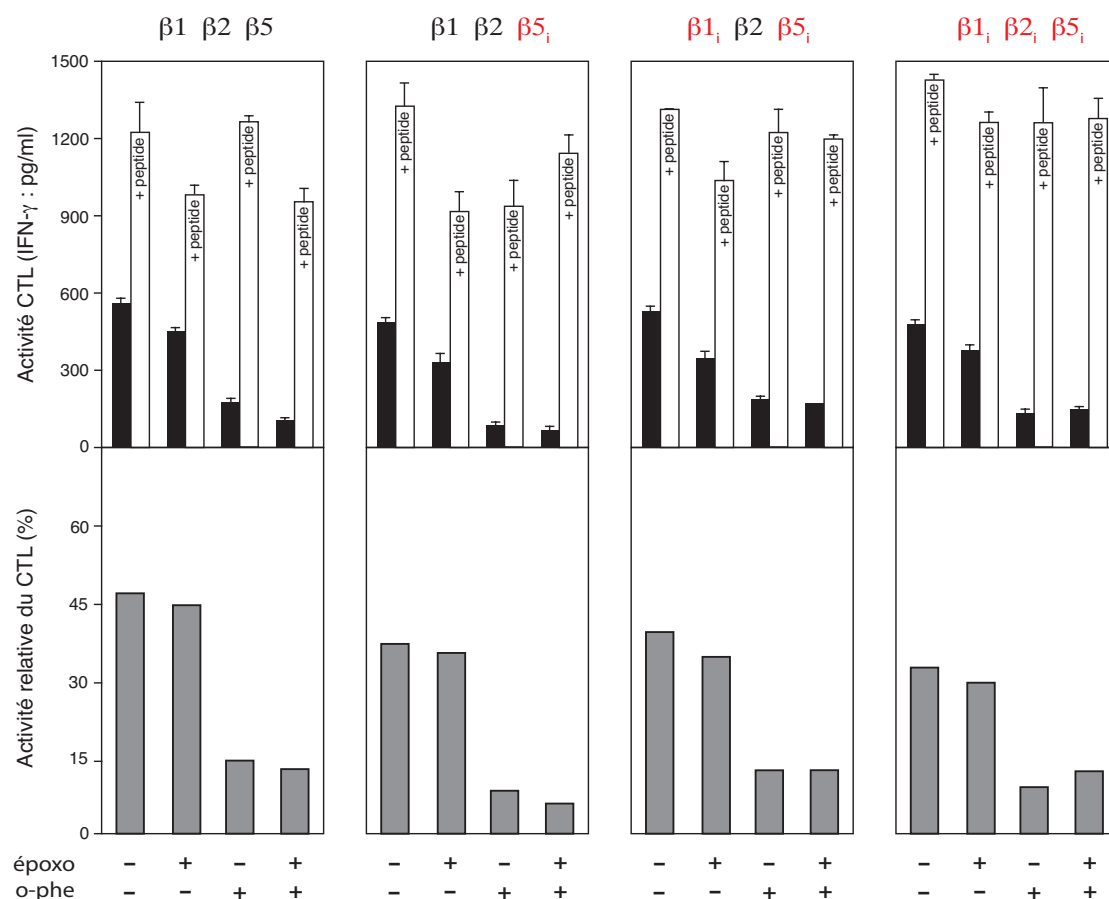


Fig 54. Influence du type de protéasome sur la capacité d'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1

Des cDNA codant pour MAGE-A3 et HLA-A1 ont été transfectés dans des lignées 293-EBNA exprimant soit le protéasome standard (β1 β2 β5), le simple intermédiaire (β1 β2 β5_i), le double intermédiaire (β_{1i} β2 β5_i) ou l'immunoprotéasome (β_{1i} β_{2i} β5_i). Après traitement à l'époxomicine (époxo) et/ou à l'orthophenanthroline (o-phe), ces transfectants ont été testés pour leur capacité à activer un clone de CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1. La production en IFN-γ dans les surnageants a été mesurée par ELISA (panneaux supérieurs) et les activités relatives des CTL par rapport aux conditions où les peptides antigéniques ont été ajoutés avant le test d'activation ont été calculées (panneaux inférieurs). (moyennes ± SEM de duplicats ; représentatif de 2 expériences).

N.B. Les transfectants 293-EBNA utilisés ont été décrits dans Guillaume B. 2010⁵³¹.

Toutefois, le type de protéasome contenu dans des transfectants 293-EBNA n'influence ni l'efficacité de la présentation de MAGE-A3/HLA1 ni le profil de la présentation qui reste invariablement résistant à l'époxomicine et sensible à l'orthophénanthroline (**Figure 54**). Aucune des quatre stratégies mises en œuvre n'ayant permis de mettre en évidence une implication du protéasome à la production du peptide MAGE-A3/HLA-A1, nous en concluons que ce peptide antigénique est bel et bien produit par une voie alternative.

II.2. Quels seraient les rôles de l'IDE dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ?

La complexité cellulaire rend illusoire la détermination du rôle précis de peptidases dans l'apprêtement de peptides antigéniques. Deux approches expérimentales complémentaires sont généralement utilisées pour appréhender les rôles hypothétiques de peptidases dans l'apprêtement de peptides antigéniques. La caractérisation de la présentation d'un antigène à partir de tests cellulaires permet d'identifier les peptidases jouant un rôle critique à l'apprêtement. La caractérisation de la production d'un peptide antigénique à partir de digestions de longs peptides (ou de protéines) par une peptidase (partiellement) purifiée ou recombinante permet de déterminer le rôle hypothétique de cette peptidase dans la présentation d'un antigène.

On considère que le rôle limitant du protéasome dans la production d'antigènes consiste à produire l'extrémité C-terminale de ceux-ci à partir de la dégradation de leurs protéines parentales. In vivo, alors que l'inhibition de l'activité du protéasome, par l'époxomicine, compromet partiellement la dégradation de MAGE-A3, elle n'affecte pas la présentation du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA1. La diminution de l'expression de l'IDE par siRNA ou de son activité par l'o-phenanthroline compromet partiellement la dégradation de la protéine MAGE-A3 ainsi que la présentation du peptide antigénique. Le clivage principal de l'IDE dans la dégradation correspond à la production de l'extrémité C-terminale de l'antigène, un rôle considéré restreint au protéasome dans la voie conventionnelle de l'apprêtement des antigènes. *In vitro*, la

déplétion par immunoaffinité de l'IDE (et non celle du protéasome) abroge la capacité de la fraction cytosolique à produire le peptide antigénique à partir d'un précurseur. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'IDE réalise l'étape limitante de la production du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1 en produisant l'extrémité C-terminale à partir de la dégradation de la protéine parentale MAGE-A3. Les digestions *in vitro* du précurseur montrent que l'IDE peut aussi produire l'extrémité N-terminale du peptide antigénique. Par ailleurs, parmi les différentes familles composant le dégradome cellulaire, seule l'inhibition des métalloaminopeptidases limite la présentation de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1. Enfin l'inhibition des métalloaminopeptidases ainsi que celle des endopeptidases cytosoliques autres que l'IDE n'affectent pas la présentation de l'antigène. En recoupant toutes ces observations, on peut considérer que l'antigène mature puisse être un produit de dégradation libéré par l'IDE à partir de la protéine parentale MAGE-A3.

Afin de renforcer cette hypothèse, quelques essais de digestions *in vitro* de la protéine MAGE-A3 par de l'IDE recombinante avaient été entrepris mais n'avaient pu mettre en évidence des produits de dégradation. Cependant, les tentatives de digestions de la protéine MAGE-A3 par une fraction cytosolique n'étaient pas plus concluantes. Cela montre, dans les conditions testées, que le protéasome, dont on mettrait moins facilement en doute la capacité à dégrader des protéines, n'était pas plus capable de dégrader la protéine MAGE-A3 que l'IDE. Ce type d'expériences nécessite un travail de mise au point de longue haleine tant la dégradation *in vitro* de protéines entières est à la fois délicate et peu efficace.

II.3. Par quoi se distinguent les deux systèmes de dégradation de MAGE-A3 ?

L'IDE et le protéasome représentent deux voies protéolytiques parallèles contribuant respectivement à la dégradation d'environ 1/3 et 2/3 du contenu cellulaire en protéines MAGE-A3. L'IDE et le protéasome ont été impliqués dans la dégradation parallèle de 4 autres substrats (A β 42, AICD, hémoglobine, lysozyme). Sur base de

ces études, deux scénarios expliqueraient la dégradation différentielle de MAGE-A3 par l'IDE et le protéasome.

1) L'IDE et le protéasome dégraderaient indistinctement les protéines MAGE-A3 (**Figure 52, voie 2**) ; la voie protéasomale serait juste deux fois plus importante que la voie IDE. L'IDE et le protéasome représentent deux voies parallèles d'élimination du fragment cytosolique (AICD) de la protéine APP^{227 228} et représentent deux voies ERAD parallèles du peptide Aβ42 produit dans le réticulum²²⁵. Dans ces deux cas, où le protéasome apparaît aussi comme la voie majeure de dégradation, rien n'indique que l'IDE et le protéasome ciblent des formes différentes de ces substrats.

2) L'IDE et le protéasome assureraient une dégradation distinctive des protéines MAGE-A3. Les formes de MAGE-A3 ciblées par le protéasome seraient deux fois plus importantes que celles ciblées par l'IDE (**Figure 52, voie 1**). Les études de la dégradation de l'hémoglobine et du lysozyme montrent clairement que l'IDE dégrade sélectivement les formes endommagées par stress oxydatif de ces substrats et non les formes intactes qui sont, quant à elles, exclusivement dégradées par le protéasome¹⁴⁶

144 145 86

Si la dégradation protéasomale de MAGE-A3 dépendait de la voie UPS (ubiquitin-proteasome system), l'adressage de la dégradation de MAGE-A3 à l'IDE ou au protéasome dépendrait de la polyubiquitination de MAGE-A3. La protéine MAGE-A3 contient théoriquement 314 acides aminés. La voie UPS nécessite l'incorporation d'un tag d'au moins 4 résidus d'ubiquitine (8,5 kDa chacun). Tous les western blots de ce travail montrent, qu'en conditions dénaturantes, MAGE-A3 se présente sous la forme d'une bande unique d'environ 35-38 kDa, ce qui est incompatible avec une forme polyubiquitinée de la protéine. Bien entendu, cette technique ne permettrait de détecter que les formes de MAGE-A3 conservant l'épitope reconnu par l'anticorps. Le site de reconnaissance de l'anticorps utilisé (le clone 57B) a été identifié par ELISA entre les résidus 14 et 31, une séquence dépourvue de lysines⁶³⁶.

Les protéines MAGEs sont relativement peu caractérisées (§ III.3 de l'introduction). D'éventuelles phosphorylations ou acétylations de la protéine MAGE-A3, qui seraient invisibles dans nos western blots, pourraient influencer l'adressage de la dégradation de la protéine. Par ailleurs, l'adressage de la dégradation pourrait tout simplement

dépendre de différences de repliement de la protéine, le protéasome et l'IDE ciblant des formes de MAGE-A3 différant les unes des autres par leur structure secondaire.

Afin de répondre à cette question, il serait envisageable d'isoler et de comparer les protéines MAGE-A3 interagissant soit avec l'IDE, soit avec le protéasome par une approche de co-précipitation. Des tests préliminaires ont déjà été réalisés à cet effet. Des lysats de cellules de mélanomes ou de transfectants exprimant stablement MAGE-A3 ont été fractionnés par une chromatographie d'exclusion de taille (Séphadex). L'analyse préliminaire de ces fractions par western blot montre que MAGE-3 s'élue en deux groupes de fractions bien distinctes. Une partie de MAGE-A3 est éluée dans 2 fractions de hauts poids moléculaires (d'environ 1MDa), contenant du protéasome (détecté avec un anticorps dirigé contre la sous-unité $\alpha 2$). La seconde partie, qui est plus enrichie en MAGE-A3, est éluée dans des fractions de poids moléculaires compris entre 100 et 300 kDa qui, elles, contiennent de l'IDE. Cette expérience nous montre qu'en condition native, MAGE-A3 n'existe pas sous forme monomérique.

A partir de ces fractions positives, une immunoprécipitation soit du protéasome soit de l'IDE permettrait de déterminer si, en plus d'être présent dans des fractions contenant soit l'IDE ou le protéasome, MAGE-A3 interagit avec ces deux protéases. Si c'est le cas, nous pourrions ensuite vérifier s'il y a des différences entre ces deux populations de MAGE-A3.

III. Contribution de l'IDE au répertoire antigénique

Le rôle de l'IDE en tant que voie d'apprêtement alternative au protéasome n'a été observé que pour le peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1. Deux perspectives semblent se dégager à l'issue de ce travail. La première serait d'identifier des peptides antigéniques qui, comme MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1, dépendraient de l'IDE et non du protéasome. La seconde serait d'évaluer de façon générale la contribution de l'IDE au répertoire antigénique.

III.1. Recherche de peptides antigéniques potentiellement produits par l'IDE

On pourrait rechercher des candidats de peptides antigéniques potentiellement produits par l'IDE sur base de leur ressemblance au peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆. La séquence du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ est incluse dans un domaine très conservé par l'ensemble des protéines MAGE. Plusieurs des peptides antigéniques identifiés dérivés d'autres gènes MAGE sont eux aussi inclus dans ce domaine. Ceci explique les grandes similarités de séquences de tels peptides (ex : MAGE-A1₁₆₈₋₁₇₆, MAGE-A1₁₆₁₋₁₆₉ **EADPTGHSY** et MAGE-A6₁₆₈₋₁₇₆ **EVDPIGHVY**)⁶²⁶. Comme mentionné dans l'introduction (§ I.4.4), l'IDE ne cible pas certains peptides naturels ayant des séquences pourtant très semblables à certains de ses substrats. Par conséquent, malgré leur grande homologie de séquence avec le peptide MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆, l'IDE pourrait ne pas être responsable de la production de ces peptides dérivés d'autres protéines MAGE. Toutefois, nous avons voulu tester l'implication potentielle de l'IDE dans l'apprêtement d'un autre antigène dérivé de MAGE-A3. Le peptide MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆/HLA-B44 est une version décamérique du peptide MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1 rallongé à son extrémité N-terminale par une méthionine⁶³⁵. Le profil d'inhibition de l'apprêtement, établi au niveau d'une lignée de mélanome, indiquait que la présentation de cet antigène dépendait du protéasome et d'une activité métallopeptidasique (**Figure 55**).

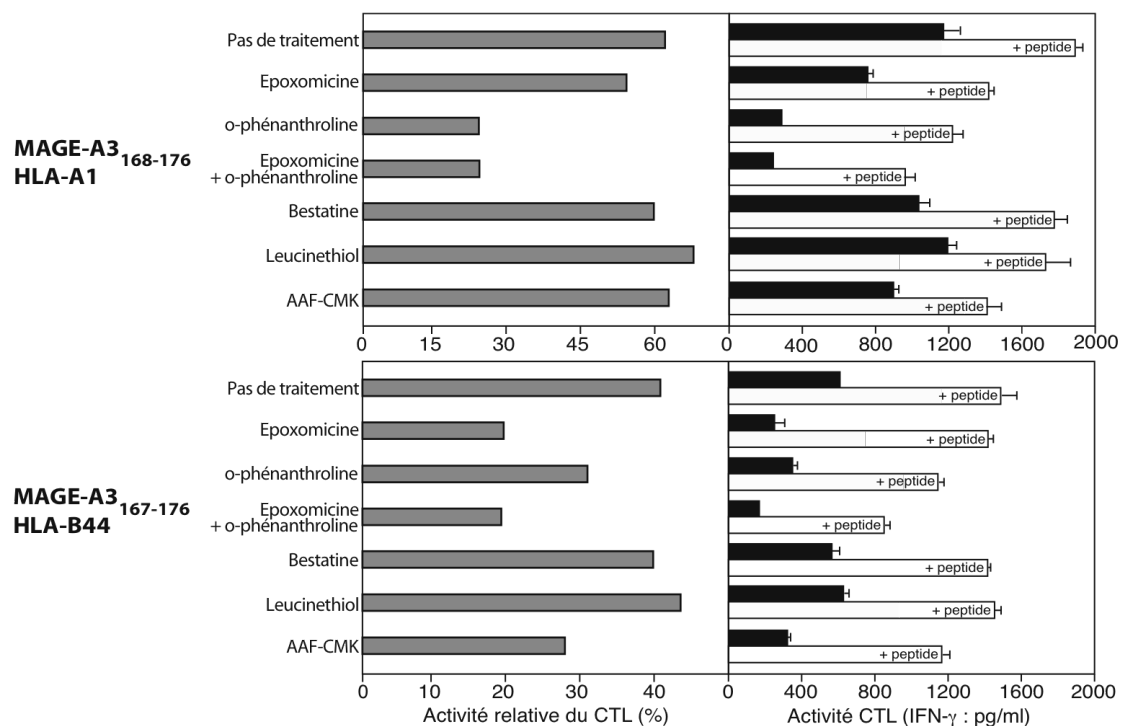


Fig 55. Apprêtement des peptides MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (HLA-A1) et MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆ (HLA-B44) par une lignée de mélanome.

La lignée MZ2-MEL a été traitée comme décrit précédemment, par différents inhibiteurs de protéases. Ces cellules ont ensuite été testées pour leur capacité à activer les clones de CTL spécifiques soit de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ou de MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆ comme décrit dans la Figure 49.

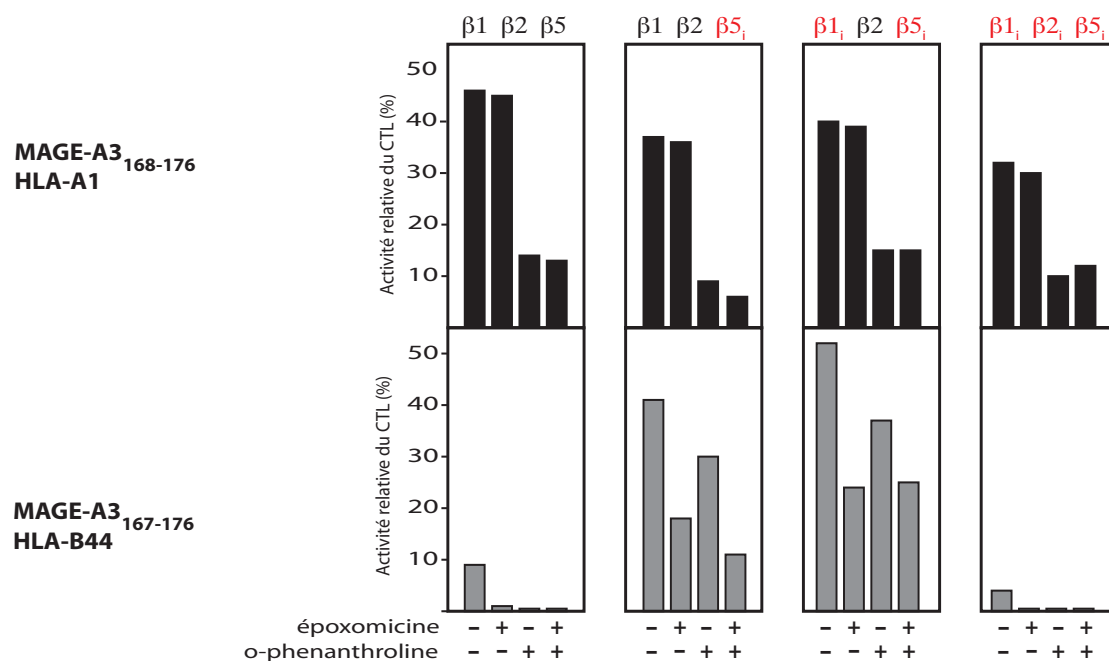


Fig 56. Influence du type de protéasome sur la présentation des peptides MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ (HLA-A1) et MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆ (HLA-B44).

Des cDNA codant pour MAGE-A3, HLA-A1 et HLA-B44 ont été transfectés dans des lignées 293-EBNA exprimant soit le protéasome standard ($\beta 1 \beta 2 \beta 5$), le simple intermédiaire ($\beta 1 \beta 2 \beta 5_i$), le double intermédiaire ($\beta 1_i \beta 2 \beta 5_i$) ou l'immunoprotéasome ($\beta 1_i \beta 2_i \beta 5_i$). Après traitement à l'époxomicine (époxo) et/ou à l'orthophénanthroline (o-phe), ces transfectants ont ensuite été testés pour leur capacité à activer les clones de CTL spécifiques soit de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ ou de MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆ comme décrit dans la Figure 54.

L'inhibition conjointe du protéasome et des métallopeptidases ne diminuant pas d'avantage la présentation du peptide, cela suggérerait une implication séquentielle des métallopeptidases et du protéasome. Aussi semblable à MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ soit cet antigène, sa sensibilité à l'AAF-CMK exclut que l'IDE soit la métallopeptidase requise à sa production. A notre connaissance, aucune métallopeptidase impliquée à ce jour dans l'apprêtement des antigènes n'est compatible avec un tel profil d'inhibition. La production de MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆/HLA-B44 dépendant d'une des activités séquentielles du protéasome et d'une métallopeptidase, nous avons voulu tester l'influence de la composition en protéasome sur l'apprêtement de ce peptide (**Figure 56**). Seules des cellules contenant soit le protéasome simple intermédiaire soit le double intermédiaire pouvaient produire l'antigène ; un cas de figure à ce jour sans précédent ^{531 532}. L'absence de rôle apparent de l'IDE dans la production du peptide MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆/HLA-B44 pourrait s'expliquer par le clivage M₁₆₇-E₁₆₈ fait par l'IDE qui permet la production de l'extrémité N-terminale de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1 mais qui détruit du même coup celle du peptide MAGE-A3₁₆₇₋₁₇₆/HLA-B44.

Alternativement, nous pourrions recourir à une approche semblable à celle utilisée dans l'identification de la peptidase responsable de la production d'un peptide immunodominant dérivé de la protéine Nef d'HIV-I ⁴⁷⁵. Nous pourrions réaliser des digestions du domaine MAGE de différents membres de la famille MAGE-A (voir des familles B et C) et vérifier si certains produits de digestions correspondent à des peptides antigéniques tumoraux matures (ou à des précurseurs potentiels de ceux-ci) d'ores et déjà identifiés ⁶²¹.

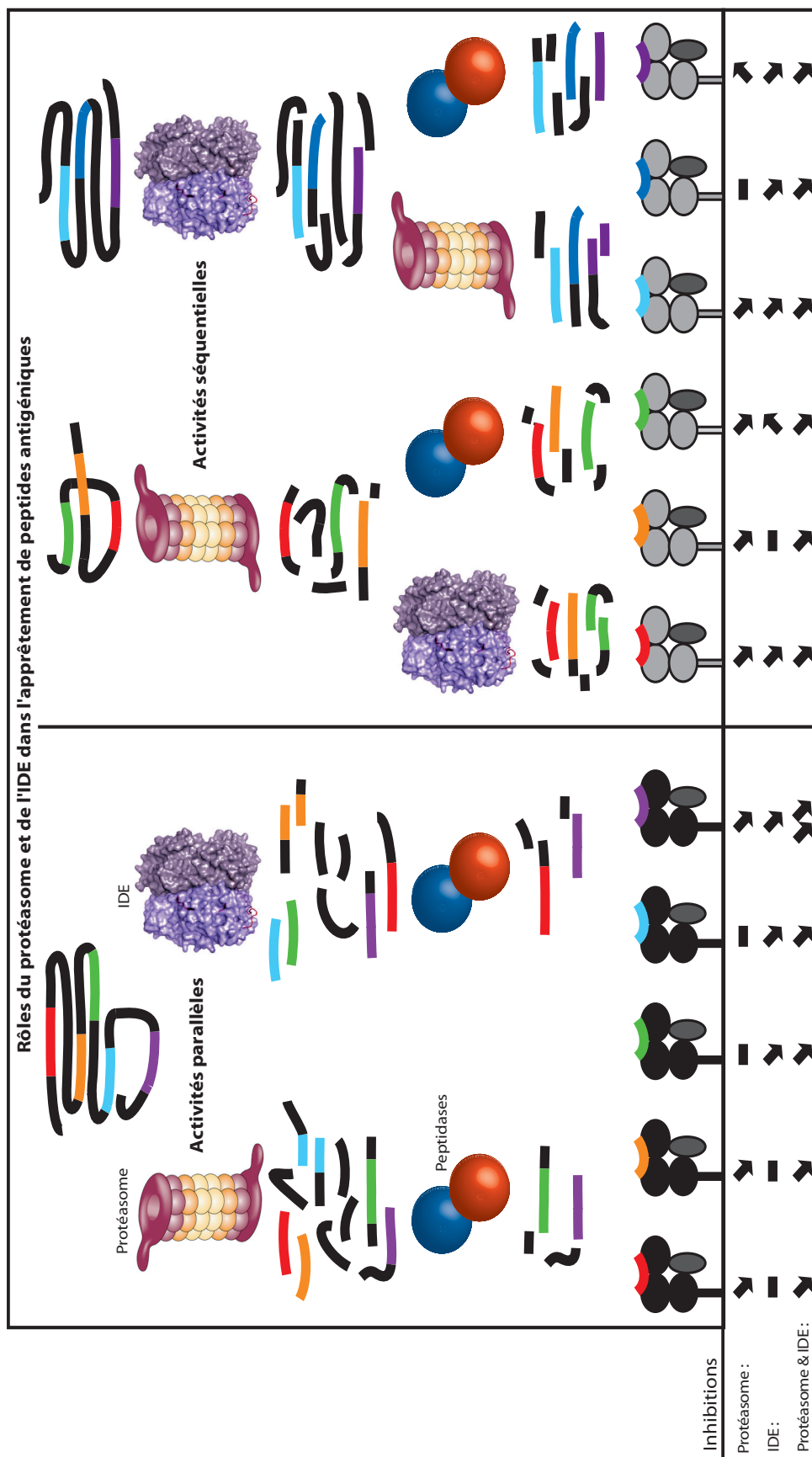


Fig 57. Rôles potentiels de l'IDE et du protéasome dans l'apprêtement des peptides antigéniques :
 En dégradant certaines formes de protéines qui ne peuvent être ciblées par le protéasome, l'IDE constitue une voie d'apprêtement d'antigènes parallèle à celle du protéasome (gauche). L'IDE pourrait agir comme une oligopeptidase en convertissant des produits libérés par le protéasome ou, alternativement, convertir en substrats des protéines non-ciblées par le protéasome. Dans ce second cas de figure, l'IDE et le protéasome interviendraient séquentiellement dans l'apprêtement des antigènes (droite). Le tableau ci-dessus représente les effets hypothétiques qu'auraient leurs inhibitions respectives sur l'apprêtement d'antigènes.

III.2. Etude de la contribution de l'IDE au répertoire antigénique de classe I.

Depuis la découverte du rôle capital du protéasome dans la production de la majorité des peptides antigéniques, pas moins de 10 autres peptidases ont à ce jour été impliquées dans l'apprêtement ^{462 506} (**Figures 31**). Après la mise en évidence de ces peptidases dans l'apprêtement de certains peptides antigéniques déterminés, des modèles murins déficients ont été développés pour certaines d'entre elles et ont montré qu'hormis ERAP1 et la thimet oligopeptidase, les autres peptidases n'ont pas un rôle majeur dans l'apprêtement des antigènes (§ III.1.5 de l'introduction) ⁵⁰⁶. TPPII et l'IDE se distinguent de ce groupe de peptidases dans la mesure où, contrairement aux autres, elles ont été impliquées dans des voies alternatives au protéasome.

Environ 95% des peptides antigéniques sont présentés par la voie protéasome-dépendante et 3-5% sont présentés par la voie alternative TAP-indépendante (§ III.1.2 et III.1.5 de l'introduction). Par conséquent, seuls quelques peptides devraient être produits par une voie alternative de type IDE-dépendante. Des expériences (très préliminaires) semblent le confirmer. Les cellules 293-HEK, suite à une délétion d'un allèle du chromosome 6, n'expriment que 3 sortes de chaînes lourdes : HLA-A3, HLA-B7, HLA-C7. Nous avons observé, en cytométrie de flux, que la diminution de l'expression de l'IDE ne modifiait pas le niveau d'expression de l'ensemble des complexes de classe I, ni celui des complexes A3 et B7. Par ailleurs, nous avons observé que la reconnaissance par le CTL spécifique de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆ de cellules incubées avec le peptide antigénique ne variait pas en fonction du niveau d'expression de l'IDE. Cela suggère que l'activité de l'IDE n'affecte pas le niveau des complexes HLA-A1 non plus. Ces approches, par leur imprécision, ne sont adéquates que pour tester l'influence d'activités peptidasiques (protéasome, ERAP1, TOP) ayant un rôle majeur dans l'apprêtement. Nous pourrions cependant tester l'influence de l'IDE sur le niveau de complexes dont l'expression est relativement résistante à l'inhibition du protéasome ⁵⁹⁸. Marcilla a montré que 30% des peptides présentés par l'HLA-B27 semblaient protéasome-indépendant mais TAP-dépendant ⁵⁹⁹. Ces peptides ne semblant pas dépendant de la voie alternative TPPII, il serait dès lors intéressant de tester l'implication de l'IDE sur la présentation de ces complexes ⁶⁰⁰.

Comme cela a été fait pour d'autres peptidases (§ III.1.4 de l'introduction), nous pourrions alternativement tirer profit du modèle murin déficient pour l'IDE, un modèle ayant principalement été exploité pour l'étude de la dégradation physiologique de l'insuline et de celle des peptides β -amyloïdes (§ I.4.6 de l'introduction). A partir de cellules dérivées de souris IDE^{-/-} et IDE^{+/+}, nous pourrions évaluer l'effet d'une perte d'expression de l'IDE sur le niveau d'expression de complexes CMH-I en surface, sur la stabilité de ces complexes, ainsi que sur la capacité de cellules infectées avec différents virus à stimuler des CTL. Au niveau des souris, nous pourrions aussi évaluer l'effet de la perte en IDE sur la population CD8, sur la réponse anti-virale, ou sur la réaction lymphocytaire lors de transferts adoptifs.

A l'image de la sélectivité de leurs transporteurs TAP respectifs, les extrémités C-terminales des peptides antigéniques de la souris (résidus hydrophobes) sont différentes de celles de l'homme (résidus hydrophobes et basiques)^{553 579}. L'IDE clive efficacement en aval d'acides aminés hydrophobes ou basiques. Dès lors, le recours à un modèle murin ne permettrait pas de tenir compte du rôle potentiel de l'IDE dans la production de peptides antigéniques à extrémités C-terminales basiques (§ I.4.4 de l'introduction). De ce fait une étude la contribution de l'IDE au répertoire antigénique humain serait complémentaire à celle réalisée à partir du modèle murin. Il s'agirait de comparer la nature peptides antigéniques analysés par spectrométrie de masse présentés par certains HLA isolés par immunoprécipitation à partir de cellules dont l'expression de l'IDE serait soit diminuée soit intacte {Marcilla, 2007 #548; Marcilla, 2008 #1842}. L'analyse des peptides nécessitant quelques milliards de cellules, l'inhibition spécifique de l'expression de l'IDE nécessiterait le recours à un shRNA plutôt qu'un siRNA. L'étude du répertoire ciblant les complexes HLA-A3, -A11, -A68, -B*2705 serait plus indiquée dans la mesure où l'expression de ces complexes est relativement résistante à l'inhibition du protéasome^{598 657} et que les peptides qu'ils présentent ont fréquemment des extrémités C-terminales basiques⁴⁸³.

L'étude de l'apprêtement de MAGE-A3₁₆₈₋₁₇₆/HLA-A1 nous a amené à envisager l'IDE principalement comme voie alternative au protéasome (**Figure 57, à gauche**). Toutefois, au vu de sa capacité à dégrader des substrats oligopeptidiques comme la somatostatine (14 aa) ou la bradikynine (9 aa), l'IDE pourrait convertir des produits libérés par le protéasome et être impliquée aussi dans l'apprêtement d'antigènes dépendant du protéasome (**Figure 57, à droite**). Les peptidases impliquées dans une voie de production de peptides antigéniques dépendante du protéasome agissent en aval du protéasome. L'IDE par sa capacité à cibler des protéines entières pourrait réaliser des clivages initiaux au sein de protéines non-ciblées par le protéasome afin de les rendre plus digestes pour celui-ci. Par conséquent, l'IDE pourrait contribuer à l'apprêtement d'antigènes dépendant du protéasome en agissant soit en amont soit en aval de ce dernier (**Figure 57, à droite**). Enfin, comme pour toutes les peptidases ayant été impliquées dans l'apprêtement, le caractère délétère ou profitable des clivages de l'IDE dépendrait de l'antigène étudié.

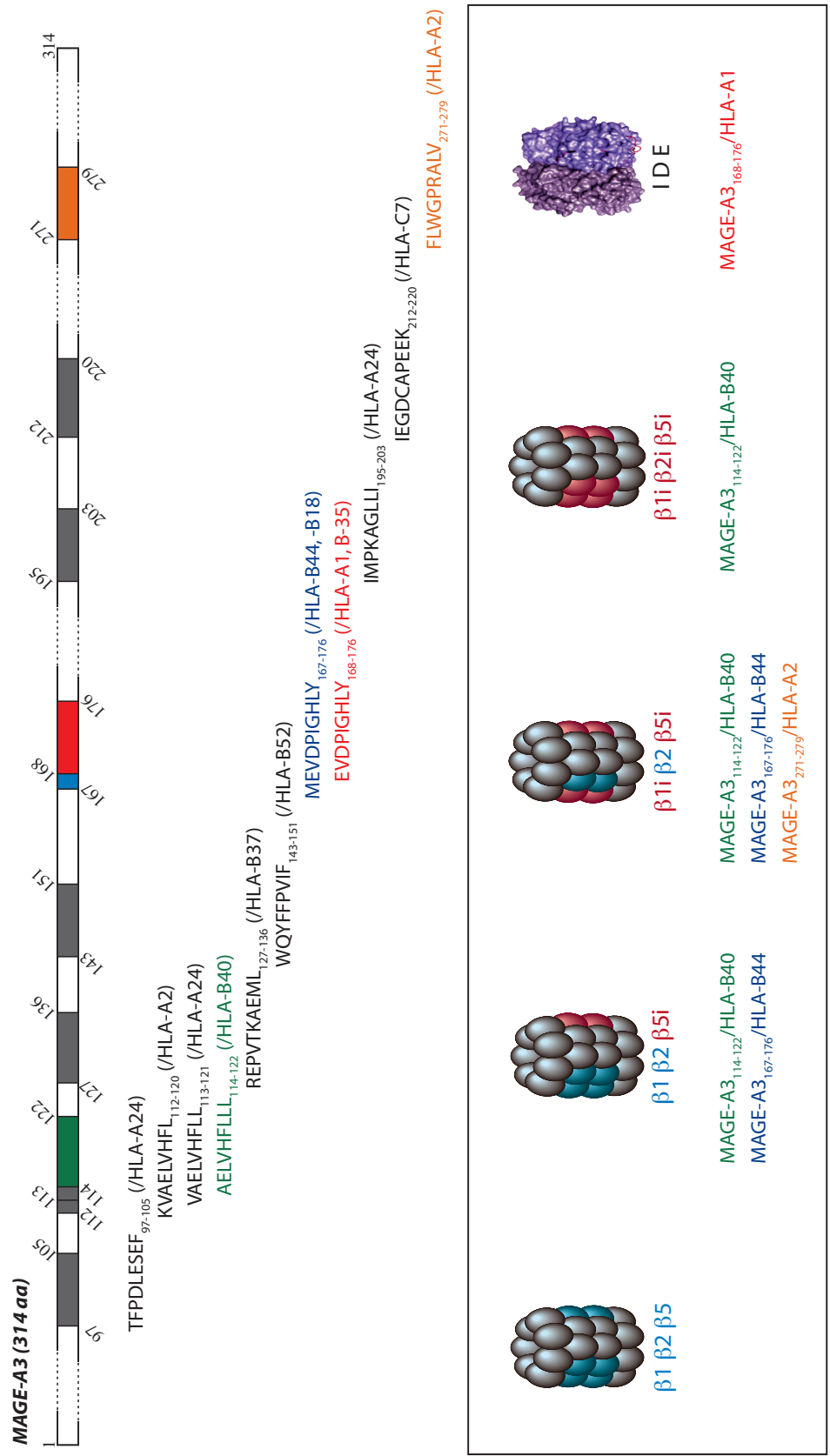


Fig 58. Apprêtement différentiel de peptides antigéniques produits à partir de la protéine MAGE-A3

MAGE-A3 est une protéine de 314 acides aminés à partir de laquelle différents peptides antigéniques de classe I ont été identifiés. Ces peptides, exprimés de façon constitutive à la surface de cellules tumorales, sont spécifiquement reconnus par des clones de lymphocytes cytolytiques isolés à partir du sang de patients. Les apprêtements de quatre d'entre-eux ont été caractérisés, principalement dans le travail de thèse de B. Guillaume et de celui-ci. *N.B. : aucun des apprêtements ne semble impliquer le protéasome standard.*

Bibliographie

- 1 Lopez-Otin, C. & Matrisian, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **7**, 800-808 (2007).
- 2 Bergmann, M. & Fruton, J. S. The influence of substrate structure on the kinetics of carboxypeptidase action. *Journal of biological chemistry* **145**, 6 (1942).
- 3 Bergmann, M., Zervas, L. & Fruton, J. S. On proteolytic enzymes : VI. On the specificity of papain. *Journal of biological chemistry* **111**, 20 (1935).
- 4 Bergmann, M., Zervas, L., Fruton, J. S., Schneider, F. & Schleich, H. On proteolytic enzymes : V. On the specificity of dipeptidase. *Journal of biological chemistry* **109**, 22 (1935).
- 5 Smith, E. L. & Hanson, H. T. The chemical nature and mode of action of pancreatic carboxypeptidase. *J Biol Chem* **179**, 803-813 (1949).
- 6 Vallee, B. L., Riordan, J. F. & Coleman, J. E. Carboxypeptidase A: approaches to the chemical nature of the active center and the mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**, 109-116 (1963).
- 7 Stahmann, M. A., Fruton, J. S. & Bergmann, M. The specificity of carboxypeptidase. *J Biol Chem* **164**, 753-760 (1946).
- 8 Fukasawa, K. M., Hirose, J., Hata, T. & Ono, Y. Aspartic acid 405 contributes to the substrate specificity of aminopeptidase B. *Biochemistry* **45**, 11425-11431, doi:10.1021/bi0604577 (2006).
- 9 Lowther, W. T. & Matthews, B. W. Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. *Chem Rev* **102**, 4581-4608 (2002).
- 10 Smith, E. L. & Bergmann, M. The peptidases of intestinal mucosa. *Journal of biological chemistry* **153**, 25 (1944).
- 11 Lupi, A., Tenni, R., Rossi, A., Cetta, G. & Forlino, A. Human prolydase and prolydase deficiency: an overview on the characterization of the enzyme involved in proline recycling and on the effects of its mutations. *Amino Acids* **35**, 739-752, doi:10.1007/s00726-008-0055-4 (2008).
- 12 Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-956 (2007).
- 13 Komander, D., Clague, M. J. & Urbe, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 550-563, doi:10.1038/nrm2731 (2009).
- 14 Blow, D. M., Birktoft, J. J. & Hartley, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**, 337-340 (1969).
- 15 Jansen, E. F., Nutting, F. & et al. Inhibition of the proteinase and esterase activities of trypsin and chymotrypsin by diisopropyl fluorophosphate; crystallization of inhibited chymotrypsin. *J Biol Chem* **179**, 189-199 (1949).

- 16 Schaffer, N. K., May, S. C., Jr. & Summerson, W. H. Serine phosphoric acid from diisopropylphosphoryl chymotrypsin. *J Biol Chem* **202**, 67-76 (1953).
- 17 Gold, A. M. & Fahrney, D. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. Ii. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl Alpha-Chymotrypsin. *Biochemistry* **3**, 783-791 (1964).
- 18 Ong, E. B., Shaw, E. & Schoellmann, G. The Identification of the Histidine Residue at the Active Center of Chymotrypsin. *J Biol Chem* **240**, 694-698 (1965).
- 19 Schoellmann, G. & Shaw, E. Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry* **2**, 252-255 (1963).
- 20 Hartley, B. S. Amino-Acid Sequence of Bovine Chymotrypsinogen-A. *Nature* **201**, 1284-1287 (1964).
- 21 Di Cera, E. Serine proteases. *IUBMB Life* **61**, 510-515, doi:10.1002/iub.186 (2009).
- 22 Sprang, S. *et al.* The three-dimensional structure of Asn102 mutant of trypsin: role of Asp102 in serine protease catalysis. *Science* **237**, 905-909 (1987).
- 23 Craik, C. S., Rocznik, S., Largman, C. & Rutter, W. J. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science* **237**, 909-913 (1987).
- 24 Henderson, R. Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. IV. The structure of indoleacryloyl-alpha-chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. *J Mol Biol* **54**, 341-354 (1970).
- 25 Lecaille, F., Kaleta, J. & Bromme, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* **102**, 4459-4488 (2002).
- 26 Matsumoto, K. *et al.* Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers* **51**, 99-107 (1999).
- 27 Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D. & James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* **102**, 4639-4750 (2002).
- 28 Stoltze, L. *et al.* Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* **1**, 413-418 (2000).
- 29 Baldwin, E. T. *et al.* Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6796-6800 (1993).
- 30 Dunn, B. M. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev* **102**, 4431-4458 (2002).
- 31 Rich, D. H. *et al.* Inhibition of aspartic proteases by pepstatin and 3-methylstatine derivatives of pepstatin. Evidence for collected-substrate enzyme inhibition. *Biochemistry* **24**, 3165-3173 (1985).
- 32 Erez, E., Fass, D. & Bibi, E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **459**, 371-378 (2009).
- 33 Friedmann, E. *et al.* Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J Biol Chem* **279**, 50790-50798 (2004).

- 34 Burley, S. K., David, P. R. & Lipscomb, W. N. Leucine aminopeptidase: bestatin inhibition and a model for enzyme-catalyzed peptide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6916-6920 (1991).
- 35 Burley, S. K., David, P. R., Taylor, A. & Lipscomb, W. N. Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6878-6882 (1990).
- 36 Becker, A. B. & Roth, R. A. An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3835-3839 (1992).
- 37 Leissring, M. A. *et al.* Designed inhibitors of insulin-degrading enzyme regulate the catabolism and activity of insulin. *PLoS One* **5**, e10504 (2010).
- 38 Lopez-Otin, C. & Overall, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 509-519 (2002).
- 39 Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **38**, D227-233 (2010).
- 40 Mirsky, I. A. & Broh-Kahn, R. H. The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Arch Biochem* **20**, 1-9 (1949).
- 41 Backer, J. M., Kahn, C. R. & White, M. F. The dissociation and degradation of internalized insulin occur in the endosomes of rat hepatoma cells. *J Biol Chem* **265**, 14828-14835 (1990).
- 42 Bergeron, J. J., Sikstrom, R., Hand, A. R. & Posner, B. I. Binding and uptake of 125I-insulin into rat liver hepatocytes and endothelium. An in vivo radioautographic study. *J Cell Biol* **80**, 427-443 (1979).
- 43 Terris, S. & Steiner, D. F. Binding and degradation of 125I-insulin by rat hepatocytes. *J Biol Chem* **250**, 8389-8398 (1975).
- 44 Duckworth, W. C. Insulin and glucagon degradation by the kidney. II. Characterization of the mechanisms at neutral pH. *Biochim Biophys Acta* **437**, 531-542 (1976).
- 45 Duckworth, W. C. Insulin and glucagon degradation by the kidney. I. Subcellular distribution under different assay condition. *Biochim Biophys Acta* **437**, 518-530 (1976).
- 46 Duckworth, W. C., Heinemann, M. A. & Kitabchi, A. E. Purification of insulin-specific protease by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3698-3702 (1972).
- 47 Authier, F., Rachubinski, R. A., Posner, B. I. & Bergeron, J. J. Endosomal proteolysis of insulin by an acidic thiol metalloprotease unrelated to insulin degrading enzyme. *J Biol Chem* **269**, 3010-3016 (1994).
- 48 Desbuquois, B., Janicot, M. & Dupuis, A. Degradation of insulin in isolated liver endosomes is functionally linked to ATP-dependent endosomal acidification. *Eur J Biochem* **193**, 501-512 (1990).
- 49 Doherty, J. J., 2nd, Kay, D. G., Lai, W. H., Posner, B. I. & Bergeron, J. J. Selective degradation of insulin within rat liver endosomes. *J Cell Biol* **110**, 35-42 (1990).
- 50 Duckworth, W. C. Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endocr Rev* **9**, 319-345 (1988).
- 51 Hooper, N. M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**, 1-6 (1994).

- 52 Baumeister, H., Muller, D., Rehbein, M. & Richter, D. The rat insulin-degrading enzyme. Molecular cloning and characterization of tissue-specific transcripts. *FEBS Lett* **317**, 250-254 (1993).
- 53 Affholter, J. A., Hsieh, C. L., Francke, U. & Roth, R. A. Insulin-degrading enzyme: stable expression of the human complementary DNA, characterization of its protein product, and chromosomal mapping of the human and mouse genes. *Mol Endocrinol* **4**, 1125-1135 (1990).
- 54 Kuo, W. L., Gehm, B. D. & Rosner, M. R. Cloning and expression of the cDNA for a Drosophila insulin-degrading enzyme. *Mol Endocrinol* **4**, 1580-1591 (1990).
- 55 Garcia, J. V., Gehm, B. D. & Rosner, M. R. An evolutionarily conserved enzyme degrades transforming growth factor-alpha as well as insulin. *J Cell Biol* **109**, 1301-1307 (1989).
- 56 Alper, B. J., Rowse, J. W. & Schmidt, W. K. Yeast Ste23p shares functional similarities with mammalian insulin-degrading enzymes. *Yeast* **26**, 595-610 (2009).
- 57 Huet, Y., Strassner, J. & Schaller, A. Cloning, expression and characterization of insulin-degrading enzyme from tomato (*Solanum lycopersicum*). *Biol Chem* **389**, 91-98 (2008).
- 58 Affholter, J. A. *et al.* Identification of residues in the insulin molecule important for binding to insulin-degrading enzyme. *Biochemistry* **29**, 7727-7733 (1990).
- 59 Duckworth, W. C. *et al.* Drosophila insulin degrading enzyme and rat skeletal muscle insulin protease cleave insulin at similar sites. *Biochemistry* **28**, 2471-2477 (1989).
- 60 Duckworth, W. C., Hamel, F. G., Bennett, R., Ryan, M. P. & Roth, R. A. Human red blood cell insulin-degrading enzyme and rat skeletal muscle insulin protease share antigenic sites and generate identical products from insulin. *J Biol Chem* **265**, 2984-2987 (1990).
- 61 Ebrahim, A., Hamel, F. G., Bennett, R. G. & Duckworth, W. C. Identification of the metal associated with the insulin degrading enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 1398-1406 (1991).
- 62 Shen, Y., Joachimiak, A., Rosner, M. R. & Tang, W. J. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature* **443**, 870-874 (2006).
- 63 Becker, A. B. & Roth, R. A. Insulysin and pitrilysin: insulin-degrading enzymes of mammals and bacteria. *Methods Enzymol* **248**, 693-703 (1995).
- 64 Cheng, Y. S. & Zipser, D. Purification and characterization of protease III from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **254**, 4698-4706 (1979).
- 65 Malito, E., Hulse, R. E. & Tang, W. J. Amyloid beta-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2574-2585 (2008).
- 66 Affholter, J. A., Fried, V. A. & Roth, R. A. Human insulin-degrading enzyme shares structural and functional homologies with *E. coli* protease III. *Science* **242**, 1415-1418 (1988).
- 67 Anastasi, A., Knight, C. G. & Barrett, A. J. Characterization of the bacterial metalloendopeptidase pitrilysin by use of a continuous fluorescence assay. *Biochem J* **290** (Pt 2), 601-607 (1993).
- 68 Cornista, J. *et al.* Cleavage of various peptides with pitrilysin from *Escherichia coli*: kinetic analyses using beta-endorphin and its derivatives. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2128-2137 (2004).

- 69 Cornista, J. C., Koga, Y., Takano, K. & Kanaya, S. Amyloidogenecity and pitrilysin sensitivity of a lysine-free derivative of amyloid beta-peptide cleaved from a recombinant fusion protein. *J Biotechnol* **122**, 186-197 (2006).
- 70 Ding, L., Becker, A. B., Suzuki, A. & Roth, R. A. Comparison of the enzymatic and biochemical properties of human insulin-degrading enzyme and Escherichia coli protease III. *J Biol Chem* **267**, 2414-2420 (1992).
- 71 Bondy, C. A. *et al.* Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression. Comparison with insulin and insulin-like growth factor receptors. *J Clin Invest* **93**, 966-973 (1994).
- 72 Kuo, W. L., Montag, A. G. & Rosner, M. R. Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rat tissues. *Endocrinology* **132**, 604-611 (1993).
- 73 Yfanti, C. *et al.* Expression of metalloprotease insulin-degrading enzyme insulysin in normal and malignant human tissues. *Int J Mol Med* **22**, 421-431 (2008).
- 74 Fakhrai-Rad, H. *et al.* Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Hum Mol Genet* **9**, 2149-2158 (2000).
- 75 Gauguier, D. *et al.* Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat Genet* **12**, 38-43 (1996).
- 76 Meigs, J. B., Panhuysen, C. I., Myers, R. H., Wilson, P. W. & Cupples, L. A. A genome-wide scan for loci linked to plasma levels of glucose and HbA(1c) in a community-based sample of Caucasian pedigrees: The Framingham Offspring Study. *Diabetes* **51**, 833-840 (2002).
- 77 Farris, W. *et al.* Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol* **164**, 1425-1434 (2004).
- 78 Myers, A. *et al.* Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science* **290**, 2304-2305 (2000).
- 79 Farris, W., Leissring, M. A., Hemming, M. L., Chang, A. Y. & Selkoe, D. J. Alternative splicing of human insulin-degrading enzyme yields a novel isoform with a decreased ability to degrade insulin and amyloid beta-protein. *Biochemistry* **44**, 6513-6525 (2005).
- 80 Authier, F., Posner, B. I. & Bergeron, J. J. Insulin-degrading enzyme. *Clin Invest Med* **19**, 149-160 (1996).
- 81 Hersh, L. B. The insulysin (insulin degrading enzyme) enigma. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2432-2434 (2006).
- 82 Roth, R. A., Ding, L. & Becker, A. B. in *Diabetes mellitus : a fundamental and clinical text* Ch. 26, (Lippincott Williams & Wilkins, 2004).
- 83 Authier, F., Cameron, P. H. & Taupin, V. Association of insulin-degrading enzyme with a 70 kDa cytosolic protein in hepatoma cells. *Biochem J* **319** (Pt 1), 149-158 (1996).
- 84 Authier, F. *et al.* Degradation of the cleaved leader peptide of thiolase by a peroxisomal proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3859-3863 (1995).

- 85 Chesneau, V., Perlman, R. K., Li, W., Keller, G. A. & Rosner, M. R. Insulin-degrading enzyme does not require peroxisomal localization for insulin degradation. *Endocrinology* **138**, 3444-3451 (1997).
- 86 Morita, M. *et al.* Insulin-degrading enzyme exists inside of rat liver peroxisomes and degrades oxidized proteins. *Cell Struct Funct* **25**, 309-315 (2000).
- 87 Platta, H. W. & Erdmann, R. Peroxisomal dynamics. *Trends Cell Biol* **17**, 474-484 (2007).
- 88 Harada, S., Smith, R. M., Smith, J. A., Shah, N. & Jarett, L. Demonstration of specific insulin binding to cytosolic proteins in H35 hepatoma cells, rat liver and skeletal muscle. *Biochem J* **306 (Pt 1)**, 21-28 (1995).
- 89 Bulloj, A. *et al.* Detergent resistant membrane-associated IDE in brain tissue and cultured cells: Relevance to Abeta and insulin degradation. *Mol Neurodegener* **3**, 22 (2008).
- 90 Vekrellis, K. *et al.* Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci* **20**, 1657-1665 (2000).
- 91 Zhao, J., Li, L. & Leissring, M. A. Insulin-degrading enzyme is exported via an unconventional protein secretion pathway. *Mol Neurodegener* **4**, 4 (2009).
- 92 Behl, M., Zhang, Y. & Zheng, W. Involvement of insulin-degrading enzyme in the clearance of beta-amyloid at the blood-CSF barrier: Consequences of lead exposure. *Cerebrospinal Fluid Res* **6**, 11 (2009).
- 93 Gao, W. *et al.* Insulin degrading enzyme is expressed in the human cerebrovascular endothelium and in cultured human cerebrovascular endothelial cells. *Neurosci Lett* **371**, 6-11 (2004).
- 94 Yokono, K., Imamura, Y., Shii, K., Sakai, H. & Baba, S. Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from pig skeletal muscle. *Endocrinology* **108**, 1527-1532 (1981).
- 95 Goldfine, I. D. *et al.* Degradation of insulin by isolated mouse pancreatic acini. Evidence for cell surface protease activity. *Diabetes* **33**, 64-72 (1984).
- 96 Li, Q., Ali, M. A. & Cohen, J. I. Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread. *Cell* **127**, 305-316 (2006).
- 97 Seta, K. A. & Roth, R. A. Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 167-171 (1997).
- 98 Qiu, W. Q. *et al.* Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* **273**, 32730-32738 (1998).
- 99 Qiu, W. Q., Ye, Z., Kholodenko, D., Seubert, P. & Selkoe, D. J. Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J Biol Chem* **272**, 6641-6646 (1997).
- 100 Bernstein, H. G. *et al.* Insulin-degrading enzyme in the Alzheimer's disease brain: prominent localization in neurons and senile plaques. *Neurosci Lett* **263**, 161-164 (1999).
- 101 Leal, M. C. *et al.* Plaque-associated overexpression of insulin-degrading enzyme in the cerebral cortex of aged transgenic tg2576 mice with Alzheimer pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**, 976-987 (2006).

- 102 Lynch, J. A. *et al.* Insulin degrading enzyme is localized predominantly at the cell surface of polarized and unpolarized human cerebrovascular endothelial cell cultures. *J Neurosci Res* **83**, 1262-1270 (2006).
- 103 Bulloj, A., Leal, M. C., Xu, H., Castano, E. M. & Morelli, L. Insulin-Degrading Enzyme Sorting in Exosomes: A Secretory Pathway for a Key Brain Amyloid-beta Degrading Protease. *J Alzheimers Dis* (2009).
- 104 Bulloj, A., Leal, M. C., Xu, H., Castano, E. M. & Morelli, L. Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease. *J Alzheimers Dis* **19**, 79-95 (2010).
- 105 Tamboli, I. Y. *et al.* Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J Biol Chem* **285**, 37405-37414 (2010).
- 106 Leissring, M. A. *et al.* Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem J* **383**, 439-446 (2004).
- 107 Kozak, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**, 8125-8148 (1987).
- 108 Udrisar, D. P. *et al.* Androgen- and estrogen-dependent regulation of insulin-degrading enzyme in subcellular fractions of rat prostate and uterus. *Exp Biol Med (Maywood)* **230**, 479-486 (2005).
- 109 Kirschner, R. J. & Goldberg, A. L. A high molecular weight metalloendoprotease from the cytosol of mammalian cells. *J Biol Chem* **258**, 967-976 (1983).
- 110 Akiyama, H. *et al.* Cellular localization of insulin-degrading enzyme in rat liver using monoclonal antibodies specific for this enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **155**, 914-922 (1988).
- 111 Shii, K., Baba, S., Yokono, K. & Roth, R. A. Covalent linkage of 125I-insulin to a cytosolic insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* **260**, 6503-6506 (1985).
- 112 Shii, K. & Roth, R. A. Inhibition of insulin degradation by hepatoma cells after microinjection of monoclonal antibodies to a specific cytosolic protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4147-4151 (1986).
- 113 Kuo, W. L., Gehm, B. D., Rosner, M. R., Li, W. & Keller, G. Inducible expression and cellular localization of insulin-degrading enzyme in a stably transfected cell line. *J Biol Chem* **269**, 22599-22606 (1994).
- 114 Duckworth, W. C., Bennett, R. G. & Hamel, F. G. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* **19**, 608-624 (1998).
- 115 Hamel, F. G., Mahoney, M. J. & Duckworth, W. C. Degradation of intraendosomal insulin by insulin-degrading enzyme without acidification. *Diabetes* **40**, 436-443 (1991).
- 116 Fawcett, J. & Rabkin, R. Degradation of insulin by isolated rat renal cortical endosomes. *Endocrinology* **133**, 1539-1547 (1993).
- 117 Duckworth, W. C., Stentz, F. B., Heinemann, M. & Kitabchi, A. E. Initial site of insulin cleavage by insulin protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 635-639 (1979).

- 118 Oku, M. & Sakai, Y. Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. *Febs J* **277**, 3289-3294 (2010).
- 119 Duckworth, W. C., Heinemann, M. & Kitabchi, A. E. Proteolytic degradation of insulin and glucagon. *Biochim Biophys Acta* **377**, 421-430 (1975).
- 120 Duckworth, W. C. *et al.* Identification of A chain cleavage sites in intact insulin produced by insulin protease and isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **147**, 615-621 (1987).
- 121 Duckworth, W. C. *et al.* Degradation products of insulin generated by hepatocytes and by insulin protease. *J Biol Chem* **263**, 1826-1833 (1988).
- 122 Kurochkin, I. V. & Goto, S. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* **345**, 33-37 (1994).
- 123 McDermott, J. R. & Gibson, A. M. Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human cathepsin D. *Neuroreport* **7**, 2163-2166 (1996).
- 124 Perez, A., Morelli, L., Cresto, J. C. & Castano, E. M. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem Res* **25**, 247-255 (2000).
- 125 Duckworth, W. C. & Kitabchi, A. E. Insulin and glucagon degradation by the same enzyme. *Diabetes* **23**, 536-543 (1974).
- 126 Rose, K. *et al.* Insulin proteinase liberates from glucagon a fragment known to have enhanced activity against Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase. *Biochem J* **256**, 847-851 (1988).
- 127 Authier, F., Mort, J. S., Bell, A. W., Posner, B. I. & Bergeron, J. J. Proteolysis of glucagon within hepatic endosomes by membrane-associated cathepsins B and D. *J Biol Chem* **270**, 15798-15807 (1995).
- 128 Authier, F., Cameron, P. H., Merlen, C., Kouach, M. & Briand, G. Endosomal proteolysis of glucagon at neutral pH generates the bioactive degradation product miniglucagon-(19-29). *Endocrinology* **144**, 5353-5364 (2003).
- 129 Mallat, A. *et al.* A glucagon fragment is responsible for the inhibition of the liver Ca^{2+} pump by glucagon. *Nature* **325**, 620-622 (1987).
- 130 Bataille, D., Fontes, G., Costes, S., Longuet, C. & Dalle, S. The glucagon-miniglucagon interplay: a new level in the metabolic regulation. *Ann N Y Acad Sci* **1070**, 161-166, doi:10.1196/annals.1317.005 (2006).
- 131 Guo, Q., Manolopoulou, M., Bian, Y., Schilling, A. B. & Tang, W. J. Molecular Basis for the Recognition and Cleavages of IGF-II, TGF-alpha, and Amylin by Human Insulin-Degrading Enzyme. *J Mol Biol* (2009).
- 132 Misbin, R. I., Almira, E. C., Duckworth, W. C. & Mehl, T. D. Inhibition of insulin degradation by insulin-like growth factors. *Endocrinology* **113**, 1525-1527 (1983).
- 133 Roth, R. A., Mesirov, M. L., Yokono, K. & Baba, S. Degradation of insulin-like growth factors I and II by a human insulin degrading enzyme. *Endocr Res* **10**, 101-112 (1984).

- 134 Muller, D., Schulze, C., Baumeister, H., Buck, F. & Richter, D. Rat insulin-degrading enzyme: cleavage pattern of the natriuretic peptide hormones ANP, BNP, and CNP revealed by HPLC and mass spectrometry. *Biochemistry* **31**, 11138-11143 (1992).
- 135 Bennett, R. G., Duckworth, W. C. & Hamel, F. G. Degradation of amylin by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* **275**, 36621-36625 (2000).
- 136 Bennett, R. G., Fawcett, J., Kruer, M. C., Duckworth, W. C. & Hamel, F. G. Insulin inhibition of the proteasome is dependent on degradation of insulin by insulin-degrading enzyme. *J Endocrinol* **177**, 399-405 (2003).
- 137 Engel, M. F. *et al.* Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6033-6038 (2008).
- 138 Garcia, J. V., Fenton, B. W. & Rosner, M. R. Isolation and characterization of an insulin-degrading enzyme from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* **27**, 4237-4244 (1988).
- 139 Hamel, F. G., Bennett, R. G., Harmon, K. S. & Duckworth, W. C. Insulin inhibition of proteasome activity in intact cells. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 671-674 (1997).
- 140 Ralat, L. A. *et al.* Ubiquitin is a novel substrate for human insulin-degrading enzyme. *J Mol Biol* **406**, 454-466 (2011).
- 141 Grasso, G., Rizzarelli, E. & Spoto, G. How the binding and degrading capabilities of insulin degrading enzyme are affected by ubiquitin. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 1122-1126 (2008).
- 142 Saric, T., Muller, D., Seitz, H. J. & Pavelic, K. Non-covalent interaction of ubiquitin with insulin-degrading enzyme. *Mol Cell Endocrinol* **204**, 11-20 (2003).
- 143 Ren, M. *et al.* Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *Embo J* **29**, 3952-3966 (2010).
- 144 Fagan, J. M. & Waxman, L. Purification of a protease in red blood cells that degrades oxidatively damaged haemoglobin. *Biochem J* **277** (Pt 3), 779-786 (1991).
- 145 Fagan, J. M. & Waxman, L. The ATP-independent pathway in red blood cells that degrades oxidant-damaged hemoglobin. *J Biol Chem* **267**, 23015-23022 (1992).
- 146 Fagan, J. M., Waxman, L. & Goldberg, A. L. Red blood cells contain a pathway for the degradation of oxidant-damaged hemoglobin that does not require ATP or ubiquitin. *J Biol Chem* **261**, 5705-5713 (1986).
- 147 Safavi, A., Miller, B. C., Cottam, L. & Hersh, L. B. Identification of gamma-endorphin-generating enzyme as insulin-degrading enzyme. *Biochemistry* **35**, 14318-14325 (1996).
- 148 Song, E. S. *et al.* Analysis of the subsite specificity of rat insulysin using fluorogenic peptide substrates. *J Biol Chem* **276**, 1152-1155 (2001).
- 149 Stentz, F. B., Kitabchi, A. E., Schilling, J. W., Schronk, L. R. & Seyer, J. M. Identification of insulin intermediates and sites of cleavage of native insulin by insulin protease from human fibroblasts. *J Biol Chem* **264**, 20275-20282 (1989).
- 150 Mukherjee, A. *et al.* Insulysin hydrolyzes amyloid beta peptides to products that are neither neurotoxic nor deposit on amyloid plaques. *J Neurosci* **20**, 8745-8749 (2000).

- 151 Chesneau, V. *et al.* Isolation and characterization of a dibasic selective metalloendopeptidase from rat testes that cleaves at the amino terminus of arginine residues. *J Biol Chem* **269**, 2056-2061 (1994).
- 152 Chow, K. M. *et al.* Studies on the subsite specificity of rat nardilysin (N-arginine dibasic convertase). *J Biol Chem* **275**, 19545-19551 (2000).
- 153 Cshai, E., Chen, G. & Hersh, L. B. Regulation of N-arginine dibasic convertase activity by amines: putative role of a novel acidic domain as an amine binding site. *Biochemistry* **37**, 3787-3794 (1998).
- 154 Burghen, G. A., Kitabchi, A. E. & Brush, J. S. Characterization of a rat liver protease with specificity for insulin. *Endocrinology* **91**, 633-642 (1972).
- 155 Kitabchi, A. E., Duckworth, W. C., Brush, J. S. & Heinemann, M. Direct measurement of proinsulin in human plasma by the use of an insulin-degrading enzyme. *J Clin Invest* **50**, 1792-1799 (1971).
- 156 Muller, D., Baumeister, H., Buck, F. & Richter, D. Atrial natriuretic peptide (ANP) is a high-affinity substrate for rat insulin-degrading enzyme. *Eur J Biochem* **202**, 285-292 (1991).
- 157 Kim, W. & Hecht, M. H. Sequence determinants of enhanced amyloidogenicity of Alzheimer A β ₄₂ peptide relative to A β ₄₀. *J Biol Chem* **280**, 35069-35076 (2005).
- 158 Storkel, S., Schneider, H. M., Muntefering, H. & Kashiwagi, S. Iatrogenic, insulin-dependent, local amyloidosis. *Lab Invest* **48**, 108-111 (1983).
- 159 Johansson, B., Wernstedt, C. & Westermark, P. Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils. *Biochem Biophys Res Commun* **148**, 1087-1092 (1987).
- 160 Rocken, C. *et al.* Atrial amyloidosis: an arrhythmogenic substrate for persistent atrial fibrillation. *Circulation* **106**, 2091-2097 (2002).
- 161 Khemtemourian, L., Killian, J. A., Hoppener, J. W. & Engel, M. F. Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res* **2008**, 421287 (2008).
- 162 Im, H. *et al.* Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE. *J Biol Chem* **282**, 25453-25463 (2007).
- 163 Kamihira, M., Naito, A., Tuzi, S., Nosaka, A. Y. & Saito, H. Conformational transitions and fibrillation mechanism of human calcitonin as studied by high-resolution solid-state ¹³C NMR. *Protein Sci* **9**, 867-877 (2000).
- 164 Sletten, K., Westermark, P. & Natvig, J. B. Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *J Exp Med* **143**, 993-998 (1976).
- 165 Kurochkin, I. V. Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci* **26**, 421-425 (2001).
- 166 Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C. L. & Beyreuther, K. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J Mol Biol* **228**, 460-473 (1992).

- 167 Turnell, W. G. & Finch, J. T. Binding of the dye congo red to the amyloid protein pig insulin reveals a novel homology amongst amyloid-forming peptide sequences. *J Mol Biol* **227**, 1205-1223 (1992).
- 168 Graham, G. J. *et al.* Aggregation of the chemokine MIP-1 alpha is a dynamic and reversible phenomenon. Biochemical and biological analyses. *J Biol Chem* **269**, 4974-4978 (1994).
- 169 Czaplewski, L. G. *et al.* Identification of amino acid residues critical for aggregation of human CC chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and RANTES. Characterization of active disaggregated chemokine variants. *J Biol Chem* **274**, 16077-16084 (1999).
- 170 Hospital, V. *et al.* Human and rat testis express two mRNA species encoding variants of NRD convertase, a metalloendopeptidase of the insulinase family. *Biochem J* **327 (Pt 3)**, 773-779 (1997).
- 171 Malito, E. *et al.* Molecular bases for the recognition of short peptide substrates and cysteine-directed modifications of human insulin-degrading enzyme. *Biochemistry* **47**, 12822-12834 (2008).
- 172 Mzhavia, N., Berman, Y. L., Qian, Y., Yan, L. & Devi, L. A. Cloning, expression, and characterization of human metalloprotease 1: a novel member of the pitrilysin family of metalloendoproteases. *DNA Cell Biol* **18**, 369-380 (1999).
- 173 Gehm, B. D., Kuo, W. L., Perlman, R. K. & Rosner, M. R. Mutations in a zinc-binding domain of human insulin-degrading enzyme eliminate catalytic activity but not insulin binding. *J Biol Chem* **268**, 7943-7948 (1993).
- 174 Shii, K., Yokono, K., Baba, S. & Roth, R. A. Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from human erythrocytes. *Diabetes* **35**, 675-683 (1986).
- 175 Song, E. S., Juliano, M. A., Juliano, L. & Hersh, L. B. Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development. *J Biol Chem* **278**, 49789-49794 (2003).
- 176 Li, P., Kuo, W. L., Yousef, M., Rosner, M. R. & Tang, W. J. The C-terminal domain of human insulin degrading enzyme is required for dimerization and substrate recognition. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 1032-1037 (2006).
- 177 Song, E. S., Cady, C., Fried, M. G. & Hersh, L. B. Proteolytic fragments of insulysin (IDE) retain substrate binding but lose allosteric regulation. *Biochemistry* **45**, 15085-15091 (2006).
- 178 Manolopoulou, M., Guo, Q., Malito, E., Schilling, A. B. & Tang, W. J. Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* **284**, 14177-14188 (2009).
- 179 Ciaccio, C. *et al.* Somatostatin: a novel substrate and a modulator of insulin-degrading enzyme activity. *J Mol Biol* **385**, 1556-1567 (2009).
- 180 McKenzie, R. A. & Burghen, G. A. Partial purification and characterization of insulin protease and its intracellular inhibitor from rat liver. *Arch Biochem Biophys* **229**, 604-611 (1984).

- 181 Zhao, L. *et al.* Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling
cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *J Neurosci* **24**, 11120-11126
(2004).
- 182 Du, J. *et al.* PPARgamma transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading
enzyme in primary neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **383**, 485-490 (2009).
- 183 Vieira, J. S. *et al.* Effect of dexamethasone and testosterone treatment on the regulation of
insulin-degrading enzyme and cellular changes in ventral rat prostate after castration. *Int J*
Exp Pathol **92**, 272-280 (2011).
- 184 Mirsky, I. A. & Perisutti, G. Effect of insulinase-inhibitor on hypoglycemic action of insulin.
Science **122**, 559-560 (1955).
- 185 Ryan, M. P. & Duckworth, W. C. Partial characterization of an endogenous inhibitor of a
calcium-dependent form of insulin protease. *Biochem Biophys Res Commun* **116**, 195-203
(1983).
- 186 Ogawa, W., Shii, K., Yonezawa, K., Baba, S. & Yokono, K. Affinity purification of insulin-
degrading enzyme and its endogenous inhibitor from rat liver. *J Biol Chem* **267**, 1310-1316
(1992).
- 187 Chou, Y. H., Kuo, W. L., Rosner, M. R., Tang, W. J. & Goldman, R. D. Structural changes in
intermediate filament networks alter the activity of insulin-degrading enzyme. *Faseb J* **23**,
3734-3742 (2009).
- 188 Camberos, M. C., Perez, A. A., Udrisar, D. P., Wanderley, M. I. & Cresto, J. C. ATP inhibits
insulin-degrading enzyme activity. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**, 334-341 (2001).
- 189 Del Carmen Camberos, M. & Cresto, J. C. Insulin-degrading enzyme hydrolyzes ATP. *Exp*
Biol Med (Maywood) **232**, 281-292 (2007).
- 190 Song, E. S. *et al.* ATP effects on insulin-degrading enzyme are mediated primarily through its
triphosphate moiety. *J Biol Chem* **279**, 54216-54220 (2004).
- 191 Yao, H. & Hersh, L. B. Characterization of the binding of the fluorescent ATP analog TNP-
ATP to insulysin. *Arch Biochem Biophys* **451**, 175-181 (2006).
- 192 Cordes, C. M., Bennett, R. G., Siford, G. L. & Hamel, F. G. Redox regulation of insulin
degradation by insulin-degrading enzyme. *PLoS One* **6**, e18138 (2011).
- 193 Ralat, L. A., Ren, M., Schilling, A. B. & Tang, W. J. Protective role of Cys-178 against the
inactivation and oligomerization of human insulin-degrading enzyme by oxidation and
nitrosylation. *J Biol Chem* **284**, 34005-34018 (2009).
- 194 Abdul-Hay, S. O. *et al.* Deletion of insulin-degrading enzyme elicits antipodal, age-dependent
effects on glucose and insulin tolerance. *PLoS One* **6**, e20818,
doi:10.1371/journal.pone.0020818 (2011).
- 195 Duckworth, W. C., Runyan, K. R., Wright, R. K., Halban, P. A. & Solomon, S. S. Insulin
degradation by hepatocytes in primary culture. *Endocrinology* **108**, 1142-1147 (1981).
- 196 Brush, J. S. Purification and characterization of a protease with specificity for insulin from rat
muscle. *Diabetes* **20**, 140-145 (1971).

- 197 Bennett, R. G., Hamel, F. G. & Duckworth, W. C. An insulin-degrading enzyme inhibitor decreases amylin degradation, increases amylin-induced cytotoxicity, and increases amyloid formation in insulinoma cell cultures. *Diabetes* **52**, 2315-2320 (2003).
- 198 Harada, S., Smith, R. M., Smith, J. A. & Jarett, L. Inhibition of insulin-degrading enzyme increases translocation of insulin to the nucleus in H35 rat hepatoma cells: evidence of a cytosolic pathway. *Endocrinology* **132**, 2293-2298 (1993).
- 199 Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**, 663-700 (1986).
- 200 Maxfield, F. R., Davies, P. J., Klempner, L., Willingham, M. C. & Pastan, I. Epidermal growth factor stimulation of DNA synthesis is potentiated by compounds that inhibit its clustering in coated pits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5731-5735 (1979).
- 201 Kuo, W. L., Gehm, B. D. & Rosner, M. R. Regulation of insulin degradation: expression of an evolutionarily conserved insulin-degrading enzyme increases degradation via an intracellular pathway. *Mol Endocrinol* **5**, 1467-1476 (1991).
- 202 Farris, W. *et al.* Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4162-4167 (2003).
- 203 Karamohamed, S. *et al.* Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes* **52**, 1562-1567 (2003).
- 204 Gu, H. F. *et al.* Quantitative trait loci near the insulin-degrading enzyme (IDE) gene contribute to variation in plasma insulin levels. *Diabetes* **53**, 2137-2142 (2004).
- 205 Authier, F., Metioui, M., Fabrega, S., Kouach, M. & Briand, G. Endosomal proteolysis of internalized insulin at the C-terminal region of the B chain by cathepsin D. *J Biol Chem* **277**, 9437-9446 (2002).
- 206 Authier, F., Danielsen, G. M., Kouach, M., Briand, G. & Chauvet, G. Identification of insulin domains important for binding to and degradation by endosomal acidic insulinase. *Endocrinology* **142**, 276-289 (2001).
- 207 Toivola, D. M., Tao, G. Z., Habtezion, A., Liao, J. & Omary, M. B. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* **15**, 608-617 (2005).
- 208 De Strooper, B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* **90**, 465-494 (2010).
- 209 Glenner, G. G. & Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-890 (1984).
- 210 Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-4917 (1986).
- 211 Hartmann, T. *et al.* Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* **3**, 1016-1020 (1997).

- 212 Selkoe, D. J. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's
disease. *Trends Cell Biol* **8**, 447-453 (1998).
- 213 Toussey, T. *et al.* ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane
proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the
gamma-secretase. *J Biol Chem* **284**, 11738-11747 (2009).
- 214 Koo, E. H. & Squazzo, S. L. Evidence that production and release of amyloid beta-protein
involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* **269**, 17386-17389 (1994).
- 215 Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P. & Xu, H. The transmembrane domain of the
Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -
amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem* **276**, 36788-36796 (2001).
- 216 De Strooper, B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on
the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep* **8**, 141-146 (2007).
- 217 Kuperstein, I. *et al.* Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small
changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. *Embo J* **29**, 3408-3420 (2010).
- 218 Jan, A., Gokce, O., Luthi-Carter, R. & Lashuel, H. A. The ratio of monomeric to aggregated
forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation,
fibrillogenesis, and toxicity. *J Biol Chem* **283**, 28176-28189 (2008).
- 219 Ling, Y., Morgan, K. & Kalsheker, N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of
proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1505-
1535 (2003).
- 220 Dorfman, V. B. *et al.* Differential cerebral deposition of IDE and NEP in sporadic and familial
Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **31**, 1743-1757 (2010).
- 221 Llovera, R. E. *et al.* The catalytic domain of insulin-degrading enzyme forms a denaturant-
resistant complex with amyloid beta peptide: implications for Alzheimer disease pathogenesis.
J Biol Chem **283**, 17039-17048 (2008).
- 222 Ding, W. X. & Yin, X. M. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein
degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* **4**, 141-150
(2008).
- 223 Kruse, K. B., Brodsky, J. L. & McCracken, A. A. Autophagy: an ER protein quality control
process. *Autophagy* **2**, 135-137 (2006).
- 224 Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated
degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008).
- 225 Schmitz, A., Schneider, A., Kummer, M. P. & Herzog, V. Endoplasmic reticulum-localized
amyloid beta-peptide is degraded in the cytosol by two distinct degradation pathways. *Traffic*
5, 89-101 (2004).
- 226 Iwata, N. *et al.* Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* **292**, 1550-1552
(2001).
- 227 Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H. & Haass, C. Insulin-degrading enzyme
rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem*
277, 13389-13393 (2002).

- 228 Venugopal, C., Pappolla, M. A. & Sambamurti, K. Insulysin cleaves the APP cytoplasmic
fragment at multiple sites. *Neurochem Res* **32**, 2225-2234 (2007).
- 229 Miller, B. C. *et al.* Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin
activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6221-6226 (2003).
- 230 Bertram, L. *et al.* Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q.
Science **290**, 2302-2303 (2000).
- 231 Ertekin-Taner, N. *et al.* Linkage of plasma Abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10
in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science* **290**, 2303-2304 (2000).
- 232 Bjork, B. F. *et al.* Positive association between risk for late-onset Alzheimer disease and
genetic variation in IDE. *Neurobiol Aging* **28**, 1374-1380 (2007).
- 233 Carrasquillo, M. M. *et al.* Concordant association of insulin degrading enzyme gene (IDE)
variants with IDE mRNA, Abeta, and Alzheimer's disease. *PLoS One* **5**, e8764 (2010).
- 234 Abraham, R. *et al.* Substantial linkage disequilibrium across the insulin-degrading enzyme
locus but no association with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Genet* **109**, 646-652
(2001).
- 235 Boussaha, M. *et al.* Polymorphisms of insulin degrading enzyme gene are not associated with
Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **329**, 121-123 (2002).
- 236 Ozturk, A., DeKosky, S. T. & Kamboh, M. I. Lack of association of 5 SNPs in the vicinity of
the insulin-degrading enzyme (IDE) gene with late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*
406, 265-269 (2006).
- 237 Cook, D. G. *et al.* Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's
disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* **162**, 313-319
(2003).
- 238 Morelli, L. *et al.* Differential degradation of amyloid beta genetic variants associated with
hereditary dementia or stroke by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* **278**, 23221-23226
(2003).
- 239 Yan, P. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact
plaques in situ. *J Biol Chem* **281**, 24566-24574 (2006).
- 240 Schrader, M. & Fahimi, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* **1763**,
1755-1766 (2006).
- 241 Esteban, I., Aguado, C., Sanchez, M. & Knecht, E. Regulation of various proteolytic pathways
by insulin and amino acids in human fibroblasts. *FEBS Lett* **581**, 3415-3421 (2007).
- 242 Fawcett, J., Hamel, F. G. & Duckworth, W. C. Characterization of the inhibition of protein
degradation by insulin in L6 cells. *Arch Biochem Biophys* **385**, 357-363 (2001).
- 243 Rooyackers, O. E. & Nair, K. S. Hormonal regulation of human muscle protein metabolism.
Annu Rev Nutr **17**, 457-485, doi:10.1146/annurev.nutr.17.1.457 (1997).
- 244 Bennett, R. G., Hamel, F. G. & Duckworth, W. C. Identification and isolation of a cytosolic
proteolytic complex containing insulin degrading enzyme and the multicatalytic proteinase.
Biochem Biophys Res Commun **202**, 1047-1053 (1994).

- 245 Duckworth, W. C., Bennett, R. G. & Hamel, F. G. A direct inhibitory effect of insulin on a
cytosolic proteolytic complex containing insulin-degrading enzyme and multicatalytic
proteinase. *J Biol Chem* **269**, 24575-24580 (1994).
- 246 Duckworth, W. C., Bennett, R. G. & Hamel, F. G. Insulin acts intracellularly on proteasomes
through insulin-degrading enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 390-394 (1998).
- 247 Hamel, F. G., Bennett, R. G. & Duckworth, W. C. Regulation of multicatalytic enzyme
activity by insulin and the insulin-degrading enzyme. *Endocrinology* **139**, 4061-4066 (1998).
- 248 Fawcett, J., Permana, P. A., Levy, J. L. & Duckworth, W. C. Regulation of protein
degradation by insulin-degrading enzyme: analysis by small interfering RNA-mediated gene
silencing. *Arch Biochem Biophys* **468**, 128-133 (2007).
- 249 Maresova, L., Pasieka, T. J. & Grose, C. Varicella-zoster Virus gB and gE coexpression, but
not gB or gE alone, leads to abundant fusion and syncytium formation equivalent to those
from gH and gL coexpression. *J Virol* **75**, 9483-9492 (2001).
- 250 Wu, L. & Forghani, B. Characterization of neutralizing domains on varicella-zoster virus
glycoprotein E defined by monoclonal antibodies. *Arch Virol* **142**, 349-362 (1997).
- 251 Li, Q. *et al.* Insulin degrading enzyme induces a conformational change in varicella-zoster
virus gE, and enhances virus infectivity and stability. *PLoS One* **5**, e11327 (2010).
- 252 Li, Q., Krogmann, T., Ali, M. A., Tang, W. J. & Cohen, J. I. The amino terminus of varicella-
zoster virus (VZV) glycoprotein E is required for binding to insulin-degrading enzyme, a
VZV receptor. *J Virol* **81**, 8525-8532 (2007).
- 253 Kennedy, E. P. Hitler's gift and the era of biosynthesis. *J Biol Chem* **276**, 42619-42631
(2001).
- 254 Schoenheimer, R., Ratner, S. & Rittenberg, D. Sutides in protein metabolism. VII. The
metabolism of tyrosine. *Journal of biological chemistry* **127**, 12 (1939).
- 255 Ratner, S., Rittenberg, D., Keston, A. S. & Schoenheimer, R. Studies in protein metabolism.
XIV. The chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats*. *Journal of
biological chemistry* **134**, 12 (1940).
- 256 Klionsky, D. J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy* **4**,
740-743 (2008).
- 257 Appelmans, F., Wattiaux, R. & De Duve, C. Tissue fractionation studies. 5. The association of
acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J* **59**, 438-
445 (1955).
- 258 De Duve, C., Gianetto, R., Appelmans, F. & Wattiaux, R. Enzymic content of the
mitochondria fraction. *Nature* **172**, 1143-1144 (1953).
- 259 De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F. Tissue
fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue.
Biochem J **60**, 604-617 (1955).
- 260 Gianetto, R. & De Duve, C. Tissue fractionation studies. 4. Comparative study of the binding
of acid phosphatase, beta-glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles. *Biochem J* **59**,
433-438 (1955).

- 261 Miller, L. L. Glucagon: a protein catabolic hormone in the isolated perfused rat liver. *Nature*
185, 248 (1960).
- 262 Deter, R. L. & De Duve, C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some
physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* **33**, 437-449 (1967).
- 263 Arstila, A. U., Shelburne, J. D. & Trump, B. F. Studies on cellular autophagocytosis. A
histochemical study on sequential alterations of mitochondria in the glucagon-induced
autophagic vacuoles of rat liver. *Lab Invest* **27**, 317-323 (1972).
- 264 Ashford, T. P. & Porter, K. R. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol*
12, 198-202 (1962).
- 265 Deter, R. L., Baudhuin, P. & De Duve, C. Participation of lysosomes in cellular autophagy
induced in rat liver by glucagon. *J Cell Biol* **35**, C11-16 (1967).
- 266 Arstila, A. U. & Trump, B. F. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of
autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am J Pathol* **53**, 687-733
(1968).
- 267 Deter, R. L. Quantitative characterization of dense body, autophagic vacuole, and acid
phosphatase-bearing particle populations during the early phases of glucagon-induced
autophagy in rat liver. *J Cell Biol* **48**, 473-489 (1971).
- 268 Fuertes, G., Martin De Llano, J. J., Villarroja, A., Rivett, A. J. & Knecht, E. Changes in the
proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum
withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* **375**, 75-86 (2003).
- 269 Mortimore, G. E., Lardeux, B. R. & Adams, C. E. Regulation of microautophagy and basal
protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. *J Biol Chem* **263**, 2506-2512
(1988).
- 270 Santambrogio, L. & Cuervo, A. M. Chasing the elusive mammalian microautophagy.
Autophagy **7**, 652-654 (2011).
- 271 Sahu, R. *et al.* Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* **20**, 131-139
(2011).
- 272 Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy through
direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132-141 (2011).
- 273 Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in
macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*
9, 859-864 (2008).
- 274 Kovacs, A. L., Palfia, Z., Rez, G., Vellai, T. & Kovacs, J. Sequestration revisited: integrating
traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy* **3**, 655-662
(2007).
- 275 Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. & Eskelinen, E. L. 3D tomography reveals
connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**, 1180-1185
(2009).
- 276 Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. Dynein-dependent movement of autophagosomes
mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* **33**, 109-122 (2008).

- 277 Jahreiss, L., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. The itinerary of autophagosomes: from
peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9**, 574-587 (2008).
- 278 Bampton, E. T., Goemans, C. G., Niranjan, D., Mizushima, N. & Tolkovsky, A. M. The
dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with
endo/lysosomes. *Autophagy* **1**, 23-36 (2005).
- 279 Diaz-Troya, S., Perez-Perez, M. E., Florencio, F. J. & Crespo, J. L. The role of TOR in
autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**, 851-865 (2008).
- 280 Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N. & Klein, L. Autophagy in thymic
epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* **455**, 396-400
(2008).
- 281 Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In vivo analysis of
autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent
autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**, 1101-1111 (2004).
- 282 Schworer, C. M. & Mortimore, G. E. Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat
liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S
A* **76**, 3169-3173 (1979).
- 283 Kanazawa, T. *et al.* Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different
signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* **279**, 8452-
8459 (2004).
- 284 Munafo, D. B. & Colombo, M. I. A novel assay to study autophagy: regulation of
autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* **114**, 3619-3629 (2001).
- 285 Nicklin, P. *et al.* Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*
136, 521-534 (2009).
- 286 Shvets, E., Fass, E. & Elazar, Z. Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living
mammalian cells. *Autophagy* **4**, 621-628 (2008).
- 287 Yan, X. *et al.* Reconstitution of leucine-mediated autophagy via the mTORC1-Barkor
pathway in vitro. *Autophagy* **8** (2012).
- 288 Karantza-Wadsworth, V. *et al.* Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in
mammary tumorigenesis. *Genes Dev* **21**, 1621-1635 (2007).
- 289 Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev
Cancer* **7**, 961-967, doi:10.1038/nrc2254 (2007).
- 290 Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E. Assessing metabolic stress and autophagy
status in epithelial tumors. *Methods Enzymol* **453**, 53-81, doi:10.1016/S0076-6879(08)04004-
4 (2009).
- 291 Apel, A., Herr, I., Schwarz, H., Rodemann, H. P. & Mayer, A. Blocked autophagy sensitizes
resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res* **68**, 1485-1494 (2008).
- 292 Lomonaco, S. L. *et al.* The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the
radioresistance of glioma stem cells. *Int J Cancer* **125**, 717-722 (2009).
- 293 Kanzawa, T. *et al.* Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant
glioma cells. *Cell Death Differ* **11**, 448-457 (2004).

- 294 Shingu, T. *et al.* Stage-specific effect of inhibition of autophagy on chemotherapy-induced cytotoxicity. *Autophagy* **5**, 537-539 (2009).
- 295 Shingu, T. *et al.* Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *Int J Cancer* **124**, 1060-1071 (2009).
- 296 Noman, M. Z. *et al.* Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res* **71**, 5976-5986, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1094 (2011).
- 297 Eisenberg-Lerner, A. & Kimchi, A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis* **14**, 376-391 (2009).
- 298 Eskelinen, E. L. Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1468-1472 (2005).
- 299 Tsuchihara, K., Fujii, S. & Esumi, H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett* **278**, 130-138 (2009).
- 300 Schneider, D. L. ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump. *J Biol Chem* **256**, 3858-3864 (1981).
- 301 Salvador, N., Aguado, C., Horst, M. & Knecht, E. Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem* **275**, 27447-27456 (2000).
- 302 Finn, P. F. & Dice, J. F. Ketone bodies stimulate chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* **280**, 25864-25870 (2005).
- 303 Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E. & Cuervo, A. M. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* **15**, 4829-4840 (2004).
- 304 Dice, J. F. Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *Faseb J* **1**, 349-357 (1987).
- 305 Dice, J. F. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* **15**, 305-309 (1990).
- 306 Dice, J. F. & Chiang, H. L. Peptide signals for protein degradation within lysosomes. *Biochem Soc Symp* **55**, 45-55 (1989).
- 307 Dice, J. F. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **3**, 295-299 (2007).
- 308 Li, W., Yang, Q. & Mao, Z. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci* **68**, 749-763 (2011).
- 309 Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L. & Cuervo, A. M. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* **28**, 5747-5763 (2008).
- 310 Agarraberes, F. A. & Dice, J. F. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* **114**, 2491-2499 (2001).
- 311 Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R. & Cuervo, A. M. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell* **39**, 535-547 (2010).

- 312 Cuervo, A. M., Mann, L., Bonten, E. J., d'Azzo, A. & Dice, J. F. Cathepsin A regulates
chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *Embo J* **22**, 47-59
(2003).
- 313 Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy. *Methods Mol Biol* **445**, 227-
244 (2008).
- 314 Iwata, J. *et al.* Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J Biol
Chem* **281**, 4035-4041 (2006).
- 315 Sandoval, H. *et al.* Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*
454, 232-235 (2008).
- 316 Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. & Lemasters, J. J. Selective degradation of mitochondria by
mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**, 245-253 (2007).
- 317 Knodler, L. A. & Celli, J. Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via
xenophagy. *Cell Microbiol* **13**, 1319-1327 (2011).
- 318 Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of
ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**, 24131-24145 (2007).
- 319 Bernales, S., McDonald, K. L. & Walter, P. Autophagy counterbalances endoplasmic
reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* **4**, e423 (2006).
- 320 Bernales, S., Schuck, S. & Walter, P. ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic
reticulum. *Autophagy* **3**, 285-287 (2007).
- 321 Hoyer-Hansen, M. & Jaattela, M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by
unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* **14**, 1576-1582 (2007).
- 322 Ciechanover, A., Hod, Y. & Hershko, A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-
dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 1100-
1105 (1978).
- 323 Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L. & Hershko, A. ATP-dependent conjugation
of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **77**, 1365-1368 (1980).
- 324 Etlinger, J. D. & Goldberg, A. L. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for
the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 54-58
(1977).
- 325 Etlinger, J. D. & Goldberg, A. L. Control of protein degradation in reticulocytes and
reticulocyte extracts by hemin. *J Biol Chem* **255**, 4563-4568 (1980).
- 326 Bigelow, S., Hough, R. & Rechsteiner, M. The selective degradation of injected proteins
occurs principally in the cytosol rather than in lysosomes. *Cell* **25**, 83-93 (1981).
- 327 Wilkinson, K. D., Urban, M. K. & Haas, A. L. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis
factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **255**, 7529-7532 (1980).
- 328 Hershko, A. & Tomkins, G. M. Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in
hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine
triphosphate dependence. *J Biol Chem* **246**, 710-714 (1971).

- 329 Tanaka, K., Waxman, L. & Goldberg, A. L. ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ubiquitin. *J Cell Biol* **96**, 1580-1585 (1983).
- 330 Hershko, A., Leshinsky, E., Ganoh, D. & Heller, H. ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1619-1623 (1984).
- 331 Schlesinger, D. H. & Goldstein, G. Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. *Nature* **255**, 42304 (1975).
- 332 Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**, 8206-8214 (1983).
- 333 Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H. & Hershko, A. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* **257**, 2537-2542 (1982).
- 334 Goldknopf, I. L. *et al.* Isolation and characterization of protein A24, a "histone-like" non-histone chromosomal protein. *J Biol Chem* **250**, 7182-7187 (1975).
- 335 Zhou, W., Wang, X. & Rosenfeld, M. G. Histone H2A ubiquitination in transcriptional regulation and DNA damage repair. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 12-15 (2009).
- 336 Haglund, K. *et al.* Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* **5**, 461-466 (2003).
- 337 Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**, 94-102 (2000).
- 338 Pickart, C. M. & Fushman, D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-616 (2004).
- 339 Li, W. *et al.* Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487 (2008).
- 340 Semple, C. A. The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Res* **13**, 1389-1394 (2003).
- 341 Chin, D. T., Kuehl, L. & Rechsteiner, M. Conjugation of ubiquitin to denatured hemoglobin is proportional to the rate of hemoglobin degradation in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5857-5861 (1982).
- 342 Ciechanover, A., Finley, D. & Varshavsky, A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**, 57-66 (1984).
- 343 Parag, H. A., Raboy, B. & Kulka, R. G. Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *Embo J* **6**, 55-61 (1987).
- 344 Kimura, Y. *et al.* An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. *Cell* **137**, 549-559 (2009).
- 345 Kaiser, S. E. *et al.* Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat Methods* **8**, 691-696 (2011).
- 346 van Loosdregt, J. *et al.* Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization. *Blood* **115**, 965-974 (2010).

347 Zhao, J. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci* **64**, 3017-3033
(2007).

348 Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin.
Nat Rev Mol Cell Biol **2**, 202-210 (2001).

349 Hough, R. & Rechsteiner, M. Ubiquitin-lysozyme conjugates. Purification and susceptibility
to proteolysis. *J Biol Chem* **261**, 2391-2399 (1986).

350 Waxman, L., Fagan, J. M. & Goldberg, A. L. Demonstration of two distinct high molecular
weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol
Chem* **262**, 2451-2457 (1987).

351 Driscoll, J. & Goldberg, A. L. The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the
1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J Biol Chem*
265, 4789-4792 (1990).

352 Eytan, E., Ganoth, D., Armon, T. & Hershko, A. ATP-dependent incorporation of 20S
protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **86**, 7751-7755 (1989).

353 Hoffman, L., Pratt, G. & Rechsteiner, M. Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26
S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **267**, 22362-
22368 (1992).

354 Hough, R., Pratt, G. & Rechsteiner, M. Purification of two high molecular weight proteases
from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **262**, 8303-8313 (1987).

355 Groll, M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-
471 (1997).

356 Unno, M. *et al.* The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution.
Structure **10**, 609-618 (2002).

357 Seemuller, E. *et al.* Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease.
Science **268**, 579-582 (1995).

358 Seemuller, E., Lupas, A., Zuhl, F., Zwickl, P. & Baumeister, W. The proteasome from
Thermoplasma acidophilum is neither a cysteine nor a serine protease. *FEBS Lett* **359**, 173-
178 (1995).

359 Gerards, W. L., de Jong, W. W., Boelens, W. & Bloemendal, H. Structure and assembly of the
20S proteasome. *Cell Mol Life Sci* **54**, 253-262 (1998).

360 Hirano, Y. *et al.* A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S
proteasomes. *Nature* **437**, 1381-1385 (2005).

361 Lasker, K. *et al.* Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an
integrative approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1380-1387 (2012).

362 Jung, T., Catalgol, B. & Grune, T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med* **30**, 191-296
(2009).

363 Kisselev, A. F., van der Linden, W. A. & Overkleeft, H. S. Proteasome inhibitors: an
expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* **19**, 99-115 (2012).

- 364 Osmulski, P. A., Hochstrasser, M. & Gaczynska, M. A tetrahedral transition state at the active sites of the 20S proteasome is coupled to opening of the alpha-ring channel. *Structure* **17**, 1137-1147 (2009).
- 365 Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. & Wolf, D. H. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* **272**, 25200-25209 (1997).
- 366 Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. & Seemuller, E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380 (1998).
- 367 Ruschak, A. M., Religa, T. L., Breuer, S., Witt, S. & Kay, L. E. The proteasome antechamber maintains substrates in an unfolded state. *Nature* **467**, 868-871 (2010).
- 368 Lowe, J. *et al.* Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539 (1995).
- 369 Dick, T. P. *et al.* Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem* **273**, 25637-25646 (1998).
- 370 Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* **17**, 739-779 (1999).
- 371 McCormack, T. A. *et al.* Kinetic studies of the branched chain amino acid preferring peptidase activity of the 20S proteasome: development of a continuous assay and inhibition by tripeptide aldehydes and clasto-lactacystin beta-lactone. *Biochemistry* **37**, 7792-7800 (1998).
- 372 Niedermann, G. *et al.* The proteolytic fragments generated by vertebrate proteasomes: structural relationships to major histocompatibility complex class I binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8572-8577 (1996).
- 373 Nussbaum, A. K. *et al.* Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12504-12509 (1998).
- 374 Toes, R. E. *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* **194**, 1-12 (2001).
- 375 Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* **8**, 739-758 (2001).
- 376 Craiu, A. *et al.* Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* **272**, 13437-13445 (1997).
- 377 Fenteany, G. *et al.* Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**, 726-731 (1995).
- 378 Kisselev, A. F., Callard, A. & Goldberg, A. L. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* **281**, 8582-8590 (2006).
- 379 Ostrowska, H., Wojcik, C., Omura, S. & Worowski, K. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 729-732 (1997).

- 380 Geier, E. *et al.* A giant protease with potential to substitute for some functions of the
proteasome. *Science* **283**, 978-981 (1999).
- 381 Groll, M. & Huber, R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural
approach. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 33-44 (2004).
- 382 Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with
fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol* **398**, 364-378 (2005).
- 383 Kessler, B. M. *et al.* Extended peptide-based inhibitors efficiently target the proteasome and
reveal overlapping specificities of the catalytic beta-subunits. *Chem Biol* **8**, 913-929 (2001).
- 384 Palmer, J. T., Rasnick, D., Klaus, J. L. & Bromme, D. Vinyl sulfones as mechanism-based
cysteine protease inhibitors. *J Med Chem* **38**, 3193-3196 (1995).
- 385 Liu, C. W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N. & Thomas, P. J. Endoproteolytic activity of the
proteasome. *Science* **299**, 408-411 (2003).
- 386 Akopian, T. N., Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L. Processive degradation of proteins and
other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem*
272, 1791-1798 (1997).
- 387 Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Castillo, V. & Goldberg, A. L. Proteasome active sites
allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein
breakdown. *Mol Cell* **4**, 395-402 (1999).
- 388 Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. & Goldberg, A. L. The sizes of peptides
generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for
understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**, 3363-
3371 (1999).
- 389 Wang, R., Chait, B. T., Wolf, I., Kohanski, R. A. & Cardozo, C. Lysozyme degradation by the
bovine multicatalytic proteinase complex (proteasome): evidence for a nonprocessive mode of
degradation. *Biochemistry* **38**, 14573-14581 (1999).
- 390 Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Baumeister, W. Existence of a molecular ruler in
proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett* **349**, 205-209 (1994).
- 391 Dick, L. R. *et al.* Proteolytic processing of ovalbumin and beta-galactosidase by the
proteasome to a yield antigenic peptides. *J Immunol* **152**, 3884-3894 (1994).
- 392 Sakata, E. *et al.* Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by
electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1479-1484 (2012).
- 393 Yao, T. & Cohen, R. E. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the
proteasome. *Nature* **419**, 403-407 (2002).
- 394 Koulich, E., Li, X. & DeMartino, G. N. Relative structural and functional roles of multiple
deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell* **19**,
1072-1082 (2008).
- 395 Groll, M. *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**, 1062-
1067 (2000).
- 396 Davy, A. *et al.* A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S
proteasome. *EMBO Rep* **2**, 821-828 (2001).

- 397 Lander, G. C. *et al.* Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* **482**, 186-191 (2012).
- 398 Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemuller, E., Baumeister, W. & Goldberg, A. L. ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation. *Mol Cell* **11**, 69-78 (2003).
- 399 Groettrup, M. *et al.* A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* **381**, 166-168 (1996).
- 400 Masters, E. I., Pratt, G., Forster, A. & Hill, C. P. Purification and analysis of recombinant 11S activators of the 20S proteasome: *Trypanosoma brucei* PA26 and human PA28 alpha, PA28 beta, and PA28 gamma. *Methods Enzymol* **398**, 306-321 (2005).
- 401 Ahn, K. *et al.* In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J Biol Chem* **271**, 18237-18242 (1996).
- 402 Wojcik, C., Tanaka, K., Paweletz, N., Naab, U. & Wilk, S. Proteasome activator (PA28) subunits, alpha, beta and gamma (Ki antigen) in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells. *Eur J Cell Biol* **77**, 151-160 (1998).
- 403 Gray, C. W., Slaughter, C. A. & DeMartino, G. N. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol* **236**, 7-15 (1994).
- 404 Forster, A., Masters, E. I., Whitby, F. G., Robinson, H. & Hill, C. P. The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell* **18**, 589-599 (2005).
- 405 Ma, C. P., Slaughter, C. A. & DeMartino, G. N. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* **267**, 10515-10523 (1992).
- 406 Whitby, F. G. *et al.* Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**, 115-120 (2000).
- 407 Realini, C., Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. & Rechsteiner, M. Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* **269**, 20727-20732 (1994).
- 408 Cascio, P., Call, M., Petre, B. M., Walz, T. & Goldberg, A. L. Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *Embo J* **21**, 2636-2645, doi:10.1093/emboj/21.11.2636 (2002).
- 409 Strehl, B. *et al.* Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* **207**, 19-30, doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00308.x (2005).
- 410 Yamano, T. *et al.* Allele-selective effect of PA28 in MHC class I antigen processing. *J Immunol* **181**, 1655-1664 (2008).
- 411 Rechsteiner, M., Realini, C. & Ustrell, V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* **345 Pt 1**, 1-15 (2000).
- 412 Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G. & Rechsteiner, M. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *Embo J* **21**, 3516-3525 (2002).

- 413 Blickwedehl, J. *et al.* Role for proteasome activator PA200 and postglutamyl proteasome
activity in genomic stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16165-16170 (2008).
- 414 Shibatani, T. *et al.* Global organization and function of mammalian cytosolic proteasome
pools: Implications for PA28 and 19S regulatory complexes. *Mol Biol Cell* **17**, 4962-4971
(2006).
- 415 Kopp, F., Dahlmann, B. & Kuehn, L. Reconstitution of hybrid proteasomes from purified
PA700-20 S complexes and PA28alphabeta activator: ultrastructure and peptidase activities. *J*
Mol Biol **313**, 465-471 (2001).
- 416 Rock, K. L. *et al.* 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 (1994).
- 417 Ahlberg, J., Berkenstam, A., Henell, F. & Glaumann, H. Degradation of short and long lived
proteins in isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, temperature, and proteolytic inhibitors.
J Biol Chem **260**, 5847-5854 (1985).
- 418 Fuertes, G., Villarroya, A. & Knecht, E. Role of proteasomes in the degradation of short-lived
proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int J Biochem Cell Biol* **35**,
651-664 (2003).
- 419 Hutson, N. J. & Mortimore, G. E. Suppression of cytoplasmic protein uptake by lysosomes as
the mechanism of protein regain in livers of starved-refed mice. *J Biol Chem* **257**, 9548-9554
(1982).
- 420 Kato, H. *et al.* Degradation of endogenous proteins and internalized asialofetuin in primary
cultured hepatocytes of rats. *Int J Biochem* **21**, 483-495 (1989).
- 421 Mortimore, G. E. & Poso, A. R. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient
deprivation and supply. *Annu Rev Nutr* **7**, 539-564 (1987).
- 422 Varshavsky, A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**,
12142-12149 (1996).
- 423 Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its
amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186 (1986).
- 424 Levy, F., Johnsson, N., Rumenapf, T. & Varshavsky, A. Using ubiquitin to follow the
metabolic fate of a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4907-4912 (1996).
- 425 Cuervo, A. M., Palmer, A., Rivett, A. J. & Knecht, E. Degradation of proteasomes by
lysosomes in rat liver. *Eur J Biochem* **227**, 792-800 (1995).
- 426 Hendil, K. B. The 19 S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa
cells. *Biochem Int* **17**, 471-477 (1988).
- 427 Tanaka, K. & Ichihara, A. Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver.
Biochem Biophys Res Commun **159**, 1309-1315 (1989).
- 428 Dengjel, J. *et al.* Identification of autophagosome-associated proteins and regulators by
quantitative proteomic analysis and genetic screens. *Mol Cell Proteomics* **11**, M111 014035
(2012).

- 429 Cockle, S. M. & Dean, R. T. The regulation of proteolysis in normal fibroblasts as they approach confluence. Evidence for the participation of the lysosomal system. *Biochem J* **208**, 795-800 (1982).
- 430 Ohkuma, S., Chudzik, J. & Poole, B. The effects of basic substances and acidic ionophores on the digestion of exogenous and endogenous proteins in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* **102**, 959-966 (1986).
- 431 Telbisz, A. & Kovacs, A. L. Intracellular protein degradation and autophagy in isolated pancreatic acini of the rat. *Cell Biochem Funct* **18**, 29-40 (2000).
- 432 Wibo, M. & Poole, B. Protein degradation in cultured cells. II. The uptake of chloroquine by rat fibroblasts and the inhibition of cellular protein degradation and cathepsin B1. *J Cell Biol* **63**, 430-440 (1974).
- 433 Poole, B. & Wibo, M. Protein degradation in cultured cells. The effect of fresh medium, fluoride, and iodoacetate on the digestion of cellular protein of rat fibroblasts. *J Biol Chem* **248**, 6221-6226 (1973).
- 434 Huisman, W., Bouma, J. M. & Gruber, M. Involvement of thiol enzymes in the lysosomal breakdown of native and denatured proteins. *Biochim Biophys Acta* **297**, 98-109 (1973).
- 435 Huisman, W., Lanting, L., Doddema, H. J., Bouma, J. M. & Gruber, M. Role of individual cathepsins in lysosomal protein digestion as tested by specific inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **370**, 297-307 (1974).
- 436 Ciechanover, A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ* **12**, 1178-1190 (2005).
- 437 Ciechanover, A. Intracellular protein degradation from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and on to human diseases and drug targeting: Nobel Lecture, December 8, 2004. *Ann N Y Acad Sci* **1116**, 1-28 (2007).
- 438 Klionsky, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 931-937 (2007).
- 439 Murakami, Y. *et al.* Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**, 597-599 (1992).
- 440 Asher, G., Tsvetkov, P., Kahana, C. & Shaul, Y. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev* **19**, 316-321 (2005).
- 441 Yu, H., Kaung, G., Kobayashi, S. & Kopito, R. R. Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome. *J Biol Chem* **272**, 20800-20804 (1997).
- 442 Bossis, G., Ferrara, P., Acquaviva, C., Jariel-Encontre, I. & Piechaczyk, M. c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitylation in vivo. *Mol Cell Biol* **23**, 7425-7436 (2003).
- 443 Maki, C. G. & Howley, P. M. Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* **17**, 355-363 (1997).

- 444 Rousseau, D. *et al.* Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* **18**, 3290-3302 (1999).
- 445 Sheaff, R. J. *et al.* Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* **5**, 403-410 (2000).
- 446 Touitou, R. *et al.* A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *Embo J* **20**, 2367-2375 (2001).
- 447 Baugh, J. M., Viktorova, E. G. & Pilipenko, E. V. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol* **386**, 814-827(2009).
- 448 Orłowski, M. & Wilk, S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* **415**, 1-5 (2003).
- 449 Shvets, E., Fass, E., Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *J Cell Sci* **121**, 2685-2695 (2008).
- 450 Ichimura, Y. *et al.* Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem* **283**, 22847-22857 (2008).
- 451 Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889 (2006).
- 452 Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884 (2006).
- 453 Komatsu, M. *et al.* Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* **169**, 425-434 (2005).
- 454 Ding, W. X. *et al.* Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* **282**, 4702-4710 (2007).
- 455 Ding, W. X. *et al.* Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* **171**, 513-524 (2007).
- 456 Wada, Y., Sun-Wada, G. H., Tabata, H. & Kawamura, N. Vacuolar-type proton ATPase as regulator of membrane dynamics in multicellular organisms. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 53-57 (2008).
- 457 Wu, W. K. *et al.* Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 258-263 (2008).
- 458 Wu, Y. C. *et al.* Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 451-456 (2009).
- 459 Tomkinson, B. & Linds, A. C. Tripeptidyl-peptidase II: a multi-purpose peptidase. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1933-1937 (2005).
- 460 Botbol, V. & Scornik, O. A. Degradation of abnormal proteins in intact mouse reticulocytes: accumulation of intermediates in the presence of bestatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 710-713 (1979).

- 461 Botbol, V. & Scornik, O. A. Intermediates in the degradation of abnormal globin. Bestatin permits the accumulation of the same peptides in cell-free extracts as in intact reticulocytes. *J Biol Chem* **254**, 11254-11257 (1979).
- 462 Rock, K. L., York, I. A. & Goldberg, A. L. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* **5**, 670-677 (2004).
- 463 Kisselev, A. F., Akopian, T. N. & Goldberg, A. L. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J Biol Chem* **273**, 1982-1989 (1998).
- 464 Saric, T. *et al.* Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *J Biol Chem* **276**, 36474-36481 (2001).
- 465 Saric, T., Graef, C. I. & Goldberg, A. L. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J Biol Chem* **279**, 46723-46732 (2004).
- 466 Ray, K., Hines, C. S., Coll-Rodriguez, J. & Rodgers, D. W. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. *J Biol Chem* **279**, 20480-20489 (2004).
- 467 Berti, D. A. *et al.* Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* **284**, 14105-14116 (2009).
- 468 Balow, R. M., Ragnarsson, U. & Zetterqvist, O. Tripeptidyl aminopeptidase in the extralysosomal fraction of rat liver. *J Biol Chem* **258**, 11622-11628 (1983).
- 469 Balow, R. M., Tomkinson, B., Ragnarsson, U. & Zetterqvist, O. Purification, substrate specificity, and classification of tripeptidyl peptidase II. *J Biol Chem* **261**, 2409-2417 (1986).
- 470 Hilbi, H., Jozsa, E. & Tomkinson, B. Identification of the catalytic triad in tripeptidyl-peptidase II through site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* **1601**, 149-154 (2002).
- 471 Tomkinson, B., Wernstedt, C., Hellman, U. & Zetterqvist, O. Active site of tripeptidyl peptidase II from human erythrocytes is of the subtilisin type. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7508-7512 (1987).
- 472 Tomkinson, B. Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem Sci* **24**, 355-359 (1999).
- 473 Diekmann, J. *et al.* Processing of Two Latent Membrane Protein 1 MHC Class I Epitopes Requires Tripeptidyl Peptidase II Involvement. *J Immunol* **183**, 1587-1597 (2009).
- 474 Guil, S. *et al.* Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental. *J Biol Chem* **281**, 39925-39934 (2006).
- 475 Seifert, U. *et al.* An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* **4**, 375-379 (2003).
- 476 Wang, E. W. *et al.* Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9990-9995 (2000).

- 477 Tsuji, J. M., Whitney, J. D., Tolentino, E. J., Perrin, M. E. & Swanson, P. E. Evaluation of
cellular wound healing using flow cytometry and expanded polytetrafluoroethylene implants.
Wound Repair Regen **18**, 335-340 (2010).
- 478 Polgar, L. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci* **59**, 349-362 (2002).
- 479 Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D. & Scharpe, S. Proline motifs in
peptides and their biological processing. *Faseb J* **9**, 736-744 (1995).
- 480 Cunningham, D. F. & O'Connor, B. Proline specific peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1343**,
160-186 (1997).
- 481 Rawlings, N. D., Polgar, L. & Barrett, A. J. A new family of serine-type peptidases related to
prolyl oligopeptidase. *Biochem J* **279** (Pt 3), 907-908 (1991).
- 482 Geiss-Friedlander, R. *et al.* The cytoplasmic peptidase DPP9 is rate-limiting for degradation
of proline-containing peptides. *J Biol Chem* **284**, 27211-27219 (2009).
- 483 Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanovic, S.
SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213-219
(1999).
- 484 Garboczi, D. N. *et al.* Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide
and HLA-A2. *Nature* **384** (1996).
- 485 Duroux, P. *et al.* IMGT-Kaleidoscope, the formal IMGT-ONTOLOGY paradigm. *Biochimie*
90, 570-583 (2008).
- 486 Cresswell, P., Ackerman, A. L., Giodini, A., Peaper, D. R. & Wearsch, P. A. Mechanisms of
MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* **207**, 145-157
(2005).
- 487 Diedrich, G., Bangia, N., Pan, M. & Cresswell, P. A role for calnexin in the assembly of the
MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* **166**, 1703-1709
(2001).
- 488 Zhang, Y., Baig, E. & Williams, D. B. Functions of ERp57 in the folding and assembly of
major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* **281**, 14622-14631 (2006).
- 489 Blom, D., Hirsch, C., Stern, P., Tortorella, D. & Ploegh, H. L. A glycosylated type I
membrane protein becomes cytosolic when peptide: N-glycanase is compromised. *Embo J* **23**,
650-658 (2004).
- 490 Hughes, E. A., Hammond, C. & Cresswell, P. Misfolded major histocompatibility complex
class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc
Natl Acad Sci U S A* **94**, 1896-1901 (1997).
- 491 Hughes, E. A., Ortmann, B., Surman, M. & Cresswell, P. The protease inhibitor, N-acetyl-L-
leucyl-L-leucyl-leucyl-L-norleucinal, decreases the pool of major histocompatibility complex
class I-binding peptides and inhibits peptide trimming in the endoplasmic reticulum. *J Exp
Med* **183**, 1569-1578 (1996).
- 492 Salter, R. D. & Cresswell, P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a
mutant TxB cell hybrid. *Embo J* **5**, 943-949 (1986).

- 493 Gadola, S. D., Moins-Teisserenc, H. T., Trowsdale, J., Gross, W. L. & Cerundolo, V. TAP
deficiency syndrome. *Clin Exp Immunol* **121**, 173-178 (2000).
- 494 Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L. & Tonegawa, S. TAP1 mutant mice are
deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* **71**,
1205-1214 (1992).
- 495 Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Selective loading of high-affinity peptides onto major
histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat Immunol*
8, 873-881 (2007).
- 496 Zernich, D. *et al.* Natural HLA class I polymorphism controls the pathway of antigen
presentation and susceptibility to viral evasion. *J Exp Med* **200**, 13-24 (2004).
- 497 Stroobant, V. *et al.* Exogenous loading of a tapasin-dependent peptide onto HLA-B*44:02 can
be restored by acid treatment or fixation of target cells. *Eur J Immunol* **42**, 12 (2012).
- 498 Morrison, L. A., Lukacher, A. E., Braciale, V. L., Fan, D. P. & Braciale, T. J. Differences in
antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T
lymphocyte clones. *J Exp Med* **163**, 903-921 (1986).
- 499 Townsend, A. & Bodmer, H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu
Rev Immunol* **7**, 601-624 (1989).
- 500 Braciale, T. J. *et al.* Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T
lymphocytes. *Immunol Rev* **98**, 95-114 (1987).
- 501 Grant, E. P., Michalek, M. T., Goldberg, A. L. & Rock, K. L. Rate of antigen degradation by
the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J Immunol* **155**, 3750-
3758 (1995).
- 502 Michalek, M. T., Grant, E. P., Gramm, C., Goldberg, A. L. & Rock, K. L. A role for the
ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation.
Nature **363**, 552-554 (1993).
- 503 Townsend, A. *et al.* Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in
vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. *J Exp Med* **168**,
1211-1224 (1988).
- 504 Craiu, A., Akopian, T., Goldberg, A. & Rock, K. L. Two distinct proteolytic processes in the
generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **94**, 10850-10855 (1997).
- 505 Mo, X. Y., Cascio, P., Lemerise, K., Goldberg, A. L. & Rock, K. Distinct proteolytic
processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. *J Immunol* **163**,
5851-5859 (1999).
- 506 van Endert, P. Post-proteasomal and proteasome-independent generation of MHC class I
ligands. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1553-1567 (2011).
- 507 Driscoll, J., Brown, M. G., Finley, D. & Monaco, J. J. MHC-linked LMP gene products
specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* **365**, 262-264 (1993).

- 508 Akiyama, K. *et al.* Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2
induced by interferon-gamma for acquirement of the functional diversity responsible for
antigen processing. *FEBS Lett* **343**, 85-88 (1994).
- 509 Groettrup, M. *et al.* A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S
proteasome. *Eur J Immunol* **26**, 863-869 (1996).
- 510 Loukissa, A., Cardozo, C., Altschuller-Felberg, C. & Nelson, J. E. Control of LMP7
expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity.
Cytokine **12**, 1326-1330 (2000).
- 511 Gaczynska, M., Goldberg, A. L., Tanaka, K., Hendil, K. B. & Rock, K. L. Proteasome
subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced
subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* **271**, 17275-17280 (1996).
- 512 Gaczynska, M., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Gamma-interferon and expression of MHC
genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* **365**, 264-267 (1993).
- 513 Gaczynska, M., Rock, K. L., Spies, T. & Goldberg, A. L. Peptidase activities of proteasomes
are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2
and LMP7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9213-9217 (1994).
- 514 Eleuteri, A. M., Kohanski, R. A., Cardozo, C. & Orłowski, M. Bovine spleen multicatalytic
proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and
MECL1 and changes in properties and specificity. *J Biol Chem* **272**, 11824-11831 (1997).
- 515 Rammensee, H. G., Friede, T. & Stevanović, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing.
Immunogenetics **41**, 178-228 (1995).
- 516 Heemels, M. T., Schumacher, T. N., Wonigeit, K. & Ploegh, H. L. Peptide translocation by
variants of the transporter associated with antigen processing. *Science* **262**, 2059-2063 (1993).
- 517 Androlewicz, M. J. & Cresswell, P. Human transporters associated with antigen processing
possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* **1**, 7-14 (1994).
- 518 Shin, E. C. *et al.* Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the
site of infection. *J Clin Invest* **116**, 3006-3014 (2006).
- 519 Sijts, A. J. *et al.* Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope
requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* **191**, 503-514 (2000).
- 520 Sijts, A. J. *et al.* MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the
levels of immunoproteasomes in infected cells. *J Immunol* **164**, 4500-4506 (2000).
- 521 Van Kaer, L. *et al.* Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice.
Immunity **1**, 533-541 (1994).
- 522 Nussbaum, A. K., Rodriguez-Carreno, M. P., Benning, N., Botten, J. & Whitton, J. L.
Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8⁺ T cell responses to
lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. *J Immunol* **175**, 1153-
1160 (2005).
- 523 Van den Eynde, B. J. & Morel, S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the
standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* **13**, 147-153 (2001).

- 524 Chapiro, J. *et al.* Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome
or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol* **176**,
1053-1061 (2006).
- 525 Ma, W. *et al.* A MAGE-C2 antigenic peptide processed by the immunoproteasome is
recognized by cytolytic T cells isolated from a melanoma patient after successful
immunotherapy. *Int J Cancer* **129**, 2427-2434 (2011).
- 526 Schultz, E. S. *et al.* The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T
lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J Exp Med* **195**, 391-399 (2002).
- 527 Morel, S. *et al.* Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the
immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* **12**, 107-117
(2000).
- 528 Basler, M., Youhnovski, N., Van Den Broek, M., Przybylski, M. & Groettrup, M.
Immunoproteasomes down-regulate presentation of a subdominant T cell epitope from
lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* **173**, 3925-3934 (2004).
- 529 Luckey, C. J. *et al.* Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes:
evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J Immunol* **161**, 112-121
(1998).
- 530 Niedermann, G. *et al.* Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of
epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* **2**, 289-
299 (1995).
- 531 Guillaume, B. *et al.* Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens
presented by HLA class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18599-18604 (2010).
- 532 Guillaume, B. *et al.* Analysis of the processing of seven human tumor antigens by
intermediate proteasomes. *J Immunol* **Manuscript in revision** (2012).
- 533 Murata, S. *et al.* Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes.
Science **316**, 1349-1353 (2007).
- 534 Tomaru, U. *et al.* Exclusive expression of proteasome subunit {beta}5t in the human thymic
cortex. *Blood* **113**, 5186-5191 (2009).
- 535 Nitta, T. *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells.
Immunity **32**, 29-40 (2010).
- 536 Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A. F., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. 26S proteasomes and
immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *Embo J* **20**,
2357-2366 (2001).
- 537 Boes, B. *et al.* Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage
site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* **179**, 901-909 (1994).
- 538 Stoltze, L. *et al.* Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T
lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities.
Eur J Immunol **28**, 4029-4036 (1998).

- 539 Beninga, J., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal
trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J*
Biol Chem **273**, 18734-18742 (1998).
- 540 Komlosh, A. *et al.* A role for a novel luminal endoplasmic reticulum aminopeptidase in final
trimming of 26 S proteasome-generated major histocompatibility complex class I antigenic
peptides. *J Biol Chem* **276**, 30050-30056 (2001).
- 541 Serwold, T., Gaw, S. & Shastri, N. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for
MHC class I molecules. *Nat Immunol* **2**, 644-651 (2001).
- 542 Matsumoto, A., Itoh, K., Seki, T., Motozaki, K. & Matsuyama, S. Human brain
carboxypeptidase B, which cleaves beta-amyloid peptides in vitro, is expressed in the
endoplasmic reticulum of neurons. *Eur J Neurosci* **13**, 1653-1657 (2001).
- 543 Berezniuk, I. *et al.* Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing alpha- and beta-
tubulin. *J Biol Chem* **287**, 6503-6517 (2012).
- 544 Kessler, J. H. *et al.* Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates
cytotoxic T cell epitopes. *Nat Immunol* **12**, 45-53 (2011).
- 545 Reits, E. *et al.* Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic
compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**, 97-108 (2003).
- 546 Princiotta, M. F. *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen
processing. *Immunity* **18**, 343-354 (2003).
- 547 Yewdell, J. W., Reits, E. & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC
class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **3**, 952-961 (2003).
- 548 Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J. & Ohsumi, Y. Two distinct pathways for
targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* **139**, 1687-1695
(1997).
- 549 Levy, F. *et al.* The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA
class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J Immunol*
169, 4161-4171 (2002).
- 550 Towne, C. F., York, I. A., Watkin, L. B., Lazo, J. S. & Rock, K. L. Analysis of the role of
bleomycin hydrolase in antigen presentation and the generation of CD8 T cell responses. *J*
Immunol **178**, 6923-6930 (2007).
- 551 Towne, C. F. *et al.* Puromycin-sensitive aminopeptidase limits MHC class I presentation in
dendritic cells but does not affect CD8 T cell responses during viral infections. *J Immunol*
180, 1704-1712 (2008).
- 552 Kim, E., Kwak, H. & Ahn, K. Cytosolic aminopeptidases influence MHC class I-mediated
antigen presentation in an allele-dependent manner. *J Immunol* **183**, 7379-7387 (2009).
- 553 Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G. J. & Neefjes, J. J. Peptide size selection by the
major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med* **179**, 1613-1623
(1994).

- 554 Lauvau, G. *et al.* Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J Exp Med* **190**, 1227-1240 (1999).
- 555 Snyder, H. L., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. *J Exp Med* **180**, 2389-2394 (1994).
- 556 Roelse, J., Gromme, M., Momburg, F., Hammerling, G. & Neefjes, J. Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J Exp Med* **180**, 1591-1597 (1994).
- 557 Schomburg, L., Kollmus, H., Friedrichsen, S. & Bauer, K. Molecular characterization of a puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase, PILS-AP. *Eur J Biochem* **267**, 3198-3207 (2000).
- 558 Miyashita, H. *et al.* A mouse orthologue of puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase is expressed in endothelial cells and plays an important role in angiogenesis. *Blood* **99**, 3241-3249 (2002).
- 559 Saveanu, L., Carroll, O., Hassainya, Y. & van Endert, P. Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol Rev* **207**, 42-59 (2005).
- 560 Tanioka, T. *et al.* Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem* **278**, 32275-32283 (2003).
- 561 Saric, T. *et al.* An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* **3**, 1169-1176 (2002).
- 562 Tanioka, T., Hattori, A., Mizutani, S. & Tsujimoto, M. Regulation of the human leukocyte-derived arginine aminopeptidase/endoplasmic reticulum-aminopeptidase 2 gene by interferon-gamma. *Febs J* **272**, 916-928 (2005).
- 563 Saveanu, L. *et al.* Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* **6**, 689-697 (2005).
- 564 Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. & Shastri, N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480-483 (2002).
- 565 Hearn, A., York, I. A. & Rock, K. L. The Specificity of Trimming of MHC Class I-Presented Peptides in the Endoplasmic Reticulum. *J Immunol* (2009).
- 566 Chang, S. C., Momburg, F., Bhutani, N. & Goldberg, A. L. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17107-17112 (2005).
- 567 York, I. A. *et al.* The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* **3**, 1177-1184 (2002).
- 568 Firat, E. *et al.* The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol* **178**, 2241-2248 (2007).
- 569 Yan, J. *et al.* In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J Exp Med* **203**, 647-659 (2006).

- 570 York, I. A., Brehm, M. A., Zendzian, S., Towne, C. F. & Rock, K. L. Endoplasmic reticulum
aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an
important role in immunodominance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9202-9207 (2006).
- 571 Hammer, G. E., Gonzalez, F., James, E., Nolla, H. & Shastri, N. In the absence of
aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly
immunogenic peptides. *Nat Immunol* **8**, 101-108 (2007).
- 572 York, I. A. *et al.* The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic
peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* **18**, 429-440
(2003).
- 573 Dando, P. M., Brown, M. A. & Barrett, A. J. Human thimet oligopeptidase. *Biochem J* **294** (
Pt 2), 451-457 (1993).
- 574 Knight, C. G., Dando, P. M. & Barrett, A. J. Thimet oligopeptidase specificity: evidence of
preferential cleavage near the C-terminus and product inhibition from kinetic analysis of
peptide hydrolysis. *Biochem J* **308** (**Pt 1**), 145-150 (1995).
- 575 Oliveira, V. *et al.* Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligo-
peptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. *Biochemistry* **40**, 4417-4425 (2001).
- 576 Knight, C. G. & Barrett, A. J. Structure/function relationships in the inhibition of thimet
oligopeptidase by carboxyphenylpropyl-peptides. *FEBS Lett* **294**, 183-186 (1991).
- 577 Lessley, B. A. & Garner, D. L. Purification and characterization of Pz-peptidase B, a neutral
metalloendopeptidase from bovine spermatozoa. *Biol Reprod* **43**, 643-658 (1990).
- 578 Orlowski, M., Reznik, S., Ayala, J. & Pierotti, A. R. Endopeptidase 24.15 from rat testes.
Isolation of the enzyme and its specificity toward synthetic and natural peptides, including
enkephalin-containing peptides. *Biochem J* **261**, 951-958 (1989).
- 579 van Endert, P. M. *et al.* The peptide-binding motif for the human transporter associated with
antigen processing. *J Exp Med* **182**, 1883-1895 (1995).
- 580 Gubler, B. *et al.* Substrate selection by transporters associated with antigen processing occurs
during peptide binding to TAP. *Mol Immunol* **35**, 427-433 (1998).
- 581 Henderson, R. A. *et al.* HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second
pathway of antigen presentation. *Science* **255**, 1264-1266 (1992).
- 582 Wei, M. L. & Cresswell, P. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain
signal sequence-derived peptides. *Nature* **356**, 443-446 (1992).
- 583 Smith, K. D. & Lutz, C. T. Peptide-dependent expression of HLA-B7 on antigen processing-
deficient T2 cells. *J Immunol* **156**, 3755-3764 (1996).
- 584 Lemberg, M. K., Bland, F. A., Weihofen, A., Braud, V. M. & Martoglio, B. Intramembrane
proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. *J*
Immunol **167**, 6441-6446 (2001).
- 585 Braud, V. M., Allan, D. S., Wilson, D. & McMichael, A. J. TAP- and tapasin-dependent
HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr*
Biol **8**, 1-10 (1998).

- 586 Weinzierl, A. O. *et al.* Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by
quantitative mass spectrometry. *Eur J Immunol* **38**, 1503-1510 (2008).
- 587 Aisenbrey, C. *et al.* Structure and dynamics of membrane-associated ICP47, a viral inhibitor
of the MHC I antigen-processing machinery. *J Biol Chem* **281**, 30365-30372 (2006).
- 588 Seliger, B. *et al.* Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after
oncogenic transformation of murine fibroblasts. *Eur J Immunol* **28**, 122-133 (1998).
- 589 Wang, Z. *et al.* Molecular analysis of the HLA-A2 antigen loss by melanoma cells SK-MEL-
29.1.22 and SK-MEL-29.1.29. *Cancer Res* **58**, 2149-2157 (1998).
- 590 Wolfel, C. *et al.* Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a
melanoma-associated tyrosinase epitope. *Int J Cancer* **88**, 432-438 (2000).
- 591 Wolfel, T. *et al.* Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by
autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* **24**, 759-764 (1994).
- 592 Aladin, F., Lautscham, G., Humphries, E., Coulson, J. & Blake, N. Targeting tumour cells
with defects in the MHC Class I antigen processing pathway with CD8+ T cells specific for
hydrophobic TAP- and Tapasin-independent peptides: the requirement for directed access into
the ER. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1143-1152 (2007).
- 593 El Hage, F. *et al.* Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined
tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*
105, 10119-10124 (2008).
- 594 Van Endert, P. Role of tripeptidyl peptidase II in MHC class I antigen processing - the end of
controversies? *Eur J Immunol* **38**, 609-613 (2008).
- 595 Glas, R., Bogyo, M., McMaster, J. S., Gaczynska, M. & Ploegh, H. L. A proteolytic system
that compensates for loss of proteasome function. *Nature* **392**, 618-622 (1998).
- 596 Villasevil, E. M. *et al.* Accumulation of polyubiquitylated proteins in response to Ala-Ala-
Phe-chloromethylketone is independent of the inhibition of tripeptidyl peptidase II. *Biochim*
Biophys Acta, doi:S0167-4889 (2010).
- 597 Grauling-Halama, S., Bahr, U., Schenk, S. & Geginat, G. Role of tripeptidyl peptidase II in
the processing of Listeria monocytogenes-derived MHC class I-presented antigenic peptides.
Microbes Infect **11**, 795-802 (2009).
- 598 Luckey, C. J. *et al.* Differences in the expression of human class I MHC alleles and their
associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J Immunol* **167**, 1212-1221
(2001).
- 599 Marcilla, M., Cragnolini, J. J. & Lopez de Castro, J. A. Proteasome-independent HLA-B27
ligands arise mainly from small basic proteins. *Mol Cell Proteomics* **6**, 923-938 (2007).
- 600 Marcilla, M., Villasevil, E. M. & de Castro, J. A. Tripeptidyl peptidase II is dispensable for
the generation of both proteasome-dependent and proteasome-independent ligands of HLA-
B27 and other class I molecules. *Eur J Immunol* **38**, 631-639 (2008).
- 601 Basler, M. & Groettrup, M. No essential role for tripeptidyl peptidase II for the processing of
LCMV-derived T cell epitopes. *Eur J Immunol* **37**, 896-904 (2007).

- 602 York, I. A., Bhutani, N., Zendzian, S., Goldberg, A. L. & Rock, K. L. Tripeptidyl peptidase II
is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most
MHC class I antigen presentation. *J Immunol* **177**, 1434-1443 (2006).
- 603 Firat, E. *et al.* Analysis of direct and cross-presentation of antigens in TPPII knockout mice. *J*
Immunol **179**, 8137-8145 (2007).
- 604 Kawahara, M., York, I. A., Hearn, A., Farfan, D. & Rock, K. L. Analysis of the role of
tripeptidyl peptidase II in MHC class I antigen presentation in vivo. *J Immunol* **183**, 6069-
6077 (2009).
- 605 Pieters, J. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv Immunol* **75**, 159-
208 (2000).
- 606 Dongre, A. R. *et al.* In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid
automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur J Immunol* **31**, 1485-1494
(2001).
- 607 Nimmerjahn, F. *et al.* Efficient generation and expansion of antigen-specific CD4⁺ T cells by
recombinant influenza viruses. *Eur J Immunol* **33**, 3331-3341 (2003).
- 608 Paludan, C. *et al.* Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after
autophagy. *Science* **307**, 593-596 (2005).
- 609 Chaux, P. *et al.* Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to
CD4⁺ T lymphocytes. *J Exp Med* **189**, 767-778 (1999).
- 610 Schultz, E. S. *et al.* A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells
by CD4⁺ cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* **60**, 6272-6275 (2000).
- 611 Tewari, M. K., Sinnathamby, G., Rajagopal, D. & Eisenlohr, L. C. A cytosolic pathway for
MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat*
Immunol **6**, 287-294 (2005).
- 612 Nimmerjahn, F. *et al.* Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a
cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* **33**, 1250-1259 (2003).
- 613 Schmid, D., Pypaert, M. & Munz, C. Antigen-loading compartments for major
histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from
autophagosomes. *Immunity* **26**, 79-92 (2007).
- 614 Dengjel, J. *et al.* Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from
intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7922-7927 (2005).
- 615 Zhou, D. *et al.* Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens.
Immunity **22**, 571-581 (2005).
- 616 Li, B. *et al.* Autophagy facilitates major histocompatibility complex class I expression
induced by IFN- γ in B16 melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* (2009).
- 617 English, L. *et al.* Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC
class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* **10**, 480-487 (2009).
- 618 van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes
on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-1647 (1991).

- 619 De Plaen, E. *et al.* Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the
MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360-369 (1994).
- 620 De Smet, C. *et al.* Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene.
Immunogenetics **39**, 121-129 (1994).
- 621 Van der Bruggen, P., Stroobant, V., Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Peptide data-base
of T-cell defined tumor antigens 2011.
<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.html>.
- 622 Gaugler, B. *et al.* Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by
autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* **179**, 921-930 (1994).
- 623 Seremet, T., Brasseur, F. & Coulie, P. G. Tumor-specific antigens and immunologic adjuvants
in cancer immunotherapy. *Cancer J* **17**, 325-330 (2011).
- 624 De Smet, C., Lorient, A. & Boon, T. Promoter-dependent mechanism leading to selective
hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. *Mol Cell Biol* **24**,
4781-4790 (2004).
- 625 De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V. & Boon, T. DNA methylation is the
primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich
promoter. *Mol Cell Biol* **19**, 7327-7335 (1999).
- 626 Van Der Bruggen, P. *et al.* Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T
cells. *Immunol Rev* **188**, 51-64 (2002).
- 627 Sang, M., Lian, Y., Zhou, X. & Shan, B. MAGE-A family: attractive targets for cancer
immunotherapy. *Vaccine* **29**, 8496-8500 (2011).
- 628 Duan, Z. *et al.* Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant
human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **9**, 2778-2785 (2003).
- 629 Cilensek, Z. M., Yehiely, F., Kular, R. K. & Deiss, L. P. A member of the GAGE family of
tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1,
Interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation. *Cancer Biol Ther* **1**, 380-387 (2002).
- 630 Liu, W., Cheng, S., Asa, S. L. & Ezzat, S. The melanoma-associated antigen A3 mediates
fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer Res* **68**, 8104-8112 (2008).
- 631 Yang, B. *et al.* MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and
suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res* **67**, 9954-9962
(2007).
- 632 Doyle, J. M., Gao, J., Wang, J., Yang, M. & Potts, P. R. MAGE-RING protein complexes
comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* **39**, 963-974, doi:S1097-2765 (2010).
- 633 Herman, J., Jongeneel, V., Kuznetsov, D. & Coulie, P. G. Differences in the recognition by
CTL of peptides presented by the HLA-B*4402 and the HLA-B*4403 molecules which differ
by a single amino acid. *Tissue Antigens* **53**, 111-121 (1999).
- 634 Lonchay, C. *et al.* Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma
patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**, 14631-
14638 (2004).

- 635 Herman, J. *et al.* A peptide encoded by the human MAGE3 gene and presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE3. *Immunogenetics* **43**, 377-383 (1996).
- 636 Rimoldi, D., Salvi, S., Schultz-Thater, E., Spagnoli, G. C. & Cerottini, J. C. Anti-MAGE-3 antibody 57B and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family. *Int J Cancer* **86**, 749-751 (2000).
- 637 de Diesbach, P. *et al.* Identification, purification and partial characterisation of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells. *Nucleic Acids Res* **28**, 868-874 (2000).
- 638 Konstantinova, I. M., Tsimokha, A. S. & Mittenberg, A. G. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* **267**, 59-124 (2008).
- 639 Schwarz, K. *et al.* The selective proteasome inhibitors lactacystin and epoxomicin can be used to either up- or down-regulate antigen presentation at nontoxic doses. *J Immunol* **164**, 6147-6157 (2000).
- 640 Neefjes, J. J., Momburg, F. & Hammerling, G. J. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* **261**, 769-771 (1993).
- 641 York, I. A. *et al.* A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* **77**, 525-535 (1994).
- 642 Kocher, T. *et al.* Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product. *Cancer Res* **55**, 2236-2239 (1995).
- 643 Amar-Costesec, A. *et al.* The tumor protein MAGE-1 is located in the cytosol of human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 710-715 (1994).
- 644 Imai, Y. *et al.* Sequence analysis of the MAGE gene family encoding human tumor-rejection antigens. *Gene* **160**, 287-290, doi:037811199400680Q [pii] (1995).
- 645 Laduron, S. *et al.* MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res* **32**, 4340-4350 (2004).
- 646 Galocha, B. *et al.* The active site of ICP47, a herpes simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC)-encoded peptide transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH2-terminal 35 residues. *J Exp Med* **185**, 1565-1572 (1997).
- 647 Munz, C. Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore? *Curr Opin Immunol* **22**, 89-93 (2010).
- 648 Crotzer, V. L. & Blum, J. S. Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol* **182**, 3335-3341 (2009).
- 649 Vigneron, N. *et al.* An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* **304**, 587-590 (2004).
- 650 Kim, S. I., Pabon, A., Swanson, T. A. & Glucksman, M. J. Regulation of cell-surface major histocompatibility complex class I expression by the endopeptidase EC3.4.24.15 (thimet oligopeptidase). *Biochem J* **375**, 111-120 (2003).
- 651 Valmori, D. *et al.* Analysis of MAGE-3-specific cytolytic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2 melanoma patients. *Cancer Res* **57**, 735-741 (1997).

- 652 van der Bruggen, P. *et al.* A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by
HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3.
Eur J Immunol **24**, 3038-3043 (1994).
- 653 Valmori, D. *et al.* Modulation of proteasomal activity required for the generation of a
cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med*
189, 895-906 (1999).
- 654 Lucchiari-Hartz, M. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte epitopes of HIV-1 Nef: Generation of
multiple definitive major histocompatibility complex class I ligands by proteasomes. *J Exp*
Med **191**, 239-252 (2000).
- 655 Lucchiari-Hartz, M. *et al.* Differential proteasomal processing of hydrophobic and hydrophilic
protein regions: contribution to cytotoxic T lymphocyte epitope clustering in HIV-1-Nef. *Proc*
Natl Acad Sci U S A **100**, 7755-7760 (2003).
- 656 Parmentier, N. *et al.* Production of an antigenic peptide by insulin-degrading enzyme. *Nat*
Immunol **11**, 449-454 (2010).
- 657 Benham, A. M., Gromme, M. & Neefjes, J. Allelic differences in the relationship between
proteasome activity and MHC class I peptide loading. *J Immunol* **161**, 83-89 (1998).