

REGULATION DE L'EXPRESSIONDES GENES DU COMPLEXE MAJEURD'HISTOCOMPATIBILITE DE CLASSE II

Nabila Jabrane-Ferrat

▶ **To cite this version:**

Nabila Jabrane-Ferrat. REGULATION DE L'EXPRESSIONDES GENES DU COMPLEXE MAJEURD'HISTOCOMPATIBILITE DE CLASSE II. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2003. tel-00092605

HAL Id: tel-00092605

https://theses.hal.science/tel-00092605

Submitted on 11 Sep 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

SYNTHESE DES TRAVAUX

Présenté en vue de l'obtension du

DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Université Paul Sabatier

Toulouse III

REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE DE CLASSE II

Par Nabila Jabrane-Ferrat, Ph.D.

Assistant Professor Reseach Immunologist

University of California San Francisco

Jean Edouard Gairin	Directeur
Roberto Accolla	Rapporteur
Vincent Lotteau	Rapporteur
Salem Chouaib	Rapporteur

Version Juillet 2002

TABLE DES MATIERES

CURICULUM VITAE..... 3
LISTE DE PUBLICATIONS 6
FICHE RESUME..... 8
Résumé des activités de recherché avant et pendant la thèse du doctorat..... 8
I. Avant et durant la préparation de la thèse de doctorat..... 8
II. Activité professionelle 8
III. Activite de Recherche Pendant la période post-doctorale 8
IV.Domaine de recherche actuel et perspectives..... 9

EXPOSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE..... 11

Introduction..... 11
Hypothèse de travail..... 11
Etats des connaissances..... 12
Etudes préalables..... 13
Assemblage du complexe RFX au niveau des promoteurs CMHII
CIITA orchestre l'expression des gènes du CMHII
Association du CIITA avec les éléments de la machinerie de transcription de base
CIITA et P-TEFb contrôlent l'élongation de la transcription par l'ARNPII
Le dogme de l'élongation de la transcription

Projets de recherches et perspectives..... 17
Structure et fonction du complexe NFY/RFX
Structure et fonction du CIITA
CIITA et remodelage de la chromatine
Mécanismes de Repression du CIITA par les snARN

CONCLUSIONS..... 23
IMPLICATIONS CLINIQUES..... 24
REFERENCES..... 25
ANNEXES..... 29
Organigramme du laboratoire..... 30

CURRICULUM VITAE

Nabila Jabrane-Ferrat

Addresse Personnelle
4 Chemin d'Embax, Appt 3
Colomiers 31770 FRANCE
Email: nferrat@hotmail.com

Addresse Professionnelle:
Surgery Department,
Comprehensive Cancer Center, UCSF
N231, 2340 Sutter Street, San Francisco
CA94122-0703, USA
Email: jugu@itsa.ucsf.edu

Date de Naissance
11/11/1960

Situation familiale:
Mariée, deux enfants

Nationalités:
Marocaine, Francaise, Americaine

Education:

Thèse de Doctorat de l'Université en Immunopharmacology,
Université Joseph Fournier Grenoble (Juin 1988).
D.E.R.B.H. Paris VII/Hôpital Saint Louis (1986).
D.E.A. Phamacologie, Université Joseph Fournier Grenoble (Juin 1984).
Maîtrise de Physiologie et Biologie Cellulaire, Université Joseph Fournier Grenoble (1983).
Licence de Physiologie et Biologie Cellulaire, Université Joseph Fournier Grenoble (1982).

Activites Professionnelles:

1990-91	Fellow, Institut Jacques Monod, Paris VII, FRANCE
1991-94	Visiting Scientist, Howard Hughes Medical Institute and Research Fellow, University of California, San Francisco (UCSF).
1994-97	Postgraduate Research Scientist, UCSF
1997-Present	Assistant Professor Research Immunologist, UCSF

Expérience de Recherche et Positions:

1991-94	Post Doctoral training in Dr. MB Peterlin laboratory, UCSF: Transcription Regulation of MHC class II genes - Protein-Protein interaction - Biochemical identification of new transcription factors
1994-96	Research Scientist, UCSF Regulation of MHC-II genes
1997-99	Assistant Professor Research Immunology Dept UCSF: Seven transmembrane G-protein coupled receptor function and signaling
1999- present	Assistant Professor Research Immunologist, Dept. of Surgery, Comprehensive Cancer Center, Mount Zion, UCSF: MHCII gene regulation, Immunotherapy for breast cancer

Distinctions Scientifiques

1987-88 Bourse de thèse, Association de Recherche sur le Cancer (ARC), Paris, FRANCE
1991-92 Bourse post-doc, Association de Recherche sur le Cancer (ARC), Paris FRANCE
1992-93 Visisting Scientist de Howard Hughes Medical Institute at UCSF
1994-96 American Heart Association : Young Investigator Award
2000-02 Breast Cancer Research Program : Principal Investigator Award

Position Actuelle

Assistant Professor Research Immunologist,
University of California San Francisco (UCSF)
Surgery Dept, Comprehensive Cancer Center, Mount Zion Hospital, UCSF

Associations Scientifiques

Member of the UCSF Comprehensive Cancer Center at the University of California, San Francisco
Tumor Immunology Research Group

Autres Activités Scientifiques

1996-présent Revue d'articles scientifiques à publier dans des revues à comité de lecture (Journal of Immunology, FASEB Journal, Journal of Biological Chemistry, Molecular and Cellular Biology)
Juillet 99- Consultant en Immunologie et Biologie Moléculaire pour le groupe Breast Cancer Immunotherapy group Surgery Dept. at UCSF Mount Zion UCSF

Expérience administrative

Gestion et budgétisation des fonds de recherche

Thèmes de recherche en cours d'investigation

1- Les bases moléculaire de l'assemblage de la transcription au niveau des MHC-II promoter. Définition et caractérisation des intéractions protéiques *in vitro* et *in vivo*. Assemblage d'un complexe actif de transcription *in vitro*. Elongation de transcription par l'ARN polymérase.
2- Immunothérapie anti-tumorale, etablissement et caractérisation de différents vaccins cellulaires pour le carcinome du sein.
3- Etablissement d'un modèle de d'arthrite inflammatoire chez la souris

Deux thèmes en projet:

1- Développement d'une nouvelle stratégie de vectorisation d'ADN. Utilisation de "gene gun", retrovirus et adenovirus, Immunoliposomes.
2- Découverte de nouveaux marqueurs pour les tumeurs du sein et établissement d'un système de vaccin cellulaire hétérologue.

Collaborations Scientifiques

1) CIITA traffiking: clonage et caractérisation des importins associées avec le CIITA (Collaborateur: Pr. M. B. Peterlin)
2) Projet Immunomix: Isolation de nouveaux marqueurs du cancer du sein humain, cibles de thérapie généque (collaborateurs: Pr. Laura Esserman et Dr. Mike Campbell, Surgery Dept. UCSF)
3) Participation au projet de développement de souris transgénique exprimant le recepteur au VIP (VPAC1) sous le contrôle de promoteur LCK (Collaborateur: Pr. E.Goetzl à UCSF).

4) Collaboration sur le projet de développement de Vaccins en immunisant avec le domaine extra-cellulaire de l'oncogène Her2/Neu (Collaborateur: Dr. M. Campbell service de Chirurgie du Cancer du sein à UCSF)

Personnes Encadrées:	**Période de formation**	**Titre et position actuels**
Miki Nakanishi	1992-94	Research Associate, UCSF
Helen Field, PhD.	1992-94	Scientist, England
Carol Lim, Etudiante	1993-95	Post-doctorante au NIH
Joe D. Fontes, Ph.D.	1993-95	Assistant Professor, Cleaveland
Charles Toth, Ph.D.	1993-94	Scientist, Boston College
Melanie Adams, MD.	1995-97	Post-doc. Fellow, UCSF
Ravi R. Pankhaniya, Etudiant	1997-99	Medical Student, Harvard University
Garry O. Gaufo, Ph.D.	1997-99	Post-Doctorant University of Utah
Yvonne Kong	1997-99	Research Associate Allergy Dept, UCSF
Nada Nekrep, Etudiante	1999-present	HHMI/UCSF Cancer Center
Giovanna Tosi, Ph.D.	1999-present	HHMI/UCSF Cancer Center

Autres responsabilités

Dès la fin de la seconde année de mon séjour aux USA, j'étais impliquée dans la définition de nouveau projet portant sur les aspects moléculaires de la régulation de l'expression des gènes CMHII.
J'ai obtenu une position d'Assistant Reseach Scientist Immunology dans le departement d'Immunologie et Microbiologie en 1995. De 1997 à 1999 j'ai obtenue la position d'Adjunct Assistant Professor dans le département d'Immunologie division d'Allergie où j'ai assuré la direction du projet "VPAC, seven trans-membrane récepteurs from immunology to cancer biology". Mon groupe était composé d'un post-doctorant, un étudiant et une technicienne, j'ai défini les objectifs à court et à long terme pour chaque membre du groupe, initié un modèle transgénique qui continue à être exploré par le laboratoire du professeur E. Goetzl à UCSF. J'ai également équipé le laboratoire en matériel de biologie moléculaire et supervisé son organisation. Bien que j'aie quitté le groupe pour prendre une position dans le département de Chirurgie, j'ai gardé une consultation scientifique pour le modèle transgénique de VPAC1.
J'ai rejoint le département de Chirurgie depuis juin 1999 sur une position d'Assistant Professor. J'ai initié le projet d'Immunothérapie tumorale. J'ai repris la direction du groupe de régulation de l'expression des gènes du CMH-II composé actuellement de cinq personnes (un étudiant en thèse et deux postdoc avec l'aide d'une technicienne et moi-même)
Durant ces années j'ai acquis une excellente expérience dans la rédaction et la révision d'articles scientifiques, la présentation dans des congrès nationaux et internationaux ainsi que la demande de financement (Grant). Cette partie de ma carrière a été accomplie dans un premier temps avec le professeur B.M. Peterlin à l'école de Médicine département d'Immunologie de Microbiologie à l'Université de Californie à San Francisco et par la suite avec le professeur E. Goetzl dans la même institution.
En plus des tâches d'encadrement et de supervision des étudiants et post-doctorants, j'organise des réunions hebdomadaires (groupe meeting) avec le professeur BM. Peterlin pour discuter des nouvelles stratégies. Mon groupe se réuni également avec les autres groupes du laboratoire Peterlin de façon régulière pour discuter des publications scientifiques (rapport avec les thèmes qui intéressent les différents groupes).

En plus, je participe aux réunions du groupe “Breast Cancer Immunotherapy” où j’assure une presentation mensuelle et du groupe “Tumor Immunology at UCSF” où j’assure une présentation trimestrielle.

Liste de Publications Nabila Jabrane-Ferrat

Tosi G, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Phosphorylation dependent dimerization of Class II transactivator.
EMBO J., In press

Jabrane-Ferrat N, Campbell, M, Peterlin BM. and LJ., Esserman. Immunity against Cancer: MHC class II transactivator and CD81 Submitted.

Jabrane-Ferrat N, Nekrep N, Esserman LJ, and Peterlin BM. Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Assembly of MHCII transcriptional enhanceosome: recruitment of class II transactivator to DNA.
Intl. Immunol. In press.

Nekrep N, Jabrane-Ferrat N, Wolf HM, Eibl MM, Geyer M, and BM, Peterlin. Ker/Kern new members of BLS group C,
Nature Immunol. In press.

Jabrane-Ferrat N, Nekrep N, Tosi G, Esserman LJ, Peterlin BM. Major histocompatibility complex class II transcriptional platform: assembly of nuclear factor Y and regulatory factor X (RFX) on DNA requires RFX5 dimers.
Mol Cell Biol. 2002 Aug;22(15):5616-25.

Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II.
Mol Cell. 2001 Aug;8(2):327-37.

Nekrep N, Geyer M, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Analysis of ankyrin repeats reveals how a single point mutation in RFXANK results in bare lymphocyte syndrome.
Mol Cell Biol. 2001 Aug;21(16):5566-76.

Jabrane-Ferrat N, Pollock AS, Goetzl EJ. Inhibition of expression of the type I G protein-coupled receptor for vasoactive intestinal peptide (VPAC1) by hammerhead ribozymes.
Biochemistry. 2000 Aug 15;39(32):9771-7.

Nekrep N, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Mutations in the bare lymphocyte syndrome define critical steps in the assembly of the regulatory factor X complex.
Mol Cell Biol. 2000 Jun;20(12):4455-61.

Bloom D, Jabrane-Ferrat N, Zeng L, Wu A, Li L, Lo D, Turck CW, An S, Goetzl EJ. Prostaglandin E2 enhancement of interferon-gamma production by antigen-stimulated type 1 helper T cells.
Cell Immunol. 1999 May 25;194(1):21-7.

Jabrane-Ferrat N, Bloom D, Wu A, Li L, Lo D, Sreedharan SP, Turck CW, Goetzl AE. Enhancement by vasoactive intestinal peptide of gamma-interferon production by antigen-stimulated type 1 helper T cells. FASEB J. 1999 Feb;13(2):347-53.

Pankhaniya R, Jabrane-Ferrat N, Gaufo GO, Sreedharan SP, Dazin P, Kaye J, Goetzl EJ. Vasoactive intestinal peptide enhancement of antigen-induced differentiation of a cultured line of mouse thymocytes. FASEB J. 1998 Jan;12(1):119-27.

Fontes JD, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Assembly of functional regulatory complexes on MHC class II promoters in vivo. J Mol Biol. 1997 Jul 18;270(3):336-45.

Lim CS, Jabrane-Ferrat N, Fontes JD, Okamoto H, Garovoy MR, Peterlin BM, Hunt CA. Sequence-independent inhibition of RNA transcription by DNA dumbbells and other decoys.
Nucleic Acids Res. 1997 Feb 1;25(3):575-81.

Jabrane-Ferrat N, Fontes JD, Boss JM, Peterlin BM. Complex architecture of major histocompatibility complex class II promoters: reiterated motifs and conserved protein-protein interactions.
Mol Cell Biol. 1996 Sep;16(9):4683-90.

Fontes JD, Jabrane-Ferrat N, Toth CR, Peterlin BM. Binding and cooperative interactions between two B cell-specific transcriptional coactivators.

J Exp Med. 1996 Jun 1;183(6):2517-21.
Voliva CF, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. The function of the octamer-binding site in the DRA promoter. Immunogenetics. 1996;43(1-2):20-6.
Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Ets-1 activates the DRA promoter in B cells. Mol Cell Biol. 1994 Nov;14(11):7314-21.
Zhang XY, Jabrane-Ferrat N, Asiedu CK, Samac S, Peterlin BM, Ehrlich M. The major histocompatibility complex class II promoter-binding protein RFX (NF-X) is a methylated DNA-binding protein. Mol Cell Biol. 1993 Nov;13(11):6810-8.
Jabrane-Ferrat N, Faille A, Loiseau P, Poirier O, Charron D, Calvo F. Effect of gamma interferon on HLA class-I and -II transcription and protein expression in human breast adenocarcinoma cell lines. Int J Cancer. 1990 Jun 15;45(6):1169-76.
Jabrane-Ferrat N, Calvo F, Faille A, Lagabrielle JF, Boisson N, Quillet A, Fradelizi D. Recombinant gamma interferon provokes resistance of human breast cancer cells to spontaneous and IL-2 activated non-MHC restricted cytotoxicity. Br J Cancer. 1990 Apr;61(4):558-62.
Calvo F, Martin PM, Jabrane N, De Cremoux P, Magdelenat H. Human breast cancer cells share antigens with the myeloid monocyte lineage. Br J Cancer. 1987 Jul;56(1):15-9.
Calvo F, Jabrane N, Faille A, Gauville C, de Cremoux P, Lagier G, Abita JP, Lechat P. Quantitative modifications of major histocompatibility complex (MHC) antigens induced by recombinant gamma interferon in two human breast cancer lines. Int J Immunopharmacol. 1987;9(4):459-68.
Calvo F, Jabrane N, Faille A, Gauville C, de Cremoux P, Lagier G, and P Lechat, 1986. Effects of recombinant interferon on cell kinetics and expression of b2 microglobulin and HLA-DR antigens in human breast cancer cell lines. Proc. Amer. Assoc. Cancer Research, 5-24.
Calvo F, Goubin G, Gauville C, Jabrane N, Magdelenat H, P de Cremoux, and M Marty, 1986. A new human breast carcinoma cell line, 466B with dedifferenciation characteristics in vitro and a transforming cKi ras gene. Proc. Amer. Soc. Clin. Oncology, 5-24.

PARTICIPATION AUX CONGRES

Mai 1994 : International HLA, Garda, Italy. Jabrane-Ferrat N, Ets-1 activates the DRA promoter in B cells. Selected for Oral presentation

June 1996: The 12th International Histocompatibity workshop and conference. Saint-Malo, France. Genetic diversity of HLA functional and medical implications. Jabrane-Ferrat N and BM Peterlin. RFX binds to S and X box in DRA promoter. Selected for Oral presentation

1997: International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco. Vasoactive intestinal peptide enhancement of antigen-induced differentiation of a cultured line of mouse thymocytes. Abstract

1999: ASMB, San Francisco.
1. Jabrane-Ferrat N, et al. Prostaglandin E2 enhancement of interferon-gamma production by antigen-stimulated type 1 helper T cells.
2. Jabrane-Ferrat N, et al. Enhancement by vasoactive intestinal peptide of gamma-interferon production by antigen-stimulated type 1 helper T cells.

Dec. 2001 San Antonio Breast Cancer Meeting, Jabrane-Ferrat N, CIITA and B7 immunotherapy for breast cancer. Selected for plenary session, 2001

FICHE RESUME

Résumé des activités de recherché avant et pendant la thèse du doctorat

I- Avant et durant la préparation de la thèse de doctorat: (1985-1989).

Mon initiation à la recherche a commencé à l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble Joseph Fournier à l'UFR de pharmacologie où j'ai obtenu mon DEA (1983-84). Lors de mon stage de DEA j'ai étudié l'effet de différents agents anti-cancereux sur la proliferation et la differenciation cellulaire dans un modèle de cancer du sein humain.

Pour mon travail de thèse Doctorat j'ai rejoint l'hôpital Saint Louis à Paris sous la direction scientifique Dr. Fabien Calvo. L'objectif principal était de développer des modèles cellulaires de cancer du sein humain (1) afin d'étudier les effets d'agents anticancereux. Lors de ma première année de thèse j'ai obtenu le DERBH de Biologie Humaine de Paris VII/Hôpital St. Louis.

En parallèle à ce projet, j'ai initié mon propre sujet de recherche sur la modulation de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dans les cellules d'adénocarcinome mammaire humain. Durant ma thèse j'ai caracterisé l'expression des antigènes dans les tumeurs du carcinome du sein établies à partir de biopsies de carcinome mammaire human. J'ai démontré que les cellules de cancer du sein n'exprimaient pas les antigènes de CMH-II. Cependant, le traitement par l'IFN-γ induisait l'expression de ces genes dans la majorité des lignées cellulaires étudiées. Les résultats ont suggéré l'éxistence d'un défaut dans le signaling ou dans la régulation de la transcription des gènes CMH-II eux-même. Comme ces antigenes sont impliques dans la presentation de l'antigene et la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunocompétentes, j'ai etudié l'implication des antigenes du CMH dans la lyse mediée par les cellules NK (Natural Killers) and LAK (Lymphokine Activated Killers). L'induction des antigènes du CMH par l' IFN-γ a été correlée à la résistance à la lyse par les cellules NK et cellules LAK et à l'augmentation de la susceptibilité à la lyse mediée par l'anticorps (Antibody Dependent Cytotoxicity ADCC). Ces travaux ont fait l'objet de plusieurs publications dans des journaux avec comité de sélection (Jabrane-Ferrat 1-6 et de thèse de Doctorat de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble en Juin 1988).

II- Activité professionelle : (1989-1990)

A la fin de ma thèse de doctorat, j'ai rejoint la société Hoffman-La Roche à Paris en tant que chercheur scientifique responsable de la mise en place des essais cliniques sur l'IFN Alpha (Roféron-2A). Mon séjour à Hoffman-La Roche m'a permis de décider de réorienter ma carrière, et j'ai ainsi quitter la recherche clinique pour reprendre une recherche beaucoup plus fondamentale. J'ai donc quitter mon poste à Hoffman-La Roche pour un post de post-doctorante à l'université de Californie San Francisco.

III- Activite de Recherche Pendant la période post-doctorale : (1991-1996)

Au cours de mon stage post-doctoral aux États Unis, j'ai travaillé sur les aspects moléculaires de la régulation de l'expression des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII).

Les thèmes de mon laboratoire d'aceuil étaient centrés sur la régulation de la transcription. Durant mon stage post-doctoral j'ai travaillé sur la régulation des gènes du CMHII.

1> Dans une première phase nous avons définit les aspects structuraux des gènes CMHII et leur niveau de méthylation et du packaging de la chromatine. En collaboration avec Melanie Ehrlich, nous avons montré que MDBP forme un complexe avec la boîte X du DRA et que le complexe MDBP qui est équivalent à l'activité EF-C (protéine qui se lie sur la séquence enhancer du virus du polyome), EP (protéine qui se lie sur la séquence enhancer de l'hépatite B) et MIF (une séquence intronique de c-myc) contient RFX-1 (Zhang, Jabrane-Ferrat et al. 1993).

2> J'ai démontré que la boîte pyrimidine tract contenait une séquence GGAAG présente dans les séquences consensus reconnues par la famille de protéines de l'oncogène Ets-1. J'ai ainsi démontré le rôle

de l'oncogène Ets-1 dans l'expression d'un taux élevé des gènes du CMH II dans les cellules B. Ce travail a été publié dans MCB (Jabrane-Ferrat et al. 1994).

3> En plus de la séquence TATA, le promoteur HLA-DRA possède une séquence Octamer qui fixe les facteurs Oct1 (expression ubiquitaire) et Oct2 (expression spécifique aux cellules B). Les mutations du site TATA ne semblent pas affecter l'expression du promoteur, alors que toutes mutations du site octamer réduisent l'expression du promoteur. Nous avons substitué la séquence Octamer-TATA par la boîteTATA de l'adénovirus E1b et montré que cette mutation par substitution enlève la dépendance du site octamer. Nous avons également montré que la boîteTATA de E1b fixe le facteur TBP, tandis que celle du promoteur DRA ne le fixe pas. Cela nous a permis de conclure qu'au niveau du promoteur HLA-DRA, la boîteTATA n'est pas fonctionnelle et que la séquence Octamer joue un rôle dans le recrutement du TBP à la machinerie de transcription basale (TBP, Pol II et TAFs) (Voliva, Jabrane-Ferrat and Peterlin 1995).

4> Après clonage du facteur OCA-B, activateur spécifique des cellules B qui interagit de façon équivalente avec les protéines Oct-1 et Oct-2 liée au site octamer, nous avons décrit la première interaction entre deux co-activateurs tissu-spécifiques: CIITA et OCA-B. Nous avons montré que le CIITA et OCA-B interagissent directement et agissent de facon synergique au niveau du promoteur HLA-DRA. Nos résultats suggèrent qu'au niveau des promoteurs de classe II le CIITA permet de recruter un second activateur OCA-B ceci permet d'exposer deux surfaces d'activation pour une interaction avec les TAFs (TBP associated factors [12]) et la machinerie de transcription de base. Ou encore que OCA-B via son interaction avec TBP et d'autres TAFs créerait un complexe qui fixerait le CIITA avec une plus grande affinité et activerait la transcription avec une plus grande éfficacité. La formation d'un complexe multiprotéique entre les protéines régulatrices et le complexe de préinitiation serait responsable de l'expression des gènes de classe II et probablement d'autres gènes impliqués dans la réponse immunitaire. L'absence de l'expression d'OCA-B dans les cellules traitées par l'IFN-γ pourrait-être responsable en partie du faible niveau d'expression des gènes de classe II dans les cellules présentatrices d'antigènes et dans les cellules somatiques (Fontes, Jabrane-Ferrat et al. 1996).

5> Des observations préliminaires nous ont permis de postuler que la boîte S est une duplication ancestrale de la boîteX. Dont le but de confirmer ce postulat, j'ai montré que la délétion de la boîte S est nécessaire à l'expression du promoteur DRA dans les cellules B et que les promoteurs du CMHII sont soumis à des contraintes spaciales très rigides. L'espace entre les boîtes S et X ne peut pas être modifié. De plus nous travaux nous permis de suggérer que non seulement les séquences X et S fixent la même protéine mais en plus il existe des interactions entre les protéines se fixant au niveau de la boîte X et au niveau de de la boîte S (Jabrane-Ferrat et al. 1996).

6> Pour confirmer que le rôle de la boîte S *in vivo* et déterminer son importance dans la régulation de l'expression des gènes CMHII, nous avons montré que RFX1 peut lier la séquence X en l'absence des autres séquences promotrices. La présence de la boîte Y permet de favoriser et d'augmenter la fixation de RFX5 par rapport à celle de RFX1. La boîte S quand à elle, elle augmente la fixation de RFX1 et de RFX5. Nos résultats ont suggéré que les boîtes S et Y permettent de sélectionner spécifiquement RFX5 (Fontes, Jabrane-Ferrat et al. 1996 et 1997).
L'ensemble des travaux résumés ici sont repris en détail dans ce mémoire d'habilitation à diriger des recherches.

EXPOSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

I. INTRODUCTION

Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) ainsi que ceux nécessaires à la dégradation et à la présentation de l'antigène sont régulés de manière coordonnée dans les cellules. Leurs promoteurs contiennent des séquences régulatrices en cis (CUS) qui lient les complexes protéiques composés du facteur régulateur X (RFX) et le facteur nucléaire Y (NFY) (Reith et al. 2000, revue). Ces facteurs sont non seulement recrutés au niveau du promoteur de manière coopérative mais ils forment également une plateforme capable de recruter le trans-activateur du CMHII (CIITA). Le recrutement de CIITA permet ainsi l'initiation et l'élongation de la transcription des gènes du CMHII localisés sur le bras court du chromosome 6 (Fontes et al. 1999, Kanazawa et al. 2000). Notre compréhension, de ce système de régulation, a été favorisée par des analyses génétiques et biochimiques du syndrome du lymphocyte nu (BLS) (Gricelli et al. 1989, Lisowska-Gropierre et al. 1994) dont les patients ont été répértoriés en différents groupes de complémentation. Les mutations responsables de cette immunodéficience, ont été identifiées pour quatres groupes de complémentation et affectent les trois sous-unités de RFX (Steimle et al. 1995, Masternak et al. 1998, Nagarajan et al. 1999) ainsi que le CIITA (Steimle et al. 1993). Dans le dernier groupe (5eme) de BLS, seuls les promoteurs en direction du télomère sont transcrits et par conséquent ils se traduisent par l'absence d'expression de certains isotypes du CMHII. La transcription des gènes impliqués dans la dégradation et la présentation de l'antigène par les déterminants du CMHII est une nécessite absolue pour une immunité adaptative. L'équipe que je souhaite créer aura pour but de pousuivre la dissection des mécanismes moléculaires qui permettent les interactions ADN-protéines et protéine-protéine au niveau du promoteur, leurs fonctions, la régulation du CIITA et sa capacité à coordonner différentes activités de l'ARN polymerase II (ARNPII), recréer ce complexe de régulation dans un système de transcription in vitro. Notre but à long terme est d'utiliser les connaissances que nous allons acquérir pour l'obtention d'un vaccin anti-tumoral.

II. HYPOTHESE DE TRAVAIL

L'étude de la régulation des gènes du CMHII et des gènes impliqués dans la dégradation et la présentation de l'antigène devra permettre d'ouvrir de nouveaux horizons pour la manipulation de la

réponse immunitaire qui aurait de nombreuses implications cliniques allant de la greffe d'organes aux traitement anti-cancéreux. De plus, l'isolement et la caractérisation de gènes mutés dans le BLS nous permettra d'offrir une possibilité de thérapie génique pour cette maladie d'immunodefficience sévère.

Objectif 1: Structure et fonction des complexes protéiques NFY/RFX. Nous nous proposons de définir les surfaces requises pour l'assemblage de ces complexes au niveau des promoters du CMHII, de caractériser les modifications post-transcriptionnelles nécessaires à l'assembage d'un complexe actif. De plus, nous étudierons la contribution de protéines qui se fixent sur des sites adjacents comme l'oncoprotéine Ets-1, le facteur HLH(E12/E47) et AP1.

Objectif 2: Structure et fonction de la phosphoprotéine CIITA.. Nous nous proposons de caractériser les différents sites de phosphorylation et d'étudier leur rôle dans la régulation de l'activité de la protéine. Les systèmes d'imagerie confocales nous permettront d'étudier le traffic de la protéine entre le cytoplasme et le noyau. Comment le CIITA orchestre le recrutement de l'ARNPII? Dicte-t-il les étapes d'initiation?

Objectif 3: Corrélations entre structure et fonction in vitro et in vivo. Notre but serait de reconstituer un complexe actif de transcription in vitro avec les protéines recombinantes. Cette stratégie nous permettra de définir la contribution de chaque facteur dans un système bien controlé.

Conclusion: Ces études devraient nous révéler non seuleument la structure et la fonction des facteurs qui régulent l'expression des gènes du CMHII mais aussi les mécanismes qui gouvernent la réponse immunitaire en général. De plus, ces connaissances acquises nous permettront de réfléchir sur les stratégies de traitment par thérapie génique.

III. ETAT DES CONNAISSANCES

Les molécules du CMHII présentent le peptide antigénique au récepteur des cellules T (TCR). Exprimées principalement à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (APC) et des lymphocytes B matures, ces molécules dirigent les intéractions entre les cellules T helper (Th) et les cellules B permettant ainsi la propagation de la réponse immunitaire. Les gènes CMHII sont concentrés sur 1mb du bras court du chromosome 6. En plus de ceux qui codent pour les chaines polymorphiques qui constituent des hétérodimères DP, DQ et DR, cette région code aussi pour pour les chaines monomorphique de DM

alpha et beta. Dans les cellules B et APC, les molécules DP, DQ et DRA sont accompagnées de DM et de la chaîne invariante (Ii), où DM va aider à déplacer CLIP de la poche CMHII facilitant ainsi la fixation du peptide antigénique (voir Reith et al. 2000 pour revue).

Contrairement à l'expression ubiquitaire des gènes du CMHI, celle des gènes du CMHII est rigoureusement régulée durant le développement ainsi que dans les différentes cellules elles-même. Exprimés constitutivement dans les cellules B matures et les cellules dendritiques, ces gènes peuvent être induits par l'interféron gamma (IFN- γ) dans les cellules APC et dans de nombreuses cellules somatiques. Cette induction nécessite la synthèse protéique, l'IFN-γ induit la transcription du CIITA qui à son tour va activer la transcription du CMHII. L'expression directe du CIITA dans les cellules somatiques permet l'expresion des déterminants du CMHII et la présentation de l'antigène. CIITA est donc l'intégrateur ou le "master switch" des gènes du CMHII. Par lui même, CIITA ne se fixe pas sur les promoteurs du CMHII mais il est recruté via de nombreuses interactions protéiques avec les protéines qui se fixent sur les CUS. Le promoteur, qui dirige la spécificité tissulaire, n'excède pas 150 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription (In) et contient les motifs S, X et Y. Les facteurs (RFX) et NFY intéragissent avec ces éléments de manière coopérative et synergique [sont nécessaires à l'expression des gènes CMHII] pb dans la proposition preced.. SXY représente les CUS de la réponse immunitaire. Le facteur NFY composé de NFY-A, -B et -C intéragit avec la boîte Y, RFX5, RFXAP et RFX-ANK [pb dans la prop suivante]sont les composantes du complexe RFX qui intéragit avec les boîtes S et X (Fig.1) (Jabrane-Ferrat et al. 1996). Les boîtes S et X sont suffisantes pour l'expression spécifique et inductible par l'IFN-□dans un système de promoteur hétérologue. Les complexes RFX et NFY intéragissent avec le CIITA. L'étude des intéractions entre ces protéines et leur assemblage in vitro et in vivo nous permettra de disséquer les mécanismes résponsables du défaut d'expression des gènes CMHII.

En conclusion, beaucoup de progrès ont été faits quant à la connaissance de la régulation du CMHII. Avec la disponibilité de systèmes de vectorisation efficaces, de protéines recombinantes etde systèmes cellulaires, il est maintenant possible de définir précisément l'architecture des complexes au niveau de ces promoteurs, leur mécanismes d'action, ainsi que le developpement d'une stratégie basée sur des protéines qui agiraient en tant que dominants égatifs. En fin, tout cela devrait permettre de jeter des bases pour mettre au point un diagnostique prénatal et éventuellement à plus long terme un moyen de thérapeutique du BLS.

IV. ETUDES PREALABLES

Assemblage du complexe RFX au niveau des promoteurs CMHII:

Nous avons étudié la régulation de la transcription des gènes du CMHII pendant les dix dernières années. Nous avons été les premiers à identifier MDBP (Methylated DNA-binding Protein) purifiée à partir d'extraits nucléaires de cellules Hela et qui se fixe préférentiellement sur des séquences méthylées dans le contexte CpG comme étant la protéine RF-X1. Nous avons montré que MDBP qui se lie sur la boîte X du DRA est équivalente à l'activité EF-C (qui se lie sur la séquence enhancer du virus du polyome C), EP (qui se lie sur la séquence enhancer de l'hépatite B) et MIF (qui se lie à une séquence intronique de c-myc) (Zhang, Jabrane-Ferrat et al. 1993).

Dans le but de mieux définir les CUS au niveau du promoteur DRA nous avons montré que Ets-1 et les protéines Oct1, Oct2 se fixent sur des séquences adjacentes des boîtes X et Y respectivement. Les deux facteurs contribuent aux taux élevés d'expression des gènes CMHII dans les cellules B (Jabrane-Ferrat et al. 1994, Voliva, Jabrane-Ferrat et al.1996). Avec la découverte de l'intéraction entre le CIITA et le co-activateur de Oct1/2 (Bob1/OBF-1/OCA), nous avons ainsi démontré les premières interactions coopératives entre deux co-activateurs qui sont tissue-spécifiques (Fontes, Jabrane-Ferrat et al. 1996). Avec l'identification de RFXANK, nous avons déterminé que RFX interagit directement avec Ets-1. En fait, la structure ankyrine (quatre motifs) de RFXANK intéragit avec le motif ETS dans Ets-1. Ces interactions jouent probablement un rôle majeur dans la stabilité du complexe protéiques au niveau des CUS et apportent un activateur suppélementaire (Jabrane-Ferrat et al. manuscript en prep.).

Des études récentes ont montré que NFYB et C intéragissent avec les protéines RFX révélant ainsi les bases biochimiques de sélection de RFX par NFY (Jabrane-Ferrat et al.1996, Lim et al. 1997, Fontes, Jabrane-Ferrat 1997, Jabrane-Ferrat et al. in press). De plus, l'intéraction entre les différentes sous-unités de RFX permetla "nucléation" du complexe et son recrutement au promoteur (Nekrep, Jabrane-Ferrat et al. 2000, Nekrep et al. 2001). Les surfaces responsables de ces intéractions sont géralement mutées ou supprimées dans BLS. Nous avons montré que RFX5 forme un homo-dimère. La nécessité absolue de ce dimère pour la formation d'un complexe actif permet d'expliquer nos observations antérieures sur la régidité des séquences promotrices (Jabrane-Ferrat et al. 1996, Jabrane-Ferrat et al. submitted).

CIITA orchestre l'expression des gènes du CMHII:

Le CIITA intéragit avec les deux complexes RFX et NFY et ces complexes se forment indépendamment de l'ADN. De ce fait, l'expression d'une seule sous-unité permet d'assembler le complexe en entier. Nos études d'intéractions ont révélés que les complexes protéiques RFX et NFY se fixent sur la région centrale du CIITA entre les position 323 et 939 laissant ainsi le domaine d'activation et la région riche en leucine (LRR) libres pour d'autres intéractions. Bien que les surfaces exactes ne sont pas encore définies nos efforts pour recruter le CIITA aux protéines RFX et NFY assemblé au niveau des CUS in vitro n'ont pas été très fructueux. Les différents complexes contactent l'ADN, mais ils ne sont pas suffisants pour recruter le CIITA. Pour l'assemblage de l'enhancéosome, l'addition d'extraits nucléaire est indispensable suggérant ainsi que d'autres protéines sont nécessaires pour le recrutement du CIITA (Jabrane-Ferrat et al. manuscript en prep.). CIITA est capable de former des homodimères dans les cellules. La majorité de la protéine est localisée au niveau du cytoplasme et uniquement une faible proportion est localisée dans le noyau. L'hypothèse actuelle est que dans les cellules APC latentes la plupart du CIITA est dans le cytoplasme. A la suite de la différenciation des macrophages et de l'intervention d'autres stimuli externes, CIITA est rapidement concentré dans le noyau où il va diriger la réponse immunitaire. Cette translocation peut-être due à la phosphorylation du CIITA, à sa dimérisation, ou encore à l'acétylation et la déacétylation des histones. Des modifications post-traductionnelles du CIITA, peuvent permettre sa translocation au niveau du noyau et son intéraction avec les protéines associées au promoteur. Le CIITA recrute des HATs induisant ainsi une acetylation des histones H3 et H4 et une transcription active du promoteur. Dans le cas d'expression de CMHII par l'IFN-□, le retrait d'IFN-□ est rapidement suivi par l'absence d'expression du CIITA et de la déacétylation des nucléosomes.

Association du CIITA avec les éléments de la machinerie de transcription de base.

Nous avons défini le domaine d'activation du CIITA et montré son rôle de coordinateur entre les séquences promotrices et la machinerie de transcription de base. Il permet de recruter TAFII32 (TBP associated factor II), Bob1/OBF-1/OCA-B et CBP (Luo et al. 1995, Strubin et al. 1995, Fontes et al. 1996, Fontes et al. 1997a, Fontes et al. 1999). En 1996, nous avons décrit la première intéraction entre deux co-activateurs tissu-spécifiques CIITA et Bob 1. Le recrutement de Bob1 permet ainsi d'exposer deux surfaces d'activation pour une intéraction avec les TAFs et la machinerie de transcription de base. La seconde hypothèse est que Bob 1 est lui même un TAF spécifique aux cellules B et dans ce cas les intéractions avec d'autres TAFs créerait un complexe qui fixerait le CIITA avec une plus grande affinité et activerait la transcription avec une plus grande efficacité (Fontes et al. 1996). La formation de ce

complexe multiprotéique entre les protéines régulatrices et le complexe de préinitiation augmenterait l'expression des gènes de classe II et probablement d'autres gènes spécifiques aux cellules B. L'absence de l'expression de Bob1 pourrait être responsable en partie du faible niveau d'expression des gènes de classe II dans les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules somatiques (Fontes et al. 1996). Pour CBP, nous avons montré que l'inhibition de la transcription du CMHII par le récepteur aux glucocorticoides (GR) est due au recrutement intensif de CBP par le GR (Fontes et al. 1997). L'intéraction entre CIITA et p300, CBP (Fontes et al. 1997b, Krestovali et al. 1997) permettrait une acétylation globale des histones au niveau du CMH et une plus grande accessibilité [et] stabilité des complexes protéiques.

Ces intéractions avec les TAFs, des co-activateurs qui sont spécifiques aux tissus , avec des proteéines comme CBP, p300 et P-CAF, permettent non seulement de démontrer le rôle du domaine d'activation du CIITA dans la régulation de la structure chromatinienne par acétylation des histones H3 et H4 mais aussi dans l'engagement d'un complexe d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (ARNPII).

CIITA et P-TEFb contrôlent l'élongation de la transcription par l'ARNPII.

La transcription des gènes eucaryotes par l'ARNPII. est régulée à différents niveaux. Dans le cas de HIV-1LTR, l'ARNPII initie la transcription mais le taux d'élongation est très faible et insuffisant. Le coactivator Tat qui est nécessaire pour la réplication optimale du virus s'associe avec P-TEFb qui est composé de cyclin T1 et Cdk9 et cette association permet la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARNPII et l'élongation des transcripts. Nous avons recement démontré qu'il ya une compétition entre Tat et CIITA pour la liaison de la cycline T1 (CT1), ce qui permet d'expliquer l'immunodéficience chez les patients infectés par le HIV. Tat joue donc un rôle dans l'inhibition de la transcription du CMHII dans les infections HIV (Kanazawa et al. 2000).

Le dogme de l'élongation de la transcription :

Bien que P-TEFb soit essentiel pour la régulation des gènes impliqués dans la réponse au choc thermique (Lis et al. 2000), à la présentation de l'antigène et à sa réponse immunitaire (Kanazawa et al. 2000). Nos connaissances sur son rôle dans d'autres système ne sont pas très claires. Les membres de la famille Rel/NF-□B régulent la croissance, la transformation et l'apoptose cellulaire. Nous étions très intrigué par le flavopiridol (une substance en phase I des essais anti-cancereux) agissant comme agent anti-prolifératif et induisant l'apoptose cellulaire (Chao et al. 2000). L'implication de NF-κB dans les régulation de l'élongation de la transcription via P-TEFb, vient des observations de la réponse au TNFαcelle-ci

dépendant de l'intégrité des sites NF-κB du HIV-LTR. Nous avons donc émis l'hypothèse que NF-κB utilise la même machinerie que Tat et CIITA pour stimuler l'élongation de la transcription. Nous avons ainsi montré que NF-κB s'associe avec P-TEFb pour permettre l'élongation de la transcription par l'ARNPII. Cette association avec P-TEFb permet l'élongation de la transcription et la protection contre l'apoptose. Elle joue un rôle majeur dans la prolifération cellulaire et dans le cancer (Barboric et al. 2001). L'importance des différents complexes P-TEFb, l'étendue de son implication et le nombre des unités transcriptionelles restent une énigme très interessante. Nos dernières observations pour β-catenin, c-myc et VP16 (Jabrane-Ferrat unpulished data) nous permettent de penser que ce dogme pourrait être un phénomène général pour l'élongation de la transcription par l'ARNPII.

V. PROJETS DE RECHERCHE ET PERSPECTIVES

A court et moyen terme, je prévois de poursuivre mes travaux dans des axes pricipaux largement dépendants des recherches que j'ai effectué au préalable.

Objectif 1: Structure et fonction du complexe NFY/RFX

A. Intéractions entre les sous unités du complexe RFX:

Cette section nous révélera les surfaces des différentes protéines du complexe RFX qui intéragissent entre elles. Nous utiliserons les techniques que nous avons développées dans mon laboratoire à UCSF. Les intéractions in vitro seront corrélées par des études fonctionnelles in vivo.

A1. Intéractions entre RFXANK et RFX5: L'analyse des intéractions entre RFXANK et RFXAP nous révèle les bases moléculaire de deux groupes de complémentation BLS et montre la contribution d'une mutation ponctuelle au syndrome BLS (Nekrep et al. 2000). L'étape suivante est de déterminer comment RFX5 intéragit avec RFXANK et RFXAP et comment ce complexe se lie ensuite à l'ADN? Dans une première étape nous avons construit une série de protéines hybrides, GST-RFXANK (type sauvage) et différents fragments de RFXANK. Ces protéines ont été produites dans Ecoli et purifiées par colonne de chromatographie d'affinité. RFX5 type sauvage ou différents mutants (définis selon les bases de domaines connus où les prédictions de structure secondaire que nous avons obtenues par les algorithmes de Chu-Fassmann) portant un N-terminal Myc tag seront exprimés in vitro. De la même façon nous disposons d'une série de mutants GST-RFXANK et GST-RFXAP. Toutes les intéractions obtenues in vitro seront confirmées in vivo dans les cellules COS. La seconde étape étant de vérifier que ces protéines mutées supportent la formation d'un complexe au niveau de l'ADN. Probablement RFX5 et RFXANK de type sauvage ne pourront pas se lier à l'ADN, cependant des mutations de RFX5 contenant au moins le domaine de fixation à l'ADN (DBD) seront capables de former un complexe. Les techniques de DNAse I "footprinting" et des interférences par méthylation pourront nous révéler si les différents combinaisons entre le DBD de RFX5 et les autres sous-unités (RFXAP et RFXANK) se fixent sur les mêmes nucléotides au niveau du promoteur. La spécifité des intéractions sera contrôlée par des anticorps. La dernière étape consistera à vérifier l'ensemble du système dans les cellules de BLS où les mutants qui ne supportent plus les intéractions entre les unités de RFX ne devraient pas restituer l'expression des gènes du CMHII. Ces études sont linéaires dans lesquelles nous utiliserons des techniques que nous avons développées et optimisées dans le laboratoire. Cependant si les résultats ne sont pas satisfaisants et ne nous permettent pas de conclure, nous utiliserons les sytèmes de deux

hybrides, dans la levure et dans les cellules de vertébrés. Ce dernier pourrait être très utile spécialement si la formation du complexe nécessite les trois unités protéiques. Les expérimentations nous révélerons les surfaces précises de RFXANK et RFX5 qui intéragissent. L'importance des différentes structures : leucine riche, DBD pour RFX5 et "ankyrine repeats" pour RFXANK. Si les structures ankyrine sont impliquées, nous devrons comparer ces résultats avec ceux des intéractions avec RFXAP, Ets-1 et CIITA. Finalement, ces intéractions peuvent nous révéler les bases moléculaires d'autres mutations BLS.

A2. Intéractions entre RFXAP et RFX5: Ces études seront calquées sur ceux présentées ci-dessus. Si c'est nécessaire, nous utiliserons les systèmes à double hybrides dans la levure et dans les cellules de vertébrés.

A3. Intéractions entre RFX5 et RFX5: Récemment nous avons montré que RFX5 existe comme homodimère in vivo et in vitro et que la dimérisation est nécessaire à l'assemblage du complexe au niveau de l'ADN (Jabrane-Ferrat et al. submitted). Cette dimérisation peut être très importante pour expliquer nos observations antérieures sur l'occupation des boîtes S et X par le complexes RFX (Jabrane-Ferrat et al. 1996). Afin de tester cette notion, nous nous proposons d'utiliser le type sauvage et les mutants "chimera" RFX5VP16 dans un système de simple et double hybride de vertébrés avec les différentes combinaisons de CUS (SX, S, XY, SY) comme cibles. En plus, nous devons étudier le rôle de la formation de dimère dans la localisation de RFX5. Puisque la dimérisation de RFX5 peut affecter la formation de l'enhancéosome au niveau du promoteur. Nous nous proposons d'assembler NFY et RFX au niveau de l'ADN en présence de RFX5 type sauvage et mutant, au niveau du domaine de dimérisation. Les résultats de ces analyses nous permettront de prédire si les modifications post-traductionnelles de RFX5 sont nécessaires. Dans tous les cas de figures, par ces séries d'études, nous aurons définis les surfaces qui forment le complexe RFX et nous aurons obtenu une image assez détaillée de la structure du complexe.

B. Intéractions entre RFX et NFY:

Nous avons étudié en détail les intéractions entre RFX et NFY. Nous avons montré que NFY recrute sélectivement RFX et exclut RFX1-4 au niveau des promoteurs du CMHII (Fontes et al. 1997a) et que ce recrutement se fait par des intéractions directes entre RFXANK et NFYA et NFYB (Jabrane-Ferrat et al. submitted). Nous entreprendrons des études similaires à celles décrites dans la séction (A) afin de définir les surfaces exactes au niveau de chaque protéine qui permettent les intéractions. Ces surfaces seront "mutagenèsées" et utiliser pour bloquer les intéractions in vivo. Par la suite nous pourrons reconstituer les différents fragments et nous en servir comme réactifs pour l'assemblage d'un complexe de transcription in vitro. Ces études peuvent nous révéler la nécessité d'autres protéines pour l'assemblage de ce complexe in vitro.

Conclusion: A la fin de notre objectif 1, nous aurons une image précise sur l'assemblage de ces protéines au niveau des promoteurs de CMHII. Nous auront élucidé les différentes contraintes d'espacement, l'ordre de recrutement, les modifications post-traductionnelles et la possibilité de protéines additionnelles. Ces études élémentaires sont nécessaires pour l'assemblage d'un complexe productif de transcription et pour les essais ultérieurs d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Nous espérons que la plus part des bases moléculaires des lésions BLS nous seront révélées. Aussi bien la restitution que l'inhibition de l'expression des gènes du CMHII peuvent ainsi être envisagées.

Objectif 2: Structure et fonction du CIITA

Le recrutement du CIITA au CUS est l'étape principale pour la transcription des gènes du CMHII. La liaison directe du CIITA au complexe RFX/NFY n'a pas été observée in vitro. De plus, le mouvement du CIITA entre le noyau et le cytoplasme, les modifications post-traductionnelles et la formation d'homodimères l'ensemble contribuant tous au contrôle de la réponse immunitaire. Finalement, la LRR reste une région inexplorée de cette molécule: identifier, isoler, cloner et exprimer cette (ou ces) protéine(s), constitue un élément important dans la compréhension des méchanismes d'action du CIITA.

a. Intéractions entre NFY/RFX et CIITA.

Bien que plusieurs études ont apporté des données sur les intéractions entre CIITA et RFX, ou encore CIITA et NFY, ces études ont été éffectuées in vivo utilisant des techniques d'imuno-précipition à partir d'extraits cellulaires. Or on sait que dans les cellules n'importe quelle sous-unité de RFX ou NFY est capable de former un complexe stable avec les autres unités. Donc ce type d'intéractions ne traduit pas forcément l'association précise entre deux unités. Pour mieux définir ces intéractions nous avons cloné et exprimé une protéine de fusion GST-CIITA dans le système bacculovirus. Les protéines NFY et RFX seront synthétisées in vitro à l'aide du système de réticulocytes de lapin. Les essais de GST pull-down seront performés avec des protéines de différentes tailles afin de déterminer le domaine exact de ces intéractions. Nos résultats préliminaires ont montrés que aussi RFXs que NFYs intéragissent avec la partie centrale du CIITA qui exclut le domaine d'activation et la région LRR. De cette facon nous pourrons définir les domaines qui intéragissent avec NFYs ou RFXs. Si c'est nécessaire des mutations isolées ou groupées seront introduites dans chaque domaine. Toutes les intéractions obtenues in vitro seront corrélées à la fonction in vivo dans les cellules COS. Additionnellement, nous utiliserons notre système favorisé de double hybrides voire triple hybrides vertébrés dans les cellules de BLS, afin de confirmer les intéractions directes entre les différentes protéines. Il est important de définir les surfaces d'intéractions entre le CIITA et différents sous-unités qui se lient à l'ADN, car notre but final est de pouvoir assembler ce complexe in vitro. Ces études doivent nous révéler comment le CIITA est recruté

au niveau du promoteur. Nous attendons que NFYB et C ainsi que RFXANK et RFX5 se lient sur des surfaces adjacentes mais différentes au niveau du CIITA. Nos résultats préliminaires nous permettent de prédire que les structures ankyrin de RFXANK et la partie C-terminale de RFX5 intéragissent avec le CIITA, cependant pour NFY tout reste à définir.

b. Identification des protéines qui se lient sur la séquence LRR du CIITA:

Les structures LRR sont connues pour l'intéraction inter-protéiques. Notre groupe, ainsi que celui de V. Steimle (Jabrane-Ferrat unpublished, Hake et al. 2000) ont rapporté la présence d'une activité protéique de 33kDa qui se fixe sur le domaine C-Terminus du CIITA. Afin d'isoler et cloner cette protéine nous avons créé une colonne d'affinité avec l'hybride GST-LRR (CIITA 748-1130aa). Les extraits nucléaires préparés à partir des cellules Hela seront passés à travers cette colonne. Les techniques classiques de concentration par précipitation au sulfate d'ammonium suivies de chromatographie sur colonne d'héparine et d'élution à faible concentration de sel (0.4M), seront appliquées. Les protéines seront ensuite passées à travers la colonne d'affinité et éluées à différentes concentrations de sel. Les fractions actives in vitro, déterminées par gel shift, seront séparées en gel préparatifs et soumis au micro-séquençage. Ces étapes doivent nous permettre d'identifier la ou les protéines qui intéragissent avec le domaine LRR du CIITA. Ces protéines seront isolées et exprimées in vitro et in vivo, et examinées pour leur intéarction directe avec le CIITA et précisément la strutcture LRR. L'ARN seront examiné pour la complémentarité du groupe E de BLS. Grâce aux étapes préliminaires de chromatographie, nous avons en main une fraction qui permet de restituer le recrutement du CIITA aux facteurs protéiques fixés sur l'ADN. Cette fraction contient plusieurs candidats protéiques qui seront clonés et testés séparément. Nous continuerons les chromatographies afin d'identifier et isoler la (les) protéine(s) qui permet de recruter CIITA, au niveau du promoteur. Nous développerons des anticorps à ces protéines afin d'étudier leur importance in vivo. Nous n'excluons pas la possibilité que les extraits nucléaires apportent les protéines necéssaires pour modifier le CIITA (kinases et histone acétylases).

P33 peut représenter une composante important de l'enhancéosome. Son identification et son clonage sont d'une importance majeure pour la comprhénsion de la régulation des gènes du CMHII. Cette protéine a une grande affinité pour LRR donc son clonage ne doit pas représenter une étape bloquante dans la progression de nos travaux. En favorisant le recrutement du CIITA au niveau du promoteur, P33 doit nous permettre l'assemblage d'un complexe actif de transcription in vitro.

c. Modifications posttranslationnelles du CIITA

CIITA est une phosphosprotéine, qui possède plusieurs sites de phosphorylation spécifique à des kinases connues. De plus, CIITA est acétylé par P-CAF sur lysines 141 et 144 localisées à proximité du domaine

d'activation. Cette dernière modification permet d'améliorer sa rétention dans le noyau et donc augmente son activité (Spilianakis et al. 2000).

Phosphorylation du CIITA: L'observation qui nous a amenée à la phophorylation du CIITA repose sur le fait que le traitement de monocytes par le phorbol ester s'accompagne par une augmentation rapide de l'activité transcriptionnelle du CIITA. Nous nous proposons d'analyser les sites de phosphorylation du CIITA. En plus des techniques de western blotting par l'anticorps 4G10 qui reconnait les phosphotyrosine, le marquage radioactif au phosphorus nous permettra d'identifier les phosphopeptides et procéder à leur microséquençage. Les séquences précise des phosphopeptides nous permettront d'identifier les kinases impliquées. Une fois identifiés, les différents sites de phosphorylation seront mutagénesés soit à l'alanine ou à l'acide aspartique, ce dernier mime un état phosphorylé de la protéine. Les mutants seront examinés pour leur fonction in vivo en présence de CAT reporter. Les mutations seront ensuite introduite dans l'hybride EGFP-CIITA et analysés pour leur localization sub-cellulaire. Ces études doivent nous révéler la plupart des sites de phosphorylation. Une des difficultés que nous pourrons rencontrer serait due à la taille de la protéine et le nombre de sites de phosphorylation possibles. Dans un premier temps nous nous concentrerons sur la région P/S/T du CIITA qui contient le putative NLS (signal de localisation nucléaire) ainsi que le domaine de dimérization (Tosi et al. manuscript en prep.). Cette étude nous révélera de nombreux sites de phosphorylation qui pourront avoir un rôle important dans le traffic de la molécule et son activité. Le CIITA phosphorylé peut-être mieux recruté aux protéines fixées sur l'ADN.

ii. Dimérisation du CIITA: Nous avons montré que CIITA forme un homodimère in vivo et in vitro (Tosi et al. manuscript en prep.). Les résultats préliminaires ont montré que les séquences 253 à 322 et 408 à 669 jouent un rôle important dans la formation d'homodimère. De plus, cette formation du dimère est sensible à la température (dimère à 37^0C mais pas à 26^0C). La sensibilté, à la température, suggèreque des modifications sont nécessaires à la phormation du dimer. Une analyse plus détaillée nous permettra de bien identifier les modifications nécessaires à la formation du dimère. Nous définirons plus précisément la surface de dimérisation du CIITA. Les créations de mutations et l'analyse de la localisation du dimère et du monomère nous permettra ainsi d'établir la corrélation entre dimérisation et fonction. La définition du domaine de dimérisation est très difficile. Ceci est dû probablement à la nature du processus lui même. Nous prévoyons que la modification du CIITA par phosphorylation est impliquée,cependant on ne peut pas exclure la possibilité que l'acétylation peut jouer un rôle aussi. Dans un premier temps nous étudierons le rôle de l'acétylation dans la formation du dimère. Si l'acétylation est impliquée, nous nous proposons de changer les lysines 141 et 147 en glutamine afin de mîmer les lysines acétylées et en arginine pour présever la charge positive. Additionnellement, nous utiliserons les approches de double

hybrides pour mieux définir les surfaces de dimérisation. Une fois définies, ces surfaces seront utilisées comme séquences peptidiques pour bloquer la intéractions. Nous nous attendons que ces intéractions soient dynamiques, probablement les phospho-serines et –thréonines seront impliquées ainsi que des kinases comme PKC.

Notre objectif 2, nous permettra d'apprendre une grande partie de la biologie du CIITA, ses modifications posttraductionnelles et ses intéarctions avec de différents co-activateurs..

Objectif 3:

Nous nous orientons actuellement vers la notion que la réponse immunitaire est régulée par la succession des évenements suivants : (i) Assemblage et composition d'une plateforme avec les protéines qui se lient à l'ADN (RFX, NFY) permettant ainsi une faible acétylation des histones H3 et H4, (ii) expression du CIITA et son recrutement au niveau du promoteur (iii) engagement de plus d'activité HATs (CBP, p300, P-CAF) suivie d'une plus forte acétylation de H3 et formation du complexe d'initiation (iv) recrutement du P-TEFb et engagement de transcription active du CMHII. Bien que les mécanismes moléculaires de répression des gènes du CMH ne soient pas encore définis, on peut spéculer que l'arrêt d'expression des gènes du CMHII soit associé à une série de phénomènes inverses où il y aurait un désengagement de P-TEFb, CIITA, RFX, NFY, désacétylation des nucléosomes associés au promoter et formation d'hétérochromatine péricentrique.

a. <u>CIITA et remodelage de la chromatine:</u> La liaison directe du CIITA aevc les promoteurs du CMHII a été très difficile à démontrer. CIITA par lui même ne se lie pas à l'ADN (Steimle et al. 1993) et son recrutement au niveau au CUS nécessite la présence non seulement des complexes RFX et NFY mais aussi d'autres protéines présentes dans les extraits nucléaires (Jabrane-Ferrat et al. inpublished). In vivo, l'over-expression du CIITA permet de détecter sa présence au niveau du promoteur (Masternak et al. 2000) ce qui a permis de suggérer que le CIITA endogène intéragit aevc le promoteur. Par conséquent, le CIITA sert de bridge entre le promoteur, les histones acétylases et la machinerie de transcription de base.

Nous utiliserons les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIPs) couplée à la la réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (real-time PCR) pour étudier le rôle du CIITA au niveau des promoteurs du CMHII dans les cellules B et les cellules inductible par IFN-□. Afin d'éxaminer le CIITA endogène nous avons développé des anticorps spécifiques au CIITA. L'ADN isolé par ChIPs des cellules B ou des cellules Hela traitées au préalable par l'IFN-□ sera analysé par PCR pour la présence des éléments du promoteur DRA. Les produits de PCR seront ensuite quantifiés soit par southern blots ou par marquage durant les réactions de PCR. Pour déterminer si l'interaction du CIITA avec le promoteur est associée à l'acétylation des histones type H3 ou H4, les ChIPs seront effectués avec un anticorps spécifiques aux histones acétylés. Les résultats obtenus avec les cellules B seront comparés à ceux des

cellules de BLS qui sont défficientes soit dans les unités de RFX ou dans CIITA. Nous utiliserons également CIITA avec différentes mutations du domaine d'activation afin de différencier entre le rôle de ce domaine et l'activité acétyletransferase intrinsèque du CIITA lui même (Krestovali et al. 1998, Spilianakis et al. 2000, Fontes et al. 1999 et Raval et al. 2001). Nos résultats préliminaires permettent de suggérer que le CIITA dirige l'activité HAT vers une acétylation des histones H3 et que cette acétylation est probablement nécessaire pour l'activité du CIITA. La présence du CIITA permetterait l'ouverture de la chromatine pour une meilleure fixation des différents facteurs et pour l'activation de la transcription. Il est donc possible que CIITA induit une stimulation globale de l'acétylation des histones à travers tout le locus CMH permettant ainsi une méilleure accessibiltité et stabilité des différents facteurs protéiques.

b. Mécanismes de Repression du CIITA par les snARN: Les snARN dont l'ARN 7SK sont présents en abondance dans le noyau des cellules sous forme d'une complexe composé au minimum de huit protéines differentes. Des travaux récents ont montré que l'ARN 7SK inhibe de façon générale et spécifique l'activation de la trancription (Yang et al. 2001, Nguyen et al. 2001). L'intéraction entre l'ARN 7SK et P-TEFb inhibe la phosphorylation du CTD de l'ARNPII par la kinase CDK9.

P-TEFb est recruté au niveau du promoteur des gènes du CMH par intéraction entre CIITA et cycline T1 et probablement reste associé à l'ARNPII durant l'élongation de la transcription. Afin de déterminer le rôle de l'ARN 7SK dans l'inhibition de l'activation de la transcription par CIITA, nous utiliserons un promoteur DRA immobilisé sur des billes d'agarose couplées à la streptavidine. La réaction de la transcription sera assemblée in vitro par addition des extraits nucléaires purifiés de cellules Hela qui expriment de façon stable le CIITA. Le complexe assemblé sera analysé pour la présence de l'ARN 7SK. Nous disposerons de plusieurs lignées de cellules qui expriment des mutations du domaine d'activation du CIITA ou encore un hybride CIITA avec l'activation domaine de VP16. Les extraits nucléaires seront purifiés à partir de ces cellules et utilisés dans des réactions de transcription in vitro, des traitement par les RNAses (A), permettront de déterminer le rôle de 7SK. Dans un second temps, nous utiliserons les essais de "depletion" et d'addition de différents facteurs afin de déterminer le rôle du CIITA dans la dissociation du complexe P-TEF/7SK. De la même facon nous étudierons l'effet de l'induction de NF-kB sur la dissociation du complexe. L'inhibition de l'expression des gènes du CMHII par 7SK peut constituer la "loop de feedback" dans les cellules APC en dehors de la stimulation par antigène.

VI. CONCLUSION

La régulation de la transcription des gènes du CMHII représente un cas unique de régulation de transcription qui a bénificié d'une corrélation génétique. Plusieurs critères en ont fait un prototype de régulation de l'expression des gènes: i. Cette régulation représente le premier et peut-être le seul cas où l'on dispose d'un co-activateur qui est spécifique au gène lui même, ii. Elle fait partie des quelques exemples de régulation avec engagement d'un enhancéosome très complexe. iii. CMHII est un cas où l'assemblage, de surfaces combinatoriales médié par la coopérativité entre différentes protéines, est d'une importance cruciale. Une telle coopérativité est représentée par la liaison de plusieurs protéines à l'ADN (RFX, NFY, CREB/AP1, Ets 1). La spécificité du co-activateur CIITA est dictée par de faibles intéractions avec au moins six de ces protéines qui composent l'enhancéosome. Finallement, le coactivateur est impliqué dans les étapes de l'initiation et de l'élongation de la transcription par l'ARNPII. Les résultats issus de notre programme de recherche devraient nous permettre de mieux comprendre l'assemblage de l'enhacéosome au niveau des promoteurs. Ils doivent aussi nous révéler la fonction détaillée du coactivateur et en particulier l'évolution d'un complexe actif de transcription au cours des différentes étapes d'initiation et d'élongation.

Sur un plan imunologique, deux observations restent sans explications, le niveau réduit d'expression des gènes de classe I reporté dans certains patients et la présence de cellules $CD4^+$. CIITA et RFX5 sont des *trans*-facteurs des gènes de classe II, n'ont pas montré d'effet sur l'expression des antigènes de classe I. Aujourd'hui, il est difficile d'expliquer la baisse de classe I et le taux élevé des cellules T CD4+ dans certains cas de Bls. Cependant, il est probable que la compréhension de l'assemblage des différentes protéines régulatrices au niveau des promoteurs et leur interaction avec la machine de transcription nous permettra de mieux comprendre la régulation des gènes de classe II. L'expression du CIITA sert comme "switch on and off", alors que la disponibilité des éléments avec lesquels CIITA interagit (protéines régulatrices) sert pour limiter le taux de transcription. La caractérisation des mécanismes d'action du CIITA doit nous révéler les secrets de la régulation de la transcription des gènes de classe II. Elle peut également servir pour définir les thérapeutiques qui peuvent-être utilisées pour certains cancers. Le CIITA peut-être transféré aux cellules malignes induisant ainsi une augmentation de l'expression des gènes de classe II. Ces cellules pourraient eventuellement servir d'APC et constituer une cible pour une immunothérapie anti-cancéreuse. Les facteurs qui régulent l'expression des gènes de classe II peuvent également être utilisés dans les thérapeutiques pour les maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde (RA) et le diabète.

VII. IMPLICATIONS CLINIQUES

La dissection des mécanismes qui régulent de l'expression des gènes du CMH nous permettra de mieux comprendre les aspects fondamentaux de la réponse immunitaire. La présentation de l'antigène par les molécules de CMH et la reconnaissance par le récepteur des lymphocytes T a permis d'établir les bases moléculaires nécessaires à une optimisation rationnelle du signal à délivrer pour une activation efficace des lymphocytes T. Un des axes de recherché que nous sommes en phase de developer est basé sur la translation clinique des notions acquises à travers l'étude de la régulation de l'expression des gènes du CMHII. Les phénomènes moléculaires de cette communication entre la cellule présentatrice de l'antigène et le lymphocyte T devrait nous guider dans les choix de vaccination anti-tumorale (Jabrane-Ferrat 2001, San Antonio Communication Orale).

Immunité antitumorale, modèle de cancer du sein. Dans le but de developer un vaccin anti-tumoral, je travaille sur un modèle transgénique de cancer de sein où le transgène Her2/Neu du rat est sous le contrôle du promoteur MMTV. Afin de permettre aux cellules tumorales de mimer les cellules présentatrices différents systèmes de véctorisation l'ADN sont en phase d'exploration. Les souris développent des tumeurs mammaires spontanées à 32-36 semaines d'age. L'analyse pathologique de ces tumeurs a montré leur similairité au DCIS (ductal infiltrating carcinoma in sittu). Ainsi nous avons dévelopé plusieurs lignées exprimant soit un seul gène (CIITA, B7.1 ou IFN-γ) soit la combinaison de deux genes (CIITA et B7.1 ou B7.1 et IFN-γ ou CIITA et IFN-γ). L'expression et secrétion de l'IFN-γ par les cellules tumorales s'est avéré responsable de l'accéleration de la prise et de la croissance tumorale dans les souris transgéniques. Les effets du CIITA et du B7.1 sont sous investigations.

Modèle de l'arthrite inflammatoire: Les ADN codant pour CIITA, B7.1 et IFN-γ ont été placés dans des vecteurs sous le control du promoteur du collagène de type II. L'expression des gènes a été confirmée dans une lignée cellulaire de chondrocytes murins (MC615). Ces plasmids ont été injectés dans les pronuclei des oeufs fertilizés de souris (souche DBA/1XSVB). La prise a été de 18% pour CIITA, 27% pour B7.1 et 3.6% pour l'IFN-γ. Non seulement la prise été très faible mais aucune des souris n'exprimait le trangène IFN-γ. Nous avons conclu que l'IFN-γ était toxique pour le development des embryons. L'expression de CIITA et B7.1 transgenes a été confirmée par in sittu hybridization *in sittu* et immunohistochimie dans les chondrocytes et les synoviocytes. L'expression de CIITA ou de B7.1 transgène n'a pas eu d'effet par elle même, cependant la co-expression des deux transgènes a montré une inflammation au niveau des joints qui s'est manifeste par une faiblesse au niveau de grasping et

enfflement de la patte. Pour etablir une souche stable, Nous sommes en phase de croisement avec la souche DBA/1.

VII. REFERENCES

Barboric, M., Nissen, R.M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N. and B.M. Peterlin. NF-kB binds P-TEFb to stimulate transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell.*, 8 , 327-337.

Chao, S.H., Fujinaga, K., Marion, J.E., Taube, R., Sausville, E.A., Senderowicz, A.M., Peterlin, B.M. and D.H. Price, 2000. Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J. Biol. Chem.*, 275, 28345-28348

Fontes, J.D., Jabrane-Ferrat, N., and B.M. Peterlin, 1996. Binding and cooperative interaction between two B cell-specific transciptional coactivators. *J. Exp. Med.*, 183, 2517-2521.

Fontes, J.D., Jabrane-Ferrat, N., and B.M , Peterlin, 1997a. Assembly of functional regulatory complexes on CMH class II promoters *in vivo., J. Mol. Biol.,* 270, 336-45.

Fontes, JD, Jiang, B., and B.M. Peterlin, 1997b. The class II trans-activator interacts with TBP-associated factor TAFII32. *Nuc. Acids Res.*, 25, 2522-2528.

Fontes, JD, Kanzawa, S. Jean, D., and B.M. Peterlin, 1999. Interactions between the class II transactivator and CREB binding protein increase transcription of major histocompatibility complex class II genes. *Mol. Cell. Biol.,* 19, 941-947.

Griscilli, C., B. Liowska-Grospierre, and B. Mach, 1989. Combined immunodeficiency with defective expression in CMH class II gènes. *Immunodef. Rev.*, 1, 135-153.

Hake, SB, Masternak, K., Kammerbauer, C., Janzen, C., Reith, W., V., Steimle, 2000. CIITA leucine-rich repeats control nuclear localization, in vivo recruitment to the major histocompatibility complex (CMH) classII enhanceosome and CMH class II gene transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7716-7725.

Jabrane-Ferrat, N. and B.M. Peterlin, 1994. Ets-1 Activates the DRA Promoter in B Cells. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 7314-7321.

Jabrane-Ferrat, N., Fontes, J., Boss, J., and B.M., Peterlin, 1996. Complex architecture of major histocompatibility complex class II promoters: reiterated motifs and conserved protein-protein interaction. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 2517-2521.

Jabrane-Ferrat, N., Nekrep, N, Tosi, G., Esserman, L.J., and B.M., Peterlin. CMHII Transcriptional platform: RFX5 Dimers recruit NFY and RFX to DNA. *Submitted Mol. Cell. Biol.*

Jabrane-Ferrat, N., and B.M., Peterlin. Assembly of CMHII transcriptional enhanceosome: recruitment of class II transactivator to DNA. *In prep.*

Jabrane-Ferrat, N., Campbell, M., Peterlin B.M. and L.J., Esserman,. CMH class II transactivator and costimulatory molecules as gene therapy for mammary tumors. *In prep.*

Kanazawa, S., Okamoto, T., and B.M. Peterlin, 2000. Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of CMH class II genes in HIV infection. *Immunity*, 12, 61-70

Krestovali, A., Agalioti, T., Spilianakis, C., Tzortzakaki, E., Merika, M., and J., Papamatheakis, 1998. Involvement of CREB binding protein in expression of major histocompatibility complex class II genes via interaction with class II transactivator. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6777-6783.

Lim, C.S., Jabrane-Ferrat, N., Fontes, J.D., Okamoto, H., Garovoy, M.R., Peterlin, B.M, A. Hunt, 1997. Sequence-independent inhibition of RNA transcription by DNA dumbbells and other decoys. *Nucleic Acids Res.*, 25, 575-81.

Lis, J.T., Mason, P., Peng, J., Price, D.H., and J., Werner, 2000. P-TEFb kinase recruitment and function of heat shock loci. *Genes Dev.*, 14, 792-803

Lisowska-Gropierre, B. et al., 1994. Two complementation groups account for most cases of inherited CMH class II deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 953-958

Luo, Y. and R.G. Roeder, 1995. Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B-Cell-specific transcription coactivator OCA-B. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 4115-4124.

Masternak, K. Barras, E., Zufferey, M., Conrad, B., Corthals, G., Aebersold, R., and W. Reith, 1998. A gene encoding a novel RFX-associated transactivator is mutated in the majority of CMH class II deficiency patients. *Nat. Genet.*, 20, 273-277.

Nekrep, N., Jabrane-Ferrat, N., and B.M., Peterlin, 2000. Mutations in the bare lymphocyte syndrome define critical steps in the assembly of the RFX complex. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 4455-4461.

Nekrep, N., Geyer, M., Jabrane-Ferrat, N., and B.M. Peterlin, 2001. Analysis of ankyrin reveals how a single point mutation in RFXANK results in bare lymphocyte syndrome. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5566-5576.

Reith, W. and B. Mach, 2001. The bare lymphocyte syndrome and the Regulation of CMH expression, *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 331-73.

Nguyen, V.T., Kiss, T., Michels, A.A, and O. Bensaude, 2001. 7Sk small nuclear RNA binds and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes, Nature, 414, 322-325.

Nagarajan, U.M., Louis-Plence, P., DeSandro, A., Nissen, R., Bushey, A., and J.M., Boss, 1999. RFX-B is the gene responsible for the most common cause of the bare lymphocyte syndrome. *Immunity*, 10, 153-162.

Peijnenburg, A., van den Berg, R., Van Eggermond., M.J., Sanal, O., Lennon, A.M., Alcaide-Loridan, C., and P.J., van den Elsen, 2000. Deffective CMH class II expression in an CMH class II deficiency patient is caused by a novel deletion of a splice donor site in CMH class II transactivator gene. *Immunogenetics*, 51, 42-49.

Raval.A. et al., 2001. Transcriptional coativator CIITA is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAFII250. *Mol.Cell*, 7, 105-115.

Steimle V, et al. 1993. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in heriditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). Cell, 75, 135-146.

Steimle, V., et al., 1995. A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary CMH class II deficiency (bare lymphocyte syndrome). *Genes Dev.*, 9, 1021-1032.

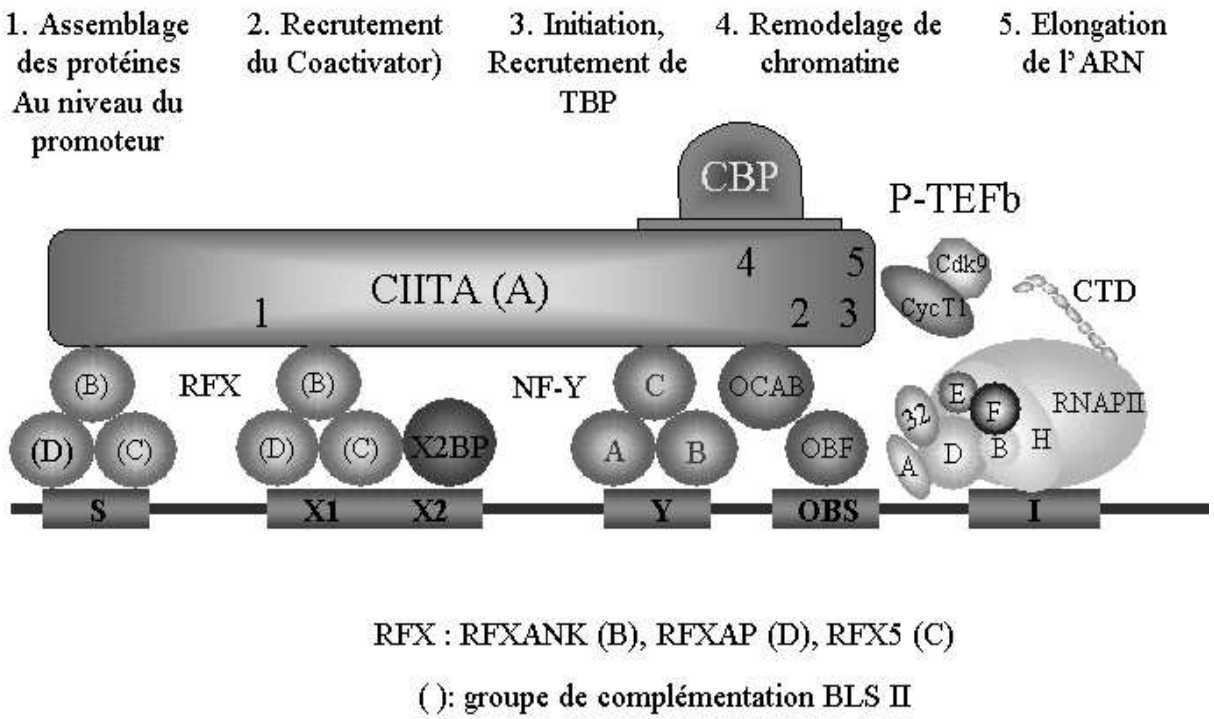
Strubin, M., J.W. Newell, and P. Matthias, 1995. OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. Cell, 80, 497-506.

Voliva, C., N. Jabrane-Ferrat, and B.M. Peterlin, 1996. The function of the octamer-binding site in the DRA promoter. Immunogenetics, 43, 20-26.

Yang, Z., Zhu, Q. and Q. Zhou, 2001. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription, Nature, 414, 317-322

Zhang, X-Y., Jabrane-Ferrat, N., Asiedu, C. K., Samac, S., Peterlin, M.B., and M. Ehrlich, 1993. The CMH class II promoter-binding protein RFX/NFX is a methylated DNA binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 6810-6818.

Organisation des Promoteurs du CMHII



RFX : RFXANK (B), RFXAP (D), RFX5 (C)

( ): groupe de complémentation BLS II

Fig. 1. Organisation du promoteur HLA DRA. Les boîtes S, X et Y, sont nécéssaires à l'expression constitutive et induite des gènes de classe II. Une séquence Octamer et un initiateur qui sont responsables de la position du complexe de transcription. Les facteurs régulateurs se fixent sur les différentes séquences. CIITA est mutés dans le groupe A de BLS. RFXANK, RFXAP et RFX5 lient les boîtes S et X et sont mutées dans les groupes B, C et D de BLS. NFY permet la fixation selective de RFX5.

ANNEXES

Organigramme du laboratoire HHMI du Dr. B.M. Peterlin

Publications Sélectionnées

Article 1:
Jabrane-Ferrat, N. and B.M., Peterlin, 1994. Ets-1 activates the DRA promoter in B cells. *Mol. Cell. Biol.:* 14, 7314-21.

Article 2:
Jabrane-Ferrat, N., Fontes, J., Boss, J., and B.M., Peterlin, 1996. Complex architecture of MHC class II promoters: Reinterated motifs and conserved protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.:* 16, 4683-90.

Article 3:
Fontes, J., **Jabrane-Ferrat, N.**, Toth, C., and B.M., Peterlin, 1996. Binding and cooperative interaction between two B cell- specific transcriptional co-activators. *J. Exp. Med.:* 183, 2517-21

Article 4:
Nekrep, N., **Jabrane-Ferrat, N.**, and B.M., Peterlin, 2000. Mutations in the bare lymphocyte syndrome define critical steps in the assembly of the RFX complex. *Mol. Cell. Biol.:* 20, 4455-61.

Article 5:
Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, **Jabrane-Ferrat N**, and B.M., Peterlin, 2001. NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell*: 8, 327-37.

Article 6:
Nekrep, N., Geyer, M., **Jabrane-Ferrat, N.**, and B.M., Peterlin, 2001. Analysis of ankyrin repeats reveals how single point mutations in RFXANK results in bare lymphocyte syndrome. *Mol. Cell. Biol.:* 21, 4455-61.

Article 7:
Jabrane-Ferrat, N., Nekrep, N, Tosi, G., Esserman, L.J., and B.M., Peterlin. MHCII Transcriptional platform: RFX5 Dimers recruit NFY and RFX to DNA. *Mol. Cell. Biol. In press*

HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE &
UNIVERSITY OF SAN FRANCISCO CALIFORNIA
COMPREHENSIVE CANCER CENTER
GENE REGULATION AND MOLECULAR IMMUNOLOGY

Directeur: Pr. B.Matija PETERLIN, HHMI Investigator

THEME I : BARE LYMPHOCYTE SYNDROME AND MAJOR HISTOCOMPATIBILTY II GENES DISREGULATION

Personnel	Appartenance
Nabila Jabrane-Ferrat, Ph.D.	Assistant Professor
Satoshi Kanazawa, Ph.D.	Post-Doctorant
Giovanna Tosi	, Ph.D. Post-Doctorante
Nada Nekrep	Etudiante
Misako Igarashi	Technicienne

THEME II: IMMUNOTHERAPIE DU CANCER DU SEIN

Personnel	Appartenance
Nabila Jabrane-Ferrat, Ph.D.	Assistant Professor
Laura Esserman, MD	Professor Breast cancer Surgery
Micheal Campbell, , Ph.D.	Assistant Professor
Hana Dalazolova, , Ph.D.	Post-Doctorante

THEME III: TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HIV

HIV Groupe 1: TAT

Personnel	Appartenance
Koh Fujinaga, Ph.D.	Post-Doctorant
RanTaube, Ph.D.	Post-Doctorant
Xin Lin, Ph.D.	Post-Doctorante
Fan Zhang, Ph.D.	Post-Doctorant
Matjaz Barboric	Etudiant

HIV Groupe 2: NEF

Personnel	Appartenance
Thomas Linnemann, Ph.D.	Post-Doctorant
Yong-Hui Zheng, Ph.D.	Post-Doctorant

Laboratory Manager: Dan Irwin
Secretaire: Paula Zupanc Ecimovic

Modulation de l'expression des antigènes HLA de classe I et II et modification de la susceptibilité à la lyse NK et LAK par l'interféron gamma

Dès mon stage de post-doc, j'étais impliquée dans la formation des étudiants et la supervision de leur projets de recherche. J'ai par la suite obtenu une position d'assistant professor. En plus des tâches d'encadrement des étudiants et post-doctorants, j'organise des réunions hebdomadaires avec les différents groupes de l'unité et J'assure des "lectures" au sein du "cancer center" à UCSF

L'expression des gènes du Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)est régulée au niveau de la transcription. Nos travaux ont montré que l'assemblage d'une plate-forme protéique et la constitution d'un enhanceosome joue un rôle fondamental dans l'expression de ces gènes. Actuellement, ous portons un interêt particulier aux modifications post-transcriptionelles des protéines régulatrices du CMHII.