

Ubiquitinylation et déubiquitinylation dans la régulation de l'activité du facteur de transcription NF- κ B

Konstantinos POALAS

Contexte international de la régulation du NF- κ B et objectifs du projet

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle essentiel dans le développement, l'homéostasie, la survie du système immunitaire, mais également dans la propagation de certains lymphomes. Les dimères NF- κ B formés par la combinaison de protéines de la famille Rel sont séquestrés dans le cytosol par leurs inhibiteurs I κ Bs. En réponse à une stimulation, le complexe IKK (« Inhibitor of NF- κ B kinase », composé des sous-unités catalytiques α et β et de la sous-unité régulatrice NEMO) phosphoryle les I κ Bs, entraînant leur dégradation rapide par le protéasome. Une fois libre, NF- κ B rejoint le noyau où il déclenche la transcription de ses gènes cibles (Figure 1). Dans les lymphocytes T, la stimulation des récepteurs antigéniques assemble une plateforme multiprotéique qui fonctionne comme un centre névralgique pour le recrutement et l'activation du complexe IKK (phosphorylation de IKK β et ubiquitination non dégradative de NEMO). Bien que la composition exacte de ce signalosome reste méconnue, la protéine d'échafaudage CARMA1, l'hétérodimère BCL10/MALT1 (complexe CBM) sont essentiels pour relayer le signal NF- κ B. Une chorégraphie subtile de phosphorylations, d'ubiquitinylations et de changements de conformation contrôle l'activité du CBM. En particulier, l'ubiquitinylation non dégradative impliquant la lysine 63 de l'ubiquitine des oligomères BCL10/MALT1 libère leurs fonctions NUT (« NF- κ B ubiquitinylated transmitter ») et autorise l'activation de NF- κ B. Les E3 ligases qui catalysent l'ubiquitinylation de

Récemment, nous avons identifié la kinase CK1 α comme un régulateur bimodal de l'activation lymphocytaire. En plus de sa fonction adaptatrice positive, CK1 α phosphoryle CARMA1 dans une boucle de rétrocontrôle négatif. De plus, l'élimination de CK1 α dans un sous-type de lymphome B (« Activated B-Cell like subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma », ABC DLBCL), dont la survie dépend de l'axe CBM-NF- κ B est toxique, révélant son rôle dans les processus d'addiction non oncogéniques. Si NF- κ B émerge comme une cible thérapeutique attractive dans le traitement de certains lymphomes tels que les ABC DLBCL, son inhibition générale pourrait avoir des conséquences délétères tant il régule de multiples processus physiologiques. Cibler sélectivement des composés propres à une voie donnée semble donc une stratégie adaptée. C'est pourquoi nous proposons de mieux comprendre comment le récepteur antigénique T (TCR) active puis régule négativement NF- κ B selon deux axes complémentaires :

1. Comprendre les mécanismes de rétrocontrôle de l'activation de NF- κ B via le criblage d'une librairie de siRNA ciblant la famille des DUBs.

2. Définir comment les organites intracellulaires intègrent des signaux externes pour les convertir en un signal hautement régulé. Nos expériences suggèrent que le réticulum endoplasmique (ER) ancre des signalosomes secondaires requis pour la propagation de NF κ B.

DUBs et USP34

Comprendre comment les cellules intègrent des signaux externes pour les convertir en messagers capables de mettre en place une réponse adaptée est un intense terrain de recherche. Toutefois, les mécanismes moléculaires en charge de

ramener les cellules vers leur état basal restent toujours mal caractérisés. Ceci est particulièrement évident pour les processus d'ubiquitination réversibles. Afin d'identifier de nouveaux régulateurs négatifs de l'activation de NF- κ B, nous avons criblé par bioluminescence une librairie de siRNA dirigés contre les DUBs codées par le génome humain (98 cibles, 2 siRNA/cible). Des cellules Jurkat E6.1 ont été transfectées avec les siRNA, puis avec un vecteur qui code l'enzyme luciférase sous contrôle du NF- κ B. L'activité transcriptionnelle de NF- κ B a été normalisée par l'activité d'un deuxième plasmide codant pour luciférase de Renilla de façon stable et indépendante. La stimulation du récepteur antigénique T (TCR, T-cell receptor) a été mimée par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ou par une mixture de PMA et de ionomycine. Ceci a permis l'identification de la protéine Ubiquitin Specific Protease 34 (USP34). La réduction des niveaux endogènes de USP34 potentialise l'activation de NF- κ B en réponse à l'engagement du TCR. Cette activation exacerbée de NF- κ B est comparable à la situation observée en l'absence de la DUB CYLD (cylindromatosis), classiquement impliquée dans le rétrocontrôle de NF- κ B.

Nos expériences de fractionnement subcellulaire indiquent que USP34 est une protéine cytosolique de 404 kDa notablement absente du noyau ou des organites. Le domaine catalytique de USP34 a été caractérisé. Par RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), nous montrons que l'absence de USP34 potentialise l'expression de gènes cibles de NF- κ B (mRNA de NFKBIA, IL-2, TNF-R). Supportant ces résultats, la production et sécrétion de la protéine IL-2 quantifiée dans le surnageant de culture cellulaire par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est accrue sans USP34. *A contrario*, l'expression ectopique du domaine catalytique de USP34 est capable de réduire l'activité de NF- κ B dans la voie de signalisation de TCR.

Afin de mieux appréhender le rôle de USP34 dans le rétrocontrôle négatif de l'activité de NF- κ B, nous avons étudié la séquence des événements d'un point de vue moléculaire. Les réactions précoces de signalisation, comme la phosphorylation globale de tyrosines, l'assemblage du complexe CBM et l'ubiquitinylation des adaptateurs BCL10 et MALT1, ne sont pas altérées en absence de USP34. Des expériences de co-immunoprécipitations ont montré qu'aucun composant élémentaire de la voie de signalisation du NF- κ B n'interagit avec USP34. De plus, les signaux qui émanent du TCR (parallèlement au NF- κ B) et mènent à l'activation des facteurs de transcription NFAT et AP-1 (via MAPK) ne sont pas affectés (profil de phospho-ERK et bioluminescence). Des extraits nucléaires de cellules stimulées ou non, en présence ou en absence de USP34, ont été analysés par immunoblot et soumis à EMSA non radioactif (electrophoresis mobility shift assay). Cette expérience a montré qu'en dépit d'une distribution nucléaire de NF- κ B p65 identique (résultat également obtenu aussi par des expériences d'immunofluorescence), l'affinité pour l'ADN de p65 était augmentée en absence de USP34. Par ailleurs, la résynthèse de I κ B α , dans les fractions cytosoliques et dans les lysats totaux, après sa dégradation est retardée dans les cellules dans lesquelles l'expression de USP34 a été réduite.

Nous avons ensuite évalué si l'absence de USP34 exacerbe également l'activation de NF- κ B en réponse à la stimulation par du TNF α et en réponse à un stress genotoxique. Ces deux signaux activent NF- κ B indépendamment du TCR. Là encore, l'activation de NF- κ B est augmentée significativement dans les cellules dépletées de USP34. L'analyse par immunoblot des lysats des cellules stimulées avec du TNF α a aussi révélé un retard de resynthèse de I κ B α . Comme cet effet est commun dans les trois voies de signalisation testées, nous avons évalué le profil de

phosphorylation du complexe IKK qui reflète son l'activité. Celle-ci n'est pas augmentée en absence de USP34 après traitement avec une mixture de PMA/ionomycine ou avec du TNF α . Au contraire, la phosphorylation du complexe IKK semble même plus faible après traitement avec une mixture de PMA/ionomycine, probablement via un mécanisme de rétrocontrôle négatif de NF- κ B.

En résumé, nos résultats indiquent que la protéine cytosolique USP34 régule spécifiquement la signalisation NF- κ B en réponse à l'engagement de différents immunorécepteurs, en agissant en aval du complexe IKK, afin de stabiliser I κ B α et éviter l'activation excessive du NF- κ B. Le mécanisme exact demeure méconnu (Tableau 1).

Tableau 1. Modèle de régulation de NF- κ B par USP34

Effet d'élimination d'USP34	Actif	Passif
NF- κ B direct	Augmentation de l'affinité pour le DNA	Pas de recrutement de I κ B ou des corépresseurs ou stabilisation du transcriptosome
NF- κ B indirect	Augmentation de l'affinité pour le DNA via des cofacteurs	Pas de recrutement de I κ B ou des corépresseurs ou stabilisation du transcriptosome

NUTs et MTDH

Les mécanismes par lesquels les adaptateurs ubiquitylés (NUTs – NF- κ B ubiquitylated transmitters) recrutent IKK et activent NF- κ B sont en cours d'élucidation. Les modèles récents suggèrent qu'un processus en deux étapes assemble tout d'abord un premier signalosome apical à proximité de l'immunorécepteur, qui mature ensuite dans le cytosol pour accéder à IKK et NF- κ B. Puisque certains complexes cristallisent à la surface d'organites intracellulaires

comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique (ER), nous avons étudié l'impact de ces organelles sur la génération et l'accumulation des NUTs ainsi que sur la transmission du signal NF- κ B. Afin d'isoler les organites, nous avons mis au point un protocole reposant sur une lyse mécanique des cellules dans un tampon isotonique suivie par une série de centrifugations différentielles. Ceci nous a permis d'isoler des membranes lourdes (HM – heavy membrane) qui contiennent ces organites et d'étudier leur structure et leur composition dans le but d'identifier des nouvelles molécules impliquées dans les voies activantes NF- κ B.

Des cellules HEK293T (rénales), BL41 (lymphocytes B) et Jurkat E6.1 (lymphocytes T) ont été stimulées avec du TNF α , du CD40L et un mélange de PMA et d'ionomycine respectivement et leurs organites purifiés et analysés par immunoblot. La forme ubiquitinylée de NUTs a été détectée dans les fractions HM et pas dans la fraction cytosolique, seulement après stimulation. Dans le cas du TCR, nous montrons que la disruption du complexe CBM (via élimination de CARMA1 ou de MALT1) supprime l'ubiquitylation de BCL10. A l'inverse, l'élimination de NEMO, qui agit en aval du CBM, n'a pas d'effet sur le profil d'ubiquitylation du BCL10. Par ailleurs, la surexpression de BCL10 entraîne l'accumulation de sa forme ubiquitinylée dans la fraction HM. Cet événement est inhibé par la mutation des lysines acceptrices d'ubiquitylation dans la séquence de BCL10. Ceci suggère que l'ubiquitylation des NUTs est un prérequis pour leur localisation membranaire.

La fraction HM contient des compartiments membranaires des plusieurs origines. Nous avons donc réalisé des expériences complémentaires afin d'identifier plus en avant les organites qui recrutent les NUTs. Des gradients de densité ainsi que des centrifugations supplémentaires permettent d'éliminer les membranes plasmiques, les lysosomes et les mitochondries dans ce processus, suggérant que l'accumulation

des NUTs après stimulation a lieu au niveau du réticulum endoplasmique (ER). Enfin, le traitement de la fraction HM avec de la trypsine permet d'éliminer les NUTs, suggérant que l'accumulation des NUTs se fait sur la face cytosolique du ER.

Nous avons également utilisé un système acellulaire afin d'évaluer si la présence de l'information moléculaire nécessaire pour la transmission du signal se trouve au niveau du ER. Le statut de phosphorylation de I κ B α (qui témoigne de l'activité du complexe IKK) a été évalué par une réaction *in vitro* dans un mélange de fractions cytosoliques issues de cellules non stimulées et de fractions HM de cellules HEK293T, BL41 et Jurkat stimulées avec du TNF α , du CD40L et des anti-CD3/anti-CD28 respectivement. Les fractions HM activées sont capables d'induire la phosphorylation de I κ B α des fractions cytosoliques des cellules non activées de manière dose-dépendante. Des expériences complémentaires utilisant des fractions enrichies en ER de cellules activées ont confirmé l'implication du ER dans le processus de transmission du signal.

Des expériences d'immunoprécipitation (IP) de BCL10 et de RIP1 dans des lysats de cellules Jurkat et HEK293T stimulées suivies d'une analyse de spectrométrie de masse a permis l'identification de la protéine transmembranaire Metadherin (MTDH). Notre analyse par microscopie confocale indique que la MTDH est localisée au niveau de la membrane du ER et sa distribution n'est pas modifiée après stimulation par du TNF α ou de PMA/ionomycine. Des expériences de co-IP de RIP1, BCL10 et TRAF2 ont confirmé leur interaction avec MTDH de façon signal-dépendant. L'IP réverse de MTDH a également montré l'interaction avec des formes ubiquitinylées de RIP1 après stimulation dans des cellules HeLa. Par ailleurs, MTDH est capable de lier avec une plus forte affinité des chaînes synthétiques d'ubiquitine de type K63 que des chaînes de type K48 *in vitro*. Le domaine responsable de cette interaction se

situe entre le 200^{ème} et le 300^{ème} acide aminé. Collectivement, nos résultats indiquent que les NUTs ubiquitinylés sont reconnus et recrutés par MTDH au niveau du ER en réponse à des cytokines et à une stimulation antigénique, probablement via des chaînes d'ubiquitine de type K63.

La réduction des niveaux d'expression de MTDH par ARN-interférence dans des cellules HEK293T empêche l'accumulation des formes ubiquitinylées des NUTs après stimulation par du TNF α , et entraîne une diminution de l'activation de NF- κ B et de la production de cytokines. La translocation nucléaire de p65 est inhibée et la phosphorylation et la dégradation d'I κ B α sont diminuées, mais sans affecter les voies MAPK/ERK. L'expression stable de shRNA dirigés contre une région non codante du mRNA de MTDH réduit également l'activation de NF- κ B en réponse à du TNF α dans des cellules Hela. Ce phénotype a été partiellement restauré par la réintroduction de MTDH par transfection. Dans le cas des cellules BL41 stimulées avec du CD40L, une diminution de l'activité de NF- κ B a été également observée. La voie JNK est aussi affectée mais pas les événements de la voie non canonique de l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Enfin, l'élimination de MTDH annihile également l'activation de NF- κ B après stimulation du TCR dans des cellules Jurkat. Toutefois, le profil de phospho-tyrosine et le flux de calcium ne sont pas modifiés, renforçant la spécificité de MTDH vis à vis de NF- κ B. L'élimination de la MTDH dans les cellules T primaires se traduit par une réduction de la prolifération et de l'expression du marqueur d'activation CD25. Des résultats similaires ont été obtenus dans des conditions de stimulations diverses, suggérant ainsi un rôle assez général de MTDH dans la régulation positive de l'activation de NF- κ B. Sans MTDH, la fraction HM des cellules stimulées n'est plus capable d'induire la phosphorylation de I κ B α de la fraction cytosolique des cellules non stimulées in vitro. De plus, les NUTs

ubiquitylés ne sont plus recrutés au niveau des HM, bien qu'ils soient normalement générés.

L'ensemble de ces résultats révèle une facette inattendue du ER et identifie MTDH comme un relai intracellulaire pour les NUTs, assurant l'activation optimale du facteur de transcription NF- κ B en réponse à divers signaux.