



THESE D'EXERCICE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 17 juin 2016
Par M. Paul Hermant

Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase 1 & 2
Cibles thérapeutiques émergentes pour la
modulation de la présentation antigénique

Membres du jury :

Président : Hélène Gras, Professeur des universités, laboratoire de Chimie Thérapeutique, faculté de Pharmacie de Lille

Assesseur : Rebecca Deprez-Poulain, Professeur des universités, laboratoire de Chimie Générale, faculté de Pharmacie de Lille

Assesseur : Benjamin Bertin, Maître de conférences des universités, laboratoire d'Immunologie, faculté de Pharmacie de Lille

Membre extérieur : Toufik Abache, Docteur en Biochimie, Responsable de laboratoire au laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies (LFB), parc Eurasanté, Loos



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPRez Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie Clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie Clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie Clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et économie Pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et économie Pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M.	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie Organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie Cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie

M.	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie Industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie Cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie Cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacologie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie Thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie Pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WILLEMAGNE	Baptiste	Chimie Organique
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie Pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	CUCCHI	Malgorzata	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et économie Pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION.....	10
I] IMMUNITE ET IMPLICATION DES ERAPS EN PHYSIOPATHOLOGIE	12
A] PHENOMENES DE RECONNAISSANCE PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	12
1] La présentation antigénique	12
2] Le système HLA.....	13
3] Spécificité du CMH-I.....	15
4] Spécificité du CMH-II.....	16
B] MECANISMES DE DEFENSE DU SYSTEME IMMUNITAIRE	18
1] Immunité innée	18
2] Immunité adaptative	19
C] LES ERAPS IMPLIQUES DANS LA PRESENTATION ANTIGENIQUE.....	21
1] Les ERAPS intégrés à la réponse immunitaire.....	21
2] Implication générale des ERAPS en physiopathologie	23
3] Le cancer.....	26
4] Les maladies auto-immunes.....	26
5] Les maladies infectieuses.....	28
II] CARACTERISTIQUES, LOCALISATION ET STRUCTURE DES ERAPS.....	29
A] MOTIFS STRUCTURAUX REMARQUABLES ET ROLE BIOLOGIQUE.....	29
B] RECONNAISSANCE DU SUBSTRAT ET BIOCHIMIE	33
C] DISTRIBUTION ET LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES ERAPS	36
D] STRUCTURE DES ERAPS	39
1] Domaines et structure tertiaire des ERAPS.....	39
2] Site catalytique des ERAPS	40
3] La poche S1.....	41
4] Le canal hydrophobe, la cavité interne et la poche S1'	43
5] Oligomérisation des ERAPS	44
6] Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNPs) et pathologie	46
III] MODULATION DES ERAPS	50
A] MODULATEURS NON SELECTIFS DES ERAPS	50
Inhibiteurs non sélectifs des ERAPS.....	50
1] L'acide hydroxamique acétique (AHA)	51
2] Le L-Leucinethiol (LeuSH)	52
3] La bestatine et l'amastatine.....	56
B] MODULATEURS SELECTIFS DES ERAPS	58
Inhibiteurs sélectifs des ERAPS.....	58
1] Les composés aminobenzamide.....	58
2] Composés phosphiniques	63
CONCLUSION.....	69
TABLE DES FIGURES.....	71
REMERCIEMENTS	72
BIBLIOGRAPHIE	73
DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE	79

Liste des abréviations

μM	micro molaire
3D	trois dimensions
A	alanine
AA	acide aminé
AHA	acide hydroxamique acétique
APN	aminopeptidase neutre humaine
BMDCs	cellules dendritiques de la moelle osseuse
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMH-I	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMV	cytomégalovirus
CPA	cellule présentatrice d'antigène
D	acide aspartique
DTT	dithiothreitol
E	acide glutamique
eCMH-I	complexe épitope-CMH-I
ERAAP	aminopeptidase du réticulum endoplasmique associé aux antigènes
ERAPs	aminopeptidases du réticulum endoplasmique
F	phénylalanine
G	glycine
GWAS	étude d'association pangénomique
H	histidine
HDAC	histone désacétylase
HLA	antigène des leucocytes humains
I	isoleucine
IC ₅₀	concentration inhibitrice 50
IFN- γ	interféron gamma
IRAP	aminopeptidase régulée par l'insuline
K	lysine
K _{cat}	constante de catalyse
K _i	constante d'inhibition
K _M	constante de Michaelis
KO	knock-out
L	leucine
LB	lymphocyte B
LeuSH	L-leucinethiol
LpNA	leucine <i>p</i> nitroanilide
LPS	lipopolysaccharide
LTCD4 ⁺	lymphocytes T CD4 positif
LTCD8 ⁺	lymphocytes T CD8 positif
M	méthionine

MM	Michaelis-Menten
MMPs	métalloprotéases matricielles
N	asparagine
NK	tueur naturel
NKCs	cellules tueuses naturelles
nM	nano molaire
nmol	nano mole
N-ter	extrémité N-terminale
P	proline
PAMP	cascade moléculaire associée aux pathogènes
PBR	région de liaison peptidique
pH	potentiel hydrogène
P-LAP	aminopeptidase placentaire
PRR	récepteur de reconnaissance des pathogènes
Q	glutamine
R	arginine
R-AMC	L-arginyl-7-amido-4-methyl coumarin
RE	réticulum endoplasmique
SA	spondylarthrite ankylosante
SER	société européenne de rhumatologie
SI	système immunitaire
SNPs	polymorphisme d'un seul nucléotide
T	thréonine
TAP	transport associé à la présentation antigénique
TCR	récepteur des cellules T
Treg	lymphocyte T régulateur
V_{max}	vitesse maximale
WT	type sauvage
X	divers acides aminés
Y	tyrosine
ZBG	groupement chélateur du zinc

Introduction

Les ERAPs qui font l'objet de ce manuscrit sont des aminopeptidases. La première aminopeptidase isolée et extraite de la levure a été découverte en 1942¹. Les aminopeptidases ont la particularité de catalyser l'hydrolyse de la liaison amide peptidique en l'extrémité N-terminale (N-ter) de leurs substrats. Plus récemment, la L-leucine aminopeptidase placentaire (P-LAP) *Homo sapiens* a été découverte et clonée en 1996². Cette P-LAP humaine appartient à la famille M1 des métalloprotéases à Zinc et est une protéine paralogue de « l'insulin regulated aminopeptidase » (IRAP) du rat^{3,4}.

L'IRAP humaine est une enzyme multifonctionnelle. En effet, elle est impliquée dans de nombreuses physiopathologies, telles que dans la maladie d'Alzheimer^{5,6}, la présentation antigénique⁷ et l'homéostasie durant la grossesse⁸. Bien qu'elle soit structuralement proche de l'ERAP1 et de l'ERAP2, dans un souci de simplification, cette enzyme ne sera pas traitée dans ce manuscrit. Bien que cette protéine IRAP humaine (EC: 3.4.11.3) a permis par homologie la découverte de deux autres membres de la famille M1 des métalloprotéases à Zinc: les ERAPs. La famille des ERAPs (endoplasmic reticulum aminopeptidase) est composée de deux enzymes humaines homologues localisées dans le réticulum endoplasmique des cellules: l'ERAP1 (EC:3.4.11.-) et l'ERAP2 (EC:3.4.11.-).

D'une manière intéressante chez la souris une seule aminopeptidase orthologue se substitue aux deux humaines ERAP1 et ERAP2. Il s'agit de l'ERAAP (EC:3.4.11.-) pour « ER aminopeptidase associated with antigen processing » appartenant à la famille M1 des métalloprotéases à Zinc. Le rôle clef de l'ERAAP a été découvert en 2002, en effet l'ERAAP est le chaînon manquant entre la production de peptide cytosolique et leur association finale avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I)⁹ (phénomène décrit plus tard dans le manuscrit).

L'ERAAP murine a été inhibée par des molécules organiques^{10,11} et des modèles de souris

¹ R. Croxatto et *al.* Destruction of hypertensin and pepsitensin by an aminopeptidase obtained from yeast. *Science*. **1942**, vol. 96(2501), 519-520.

² T. Rogi et *al.* Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *J. Biochem.* **1996**, vol. 271, 56-61.

³ SR. Keller et *al.* Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biochem.* **1995**, vol. 270, 23612-23618.

⁴ SA. Ross et *al.* Characterization of the insulin-regulated membrane aminopeptidase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem.* **1996**, vol. 271, 3328-3332.

⁵ AL. Albiston et *al.* Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biochem.* **2001**, vol. 276, 48623-48626.

⁶ H. Matsumoto et *al.* Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. *Eur J Biochem.* **2001**, vol. 268, 3259-3266.

⁷ L. Saveanu et *al.* IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science*. **2009**, vol. 325, 213-217.

⁸ N. Yamahara et *al.* Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placenta during normal pregnancy. *Life Sci.* **2000**, vol. 66, 1401-1410.

⁹ T. Serwold et *al.* ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*. **2002**, vol. 419, 480-483.

¹⁰ GE. Hammer et *al.* In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nature Immunology*. **2006**, vol. 8(1), 101-108.

déficiences en ERAAP ont été produits¹² dans le but de valider cette cible en thérapeutique. Ces travaux ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes et des voies physiologiques impliquant les ERAPs humaines. Il faut retenir que l'ERAAP et l'ERAP1 humaine ont une homologie de séquence proche d'une valeur de 85.38% alors que l'ERAP2 et l'ERAP1 ont une homologie de 49.73% (Tableau 1).

Enzyme	Longueur	Identifiant UniProtKB	Nomenclature EC	Identité vs hERAP1
<i>Homo sapiens</i> (humain) ERAP1	941 AA	Q9NZ08	EC:3.4.11.-	100%
<i>Mus musculus</i> (souris) ERAAP	960 AA	Q9EQH2	EC:3.4.11.-	85.38%
<i>Homo sapiens</i> (humain) ERAP2	930 AA	Q6P179	EC:3.4.11.-	50.05%
<i>Homo sapiens</i> (humain) IRAP	1025 AA	Q9UIQ6	EC:3.4.11.3	44.10%

Tableau 1 | Alignement des séquences et pourcentage d'homologie réalisé par ClustalW2®.

Peu de travaux ont décrits les événements protéolytiques intervenant dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE)¹³. A l'inverse, les événements protéolytiques imputables aux protéases transmembranaires du RE dans la lumière cytosolique (tel que le clivage de peptides signaux¹⁴ et l'hydrolyse de liaisons amides spécifiques¹⁵) ont été largement étudiés. Par conséquent une meilleure compréhension des voies de signalisations, des mécanismes et des spécificités de cette voie ERAP possède un fort potentiel en thérapeutique. Cette voie physiologique ERAPs de par son originalité et sa fonction d'éditeur antigénique a fait l'objet récemment de nombreuses publications.

Ce travail propose de compiler les caractéristiques déterminantes des ERAP1 et ERAP2 et les outils pharmacologiques utilisés pour l'exploration de leurs potentielles implications dans trois grandes aires thérapeutiques, dans le but de conclure sur l'état de l'art actuel et sur les perspectives de recherche qu'offrent ces deux cibles enzymatiques émergentes. Dans un premier temps nous situerons les voies immunitaires associées aux ERAPs et les mécanismes d'action de ces deux enzymes. Le lien entre les ERAPs et de potentielles dérégulations pathologiques impliquées dans les trois grandes aires thérapeutiques de l'oncologie, de l'infectiologie et de l'auto-immunité sera discuté. La structure des ERAPs et l'étude de leurs polymorphismes génétiques seront exposées. Enfin les inhibiteurs chimiques de ces enzymes seront présentés, cela nous permettra de définir d'éventuels besoins en molécules inhibitrices et de statuer sur l'inhibition des ERAPs à court, moyen et long terme.

¹¹ A. Niranjana et al. Nonclassical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunology*. **2012**, vol. 13(6), 579-586.

¹² N. Blanchard et al. Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells. *J Immunol*. **2010**, vol. 184(6), 3033-3042.

¹³ A. Hattori et al. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biochemistry, physiology and pathology. *J Biochem*. **2013**, vol. 154(3), 219-228.

¹⁴ R. Fluhrer et al. Intramembrane proteolysis by signal peptide peptidases: A comparative discussion of GXGD-type aspartyl proteases. *J Biochem*. **2009**, vol. 284(21), 13975-13979.

¹⁵ MS. Wolfe et al. Intramembrane-cleaving proteases. *J Biochem*. **2009**, vol. 284(21), 13969-13973.

I] Immunité et implication des ERAPs en physiopathologie

Les informations apportées dans cette partie sur le système immunitaire (SI) ne sont pas exhaustives. L'objectif est d'obtenir une vue globale des mécanismes immunitaires afin de situer la fonction des ERAPs dans cette admirable machinerie cellulaire qu'est le système immunitaire.

Le système immunitaire est extrêmement complexe et les connaissances sur les mécanismes régissant ce système ne cessent de croître bien que le système immunitaire de chaque individu est unique. « *Nature is a mutable cloud which is always and never the same* » - Ralph Waldo Emerson. Le système immunitaire possède une composante héréditaire transmise à la naissance et une composante environnementale propre à chaque individu. Ce système autonome et adaptatif possède une grande plasticité.

Le système immunitaire discrimine le soi du non-soi; par conséquent il possède des effecteurs cellulaires doués d'un mécanisme de reconnaissance face aux microorganismes et à toutes substances étrangères du non-soi. Au mécanisme de reconnaissance s'ajoute un mécanisme de défense et de prise en charge des éléments étrangers potentiellement pathogènes. Ces mécanismes de reconnaissance et de défense sont coopératifs et efficaces grâce à une coordination fine du SI.

A] Phénomènes de reconnaissance par le système immunitaire

1] La présentation antigénique

La reconnaissance antigénique est un concept clef dans la compréhension des phénomènes physiologiques impliquant le système immunitaire. Celui-ci reconnaît les antigènes à l'aide de récepteurs localisés à la surface de ses cellules effectrices. Un antigène est une macromolécule naturelle ou synthétique qui, introduite dans un organisme, est capable d'y provoquer la stimulation des cellules immunocompétentes. Cette stimulation est responsable des réactions immunitaires à médiations cellulaires et humorales. La nature des antigènes est diverse. Ils sont issus, pour la majorité d'entre eux, de résidus protéiques, saccharidiques et de leurs dérivés lipidiques. L'origine des antigènes est variée. En effet, il existe des antigènes étrangers à l'individu (exogène) et des antigènes propres à l'individu (endogène).

Un antigène possède deux propriétés majeures qui sont :

- L'antigénicité : capacité de l'antigène à être reconnu par le système immunitaire.
- L'immunogénicité : potentiel d'un antigène à induire une réponse immunitaire.

Ainsi une substance peut être antigénique mais pas immunogène. De nombreux paramètres sont à prendre en compte concernant ces deux propriétés, notamment l'espèce de

l'organisme hôte, la dose d'antigène présente, les caractéristiques physico-chimiques et la forme de celui-ci en trois dimensions.

Un antigène est composé d'un ou de plusieurs épitopes. Un épitope est une petite partie d'une molécule antigène capable de s'associer au site de liaison (paratope) d'une molécule réceptrice d'antigène tel qu'un anticorps ou un récepteur des cellules T (TCR). Un même antigène peut comporter plusieurs épitopes (différents ou identiques) (Figure 1).

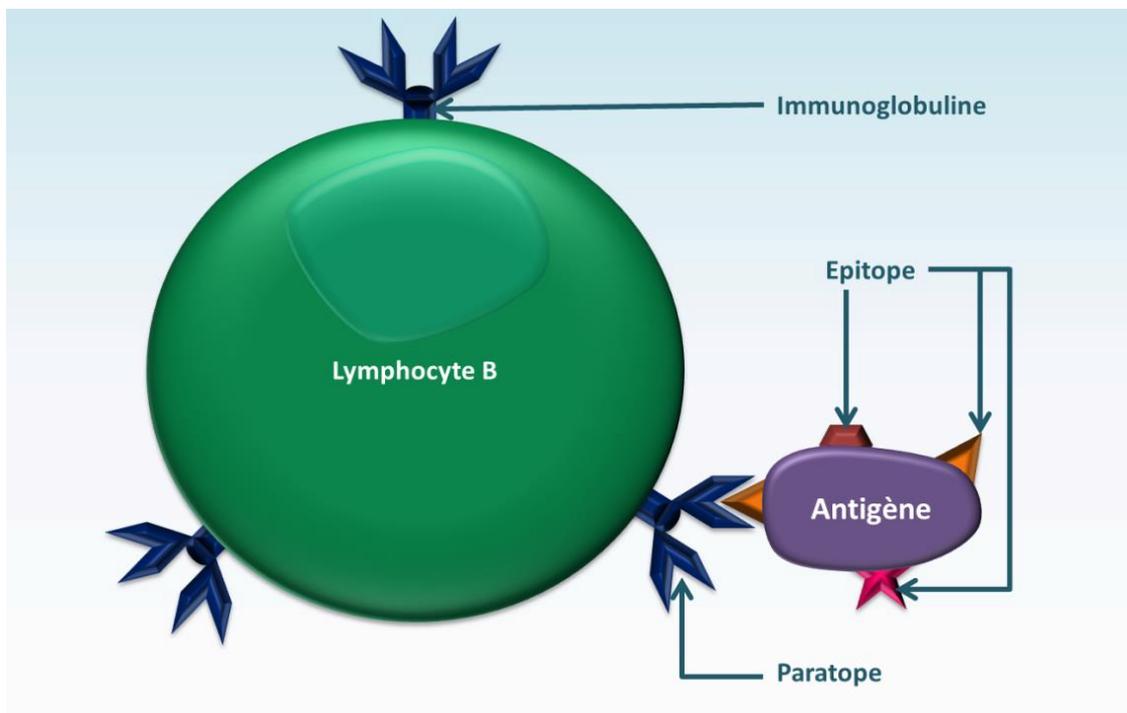


Figure 1 | Reconnaissance par un lymphocyte B d'un antigène par l'association épitope-paratope.

2] Le système HLA

Les antigènes des leucocytes humains (HLA) sont indispensables au système immunitaire de façon à discriminer le soi du non-soi. Les antigènes HLA sont codés par un groupe de gènes présent dans le bras court du chromosome 6 et d'une façon intéressante le code HLA d'un individu est unique. Ces antigènes HLA sont des macromolécules présent à la surface des cellules et elles permettent l'identification des cellules du soi par le système immunitaire. Le sigle HLA s'utilise en conjonction avec une lettre et un chiffre dans le but de désigner un allèle spécifique d'un locus donné. Par exemple le HLA-DRB1 désigne l'allèle B, du locus 1 du gène HLA-DR. Les antigènes HLA, également dénommés CMH pour complexe majeure d'histocompatibilité, sont divisés en trois groupes (Tableau 2).

Groupe	Allèle
CMH de classe I (CMH-I)	HLA-A
	HLA-B
	HLA-C
CMH de classe II (CMH-II)	HLA-DP
	HLA-DQ
	HLA-DR
Groupe de classe III	N'intervient pas dans la présentation antigénique

Tableau 2 | Allèles codants pour le CMH-I, le CMH-II et mention du groupe de troisième classe.

Il est à noter que le CMH-I et le CMH-II ne présentent que des molécules de natures protéiques, bien que certains polysaccharides puissent tout de même être présentés par cette voie.

Les molécules de classe I sont composées de deux chaînes polypeptidiques α (3 sous unités) et β (1 sous unité) associées de manière non covalente. La chaîne lourde α polymorphique est codée par les gènes HLA (A, B et C) tandis que la chaîne légère β non polymorphique est codée par un gène n'appartenant pas au système HLA. La chaîne β assure le maintien de la conformation du CMH-I. Les molécules du CMH-I sont constituées de quatre domaines caractéristiques (Figure 2) :

- La région PBR (peptide binding région), formée par les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, est semblable à une cavité dans laquelle ira se loger le peptide antigénique.
- La région formée des sous unités $\beta 2m$ et $\alpha 3$ fixe le CD8.
- Les régions transmembranaire et intra-cytoplasmique sont uniques et permettent l'ancrage du CMH-I aux membranes par la sous unité $\alpha 3$.

Les molécules de classe II sont composées de deux chaînes polypeptidiques α (2 sous unités) et β (2 sous unités) codées toutes les deux par les gènes HLA et associées de manière non covalente. Le CMH-II est constitué de quatre régions déterminantes (Figure 2) :

- Le domaine PBR, composé des sous unités $\alpha 1$ et $\beta 1$, forme une cavité dans laquelle ira se fixer le peptide antigénique.
- Le domaine formé des sous unités $\alpha 2$ et $\beta 2$ fixe le CD4.
- Les régions transmembranaire et intra-cytoplasmique sont constituées de deux segments. L'un issu de la chaîne α et l'autre provenant de la chaîne β .

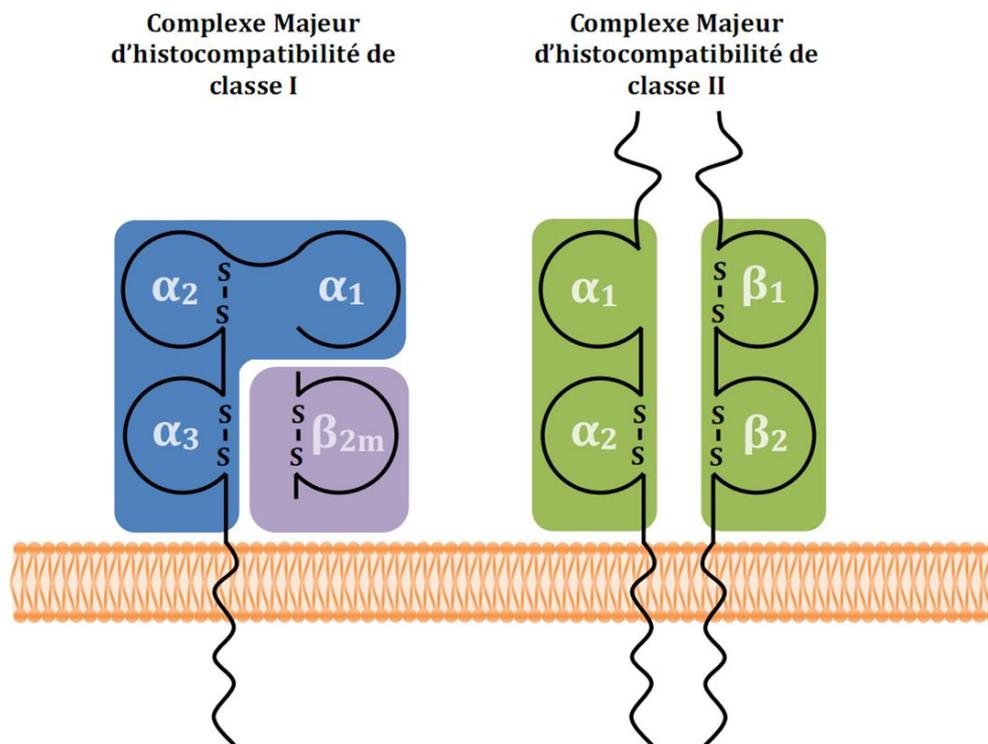


Figure 2 | Macrostructure du CMH-I et du CMH-II.
D'après le site <http://www.cours-pharmacie.com>

3] Spécificité du CMH-I

Les molécules CMH-I sont présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme à des taux variables en fonction du type cellulaire. Les cellules présentant le CMH-I à leur surface justifient ainsi, vis-à-vis du système immunitaire, leur appartenance au soi. Dans le cas où une cellule ne présente pas de molécule CMH-I ou présente un CMH-I modifié, elle sera détruite car considérée comme une cellule du non-soi.

Le CMH-I permet la présentation de peptides antigéniques produits dans la cellule aux lymphocytes T CD8 positifs (LTCD8⁺). Ces peptides sont des antigènes du soi ou des antigènes du non-soi mais produits par la cellule (ce qui peut être le cas lors d'infections virales). Par conséquent, dans ce cas, on considère ici les peptides endogènes provenant du cytoplasme. Les chaînes lourdes α et la chaîne légère β sont synthétisées de manière indépendante dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules. Les chaînes α et β s'associent à des protéines chaperonnes pour maintenir leur conformation. Deux molécules présentes dans la membrane du RE (TAP-1 et TAP-2) s'associent pour former un canal permettant le passage de peptides issus des digestions par le protéasome. Certains de ces peptides, une fois dans le RE, seront complexés avec le CMH-I. Cette complexation sera accompagnée par le relargage des protéines chaperonnes ce qui induira la migration du complexe vers la membrane plasmique via l'appareil de Golgi (Figure 3)¹⁶. Ce phénomène de présentation par le CMH-I s'apparente au phénomène de la présentation croisée (cross présentation) à la différence que les antigènes ERAPs dépendants présentés sont

¹⁶ JW. Yewdell et al. Making sense of mass destruction: Quantitating MHC class I antigen presentation. Nature reviews. 2003, vol. 3, 952-961.

intracellulaires. La présentation croisée consiste en la capacité de certaines cellules présentatrices d'antigène de capter, d'intégrer et de présenter des antigènes extracellulaires par le biais du CMH-I aux $LTCD8^+$.

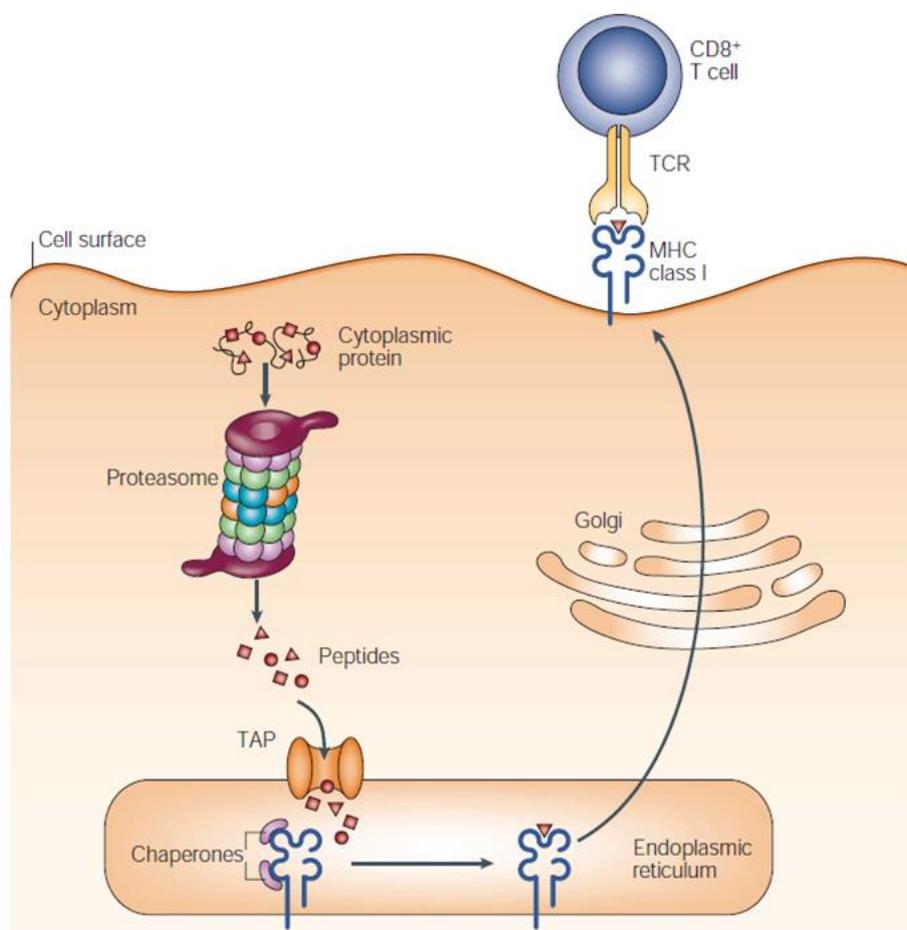


Figure 3 | Mécanisme de présentation antigénique médié par le CMH-I.

Des protéines cytoplasmiques sont dégradées par le protéasome produisant ainsi des peptides. Ces peptides sont acheminés par un transport actif, médié par la protéine canal transmembranaire TAP, dans le RE. Ces peptides sont complexés avec le CMH-I puis exocytés à la surface de la cellule pour être reconnus par les $LTCD8^+$. D'après JW. Yewdell et *al.* Nature reviews. **2003**, vol. 3, 952-961.

4] Spécificité du CMH-II

Les antigènes CMH-II sont exprimés par une population cellulaire restreinte à l'inverse du CMH-I. En effet, seules les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) tel que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les cellules épithéliales du thymus présentent à leur surface ce marqueur CMH-II. Le CMH-II à l'instar du CMH-I présente des peptides antigéniques exogènes (produits à l'extérieure de la cellule) provenant du milieu extracellulaire. Ces peptides sont internalisés par endocytose, ceux-ci seront digérés par le système endolysosomal. Les chaînes α et β sont synthétisées de façon indépendante dans le réticulum endoplasmique (RE) et associées à la chaîne invariante. La chaîne invariante est composée d'un chaînon transmembranaire et d'un fragment CLIP (Class II associated invariant chain peptide). Ce complexe est acheminé dans l'appareil de Golgi, permettant ainsi la formation de la vésicule endocytique spécifique du CMH-II : la CIIV

(Class II Vesicle). Une fois la vésicule formée des cathepsines dégradent la chaîne invariante en épargnant le fragment CLIP. L'antigène protéique présent dans la CIIV se fixe alors sur le CMH-II, en déplaçant le fragment CLIP, pour finalement aboutir à la membrane plasmique des CPA (Figure 4)¹⁷.

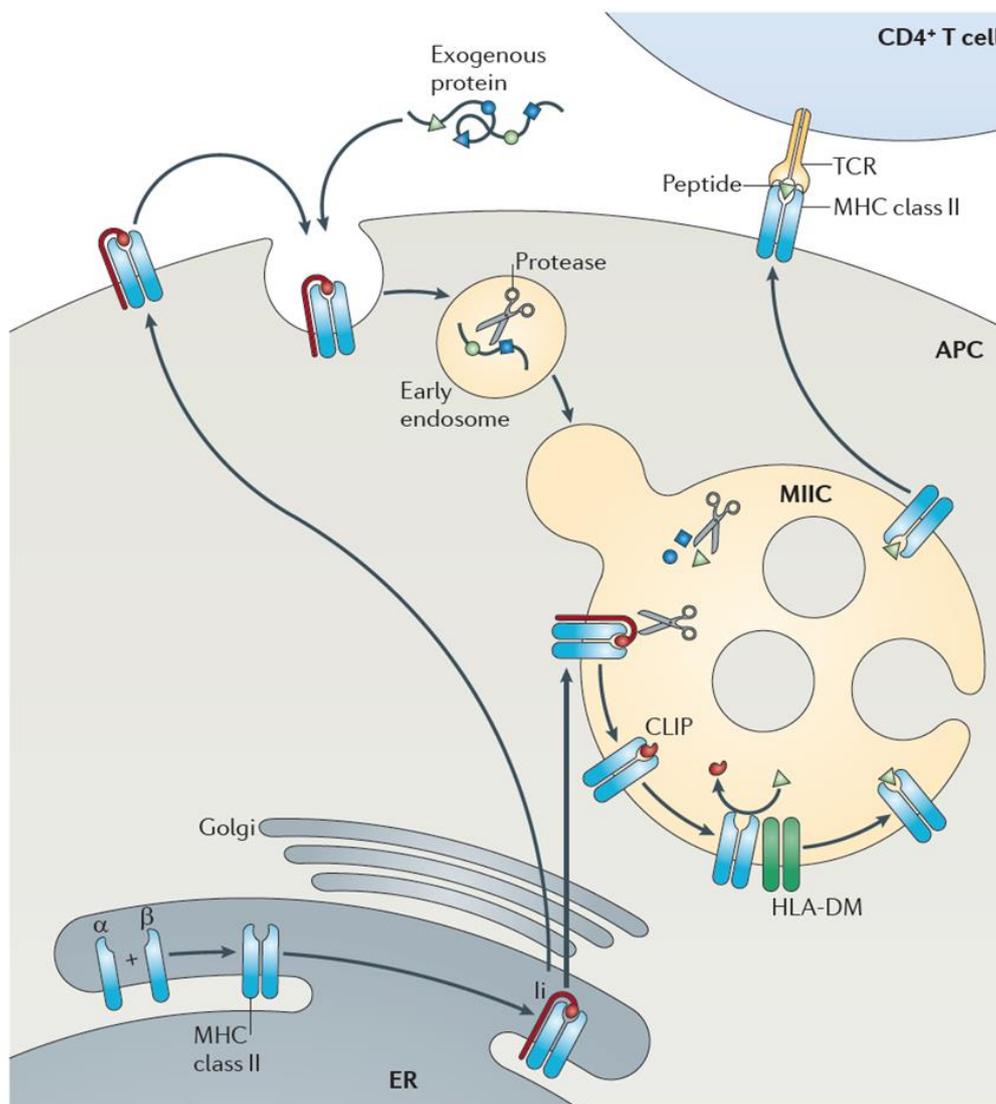


Figure 4 | Mécanisme de présentation antigénique par le CMH-II.

Une protéine exogène est endocytée par la cellule puis dégradée en peptides. Ces peptides s'associent aux CMH-II produits dans le RE. Ces complexes sont exocytés à la surface des cellules pour être reconnu par les lymphocytes T CD4 positif (LTCD4⁺). D'après J. Neefjes et *al.* Nature reviews. 2011, vol. 11, 823-836.

¹⁷ J. Neefjes et *al.* Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nature reviews. 2011, vol. 11, 823-836.

B] Mécanismes de défense du système immunitaire

1] Immunité innée

L'immunité innée et l'immunité adaptative doivent être considérées comme deux systèmes collaborant pour élaborer la réponse immunitaire et non comme deux systèmes indépendants.

L'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des agents infectieux et pathogènes qui nous entourent (bactéries, virus...). Elle s'organise autour de l'immunité innée constitutive et de l'immunité innée induite.

L'immunité innée constitutive à l'échelle macroscopique par le biais de la peau, des muqueuses, des sécrétions lacrymales etc... permet une protection mécanique, chimique et biologique. L'immunité innée constitutive à l'échelle cellulaire se traduit par la présence d'acide gras et du pH en milieu physiologique contrôlé. Prenons l'exemple des cellules pariétales de l'estomac qui, par la sécrétion d'acide chlorhydrique, permettent le maintien d'une acidité gastrique comprise entre cinq et un (en fonction des périodes prandiales). Cette acidité est l'une des premières barrières chimiques du tractus digestif. Une fois l'agent infectieux dans l'organisme, l'immunité innée induite permet la reconnaissance des microorganismes étrangers et leur destruction. Pour cela des effecteurs cellulaires tel que les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les leucocytes NK (natural killer) sont recrutés. L'induction de la réponse immunitaire innée est possible par le biais de récepteurs du soi PRR (pattern recognition receptors) en interaction avec les molécules du non-soi PAMP (pathogen associated molecular patterns). Les principaux mécanismes de défense de ce type d'immunité sont la réaction inflammatoire, la phagocytose et la mise en place du système du complément (Figure 5).

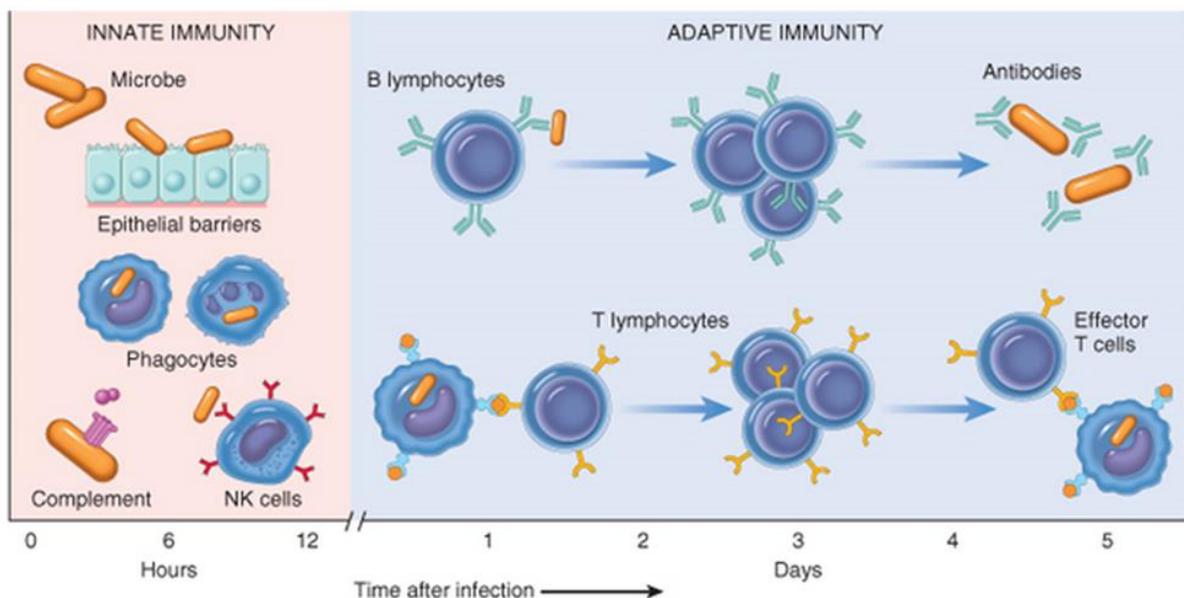


Figure 5 | Immunité innée et adaptative.
D'après Kumar et al. Robbins basic pathology 8th edition.

2] Immunité adaptative

Les CPA et en particulier les cellules dendritiques ont un rôle prépondérant dans l'activation de l'immunité adaptative. Les cellules CPA immatures sont recrutées au niveau des sites inflammatoires, après la phagocytose des agents pathogènes présents sur le site inflammatoire ces CPA migrent alors vers les organes lymphoïdes secondaires. Durant la migration ces CPA acquièrent leur maturité, ces cellules perdent leur capacité de phagocytose et par le biais d'une surexpression du CMH-II se spécialisent dans la présentation des antigènes aux lymphocytes. Les organes lymphoïdes secondaires tel que la rate, les ganglions lymphatiques... sont le siège de la réponse immunitaire adaptative où les lymphocytes T et B sont mis en présence des antigènes précédemment phagocytés par les CPA. Les organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse) quant à eux assurent la différenciation des cellules immunitaires¹⁸.

L'immunité adaptative repose essentiellement sur trois effecteurs cellulaires :

- Les lymphocytes B (LB).
- Les lymphocytes T marqueur CD4 positif (LTCD4⁺).
- Les lymphocytes T marqueur CD8 positif (LTCD8⁺).

Les LB une fois activés par les LTCD4⁺, les cytokines et les antigènes présentés par les CPA se différencient en plasmocyte¹⁹. Les plasmocytes sont responsables de l'immunité à médiation humorale par la production d'une grande quantité d'immunoglobuline²⁰ (Figure 6).

Les LTCD4⁺ (lymphocyte auxiliaire) sont des cellules différenciées du système immunitaire dont la prolifération permet de diriger d'autres effecteurs cellulaires pour éliminer un pathogène. Il existe plusieurs populations de LTCD4⁺, une population promotrice de la réponse immunitaire par la sécrétion de protéines et de cytokines. Il existe deux sous-types de ces lymphocytes CD4⁺ promoteurs de la réponse immunitaire :

- Les lymphocytes CD4⁺ Th1 produisent l'interféron γ et l'interleukine 12²¹.
- Les lymphocytes CD4⁺ Th2 produisent l'interleukine 4, 5 et 13²¹.

Une autre population de LTCD4⁺ régulatrice (Treg) a une action immunosuppressive. Cette population permet le contrôle de la réponse immunitaire en inhibant la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs. Ces Treg sont nécessaires à la préservation de l'homéostasie et au maintien de la tolérance immunitaire²².

¹⁸ MJ. Shlomchik et al. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunological reviews*. **2012**, vol. 247, 52-63.

¹⁹ A. Radbruch et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews*. **2006**, vol. 6, 741-750.

²⁰ M. Shapiro-Shelef et al. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. **2003**, vol. 19, 607-620.

²¹ T. Biedermann et al. Th1 and Th2 lymphocyte development and regulation of Th cell-mediated immune responses of the skin. *Journal of investigative dermatology symposium proceedings*. **2004**, vol. 9(1), 5-14.

²² H. Zeng et al. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature*. **2013**, vol. 499(7459), 485-490.

Les $LTCD8^+$ (lymphocyte cytotoxique) détruisent les cellules infectées médiées par la présentation du CMH-I et de peptides du non-soi. Une fois activées par le complexe CMH-I-antigène les lymphocytes $CD8^+$ libèrent la perforine (induction de pores dans la membrane plasmique des cellules infectées) et le granzyme (pénètre dans la cellule et induit l'apoptose). Les $LTDC8^+$ sont les principaux effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire cellulaire adaptative (Figure 6).

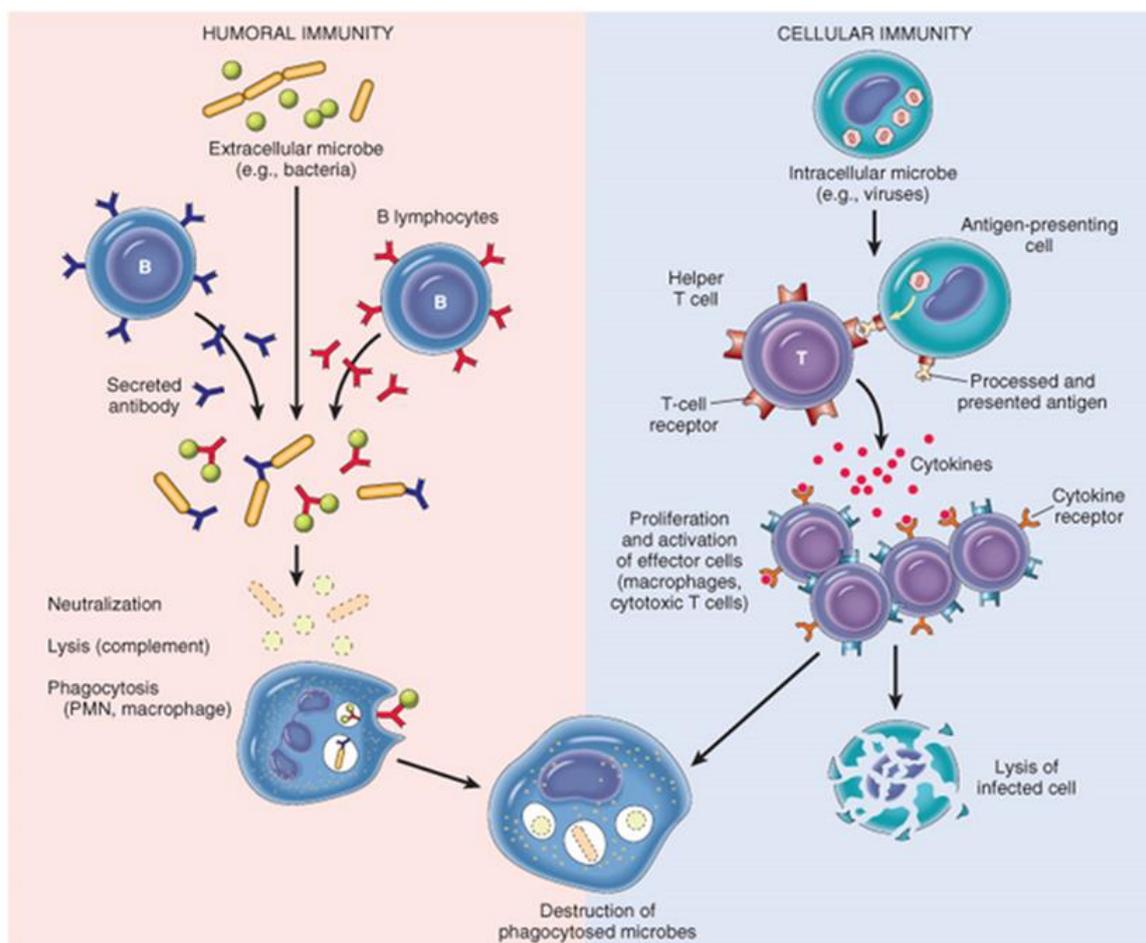


Figure 6 | Immunité humorale et cellulaire.
D'après Kumar et al. Robbins basic pathology 8th edition.

L'activation d'un lymphocyte s'accompagne d'une expansion clonale (permettant d'amplifier la réponse immunitaire spécifique à l'antigène) et la mise en place d'une réponse mémoire.

C] Les ERAPs impliqués dans la présentation antigénique

1] Les ERAPs intégrés à la réponse immunitaire

La découverte des ERAPs et de leurs rôles dans la réponse immunitaire a été un maillon manquant concernant la présentation croisée (CMH-I) de peptides aux LTCD8⁺²³. Un modèle et la preuve de concept de l'un des rôles des ERAPs ont été avancés et ont montré l'importance des ERAPs dans cette voie de présentation antigénique²⁴. Des expériences réalisées sur souris ERAAP-wildtype (WT) et ERAAP-knockout (KO) illustre le lien étroit entretenu par les voies physiologiques ERAPs et la réponse immunitaire.

Comme la majorité des peptides ligands du CMH-I, le peptide d'une taille de 190 à 198 acides aminés (AA) dénommé Fam49b est issu des dégradations du protéasome dans le cytosol des cellules et transporté dans le RE par la protéine canal TAP. Les cellules synthétisant le CMH-I non classique (Qa-1) ne présentent pas les fragments issus de Fam49b (190-198) lorsqu'ERAAP est exprimé (ERAAP-WT) (Figure 7).

Hypothétiquement cela est dû à respectivement une voie directe et une voie indirecte :

- La destruction des épitopes par ERAAP dans le RE.
- Un phénomène de compétition perdu vis-à-vis d'autres peptides raccourcis par ERAAP.

²³ M. Weimershaus et *al.* Peptidases trimming MHC class I ligands. *Curr Opin Immunol.* **2013**, vol. 25(1), 90-96.

²⁴ N. Shastri et *al.* Non-classical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunol.* **2012**, vol. 13(13), 579-588.

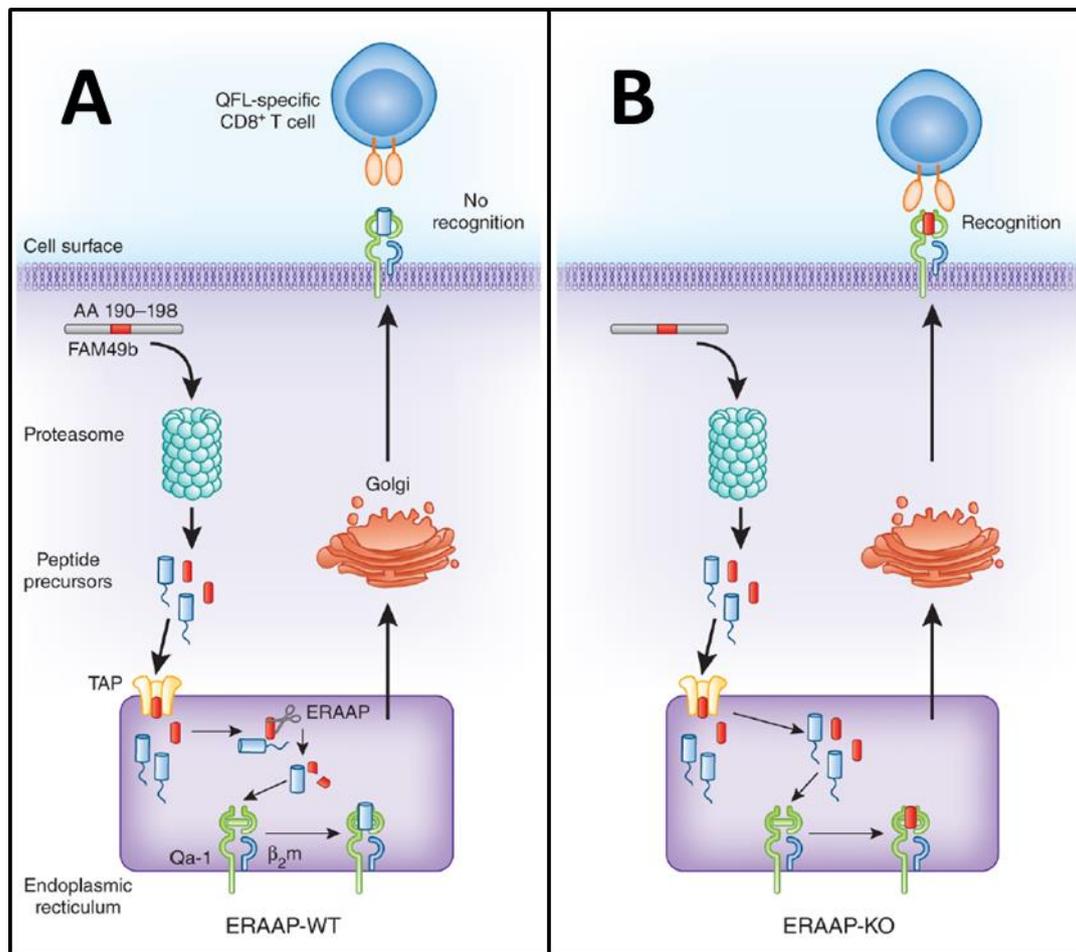


Figure 7 | Modèle de l'immunosurveillance médié par l'ERAAP.

Dans le cas d'une cellule ERAAP-WT (**A**) un précurseur peptidique est raccourci par ERAAP, complexé au CMH-I. Ce complexe n'induit pas de réponse cytotoxique. Au contraire dans cette expérience une cellule ERAAP-KO (**B**) ne raccourci pas le peptide issu de Fam49b (190-198) ce qui a pour conséquence une reconnaissance par les LTCD8⁺ et une destruction de la cellule. Adapté de JW. Yewdell et *al.* Nature immunology. **2012**, vol. 13(6), 526-528.

En présence d'ERAAP à gauche (**A**) l'un des peptides précurseurs (en bleu) est raccourci par l'ERAAP de manière à être complexé au CMH-I non classique (Qa-1) puis exocyté à la surface de la cellule. Ce complexe n'est pas reconnu par les LTCD8⁺ spécifiques (Qa-1-FL), ainsi la cellule survie.

En l'absence d'ERAAP à droite (**B**) le fragment FL (en rouge) issu de Fam49b (190-198) est complexé au CMH-I non classique (Qa-1) et par un phénomène d'exocytose atteint la surface de la cellule. Ce complexe est reconnu par les LTCD8⁺ spécifiques (Qa-1-FL) et entraîne la destruction de la cellule par le LTCD8⁺ (Figure 7)²⁵.

Ce mécanisme médié par les ERAPs est potentiellement utilisé par des agents pathogènes ou des cellules tumorales pour interférer avec le système d'immunosurveillance dans le but de proliférer.

²⁵ JW. Yewdell et *al.* Don't mess with ERAAP. Nature immunology. **2012**, vol. 13(6), 526-528.

2] Implication générale des ERAPs en physiopathologie

ERAP1 et ERAP2 sont des éditeurs antigéniques. En effet, ces deux enzymes exercent un contrôle sur les épitopes et par conséquent sur les antigènes potentiellement présentés à la surface de la cellule par le CMH-I²⁶ (présentation croisée). Les aminopeptidases ERAP1 et ERAP2 sont ubiquitaires et localisées dans le réticulum endoplasmique des cellules²⁷ (Figure 8).

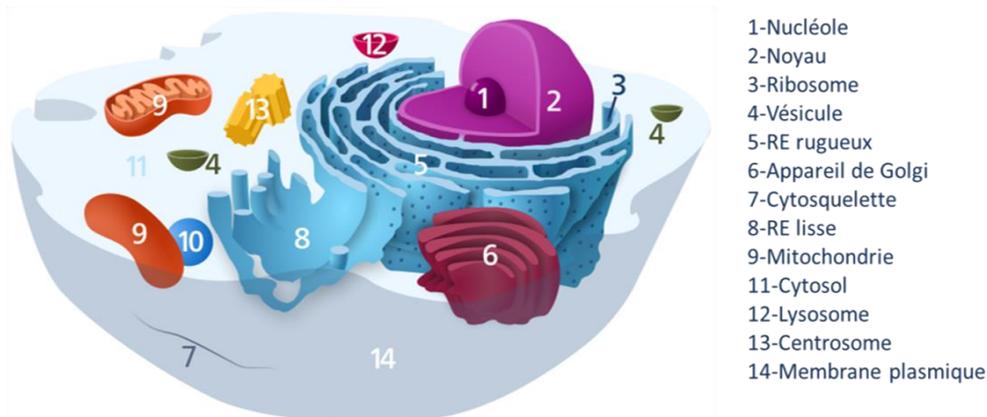


Figure 8 | Localisation du réticulum endoplasmique (RE) dans une cellule eucaryote animale.
Adapté de « animal cell » wikipedia.

Ces protéines raccourcissent leurs peptides substrats (ayant une taille de 9 à 16 AA) en oligopeptides par hydrolyse des liaisons peptidiques catalysée par l'ion zinc. Cette catalyse permet la production d'épitope par la cellule. En fonction du substrat clivé par ces enzymes les épitopes sont:

- Soit complexés avec le paratope CMH-I et acquièrent ainsi un pouvoir immunogène en formant un antigène.
- Soit non complexés avec le CMH-I et n'acquièrent pas de pouvoir immunogène²⁸.

ERAP1 et ERAP2 sont des modulateurs ou éditeurs immunologiques car l'immunogénicité induite par leur action enzymatique est substrat-dépendante. De plus ces deux enzymes sont complémentaires car ERAP1 et ERAP2, bien qu'ayant des substrats communs, raccourcissent également des substrats spécifiques. Les ERAPs sont capables de former des homo-dimères (ERAP1-ERAP1 ou ERAP2-ERAP2) et également s'associent en hétéro-dimère (ERAP1-ERAP2) afin de reconnaître une plus large gamme de substrats²⁹. Enfin ERAP1 et ERAP2 sont deux enzymes avec une activité concertée. Par conséquent chacune de ces deux enzymes peut utiliser le produit de dégradation de l'autre comme substrat. Il est donc possible d'envisager

²⁶ N. Shastri et al. Non-classical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunol.* **2012**, vol 13(13), 579-588.

²⁷ T. Tanioka et al. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem.* **2003**, vol. 278(34), 32275-32283.

²⁸ N. Shastri et al. Non-classical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunol.* **2012**, vol. 13(13), 579-588.

²⁹ L. Saveanu et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunol.* **2005**, vol. 6, 689-697.

qu'un peptide substrat soit raccourci d'une façon séquentielle et concertée par ERAP1 et ERAP2³⁰.

Les protéines devant être dégradées par la cellule sont marquées par l'ubiquitine. Elles sont alors adressées au protéasome afin d'être hydrolysées en fragments protéiques. Ces fragments sont acheminés dans le réticulum endoplasmique (RE) à l'aide de la protéine de transport des antigènes (TAP) vu précédemment. Ces fragments protéiques subissent alors l'hydrolyse des aminopeptidases ERAP1 et ERAP2³¹. Lors d'un processus non pathologique (Figure 9 **[A]**), avec un oligopeptide devant être présenté au système immunitaire adaptatif, il y a formation du complexe CMH-I-peptide puis exocytose de ce complexe à la surface des cellules afin que ce complexe soit reconnu par le système immunitaire adaptatif (avec un rôle prépondérant des LTCD8⁺).

Il a été démontré qu'une mutation ponctuelle, portée sur un seul nucléotide entraînant un polymorphisme génétique chez des individus, sur les gènes ERAP peuvent être source de prédisposition à certaines maladies, notamment dans le domaine de l'auto-immunité³².

Un polymorphisme d'ERAP1 ou d'ERAP2 peut être à l'origine d'une altération de son activité biologique. En conséquence un peptide normalement détérioré par les ERAPs sera raccourci et complexé au CMH-I pour être acheminé par exocytose à la surface de la cellule (Figure 9 **[B]**). Cet antigène aberrant pourra entraîner des réponses immunitaires inadaptées. De plus une mauvaise prise en charge des peptides substrats peut provoquer leur accumulation dans le réticulum endoplasmique par défaut de complexation avec le CMH-I. Cette accumulation et leur incorporation dans des vésicules d'exocytose aspécifique permet leur relargage dans le liquide extracellulaire (Figure 9 **[C]**). Hypothétiquement ce relargage persistant peut être un facteur inflammatoire local.

³⁰ D. Lopez et *al.* Concerted In Vitro Trimming of Viral HLA-B27-Restricted Ligands by Human ERAP1 and ERAP2 Aminopeptidases. *Plos one.* **2013**, vol. 8(11), e79596.

³¹ N. Haroon et *al.* Endoplasmic reticulum aminopeptidases: Biologie and pathogenic potential. *Nature Reviews Rheumatology.* **2010**, vol. 6, 461-467.

³² E. Stratikos et *al.* A Common Single Nucleotide Polymorphism in Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Induces a Specificity Switch That Leads to Altered Antigen Processing. *J Immunol.* **2012**, vol. 189, 2383-2392.

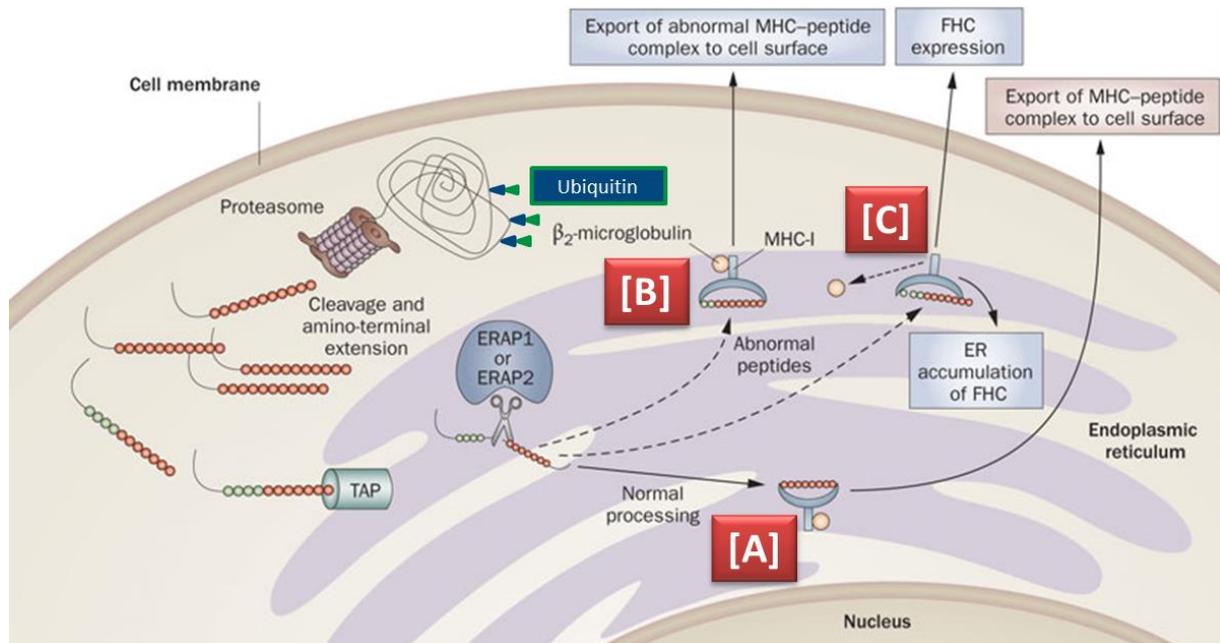


Figure 9 | Catabolisme protéique d'une cellule nucléé et présentation antigénique croisée.
Adapté de N. Haroon et *al.* Nature reviews rheumatology. 2010, vol. 6, 461-467.

Ainsi la dérégulation de ce système finement contrôlée par la cellule entraîne des prédispositions à diverses pathologies, qui associée à d'autres facteurs entraîne le phénotype pathologique. Ces protéines semblent particulièrement intéressantes dans de grands domaines thérapeutiques tels que les maladies infectieuses, le cancer et les maladies auto-immunes.

En effet, l'immunosurveillance par les lymphocytes T cytotoxique requière une production des cellules d'une large gamme de peptides complexés avec le CMH I reconnu par ces lymphocytes T. L'absence des ERAPs, impliquées dans la présentation antigénique de surface associée au CMH I, augmente paradoxalement l'immunogénicité des complexes CMH I présentés³³. La déficience en ERAPs diminue fortement la synthèse de complexes pCMH-I stables conventionnels, d'autre part, une grande variété de nouveaux pCMH-I est présente à la surface des cellules. Ces derniers pCMH-I sont hautement immunogènes et induisent une puissante réponse des lymphocytes T CD8⁺ et lymphocytes B³⁴. De plus l'expression de l'ERAP1 est inhibée dans certaines lignées cancéreuses³⁵. Enfin le cytomégalovirus (CMV) humain inhibe ERAP1 par la production d'un micro-ARN. Ce micro-ARN permet l'extinction de l'expression du gène d'ERAP1³⁶.

³³ GE. Hammer et *al.* In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. Nature immunology. 2006, vol. 8(1), 101-108.

³⁴ GE. Hammer et *al.* In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. Nature immunology. 2006, vol. 8(1), 101-108.

³⁵ D. Fruci et *al.* Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues. J Cell Physiol. 2008, vol. 216, 742-749.

³⁶ S. Kim et *al.* Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8+ T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. Nature Immunology. 2011, vol. 12, 984-991.

La régulation des ERAPs par la cellule associée à leurs polymorphismes contribuent au développement de maladies auto-immunes et notamment à la spondylarthrite ankylosante³⁷ et au psoriasis³⁸.

3] Le cancer

Dans le cancer, l'immunité innée médiée par les « Natural killer cells » (NKC) est liée à la voie des aminopeptidases ERAP1 et ERAP2³⁹. Fruci et *al* ont mis en évidence dans des modèles murins KO en ERAP1, avec xélogreffe tumorale, l'exacerbation de la cytolyse par les LTCD8⁺ et les NKs. En conséquence, on a observé une diminution de la masse tumorale chez ces animaux⁴⁰. La modulation des ERAPs en thérapie contre le cancer consisterait en la génération d'épitopes immunogènes par les cellules cancéreuses. Ce qui entrainerait la reconnaissance de ces cellules tumorales et leur destruction par les cellules NK et LTCD8⁺⁴¹ (Figure 10).

4] Les maladies auto-immunes

Des études génomiques ont révélé l'association de certains polymorphismes génétiques avec la spondylarthrite ankylosante (SA)⁴². La spondylarthrite ankylosante est une maladie chronique inflammatoire de la colonne vertébrale, il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour cette maladie, en effet les patients reçoivent un traitement symptomatique recommandé par la Société Européenne de Rhumatologie (SER)⁴³.

Cette maladie est fortement associée à l'allèle HLA-B27 du CMH-I. D'une façon intéressante le polymorphisme rs30187 d'ERAP1 réduit le risque de développer cette maladie chez les patients portant l'allèle HLA-B27⁴⁴. De plus des polymorphismes du locus HLA-B27, IL-23R et d'ERAP1 sont directement impliqués dans le mécanisme immunitaire associé à la pathogénèse de la spondylarthrite ankylosante⁴⁵. Des cellules dérégulées pro-inflammatoire sont en cause dans des maladies auto-immunitaires. Par conséquent la modulation de la voie ERAP a un intérêt tout particulier dans cette maladie⁴⁶ et cette modulation contribuerait à la diminution de la présentation antigénique de ces cellules, cela pourrait

³⁷ DM. Evans et *al*. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature Genet.* **2011**, vol. 43, 761-767.

³⁸ A. Strange et *al*. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature Genet.* **2010**, vol. 42, 985-990.

³⁹ D. Fruci et *al*. Natural killer cells efficiently reject lymphoma silenced for the endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing. *AACR.* **2011**, vol. 10, 1597-1606.

⁴⁰ N. Shastri et *al*. Non-classical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunology.* **2012**, vol. 13(13), 579-588.

⁴¹ A. Diefenbach et *al*. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature.* **2001**, vol. 413, 165-171.

⁴² MA. Brown et *al*. Genetics and the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol.* **2009**, vol. 21, 318-323.

⁴³ J. Braun et *al*. Dissemination and evaluation of ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis in Europe. *Z Rheumatol.* **2009**, vol. 68, 417-419.

⁴⁴ MA. Brown et *al*. Progress in spondylarthritis. *Progress in studies of the genetics of ankylosing spondylitis. Arthritis Res Ther.* **2009**, vol. 11, 254-259.

⁴⁵ PB. Wright et *al*. Ankylosing spondylitis patients display altered dendritic cell and T cell populations that implicate pathogenic roles for the IL-23 cytokine axis and intestinal inflammation. *Rheumatology.* **2015**, vol. 245, 263-275.

⁴⁶ TJ. Kenna et *al*. Endoplasmic reticulum aminopeptidases in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* **2015**, vol. 54(9), 1549-1556.

réduire voir abolir l'inflammation locale et ainsi lutter efficacement contre ces pathologies (Figure 10).

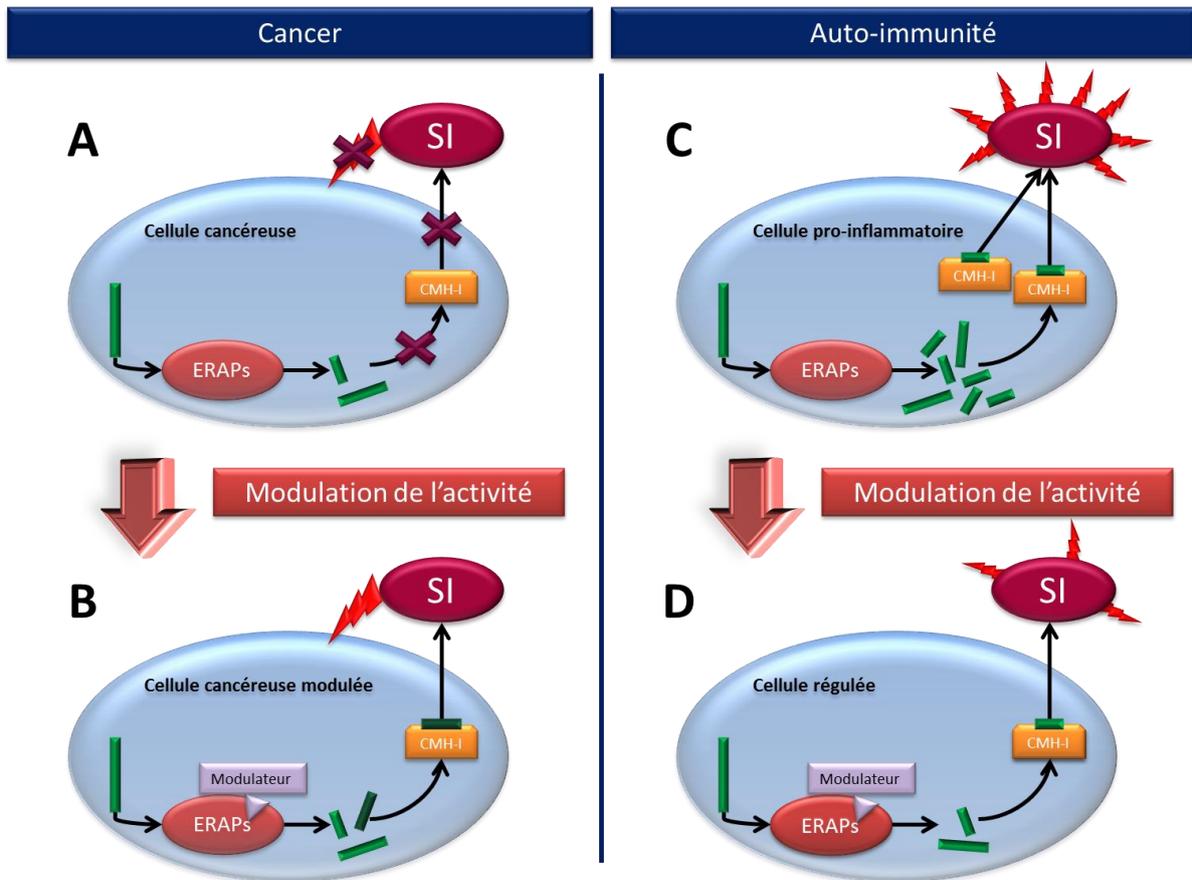


Figure 10 | Modification quantitative et qualitative de l'activité des ERAPs et potentiels effets dans le domaine thérapeutique du cancer et de l'auto-immunité.

[A] Cellule cancéreuse échappant au système immunitaire par suppression des antigènes immunogènes. **[B]** Cellule cancéreuse modulée produisant des antigènes immunogènes responsables de sa lyse par le système immunitaire. **[C]** Cellule pro-inflammatoire avec efficacité élevée du système ERAP provoquant l'inflammation locale. **[D]** Cellule régulée par modulation de l'activité des ERAPs et diminution de l'inflammation locale.

En **[A]** une cellule cancéreuse échappant au système immunitaire par la suppression d'antigène immunogène. Par la modification de l'activité des ERAPs **[B]** la cellule cancéreuse produit des antigènes immunogènes responsables de sa lyse par le système immunitaire (SI). En **[C]** une cellule pro-inflammatoire provoque l'inflammation locale. Par la modification de l'activité des ERAPs **[D]** la production d'antigène inflammatoire est diminuée et aboutie à une atténuation de l'inflammation par une baisse de stimulation du système immunitaire (Figure 10).

5] Les maladies infectieuses

Les protéines ERAPs ont un rôle prépondérant dans l'immunosurveillance vu précédemment (Figure 10)⁴⁷. Les ERAPs par leur édition antigénique sont étroitement liées à la réponse des leucocytes NK et LTCD8⁺ par la complexation des épitopes édités au CMH-I⁴⁸. Les cellules NK sont l'une des premières lignes de défense contre les virus (cytomégalovirus^{49,50} ...), les parasites et bactéries⁵¹ utilisant la machinerie cellulaire de l'hôte pour produire leur matériel protéique. C'est pourquoi une meilleure connaissance des phénomènes imputables aux ERAPs et l'utilisation d'outils pharmacologiques, tel que des inhibiteurs de ces protéines ou des sondes chimiques, permettront une avancée dans le domaine thérapeutique qu'est l'infectiologie (Figure 11).

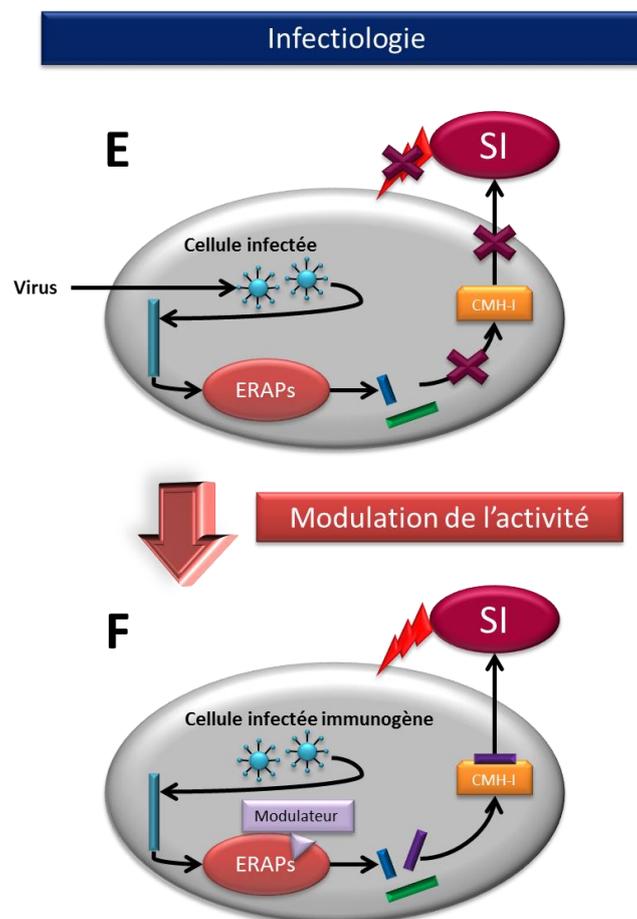


Figure 11 | Modification quantitative et qualitative de l'activité des ERAPs et potentiels effets dans le domaine de l'infectiologie.

[E] Cellule infectée par un virus échappant au système immunitaire. [F] Cellule infectée modulée produisant des antigènes immunogènes responsables de sa lyse par le système immunitaire.

⁴⁷ J. Neefjes et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews*. **2011**, vol. 11, 823-836.

⁴⁸ FM. Karlhofer et al. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2 activated natural killer cells. *Nature*. **1992**, vol. 358, 66-70.

⁴⁹ MT. Orr et al. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat immunol*. **2010**, vol. 11(4), 321-327.

⁵⁰ E. Firat et al. The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J immunol*. **2007**, vol. 178(4), 2241-2248.

⁵¹ LL. Lanier et al. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat rev immunol*. **2008**, vol. 8(4), 259-268.

II] Caractéristiques, localisation et structure des ERAPs

A] Motifs structuraux remarquables et rôle biologique

Les ERAPs (ERAP1 et ERAP2) sont des exopeptidases et plus précisément des aminopeptidases, de ce fait elles raccourcissent leurs peptides substrats par leur extrémité N-terminale. Ce sont des métalloprotéases à Zinc car un atome de Zinc coordonné par trois histidines est nécessaire aux réactions protéolytiques de ces enzymes. Elles appartiennent à la famille M1 des métalloprotéases⁵² incluant également l'aminopeptidase neutre humaine (APN)⁵³. Cette famille M1 est définie par une séquence hautement conservée à travers les espèces : le motif GAMEN.

Le motif GAMEN est totalement conservé parmi les aminopeptidases de la famille M1, de ce fait il est identique de l'ERAP1 à l'ERAP2⁵⁴. Le motif GAMEN est adjacent au site catalytique et interagit avec l'extrémité N-terminale des substrats, donc est responsable du caractère exopeptidase et aminopeptidase de ces enzymes⁵⁵.

Ce motif est composé respectivement d'une glycine (G), d'une alanine (A), d'une méthionine (M), d'un acide glutamique (E) et d'une asparagine (N). Ci-dessous le motif GAMEN des ERAPs (Figure 12).

⁵² D. Vourloumis et *al.* Novel selective inhibitors of aminopeptidases that generate antigenic peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**, vol. 23, 4832–4836.

⁵³ R. Deprez et *al.* Structure–Activity Relationships and Blood Distribution of Antiplasmodial Aminopeptidase-1 Inhibitors. *J Med Chem*. **2012**, vol. 55, 10909-10917.

⁵⁴ M. Tsujimoto et *al.* Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. *Heart Fail Rev*. **2008**, vol. 13, 285-291.

⁵⁵ G. Vazeux et *al.* A glutamate residue contributes to the exopeptidase specificity in aminopeptidase A. *J Biochem*. **1998**, vol. 334, 407-413.

	G	A	M	E	N
	Glycine	Alanine	Méthionine	Acide glutamique	Asparagine
ERAP1 (PDB 3MDJ)	317	318	319	320	321
ERAP2 (PDB 3SE6)	334	335	336	337	338

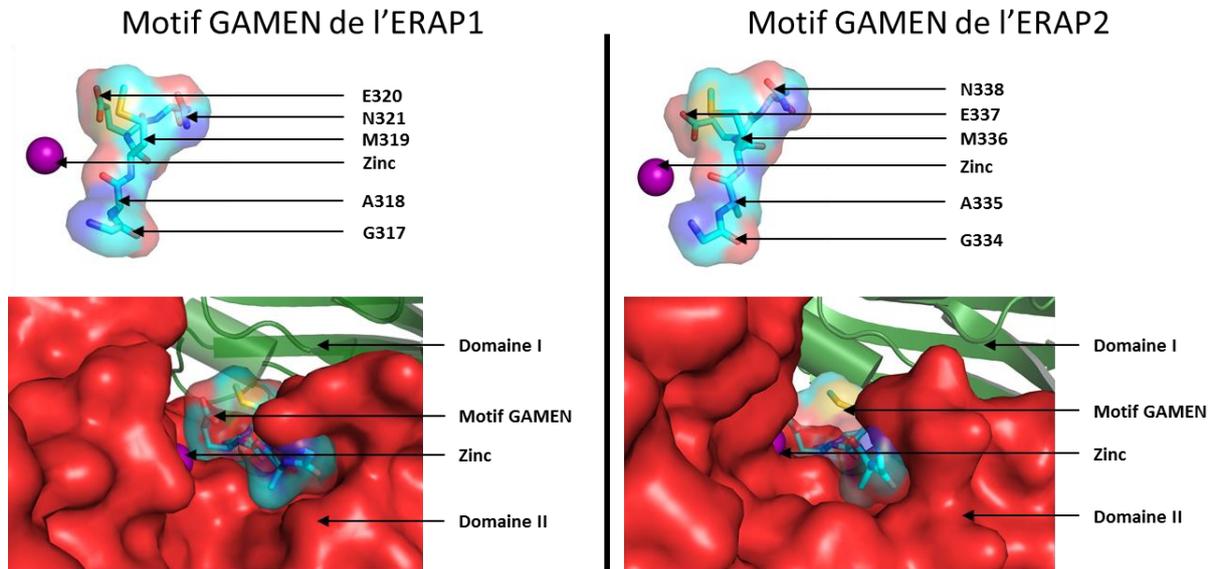


Figure 12 | Motif GAMEN situé dans la séquence de l'ERAP1 et de l'ERAP2 avec illustration.

Un autre motif structural remarquable des ERAPs est le motif HEXXH₁₈E (Figure 13). Ce motif est composé de deux histidines (H), de deux acides glutamiques (E) et de divers acides aminés (X)⁵⁶. Ce motif structural coordonne l'atome de Zinc. De plus le premier acide glutamique (exemple pour ERAP1 : E354) polarise une molécule d'eau et permet son attaque nucléophile sur le carbonyle du peptide substrat formant un intermédiaire tétraédrique. Cet intermédiaire tétraédrique permet l'hydrolyse de la liaison protéique⁵⁷.

⁵⁶ J. Wang et al. Histidine residue in the zinc-binding motif of aminopeptidase A is critical for enzymatic activity. PNAS. **1993**, vol. 90, 1222-1226.

⁵⁷ G. Vazeux et al. Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. J Biol Chem. **1996**, vol. 271, 9069-9074.

	H	E	X	X	H	(X) ₁₈	E
	Histidine	Acide glutamique	Divers		Histidine	Divers	Acide glutamique
ERAP1 (PDB 3MDJ)	353	354	355	356	357	358 - 375	376
ERAP2 (PDB 3SE6)	370	371	372	373	374	375 - 392	393

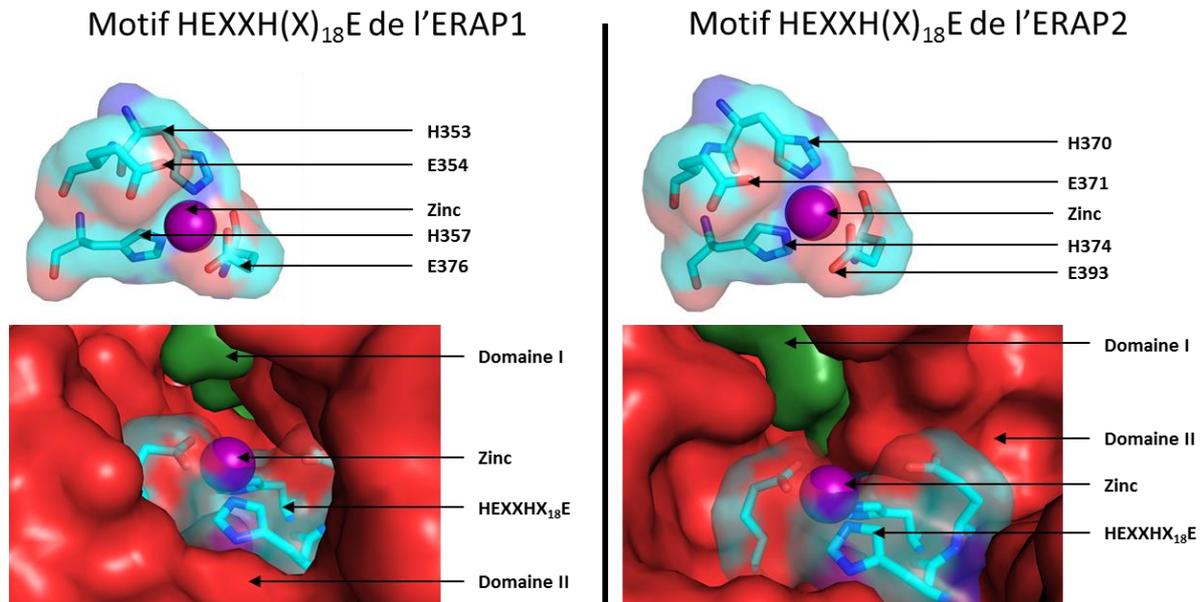


Figure 13 | Motif HEXXH(X)₁₈E de l'ERAP1 et de l'ERAP2 avec illustration.

Comme vu en introduction ERAP1 et ERAP2 ont une homologie de séquence de 50.05%. L'alignement de séquence de ces deux protéines a été réalisé à l'aide du logiciel Jalview®. Les deux séquences d'ERAP1 et d'ERAP2 utilisées sont les séquences canoniques avec la plus forte prévalence dans la population. La couleur blanche représente les taux d'homologie faible alors que le gradient de couleur bleu avec une intensité croissante est proportionnel au pourcentage d'homologie des acides aminés alignés. Le taux d'homologie a été calculé par la méthode de bio-informatique BLOSUM62 (blocks substitution matrix)⁵⁸ (Figure 14).

⁵⁸ S. Henikoff et *al.* Amino acid substitution matrices from protein blocks. PNAS. 1992, vol. 89, 10915-10919.

Q9NZ08|ERAP1 1 MVFLPLKWSLATMSFLLSLLALLTVSTPSWCQSTE ASPKRS DGT PFPWNKIR
Q6P179|ERAP2 13 KPMFNIHRGFYCLTALLPQICICSQFSVPSSYHFTE DPGAF PVATNGERFPWQELR

Q9NZ08|ERAP1 54 LPEYVIPVHYDLLIHANLTTLTFWGTTKVEITASQPTSTIILHSHHLQISRATLRK
Q6P179|ERAP2 69 LPSVVIPLHYDLFVHPNLTSLDFVASEKIEVLVSNATQFIILHSDKLEITNATLQS

Q9NZ08|ERAP1 110 GAGER LSE EPLQVLEHPRQEIQIALLAPEPLLVGLPYTVVIHYAGNLSETFHGFY
Q6P179|ERAP2 125 EEDSRYMKPGKELKVLSPYPAHEQIALLVPEKLT PHLKYYVAMDFQAKLGDGFEGFY

Q9NZ08|ERAP1 164 KSTYRTKEGELRILASTQFEPTAARMAFPCFDEPAFKASFSIKIRREPRHLAISNM
Q6P179|ERAP2 181 KSTYRTLGGETRILAVTDFEPTQARMAFPCFDEPLFKANFSIKIRRESRHIALSNM

Q9NZ08|ERAP1 220 PLVKSVTVAEGLIEDHFDVTVKMSTYLVAFIISDFESVSKITKSGVKVSVYAVPDK
Q6P179|ERAP2 237 PKVKTIELEGGLLLEDHFETTVMKSTYLVAYIVCDFHSLSGFTSSGVKVSIIYASPK

Q9NZ08|ERAP1 276 INQADYALDAAVTLLFEYEDYFSIPYPLPKQDLAAIPDFQSGAME NWGLTTYRESA
Q6P179|ERAP2 293 RNQTHYALQASLKLLDFYEKYFDIYYPLSKLDL IAI PDFAPGAME NWGLITYRETS

Q9NZ08|ERAP1 332 LLFDAEKSSASSKLGITMTVAHELAHQWFGNLTMEWWDLWLN EGF AKFMEFVSV
Q6P179|ERAP2 349 LLFDPKTSSASDKLWVTRVIAHELAHQWFGNLTMEWWDIWLK EGF AKYME LIAV

Q9NZ08|ERAP1 388 SVTHPELKVGDYFFGKCFDAMEVDALNSSHPVSTPVENPAQIREMFDVSYDKGAC
Q6P179|ERAP2 405 NATYPELQFDDYFLNVCFEVITKDSLNSSRPI SKPAETPTQIQEMFDEVSYNKGAC

Q9NZ08|ERAP1 444 ILNMLREYLSADAFKSGIVQYLQKHSYKNTKKNEDLWDSMASICPTDGVKGMDFGC
Q6P179|ERAP2 461 ILNMLKDFLGEKFKQGI IQYLKFKFSYRNAKNDLWSSLSNSCLESDFTS G VVCH

Q9NZ08|ERAP1 499 SRSQHSSSSSHWHQEGVDVKTMMNTWTLQKGFPLITITVRGRNVHMKQEHYMKG
Q6P179|ERAP2 516 SDPKMTSNMLAFLGENAEVKEMMTWTLQKGIPLLVVKQDGC SLRLQQERFLQGVF

Q9NZ08|ERAP1 553 SDG APDTGYLWHVPLTFITSKSDMVHRFLLKTCTDVLILPEEVEWIKFNVMG
Q6P179|ERAP2 572 QEDPEWRALQERYLWHIPLTYSTSSSNVIHRHILKSKTDTLDLPEKTSWVKFNVD S

Q9NZ08|ERAP1 605 NGYYIVHYEDDGWDSL TGLLKGHTAVSSNDRASLINNAFQLVSI GKLSIEKALDL
Q6P179|ERAP2 628 NGYYIVHYEGHWDLITQLNQNH TLLRPKDRVGLIHDVFQLVGAGRLLDKALDM

Q9NZ08|ERAP1 661 SLYLKHETEIMPVFQGLNELIPMYKLMKRD MNEVETQFKAFILRLRDLIDKQTW
Q6P179|ERAP2 684 TYLLQHETSSPALLEGLSYLESFYHMMDRRNI SDISENLKRYLLQYFKPVIDRQSW

Q9NZ08|ERAP1 717 TDEGSVSRMLRSQLLLACVHNYQPCVQRAEGYFRKWKESNGNLSLPVDVTLAVF
Q6P179|ERAP2 740 SDKGSVWDRMLRSALLKLACDLNHAPCIQKAAELFSQWMESSGKLNIPDVLKIVY

Q9NZ08|ERAP1 773 AVGAQSTEGWDFLYSKYQFSLSSTEK SQIEFALCRTQNKELQWLLDESFKGDKIK
Q6P179|ERAP2 796 SVGAQT TAGWNYLLEQYELSMSSAEQNKILYALSTSKHQEKLLKIELGMGKVIK

Q9NZ08|ERAP1 829 TQEFQILTLIGRNPVGYPLAWQFLRKNWNKLVQK FELGSSIAHVMGT TNQFST
Q6P179|ERAP2 852 TQNL AALLHAIARRPKGQQLAWDFVRENWTHLLKFDLGSYDIRMIISGTTAHFSS

Q9NZ08|ERAP1 885 RTRLEEVKGFSSSLKENGSQLRCVQQT IETI EENIGWMDKNFDKIRVWLQSEK
Q6P179|ERAP2 908 KDKLQEVKLFESLEAQSGLDIFQTVLETITKNIKWLEKNLPTLR TWLMVNT

Figure 14 | Alignement de la séquence des acides aminés de l'ERAP1 et de l'ERAP2.

Réalisé à l'aide du logiciel Jalview®. Motifs GAMEN et HEXXH₁₈E représentés avec un fond vert.

B] Reconnaissance du substrat et biochimie

Les ERAPs reconnaissent préférentiellement les peptides de 9 à 16 acides aminés, cela peut être expliqué par le modèle de reconnaissance bilatérale des substrats. Ce modèle suggère que les ERAPs interagissent avec l'acide aminé hydrophobe en position C-terminale des peptides substrats d'une taille de 9 à 16 acides aminés⁵⁹. La taille des substrats influence leur reconnaissance par les ERAPs (Figure 15). Un substrat avec une taille optimale de 9 à 16 acides aminés (Figure 15 [A]) est reconnu en sa partie N-terminale et C-terminale formant un complexe stable propice pour la réaction enzymatique. Les peptides d'une taille inférieure à 9 acides aminés sont faiblement raccourcis par les ERAPs (Figure 15 [B] et [C]). A cette dimension de taille s'ajoute la dimension de séquence. En effet pour l'ERAP1 les substrats avec leur partie C-terminale chargée ne sont pas raccourcis (Figure 15 [D]).

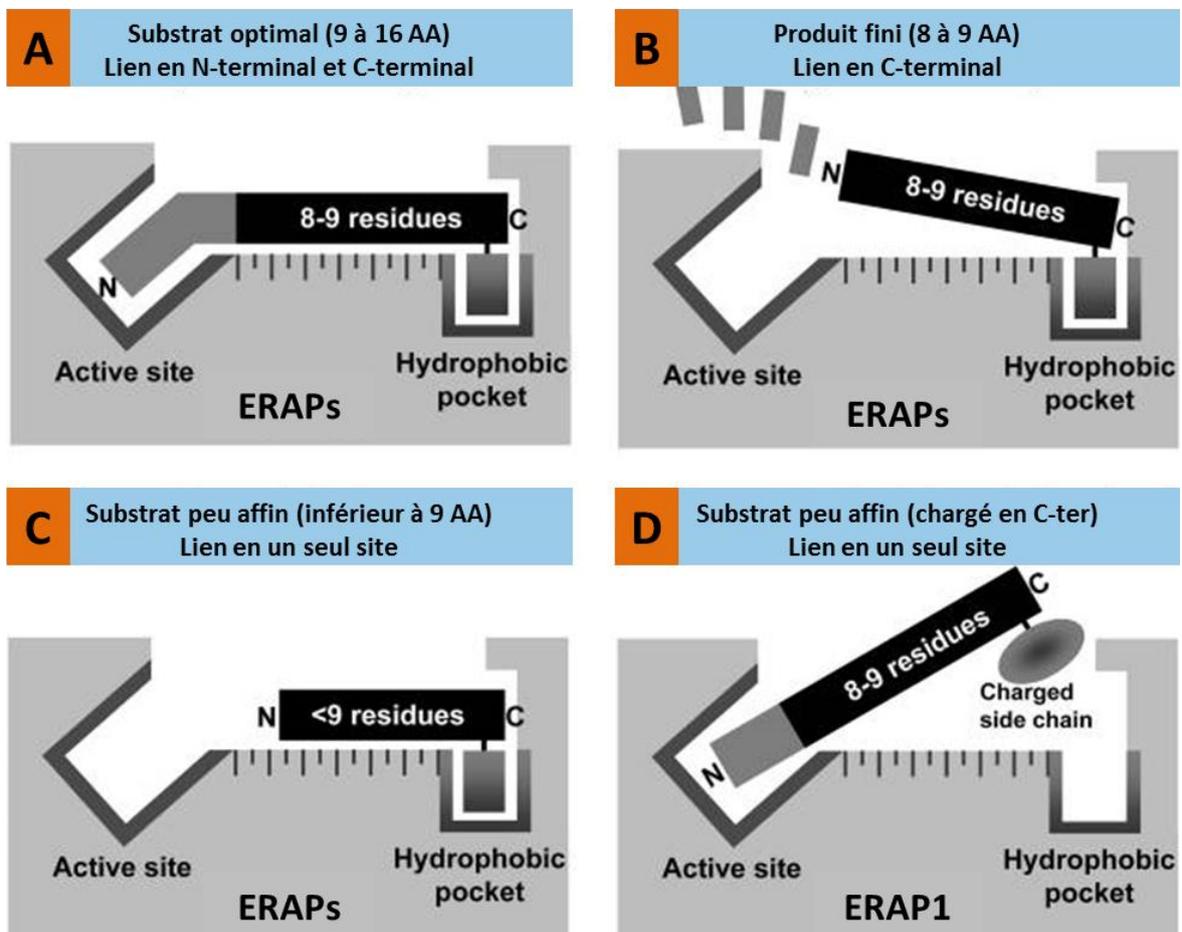


Figure 15 | Modèle de reconnaissance bilatérale des ERAPs.
Adapté de SC. Chang et al. PNAS. 2005, vol. 102, 17107-17112.

⁵⁹ SC. Chang et al. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of CMH class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. PNAS. 2005, vol. 102, 17107-17112.

Les peptides, issus de la dégradation protéosomale, non mature sont raccourcis par les ERAPs en leur partie N-terminale. Les peptides ainsi raccourcis à la taille de 8 à 10 acides aminés peuvent former des complexes stables avec le CMH-I⁶⁰. De plus un grand nombre de séquences protéiques sont dégradées par le protéasome. Ainsi les ERAPs raccourcissent une large gamme de substrat avec des séquences d'acides aminés variées. Les ERAP1 et ERAP2 ont une activité complémentaire. En effet, ERAP2 clive les acides aminés N-terminaux de certains peptides substrats alors qu'ERAP1 ne possède par cette faculté et inversement⁶¹. De plus, des différences de produits ont été obtenues par digestion de substrats naturels par les enzymes ERAP1 et ERAP2 séparés ou en mélange. Ce qui conforte l'hypothèse d'un mécanisme concerté entre les deux aminopeptidases ERAP1 et ERAP2⁶².

L'incubation des deux enzymes seules *versus* l'incubation de concert des deux enzymes révèle un raccourcissement exacerbé en présence des deux enzymes. Lorsque le ratio Enzyme/Substrat est diminué (quantité de substrat doublé) la production d'un intermédiaire de dégradation (11-mer) est restauré (25% avec ERAP1) à la hauteur de 23% avec le mélange des deux enzymes (Figure 16). Ces données indiquent que les deux aminopeptidases ont une activité protéolytique concertée non destructive uniquement à faible concentration.

Les séquences du peptide précurseur N₁₉₁₋₂₀₅ et de l'intermédiaire de dégradation (11-mer) identifié en MS (caractères gras) sont indiquées au sommet de l'encadré bleu. La digestion du peptide initial à différents temps et avec plusieurs combinaisons d'ERAP1 et/ou ERAP2 révèle des différences de composition du milieu réactionnel importantes.

⁶⁰ P. Cascio et al. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. EMBO. **2001**, vol. 20, 2357-2366.

⁶¹ L. Saveanu et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. Nat immunol. **2005**, vol. 6, 689-697.

⁶² E. Lorente et al. Concerted in vitro Trimming of Viral HLA-B27-Restricted Ligands by Human ERAP1 and ERAP2 Aminopeptidases. PloS ONE. **2013**, vol. 8(11), e79596.

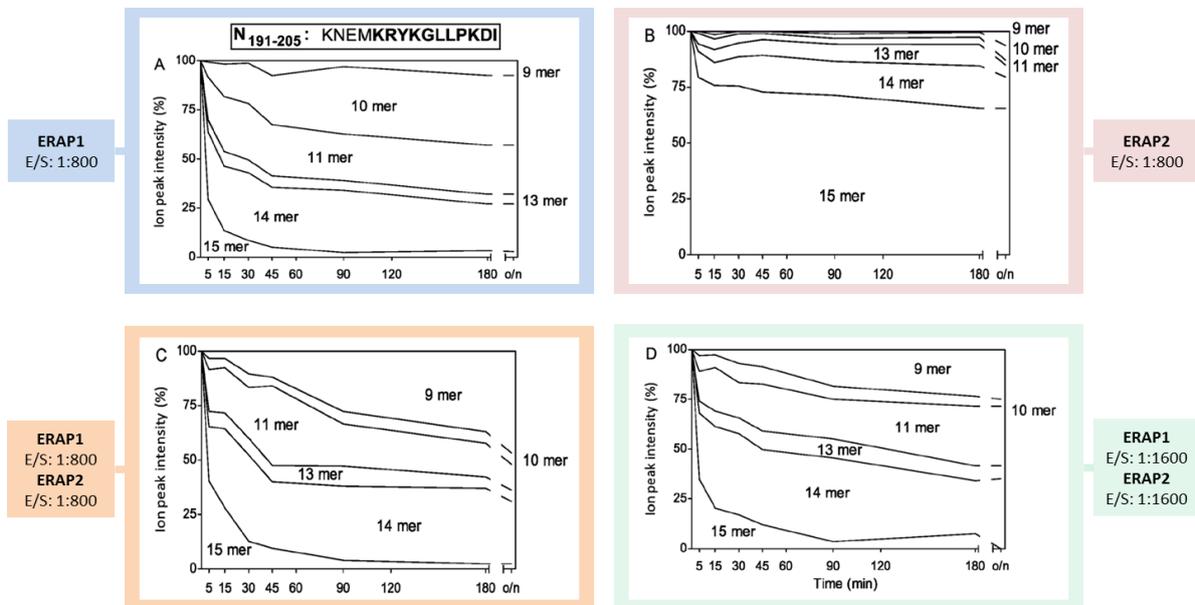


Figure 16 | Aire sous la courbe cumulée de peptides en fonction du temps.

Adapté de E. Lorente et al. *PLoS ONE*. 2013, vol. 8(11), e79596.

La réduction de l'expression de l'ERAP1 par SiRNA conduit à la diminution et/ou à l'abolition de la présentation antigénique de certains épitopes^{63,64}. Alors que pour d'autres épitopes cet extinction d'ERAP1 n'a pas d'effet ou augmente leur présentation. Le rôle des ERAP dans la présentation antigénique croisée⁶⁵ par le raccourcissement de peptides dans le RE a été démontré dans différentes lignées cellulaires et divers modèles murins. La complexité de ce système [ERAPs - CMH-I] n'est plus à démontrer. En effet l'expression du complexe épitope-CMH-I (eCMH-I) à la surface des cellules dépend de la quantité et de la qualité de l'épitope raccourci produit. Un modèle déficient en ERAP entraîne une diminution en l'expression de eCMH-I à la surface de la cellule. Cette diminution est due à une dissociation rapide du complexe épitope-CMH-I de la surface cellulaire plutôt qu'une vitesse faible de complexation dans le RE. C'est pourquoi les ERAPs sont cruciales dans la synthèse d'épitopes optimales pour la complexation avec le CMH-I. L'activité des ERAPs entraîne la formation de complexes stables à la surface de la cellule^{66,67}.

⁶³ S. Hulpke et al. The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptive immunity. *Trends Biochem Sci*. 2013, vol. 38, 412-420.

⁶⁴ IA. York et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol*. 2002, vol. 3, 1177-1184.

⁶⁵ T. Serwold et al. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*. 2002, vol. 419, 480-483.

⁶⁶ GE. Hammer et al. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol*. 2006, vol. 7, 103-112.

⁶⁷ GE. Hammer et al. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat Immunol*. 2006, vol. 8(1), 101-108.

C] Distribution et localisation intracellulaire des ERAPs

L'extrémité N-terminale des ERAPs contient une séquence de résidus hydrophobe caractéristique des protéines traduites et directement co-transloquée dans le RE. L'analyse de la séquence (notamment l'absence d'autres domaines hautement hydrophobes) indique que ces protéines ne possèdent pas d'autre domaine transmembranaire. De plus aucun motif évident ne permet d'affirmer que ces enzymes ERAPs soient cytosolique. Leur localisation a été déterminée par culture cellulaire et western-blot. Les expériences de microscopie par fluorescence (Figure 17) révèlent des auréoles péri-nucléaires caractéristiques du réticulum endoplasmique par les cellules co-transfectées par les ERAPs (Figure 17 couleur verte) et une absence de cette auréole pour les cellules co-transfectées par le vecteur contrôle. De plus ERAAP est co-localisée avec les principaux marqueurs du RE : BiP et gp96. Il est raisonnable de conclure que ces protéines ERAPs sont localisées dans le réticulum endoplasmique des cellules⁶⁸.

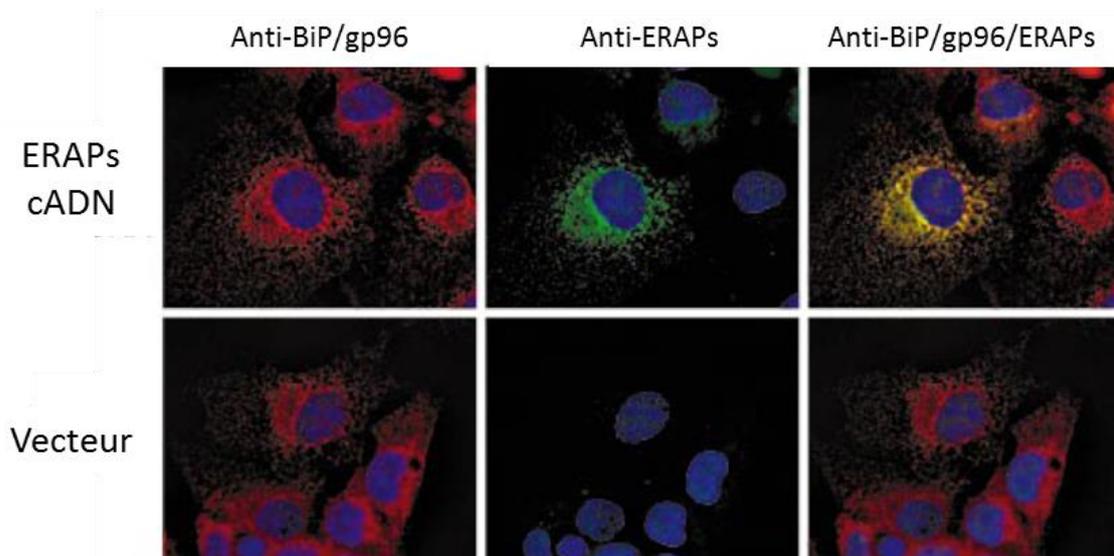


Figure 17 | Les ERAPs sont localisées dans le réticulum endoplasmique.

Adapté de T. Serwold et *al.* Nature. 2002, vol. 419, 480-483.

⁶⁸ Serwold T et *al.* ERAAP customizes peptides for MHC I molecules in the endoplasmic reticulum. Nature. 2002, vol. 419, 480-483.

Dans le but d'évaluer l'expression des ERAPs et du CMH-I en fonction des différents types cellulaires l'analyse de sept types tissulaires a été entreprise. Les ERAPs sont détectées dans tous les tissus étudiés mais leur expression est maximale dans le foie, les poumons, la rate et le thymus ; c'est dans ces tissus que l'on retrouve également les plus hauts taux de CMH-I (Figure 18). L'expression des ERAPs est augmentée d'un facteur 10 lorsque des fibroblastes sont traités par la cytokine inflammatoire interféron gamma (IFN- γ) (Figure 18). Cette cytokine augmente également de nombreux autres composants clés impliqués dans la présentation antigénique médiée par le CMH-I⁶⁹.

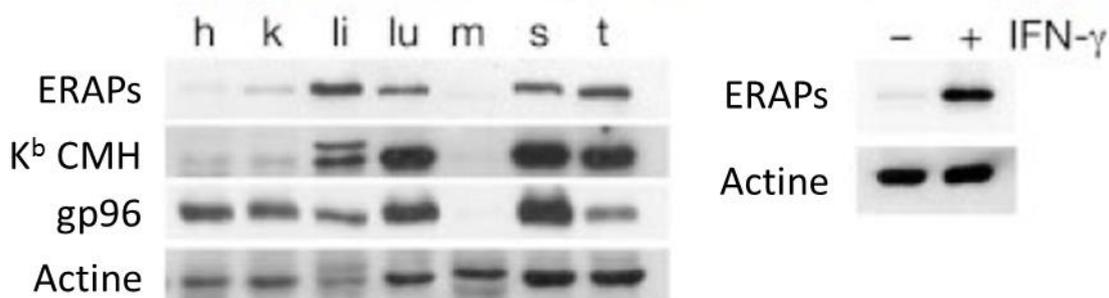


Figure 18 | Localisation des ERAPs en fonction de certains types cellulaires.

Résultats des Western blot en fonction des différents tissus pour les ERAPs, K^b CMH de classe I, gp96 et actine. h, heart; k, kidney; li, liver; lu, lung; m, muscle; s, spleen; t, thymus. Adapté de T. Serwold et *al.* *Nature*. **2002**, vol. 419, 480-483.

La confirmation de la localisation cellulaire des ERAPs a été apportée par la culture de cellules déficientes en protéine TAP (Transporter associated with Antigen Processing) bloquant ainsi l'importation des peptides, liés à cette voie, dans le réticulum endoplasmique. Deux précurseurs du peptide SHL8 avec une séquence de translocation RE ont été utilisés pour permettre l'analyse exclusive du traitement de ces peptides dans le RE⁷⁰. Des cellules exprimant l'un des deux précurseurs du peptide SHL8 : l'un donnant directement le peptide SHL8 après clivage d'une protéase aspécifique (ES-SHL8) et l'autre nécessitant un raccourcissement de sept acides aminés en son extrémité N-terminale (ES-[X7]SHL8). La réduction de l'expression des ERAPs réduit la synthèse du peptide SHL8 de la part des cellules exprimant le précurseur allongé en son domaine N-terminale (ES-[X7]SHL8) (Figure 19). En parallèle la réduction de l'expression des ERAPs n'induit pas de changement pour les cellules exprimant le précurseur ne requérant pas de raccourcissement (ES-SHL8) (Figure 19).

⁶⁹ U. Boehm et *al.* Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol*. **1997**, vol. 15, 749-795.

⁷⁰ K. Anderson et *al.* Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. *J Exp Med*. **1991**, vol. 174, 489-492.

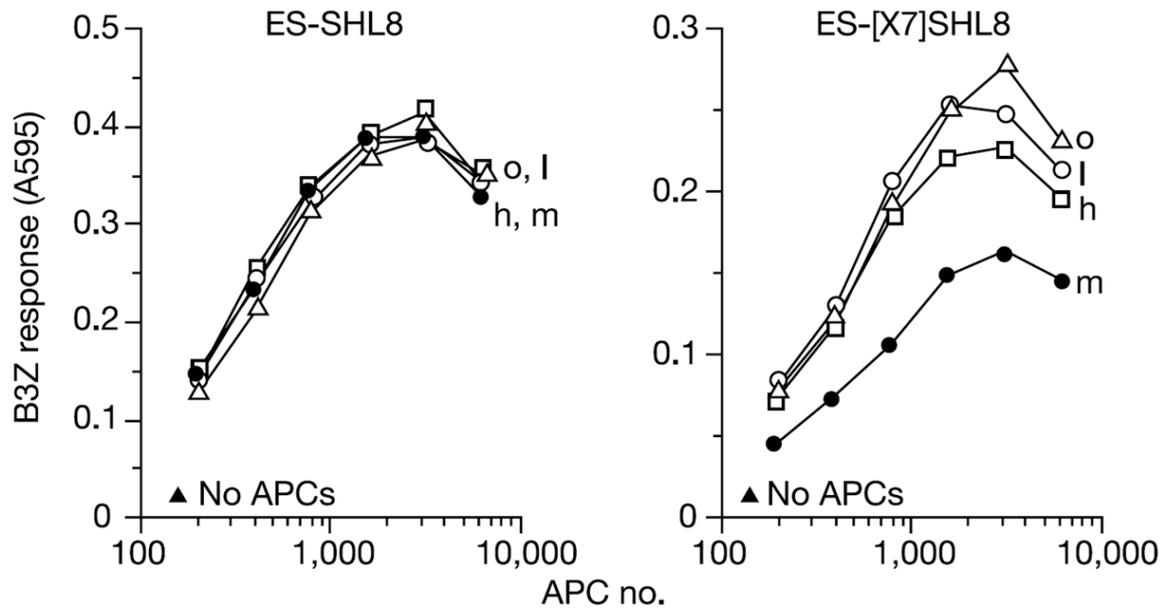


Figure 19 | Confirmation de la localisation des ERAPs dans le réticulum endoplasmique.

Triangle, cellule transfectée avec oligofectamine (o). Cercle vide, siRNA spécifique de lamin b1 (l). Carré, ERAP1 humaine utilisée comme contrôle négatif (h). Cercle plein, ERAAP murine(m). Adapté de T. Serwold et *al.* Nature. **2002**, vol. 419, 480-483.

Des études ont montrés que la protéolyse de précurseurs antigéniques dans le cytoplasme mène rarement au peptide final présenté^{71,72,73}. Les ERAPs sont impliquées dans ce processus et réalisent leur catalyse dans le réticulum endoplasmique des cellules. De plus à l’instar du CMH-I l’expression des ERAPs est ubiquitaire.

⁷¹ PM. Kloetzel et *al.* Antigen processing by the proteasome. Nature rev Mol Cell Biol. **2001**, vol. 2, 179-187.

⁷² P. Cascio et *al.* 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. EMBO. **2001**, vol. 20, 2357-2366.

⁷³ R. Toes et *al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. J Exp Med. **2001**, vol. 194, 1-12.

D] Structure des ERAPs

1] Domaines et structure tertiaire des ERAPs

Les protéines ERAPs ont été segmentées en quatre domaines I, II, III et IV dans le but de mieux appréhender les rôles respectifs de chaque domaine. Le pourcentage d'homologie de séquence entre ERAP1 et ERAP2 oscille en fonction des domaines considérés. Il est de l'ordre de 58% pour le domaine I, de 60% pour le domaine II, de 47% pour le domaine III et pour le domaine IV le moins conservé de 43%.

Composition	Domaine I	Domaine II	Domaine III	Domaine IV
ERAP1 (PDB 2YN0)	AA 46 à 254	AA 255 à 529	AA 530 à 614	AA 615 à 940
ERAP2 (PDB 3SE6)	AA 55 à 271	AA 272 à 546	AA 547 à 647	AA 648 à 960

Tableau 3 | Composition des domaines I à IV des ERAPs.

Bien que le nombre d'acide aminés soit différent par domaine pour ERAP1 et ERAP2 ces deux enzymes sont organisées dans l'espace de la même manière. Le domaine I, principalement composé de feuillet β ($\beta 1$ à $\beta 15$ pour ERAP1), est proche du site catalytique et interagit avec le domaine IV par la boucle étendue entre $\beta 9$ et $\beta 10$. Le domaine II contient le site catalytique, le motif HEXXH₁₈E et le motif GAMEN. De plus une hélice α ($\alpha 6$ pour ERAP1) forme la base d'un canal central le long du site catalytique avec un encombrement stérique par le domaine I crucial pour l'activité exopeptidase (par exemple cet encombrement stérique est absent pour l'endopeptidase qu'est la thermolysine (EC 3.4.24.27))⁷⁴. Le domaine III d'une taille réduite est composé de deux feuillets β ($\beta 20$ et $\beta 26$ pour ERAP1) flexibles attachant le domaine II avec le domaine IV. Le domaine IV est uniquement composé d'hélices α ayant la particularité de former une surface concave dans l'espace. Lorsque les ERAPs sont sous forme fermées le domaine IV recouvre intégralement le site catalytique pour former une large cavité centrale isolant totalement le site catalytique vis-à-vis du milieu extérieur.

La configuration fermée des ERAPs est définie par le contact entre le domaine II et le domaine IV formant une large cavité interne, isolée et adjacente au site catalytique (2920Å² pour ERAP1⁷⁵ et 3334Å² pour ERAP2⁷⁶). Les ERAPs en configuration fermées ne permettent plus l'accès au solvant, mais piègent de nombreuses molécules d'eau essentielles à l'activité catalytique au sein de la cavité. Lorsque les domaines II et IV se dissocient les ERAPs adoptent la configuration ouverte (Figure 20), exposant ainsi le site catalytique au solvant et au milieu extérieur.

⁷⁴ MA. Holmes et al. Structure of thermolysin refined at 1.6Å resolution. Journal of molecular biology. **1982**, vol. 160(4), 623-639.

⁷⁵ G. Kochan et al. Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. PNAS. **2011**, vol. 108(19), 7745-7750.

⁷⁶ JR. Birtley et al. The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing. Biochemistry. **2012**, vol. 51, 286-295.

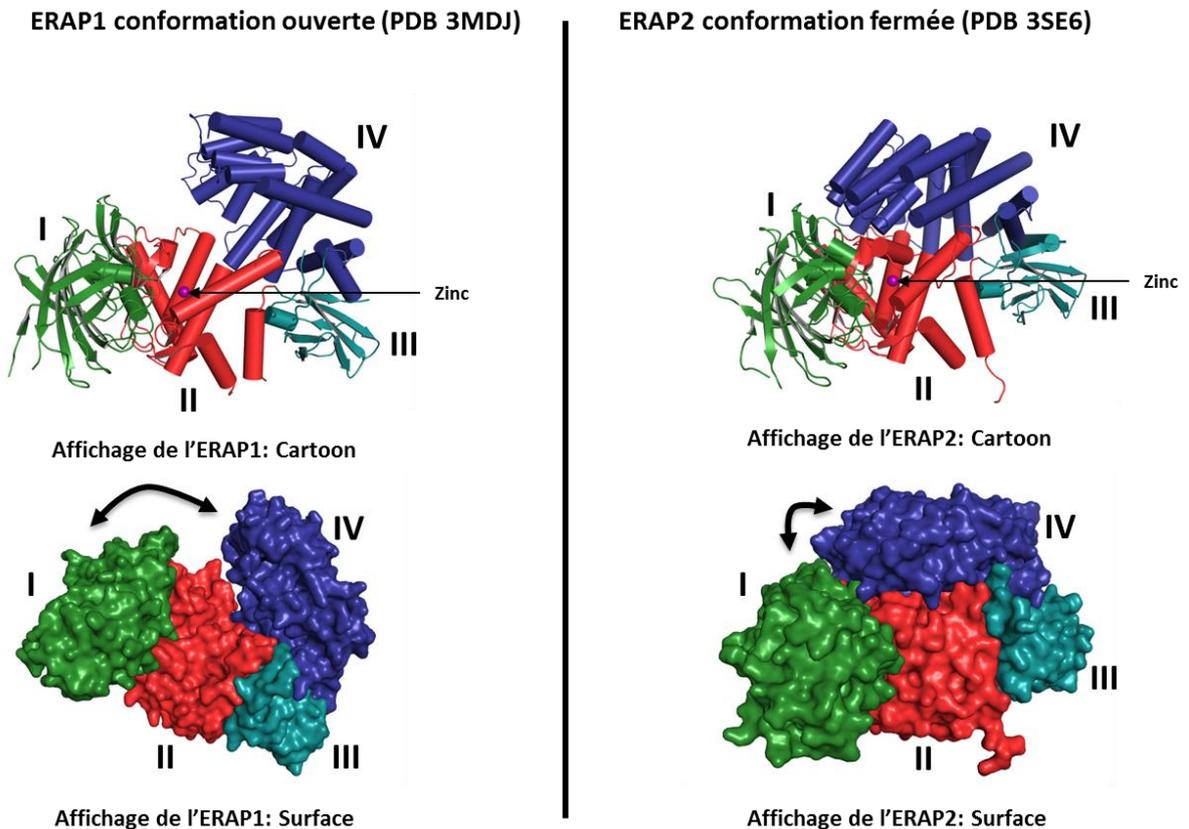


Figure 20 | Adoption d'une conformation ouverte et fermée par les ERAPs.

Domaine I [vert], II [rouge], III [cyan], et IV [bleu] de l'ERAP1 et de l'ERAP2 respectivement en conformation ouverte et fermée. Réalisé avec le logiciel pymol®.

2] Site catalytique des ERAPs

Le site catalytique des ERAPs est composé d'un atome de Zinc indispensable à l'activité aminoprotéolytique de ces enzymes. Cet atome de Zinc est inclus dans deux sphères de coordination. La sphère de coordination primaire est composée de deux histidines (H370 et H374 pour ERAP2) et d'un acide glutamique (E393 pour ERAP2). La sphère de coordination secondaire est constituée d'un glutamate (E371 pour ERAP2) ayant la faculté de stabiliser par liaison hydrogène le carbonyle du peptide substrat afin de le positionner pour l'attaque nucléophile de la molécule d'eau polarisée par l'atome de Zinc. La tyrosine (T455), conservée dans toutes les aminopeptidases M1, est incluse dans cette sphère de coordination secondaire et assiste la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique durant le cycle catalytique⁷⁷. Cette configuration est partagée par les ERAPs, toutefois, dans un souci de clarté seul le site catalytique de l'ERAP2 sera développé dans l'exemple suivant (Figure 21).

⁷⁷ A. Addlagatta et al. Structure of aminopeptidase N from Escherichia coli suggests a compartmentalized, gated active site. PNAS. 2006, vol. 103(36), 13339-13344.

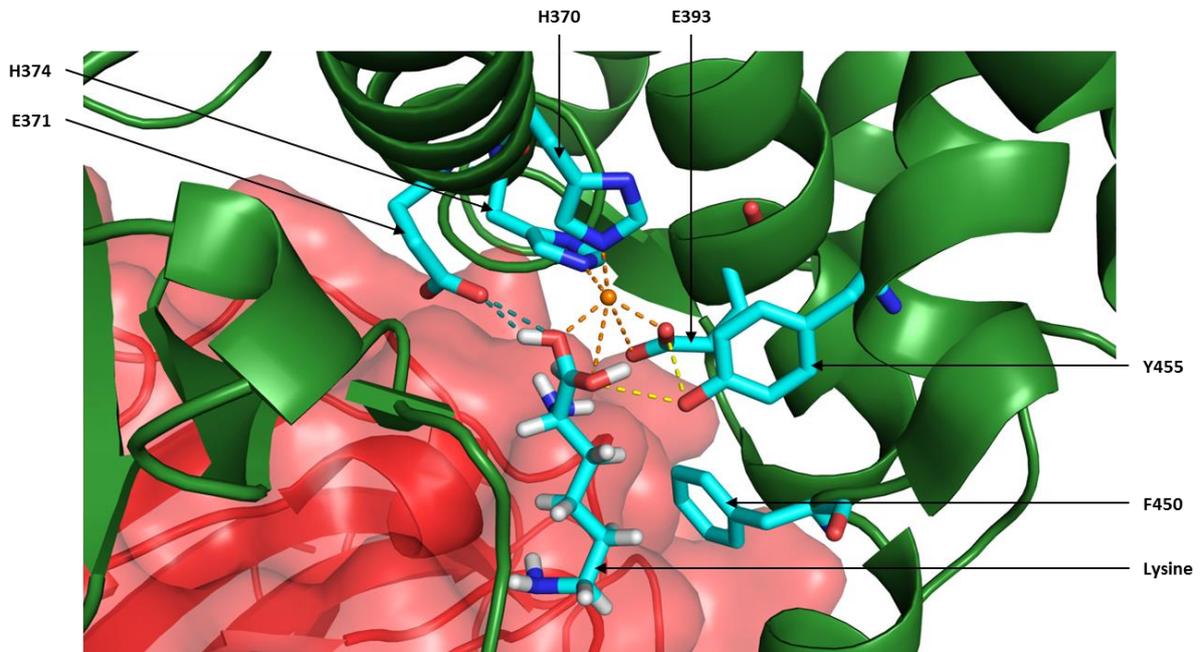


Figure 21 | Site catalytique d'ERAP2 en conformation fermée.

L'atome de Zinc et ses sphères de coordinations sont représentées en orange. Les liaisons hydrogènes de la tyrosine 455 sont représentées en jaune. Les liaisons hydrogènes de l'acide glutamique 371 sont représentées en sarcelle. Code couleur des atomes représentés en bâton: cyan = carbone; rouge = oxygène; blanc = hydrogène; bleu = azote. Réalisé avec le logiciel pymol®.

3] La poche S1

Les poches S1 des enzymes ERAP1 et ERAP2 leur sont spécifiques et sont l'un des paramètres permettant d'expliquer les différences de reconnaissance de substrat de ces deux aminopeptidases. C'est pourquoi les détails des poches S1 de l'ERAP1 et de l'ERAP2 seront traités séparément.

ERAP1 :

La poche S1 d'ERAP1 est délimitée par la phénylalanine 433 (F433), la chaîne latérale de la méthionine 319 (M319), le segment aliphatique de l'acide glutamique 183 (E183) et la fonction amide de la glutamine 181 (Q181). Une partie de la poche est constituée de l'acide glutamique 177 (E177), de la proline 201 (P201) et de la glutamine 447 (Q447). La fin de la poche est formée par la chaîne latérale aliphatique de l'arginine 430 (R430) scellant ainsi le bas de la poche par interaction électrostatique de son ion guanidinium avec le carboxylate de l'acide glutamique 865 (E865) appartenant au domaine IV. E865 est lié par liaison non covalente au noyau imidazole de l'histidine 160 (H160) du domaine I. De plus la glutamine 181 est un acide aminé essentiel à la spécificité de reconnaissance des substrats par l'ERAP1⁷⁸ (son homologue pour ERAP2 étant l'acide aspartique 198)⁷⁹. Pour résumer, la

⁷⁸ Y. Goto et *al.* Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1. *J Biochem.* **2008**, vol. 416(1), 109-116.

⁷⁹ JR. Birtley et *al.* The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing. *Biochemistry.* **2012**, vol. 51, 286-295.

poche S1 d'ERAP1 est étendue et l'espace délimité par S1 est un instrument pour la protéine afin de reconnaître des peptides composés de différentes parties N-terminales⁸⁰.

ERAP2 :

La poche S1 d'ERAP2 est délimitée dans un premier temps par des acides aminés du motif GAMEN, la glycine 334 (G334) et l'alanine 335 (A335). Puis dans la continuité par la proline 333 (P333) adjacente. Dans un second temps une molécule d'eau stabilise un état pyramidal par liaison hydrogène avec les acides carboxyliques de trois acides glutamiques (E200, E337 et E393). De plus deux acides aminés importants du domaine I comprenant l'acide glutamique 200 (E200) et l'acide aspartique 198 (D198) forment des liaisons hydrogènes avec la partie N-terminal des substrats et permettent ainsi l'ancrage des substrats dans cette poche. D'une façon intéressante D198 est un acide aminé déterminant pour la spécificité de reconnaissance de l'ERAP2⁸¹. Enfin cette poche S1 de l'ERAP2 est plafonnée par l'acide glutamique 177 (E177), la proline 201 (P201) et la glutamine 447 (Q447)⁸².

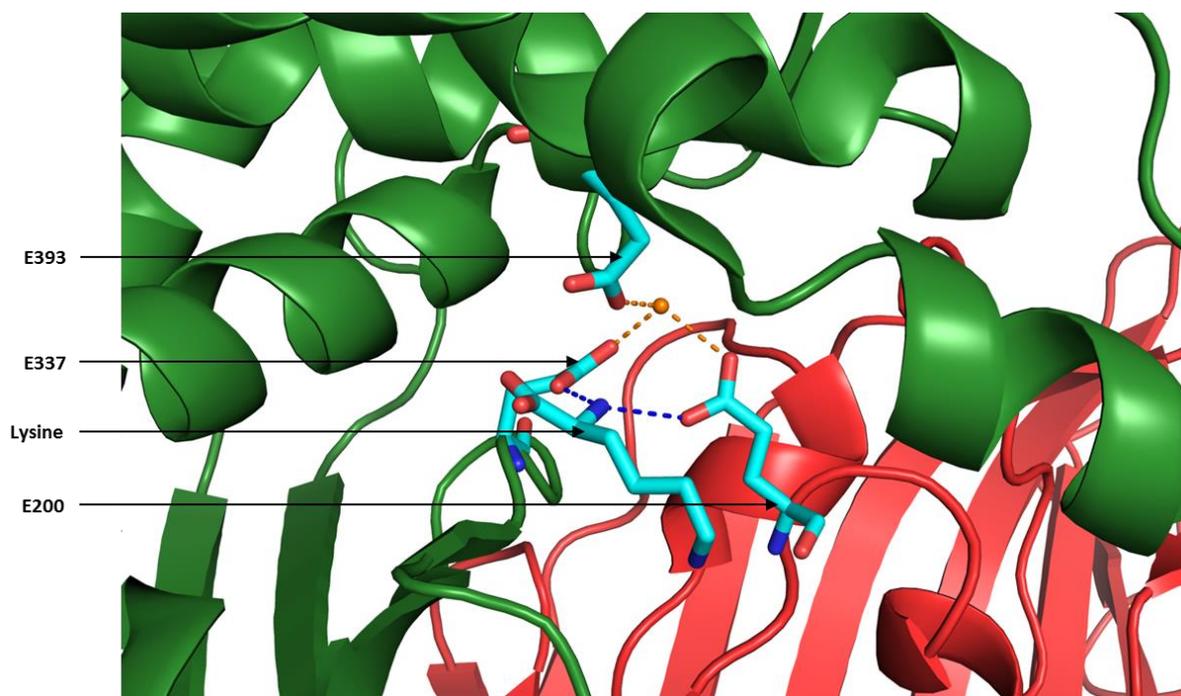


Figure 22 | Poche S1 de l'ERAP2.

Molécule d'eau et trois liaisons hydrogènes associées [orange] formant un état pyramidal stabilisateur. Liaisons hydrogènes de l'azote libre de la lysine [bleu] avec E337 et E200. Réalisé avec le logiciel pymol®.

⁸⁰ A. Addlagatta et al. Structure of aminopeptidase N from Escherichia coli suggests a compartmentalized, gated active site. PNAS. **2006**, vol. 103(36), 13339-13344.

⁸¹ E. Zervoudi et al. Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides. J Biochem. **2011**, vol. 435(2), 411-420.

⁸² JR. Birtley et al. The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing. Biochemistry. **2012**, vol. 51, 286-295.

Le changement de nombreux résidus entre ERAP1 et ERAP2 marque un changement dans le potentiel électrostatique à la base de la poche S1. Ce qui est corrélé avec la préférence d'ERAP2 pour les substrats positivement chargés en leur partie N-terminale⁸¹.

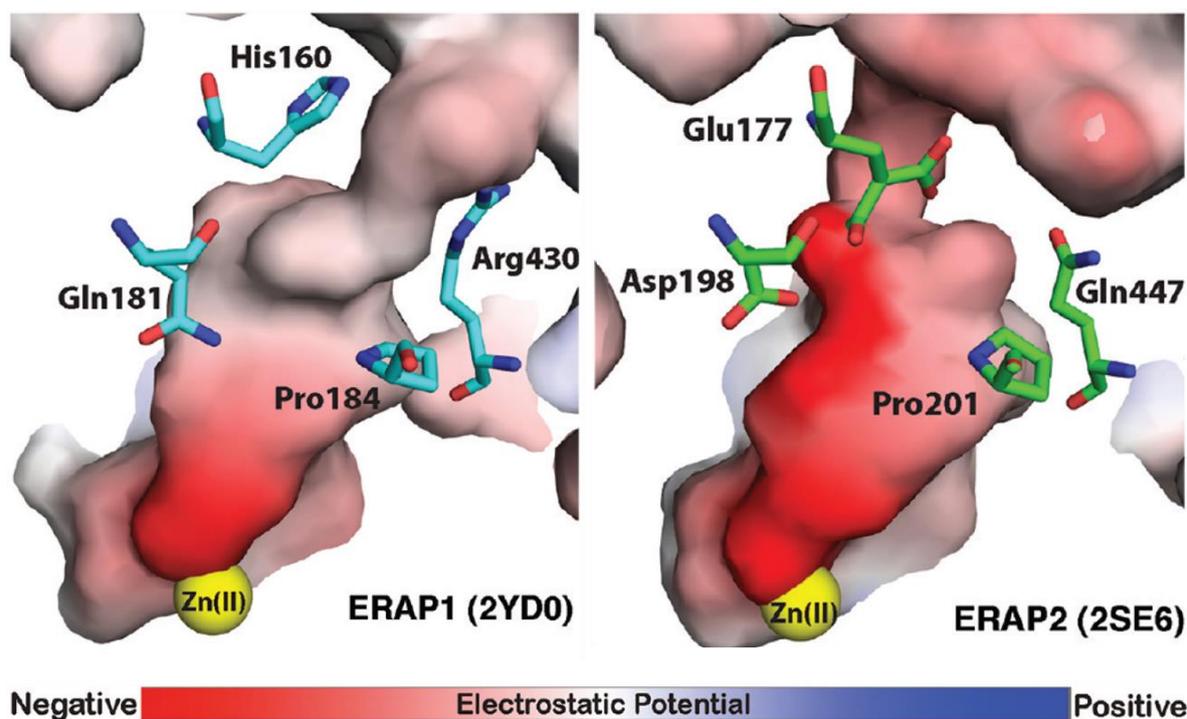


Figure 23 | Potentiel électrostatique d'une fraction de la poche S1 reconnaissant l'acide aminé N-terminal des substrats. ERAP1 à gauche et ERAP2 à droite. Adapté de JR. Birtley et *al.* *Biochemistry* 2012, vol. 51, 286-295.

4] Le canal hydrophobe, la cavité interne et la poche S1'

Lorsque les ERAPs sont en conformation fermées il y a formation d'un canal hydrophobe entre les domaines II et IV adjacent au site catalytique. La cavité interne formée par les domaines des ERAPs en conformation fermées permet l'accueil du peptide substrat. Le différentiel des surfaces de ces cavités internes (3185Å² pour ERAP1 et 3334Å² pour ERAP2) est peu élevé. Toutefois, les chaînes latérales des acides aminés tapissant ces poches comportent des différences notamment pour les chaînes latérales issues du domaine le moins homologue : le domaine IV. Les chaînes latérales acides ayant un potentiel électrostatique négatif sont au nombre de 19 pour les deux enzymes. Tandis que les chaînes latérales basiques à potentiel électrostatique positif sont majoritaires pour ERAP2 (17) versus ERAP1 (12). Enfin le nombre de chaînes polaires (hydroxyle et amide) sont du même ordre de grandeur pour les deux enzymes. Le nombre de chaînes latérales polaires importe mais leur placement dans la cavité est un facteur déterminant la physionomie de ces poches. Cette physionomie de la cavité interne est un facteur expliquant la spécificité de substrat de l'ERAP1 et de l'ERAP2 (Tableau 4).

	ERAP1		ERAP2	
	Domaine II	Domaine IV	Domaine II	Domaine IV
Chaînes latérales ionisables Acides	13	6	11	8
Chaînes latérales ionisables Basiques	6	6	6	11
Chaînes latérales polaires Hydroxyle ou Amide	12	25	17	17

Tableau 4 | Acides aminés, de la cavité interne, à polarité remarquable pour ERAP1 et ERAP2.

La structure de la poche S1' sélectionne en particulier les seconds acides aminés post N-terminaux du substrat. L'ensemble des différences concernant le canal hydrophobe, la cavité interne et la poche S1' déterminent les substrats pris en charge par ces deux enzymes. En effet ERAP1 prend en charge d'une façon préférentielle les peptides positivement chargés^{83,84}. Mais ces différences induisent également une sélectivité en fonction de la taille des substrats avec une préférence notoire d'ERAP2 pour les peptides de taille restreinte⁸⁵.

5] Oligomérisation des ERAPs

L'ERAP1 à l'heure actuelle a été cristallisée sous forme de monomère (PDB : 3QNF, 3MDJ, 3RJO et 2YDO). D'une façon similaire l'ERAP2 a été cristallisée sous forme de monomère (PDB : 3SE6, 4JBS, 4E36, 5AB2, 5AB0 et 5CU5). Toutefois, il est possible que l'ERAP1 et l'ERAP2 oligomérisent dans l'espace limité du RE où leur concentration peut être importante. De plus un homodimère de la protéine hautement homologue IRAP a été démontré⁸⁶. Enfin l'ERAP1 et l'ERAP2 travaillent de concert et un mécanisme d'hétérodimérisation entre ces deux enzymes a été avancé⁸⁷. Sur ce postulat un modèle d'homodimère d'ERAP2 a été proposé⁸⁸. Ce travail, bien qu'hypothétique, a permis d'aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'oligomérisation des ERAPs.

Le modèle développé repose sur un homodimère asymétrique des ERAP2. Cette dimérisation est médiée majoritairement par le domaine I définissant une zone d'exclusion de 1147Å². Un feuillet-β du domaine I de chaque monomère interagit avec un feuillet-β de l'autre monomère. On aboutit alors à une liaison de 4 feuillets-β antiparallèles entre les deux domaines I de chaque monomère (Figure 24).

⁸³ I. Evnouchidou et al. The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. PLoS ONE. **2008**, vol. 3(11), e3658.

⁸⁴ TT. Nguyen et al. Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. Nat Struct mol biol. **2011**, vol. 18(5), 604-613.

⁸⁵ SC. Chang et al. The ER aminopeptidase, ERAP1 trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a 'molecular ruler' mechanism. PNAS. **2005**, vol. 102(47), 17107-17112.

⁸⁶ DB. Ascher et al. Regulation of insulin-regulated membrane aminopeptidase activity by its C-terminal domain. Biochemistry. **2011**, vol. 50(13), 2611-2622.

⁸⁷ L. Saveanu et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. Nature Immunol. **2005**, vol. 6, 689-697.

⁸⁸ JR. Birtley et al. The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing. Biochemistry. **2012**, vol. 51, 286-295.

Les thréonines 191 (T191) de chaque monomère forment des liaisons hydrogènes mutuelles entre les oxygènes du carbonyle et l'azote de l'amide (2.9Å et 3.0Å). Le manque d'autres interactions majoritaires est compensé par de nombreuses interactions ioniques :

- L'acide glutamique 190 (E190) d'un monomère avec l'Arginine 229 (R229) de l'autre monomère et *vice versa* (2.8Å et 3.2Å).
- Une liaison hydrogène non conventionnelle entre hydrogènes de l'isoleucine 193 (I193) et l'oxygène du carbonyle de la glycine 188 (G188) de chaque monomère et *vice versa*.
- Une liaison hydrogène entre la leucine 187 [Domaine I] (L187) et l'asparagine 291 [Domaine II] (N291) de chaque monomère et *vice versa* ce qui rapproche mutuellement les boucles (L187 et G188).
- Il existe deux interactions ioniques fortes entre domaines IV des deux monomères mettant en jeu l'acide glutamique 813 (E813) et la lysine 848 (K848) (2.6Å et 2.9Å).

De nombreux résidus, extrêmement conservés chez ERAP1, pourraient participer à une hétérodimérisation de ces deux protéines appartenant à la famille M1.

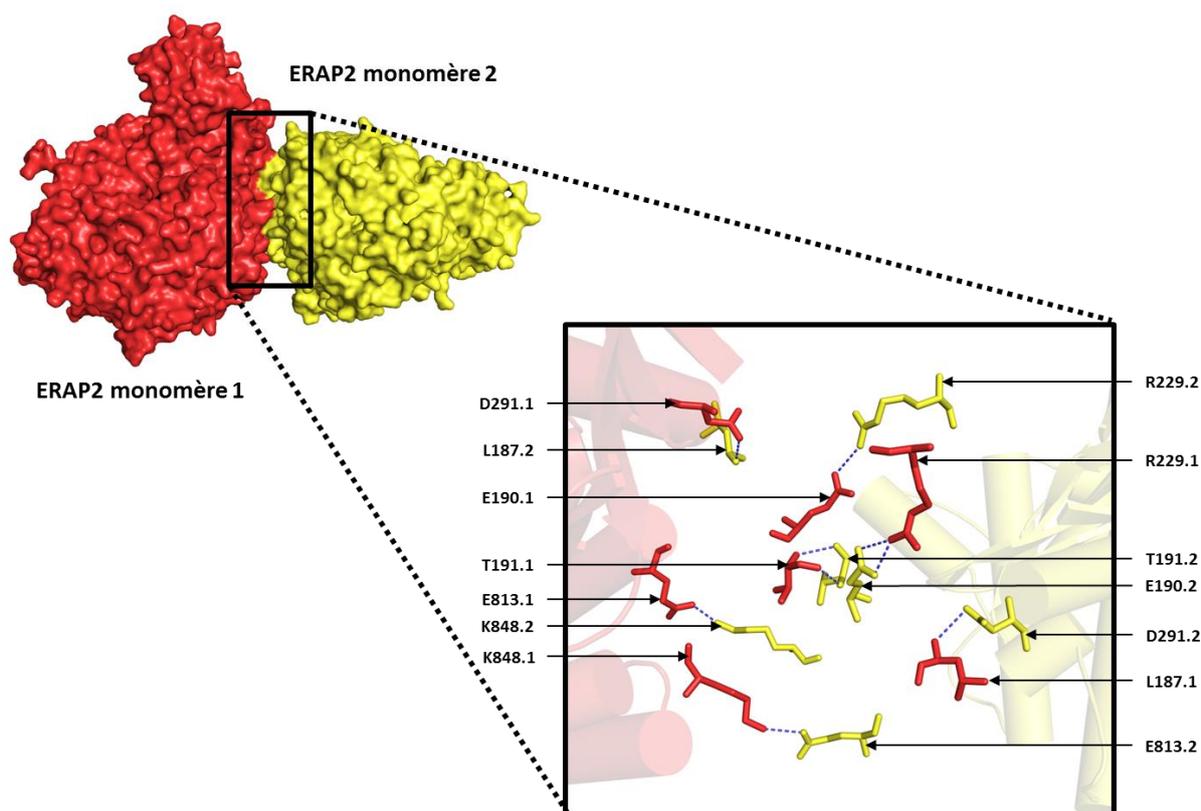


Figure 24 | Homodimérisation de l'ERAP2.

Les acides aminés du monomère 1 sont représentés en rouge, les acides aminés du monomère 2 sont représentés en jaune. Réalisé avec le logiciel pymol®.

6] Polymorphisme d'un seul nucléotide (SNPs) et pathologie

ERAP1 et ERAP2 sont toutes deux naturellement polymorphique au sein de la population et plus d'une douzaine de SNPs dans le génome ont été associés à des prédispositions concernant des maladies humaines majeures incluant des maladies inflammatoires, auto-immunes^{89,90}, infections virales^{91,92} et cancer^{93,94,95}. Ces SNPs affectent la réponse des LTCD8⁺, des cellules NK et la production de cytokines inflammatoires⁹⁶. Un SNP se traduit par la modification d'un acide aminé dans la protéine ce qui peut avoir des répercussions sur le raccourcissement de peptides substrats et par ce biais modifier la présentation antigénique des cellules pour aboutir à une réponse immunitaire modifiée.

Certains SNPs, en association avec d'autres facteurs, favorisent l'apparition de maladies déclarées. En effet, une étude GWAS (étude d'association pangénomique) sur population caucasienne a démontré l'importance du SNPs rs30187-T de l'ERAP1 associé à une mutation du CMH-I dans l'augmentation du risque de développer un psoriasis⁹⁷. Le psoriasis est une maladie auto-immune dans laquelle des lymphocytes T anormalement stimulés provoquent l'inflammation et des dommages aux cellules de l'épiderme. De plus deux SNPs de l'ERAP1 sont des facteurs de risque quant au développement de la maladie de Behcet⁹⁸. La maladie de Behcet est une vascularite à composante inflammatoire, les mécanismes régissant le développement de la maladie n'ont à l'heure actuelle pas été élucidés. Les SNPs rs10050860-T et rs17482078-T de l'ERAP1 ont été identifiés, à travers une étude GWAS appliquée à des populations turques, comme facteur favorisant le déclenchement de la maladie (Behcet) en association avec le HLA-B51⁹⁹.

L'exemple majeur développé est l'association de SNPs de l'ERAP1 et de l'ERAP2 avec la spondylarthrite ankylosante. La spondylarthrite ankylosante est une maladie inflammatoire chronique articulaire de la colonne vertébrale avec un terrain génétique prédominant et une étiologie auto-immunitaire. Des études GWAS ont démontrées que plusieurs SNPs de

⁸⁹ PR Burton et al. Association scan of 14,500 non synonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet.* **2007**, vol. 39(11), 1329-1337.

⁹⁰ Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet.* **2010**, vol. 42(2), 123-127.

⁹¹ R. Cagliani et al. Genetic diversity at endoplasmic reticulum aminopeptidases is maintained by balancing selection and is associated with natural resistance to HIV-1 infection. *Hum Mol Genet.* **2010**, vol. 19(23), 4705-4714.

⁹² L. Hill et al. Fetal ERAP2 variation is associated with preeclampsia in African Americans in a case-control study. *BMC Med Genet.* **2011**, vol. 12(64).

⁹³ MJ. Smyth et al. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* **2006**, vol. 90, 1-50.

⁹⁴ JB. Swann et al. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* **2007**, vol. 117, 1137-1146.

⁹⁵ S. Crotty et al. Follicular helper CD4 T cells (THF). *Annu rev immunol.* **2001**, vol. 29, 621-663.

⁹⁶ E. Stratikos et al. A role for naturally occurring alleles of endoplasmic reticulum aminopeptidases in tumor immunity and cancer pre-disposition. *Frontiers in oncology.* **2014**, vol. 4(363), 1-10.

⁹⁷ Psoriasis consortium. A. Strange et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet.* **2010**, vol. 42(11), 985-990.

⁹⁸ MJ. Ombrello et al. Behcet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2014**, vol. 111, 8867-8872.

⁹⁹ Y. Kirino et al. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behcet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nat Genet.* **2013**, vol. 45, 202-207.

l'ERAP1 et de l'ERAP2 sont associés à des prédispositions pour la spondylarthrite ankylosante^{100,101,102}.

Les SNPs majoritaires des ERAPs, leur relation aux maladies, aux systèmes HLA et leurs conséquences fonctionnelles sont exposées ci-dessous (Tableau 5).

	ERAP1/2 SNP	Disease association	HLA class I link	Affects
ERAP1	rs3734016 (E56K)	HPV-induced cervical carcinoma		Expression levels
	rs26653 (R127P)	Ankylosing spondylitis, HPV-induced cervical carcinoma		Expression levels
	rs2287987 (M349V)	Ankylosing spondylitis		
	rs30187 (K528R)	Ankylosing spondylitis, psoriasis, essential hypertension, multiple sclerosis	B*27 Cw*0602	Activity and specificity
	rs10050860 (D575N)	Ankylosing spondylitis, Behçet disease		Activity
	rs17482078 (R725Q)	Ankylosing Spondylitis, Behçet disease	B*51	Activity
	rs27044 (Q730E)	Ankylosing spondylitis, HPV-induced cervical carcinoma		Activity and specificity
ERAP2	rs2549782 (K392N)	Ankylosing spondylitis, preeclampsia, resistance to HIV infection		Activity and specificity
	rs2248374 (non-coding)	Ankylosing spondylitis		Expression levels

Tableau 5 | Les SNPs prépondérants dans la population pour ERAP1 et ERAP2.

Adapté de E. Stratikos et *al.* *Frontiers in oncology*. **2014**, vol. 4(363), 1-10.

Un SNP peut augmenter sensiblement la prédisposition d'un patient pour une maladie, mais les patients déclarant la spondylarthrite ankylosante présentent plusieurs SNPs. Ces divers SNPs d'un même individu sont une composante de leur haplotype. L'haplotype est un groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome. Des haplotypes sont associés à des prédispositions ou résistances à la spondylarthrite ankylosante. Par exemple un haplotype prédisposant à la spondylarthrite ankylosante (composé de trois SNPs) a été proposé, incluant les deux ERAPs, 730Q & 528K pour ERAP1 et 392N pour ERAP2¹⁰³. Toutefois, les prédispositions du patient à la spondylarthrite ankylosante pour cet haplotype sont mises en évidence uniquement lorsqu'il est associé au HLA-B27 ou au HLA-B51. Par conséquent la maladie est effective lorsque plusieurs haplotypes (haplotype des ERAPs et haplotype du CMH-I) sont mis en présence (en omettant la composante environnementale).

A titre d'exemple, le SNP de l'ERAP2 (rs2549782) code la variation N392K (remplacement de l'asparagine 392 (N392) par la lysine 392 (K392)). Le SNP N392K mène à une altération de l'activité et de la spécificité de l'enzyme. La structure cristallographique du variant K392 suggère que le polymorphisme interfère avec la stabilisation de la partie N-terminal du peptide d'une façon directe et indirecte par interaction avec des résidus clés participant à la catalyse¹⁰⁴.

¹⁰⁰ PR. Burton et *al.* Association scan of 14,500 non synonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*. **2007**, vol. 39, 1329-1337.

¹⁰¹ DM. Evans et *al.* Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet*. **2011**, vol. 43, 761-767.

¹⁰² International genetics of ankylosing spondylitis consortium (IGAS). A. Cortes et *al.* Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat genet*. **2013**, vol. 45, 730-738.

¹⁰³ FW. Tsui et *al.* Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Ann rheum dis*. **2010**, vol. 69, 733-736.

¹⁰⁴ I. Evnouchidou et *al.* A common single nucleotide polymorphism in endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 induces a specificity switch that leads to altered antigen processing. *The journal of immunology*. **2012**, vol. 189, 2383-2392.

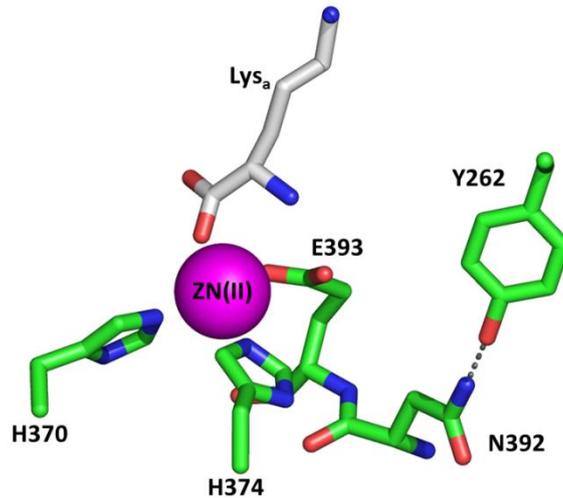


Figure 25 | Single Nuclear Polymorphism de l'ERAP2 : rs2549782.
Réalisé avec le logiciel pymol®.

Le remplacement de l'asparagine 392 (N392), stabilisant la tyrosine 262 (Y262) par liaison hydrogène, par la lysine 392 (K392) perturbe la structure d'ERAP2 proche du site catalytique (Figure 25). Cette mutation ponctuelle affecte l'efficacité et les propriétés de l'enzyme tant sur un point quantitatif que qualitatif. Ce polymorphisme dans la population implique des variations dans la prise en charge de certains épitopes, ce qui est un facteur important dans la variabilité de la réponse immunitaire interindividuelle chez l'Homme. Le SNP N392K de l'ERAP2 (rs2549782) a été caractérisé et est un modèle d'étude intéressant pour comprendre le rôle de ces variants dans le processus de présentation antigénique.

L'activité des deux variants a été comparée en utilisant un substrat fluorogène, la L-arginyl-7-amido-4-méthyl coumarin (R-AMC). Le variant ERAP2^N a une activité significativement accrue face au variant ERAP2^K vis-à-vis du substrat R-AMC (Figure 26).

ERAP2^N : 78 ± 1 mmol produit . mol enzyme⁻¹ . sec⁻¹
ERAP2^K : 4.8 ± 3 mmol produit . mol enzyme⁻¹ . sec⁻¹

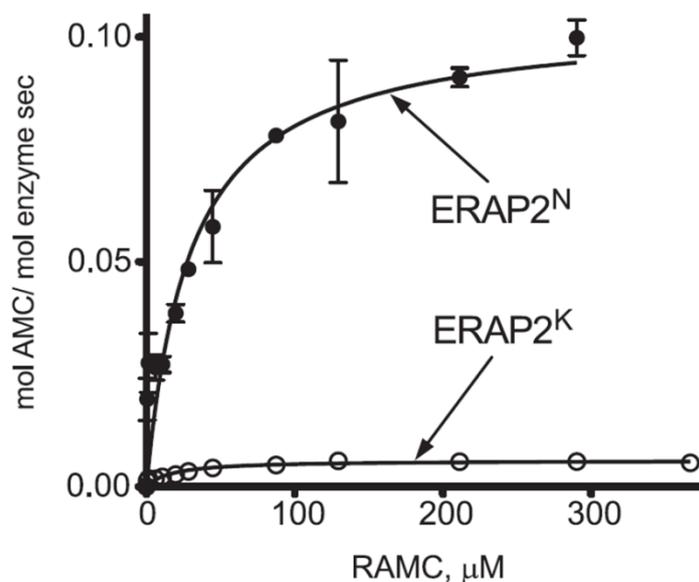


Figure 26 | Hydrolyse du substrat R-AMC par ERAP2^N et ERAP2^K.
D'après I. Evnouchidou et *al.* The journal of immunology. **2012**, vol. 189, 2383-2392.

L'exemple de ce polymorphisme génétique N392K illustre l'importance des SNPs en pathologie car les deux allèles N392 et K392 sont répartis équitablement dans la population humaine, ce qui est vraisemblablement le résultat d'une sélection naturelle impliquant un équilibre hôte-pathogène¹⁰⁵. Ce polymorphisme rs2549782 d'ERAP2 est associé à des maladies dans tous les modèles basés sur des études génétiques pour ERAP2. La proximité du résidu 392 vis-à-vis du site catalytique d'ERAP2 perturbe son activité enzymatique.

Ces caractéristiques génétiques : SNPs, haplotypes, prédispositions ou résistances à des maladies appartiennent à un domaine de spécialiste. La pharmacogénétique étudie l'influence du patrimoine génétique des patients sur l'activité des molécules bioactives. La pharmacogénétique est un premier pas dans le développement de la médecine personnalisée.

Ces caractéristiques sont à prendre en compte dans le développement d'un candidat médicament pour garantir l'efficacité de la molécule thérapeutique en ciblant les populations réceptives.

¹⁰⁵ R. Cagliani et *al.* Genetic diversity at endoplasmic reticulum aminopeptidases is maintained by balancing selection and is associated with natural resistance to HIV-1 infection. Hum Mol Genet. **2010**, vol. 19(23), 4705-4714.

III] Modulation des ERAPs

A] Modulateurs non sélectifs des ERAPs

Les structures radio-cristallographiques des ERAPs humaines sont un outil incontournable pour une meilleure compréhension mécanistique et une meilleure compréhension des phénomènes de régulation s'opérant sur ces enzymes. La co-cristallisation des ERAPs avec une famille d'inhibiteurs a d'ores et déjà été obtenue¹⁰⁶. Ces travaux peuvent nous être utiles pour la conception future d'inhibiteurs spécifique des ERAPs^{107,108}.

Inhibiteurs non sélectifs des ERAPs

La conception d'inhibiteurs de métalloprotéase à zinc, ayant pour cible le site catalytique de ces enzymes, repose sur deux composantes. La première composante repose sur l'utilisation de groupements chimiques chélateurs de l'ion métallique Zinc tel que le AHA. La seconde composante repose sur l'utilisation d'un squelette peptidomimétique pour interagir avec les poches latérales en périphérie du site catalytique. Le squelette peptidomimétique permet un gain en sélectivité et en puissance. Associé à un Groupement Chélateur du Zinc (ZBG) adéquat on forme l'inhibiteur complet. Un ZBG de choix fortement utilisé dans le développement de molécules bioactives est l'acide hydroxamique. Des molécules thérapeutiques ayant atteint le marché tel que le vorinostat et le bélinostat inhibiteurs d'histone désacétylase (HDAC) illustrent une famille de composés intégrant dans leur structure un ZBG acide hydroxamique.

Le squelette de la molécule inhibitrice (groupements chimiques hors groupement chélateur du métal) peut permettre, s'il est correctement optimisé, l'accroissement de la puissance inhibitrice du composé et la sélectivité du composé pour l'enzyme ciblé en interagissant avec ces poches latérales spécifiques, les molécules d'eau de solvatation et dans sa globalité la conformation en trois dimensions (3D) de la protéine. L'inhibition spécifique de composés d'une métalloprotéase vis-à-vis d'une autre dans la même famille a largement été étudiée au travers des métalloprotéases matricielles (MMPs).

¹⁰⁶ M. Mavridis et *al.* The Crystal Structure of Human Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Reveals the Atomic Basis for Distinct Roles in Antigen Processing. *Biochemistry*. **2012**, vol. 51, 286-295.

¹⁰⁷ AHM. Wong et *al.* The X-ray Crystal Structure of Human Aminopeptidase N Reveals a Novel Dimer and the Basis for Peptide Processing. *Journal of Bio Chem*. **2012**, vol. 287(44), 36804-36813.

¹⁰⁸ DT. Puerta et *al.* New Beginnings for Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Identification of High-Affinity Zinc-Binding Groups. *JACS*. **2004**, vol. 126, 8388-8389.

1] L'acide hydroxamique acétique (AHA)

La majorité des inhibiteurs de métalloprotéase à zinc ont été développés en se focalisant sur le mème d'une chaîne latérale d'acide aminé naturel pour obtenir une haute activité et sélectivité¹⁰⁹. L'inhibition de métalloprotéase à zinc a dans un premier temps été développée à l'aide de l'Acide Hydroxamique Acétique (AHA) (Figure 27) comme évaluateur de la chélation bivalente des hydroxamates avec l'ion zinc¹¹⁰. Il a été utilisé comme composé de référence pour évaluer la puissance d'autres inhibiteurs potentiels¹¹¹.

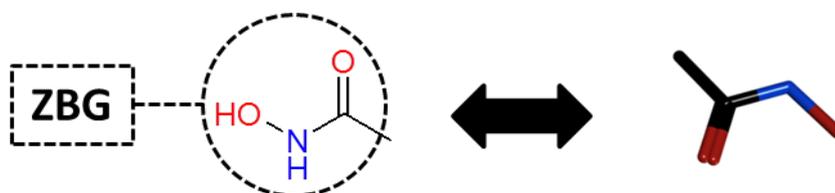


Figure 27 | La molécule AHA et son état énergétiquement favorable en trois dimensions.
Réalisé avec le logiciel MOE®.

L'inhibiteur AHA a été largement utilisé comme outil dans l'étude des interactions de fonctions chimiques chélatrices de l'atome de zinc de diverses métalloprotéases¹¹². Son activité est faible et non spécifique (Tableau 6)^{113,114}.

Entrée	Composé	Cibles	IC ₅₀ (μM)
1	AHA	MMP1	41600 (±400)
2	AHA	MMP2	15000 (±3000)
3	AHA	MMP3	25100 (±4000)

Tableau 6 | Puissance de l'AHA sur les MMPs 1 à 3.

Le ligand AHA est un composé historique dans le développement d'inhibiteurs de métalloprotéases. L'une des stratégies pour la conception d'inhibiteurs des ERAPs repose sur l'utilisation d'un groupement ZBG associé à un squelette organique.

¹⁰⁹ DT. Puerta et al. New Beginnings for Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Identification of High-Affinity Zinc-Binding Groups. *JACS*. **2004**, vol. 126, 8388-8389.

¹¹⁰ PJ. Hajduk et al. NMR-Based Modification of Matrix Metalloproteinase Inhibitors with Improved Bioavailability. *J Med Chem*. **2002**, vol. 45, 5628-5639.

¹¹¹ MK. Thorson et al. Inhibition of the lymphoid tyrosine phosphatase: the effect of zinc(II) ions and chelating ligand fragments on enzymatic activity. *Bioorganic & Medicinal chemistry letters*. **2014**, vol. 24, 4019-4022.

¹¹² DT. Puerta et al. Heterocyclic zinc-binding groups for use in next-generation matrix metalloproteinase inhibitors: potency, toxicity, and reactivity. *J Biol Inorg Chem*. **2006**, vol. 11, 131-138.

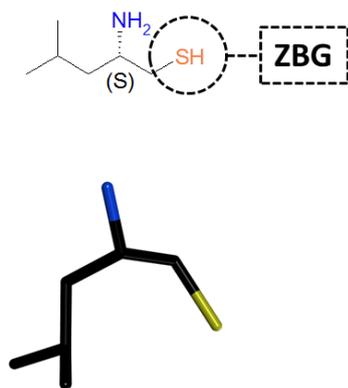
¹¹³ FE. Jacobsen et al. A new role for old ligands: Discerning chelators for zinc metalloproteinases. *JACS*. **2006**, vol. 128, 3156-3157.

¹¹⁴ I. Bertini et al. Exploring the subtleties of drug-receptor interactions: the case of matrix metalloproteinases. *JACS*. **2007**, vol. 129, 2466-2475.

2] Le L-Leucinethiol (LeuSH)

Les mécanismes précédents ont été explorés par l'inhibition des ERAPs par le L-Leucinethiol. Le L-Leucinethiol (LeuSH) est un inhibiteur puissant mais non sélectif des aminopeptidases. Il a été utilisé comme outil pharmacologique dans le but de comprendre les mécanismes imputables aux aminopeptidases ERAPs¹¹⁵. Le Leucinethiol (LeuSH) est utilisé comme inhibiteur d'ERAAP en co-administration avec le Dithiothreitol (DTT). Le DTT est un agent réducteur et permet ainsi la conservation du LeuSH sous sa forme réduite active¹¹⁶. Le LeuSH chélate l'atome métallique des aminopeptidases cibles à l'aide de son amine primaire et de son groupement thiol. A titre indicatif ce composé a une constante d'inhibition (K_i) de 22nM envers la leucine aminopeptidase¹¹⁷. La leucine aminopeptidase est une métalloprotéase à zinc retrouvée dans le cytoplasme des cellules.

L-Leucinethiol (LeuSH)



Dithiothreitol (DTT)

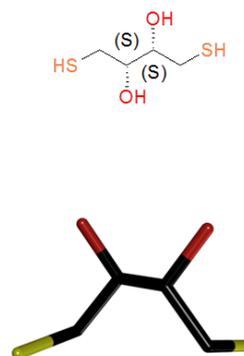


Figure 28 | Le Leucinethiol et son agent réducteur associé le dithiothreitol dans leur état énergétiquement favorable.
Réalisé avec le logiciel MOE®.

Le LeuSH est également un inhibiteur puissant des ERAPs mais non spécifique¹¹⁸. Le LeuSH a été largement utilisé comme outil pharmacologique et en test enzymatique *in vitro* le LeuSH inhibe d'un facteur 22 la dégradation d'un composé peptidomimétique hydrolysé en condition physiologique par les ERAPs¹¹⁹ (Figure 29).

¹¹⁵ T. Serwold et al. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nature immunology*. **2001**, vol. 2(7), 644-651.

¹¹⁶ GE. Hammer et al. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nature immunology*. **2006**, vol. 8(1), 101-108.

¹¹⁷ WW. Chan. L-leucinethiol a potent inhibitor of leucine aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun*. **1983**, vol. 116(1), 297-302.

¹¹⁸ WW. Chan. L-leucinethiol a potent inhibitor of leucine aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun*. **1983**, vol. 116(1), 297-302.

¹¹⁹ T. Kanaseki et al. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity*. **2006**, vol. 25, 795-806.

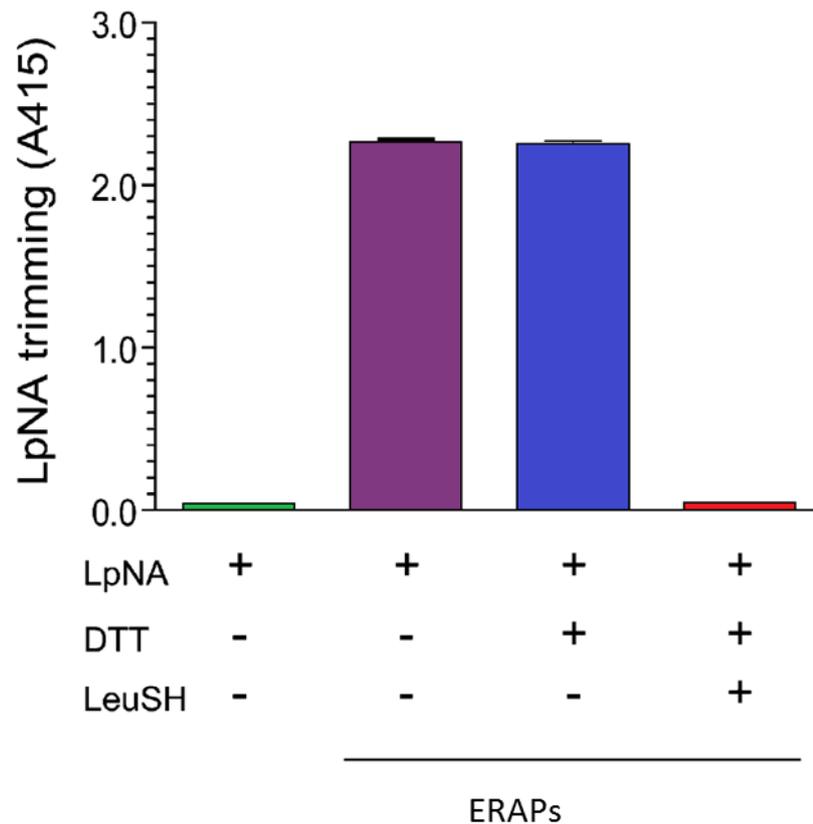


Figure 29 | Inhibition des ERAPs par le LeuSH et impact de cette inhibition sur le raccourcissement d'un substrat.

Incubation avec la Leucine *p*nitroanilide (LpNA) avec (+) ou sans (-) Leucinethiol (LeuSH) et Dithiothreitol (DTT). L'hydrolyse du LpNA est mesurée par absorbance à 415nm. Adapté de T. Kanaseki et *al.* *Immunity*. **2006**, vol. 25, 795-806.

En test cellulaire *in vitro* le LeuSH a confirmé un mécanisme ERAPs dépendant. En effet l'inhibition de l'activité catalytique des ERAPs entraîne une augmentation de la réponse immunitaire cytotoxique (CD8⁺ et IFN γ ⁺)¹²⁰ (Figure 30). Les cellules BEko T ont une spécificité de réponse cytotoxique pour les peptides du soi étendu en leur partie N-terminale et présenté par le CMH de classe I. Ci-dessous des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) issue de la moelle osseuse (BMDCs : bone marrow-derived dendritic cells) sont incubées cinq heures avec le milieu de culture medium seul, avec le medium et le DTT (+DTT) ou le medium avec DTT et Leucinethiol (+DTT +LeuSH). Ces CPAs sont incubées avec les cellules BEko T et le taux de CD8⁺ IFN γ ⁺ est mesuré. On n'observe pas de différence de réponse pour les conditions avec CPAs ERAAP-KO tandis qu'une différence significative est observée pour les CPAs WT. L'induction de la réponse immunitaire cytotoxique (similaire au modèle ERAAP-KO) par le LeuSH est ERAPs dépendant.

¹²⁰ GE. Hammer et *al.* In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nature immunology*. **2006**, vol. 8(1), 101-108.

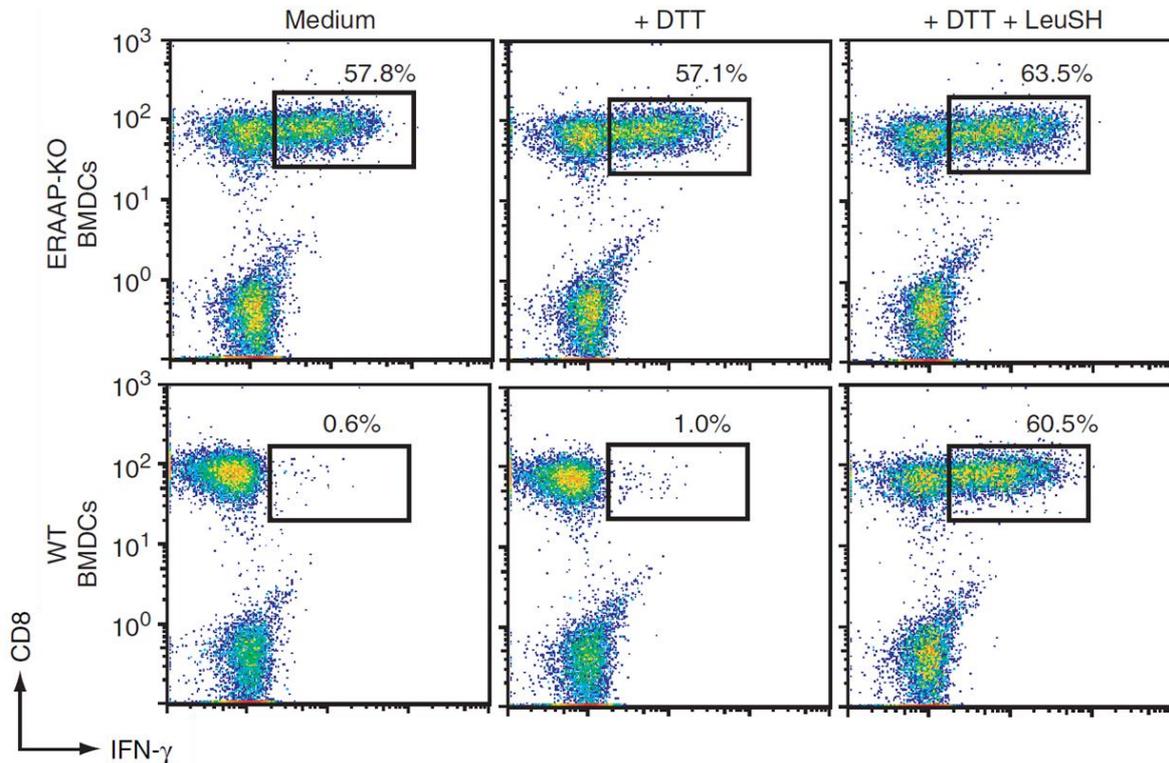


Figure 30 | Inhibition des ERAPs par le LeuSH et induction de la réponse immunitaire cytotoxique.
Adapté de GE. Hammer et *al.* Nature immunology. **2006**, vol. 8(1), 101-108.

De plus le LeuSH, comme outil biochimique, a été utilisé pour sélectionner des clones présentant en leur sein un plasmide cyclique à ADN. Ces clones codants pour un épitope ont mis en évidence une exacerbation de la réponse immunitaire cytotoxique lorsqu'ERAAP est inhibé¹²¹ (Figure 31). Ce plasmide code pour un épitope sensible à l'activité des ERAPs. Le Leucinethiol inhibe les ERAPs ainsi l'épitope n'est pas dégradé et se complexe avec un paratope, ce complexe induit la cytolyse des clones par les cellules BEKo-T-WT. Une haute cytolyse par les cellules BEKo-T-WT permet la sélection des clones présentant en leur sein le plasmide à ADN cyclique.

¹²¹ NA. Nagarajan et *al.* Nonclassical MHC-I class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. Nature immunology. **2012**, vol. 13(6), 579-586.

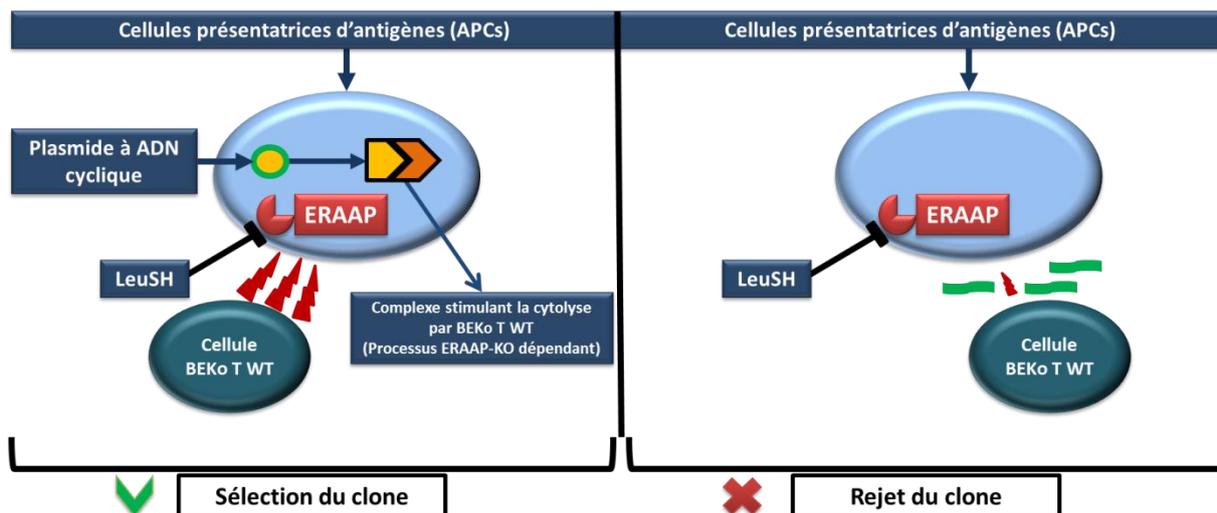


Figure 31 | Sélection de clones avec le plasmide d'intérêt par inhibition des d'ERAAP par le LeuSH.

Enfin, le L-Leucinethiol a été injecté en intratumorale *in vivo* comme inhibiteur d'ERAAP dans des modèles de xénogreffe en oncologie¹²². Le LeuSH est spécifique des aminopeptidases microsomales et non-microsomales. C'est pourquoi le LeuSH, à l'instar du AHA, est un outil pharmacologique pour explorer le rôle biologique des ERAPs. D'autres sondes chimiques telles que l'amastatine et la bestatine offrent une alternative au LeuSH pour inhiber les ERAPs.

¹²² E. James et al. Induction of protective antitumor immunity through attenuation of ERAAP function. Journal of immunology. **2013**, vol. 190, 5839-5846.

3] La bestatine et l'amastatine

Des molécules telles que l'amastatine et la bestatine ont supplantées l'AHA. Ces deux molécules sont des inhibiteurs puissants mais non sélectif des aminopeptidases (Figure 32)¹²³.

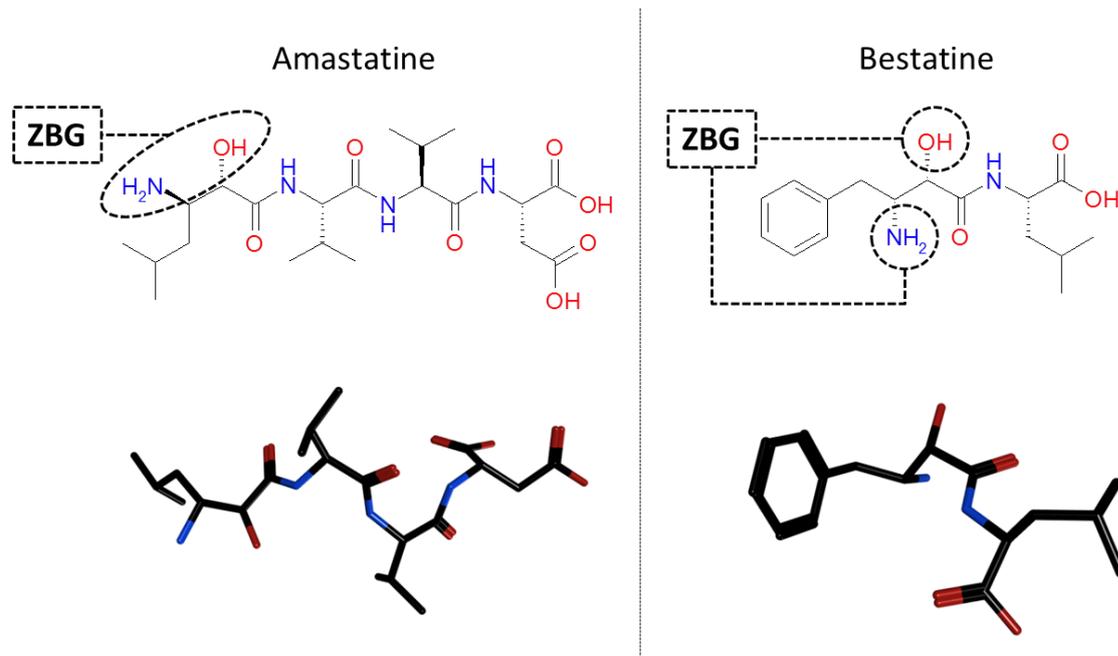


Figure 32 | Structure de l'amastatine et de la bestatine dans leur état énergétiquement favorable.
Réalisé avec le logiciel MOE®.

La bestatine a été co-cristallisée avec l'ERAP1 (PDB 2YD0) (Figure 33). Cette co-cristallisation a permis de confirmer le mode de liaison de la bestatine aux ERAPs. La bestatine stabilise l'état de transition tétraédrique durant la phase catalytique d'hydrolyse des liaisons peptidiques des ERAPs. Cela stabilise les ERAPs dans leur conformation fermée et inhibe leur activité. L'inhibition des ERAPs a été mise en évidence par la stimulation du système immunitaire induite par un mélange de LipoPolySaccharide (LPS), pro-inflammatoire et d'interféron gamma (IFN γ). Ce qui augmente le taux de l'ERAP1 et en l'absence d'inhibiteur augmente la phagocytose des macrophages. En présence d'amastatine cette voie inflammatoire ERAP-dépendante est inhibée¹²⁴.

¹²³ AHM. Wong et al. The X-ray Crystal Structure of Human Aminopeptidase N Reveals a Novel Dimer and the Basis for Peptide Processing. *Journal of Bio Chem.* **2012**, vol. 287(44), 36804-36813.

¹²⁴ Y. Goto et al. Secretion of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Is Involved in the Activation of Macrophages Induced by Lipopolysaccharide and Interferon- γ . *JCB.* **2011**, vol. 24, 21906-21914.

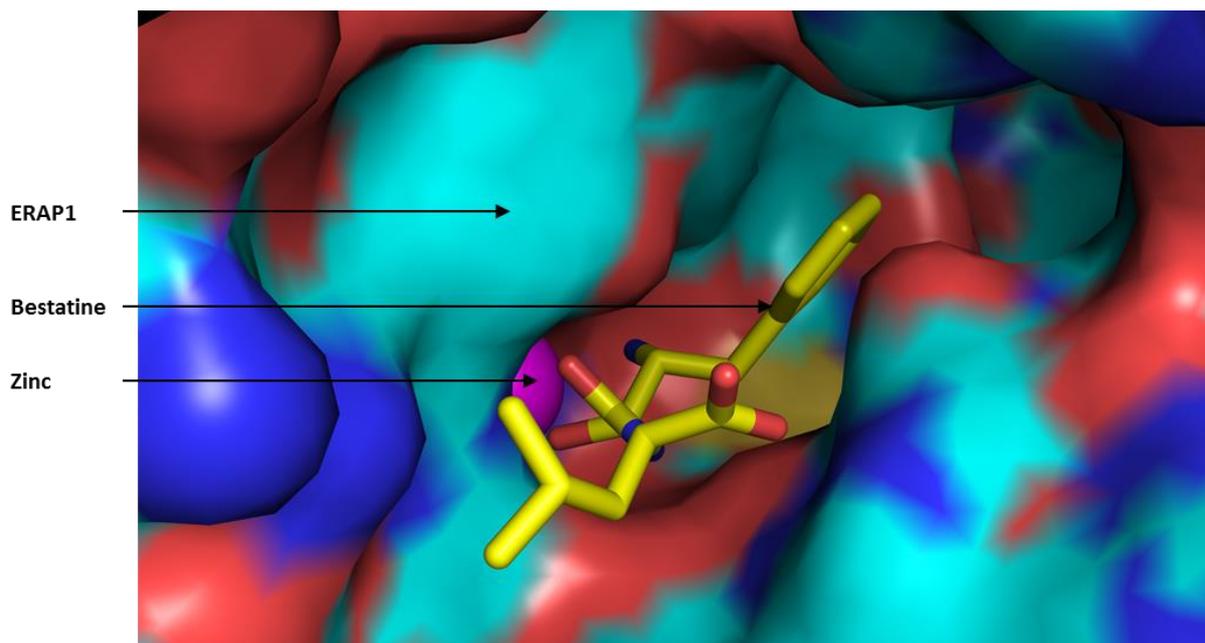


Figure 33 | La bestatine co-cristallisé dans le site catalytique de l'ERAP1 (PDB 2YD0).
Atome de carbone (jaune et cyan), d'oxygène (rouge) et d'azote (bleu). Réalisé avec le logiciel pymol®.

La co-cristallisation de la bestatine avec ERAP1 révèle la liaison de la fonction alcool, en position alpha de la fonction amide, avec le zinc. De plus cette co-cristallisation établit les bases et permettra la comparaison avec la structure co-cristallographique de nouveaux inhibiteurs des ERAPs tels que les composés aminobenzamide.

B] Modulateurs sélectifs des ERAPs

Inhibiteurs sélectifs des ERAPs

Les connaissances concernant les ERAPs ne cessent de croître. Toutefois, la manipulation pharmacologique de la fonction de ces cibles biologiques en est encore à ses débuts.

ERAP1, ERAP2 et IRAP sont homologues avec une identité de séquence d'environ 50%. La conception d'inhibiteurs repose sur le fait que ces inhibiteurs doivent être sélectifs d'une enzyme à l'autre dans cette famille (entre ERAP1 et ERAP2 par exemple). Les travaux d'autres équipes portant sur les MMPs ont montré que l'emploi d'un chélateur puissant de l'atome de zinc (tel que l'acide hydroxamique) peut être source de faible sélectivité dû à l'inhibition d'autres métalloprotéases humaines (1^{ère} génération des MMPs)^{125,126} entraînant des effets secondaires. De plus la cavité catalytique proche de l'atome métallique est bien conservée. La stratégie employée par les équipes des docteurs E Stratikos et D Vourloumis¹²⁷ pour la conception de leurs inhibiteurs s'organise autour d'un groupement ne liant le zinc que faiblement : l'aminobenzamide fonction retrouvé également dans des inhibiteurs d'HDAC (Histone désacetylase) de classe I¹²⁸.

1] Les composés aminobenzamide

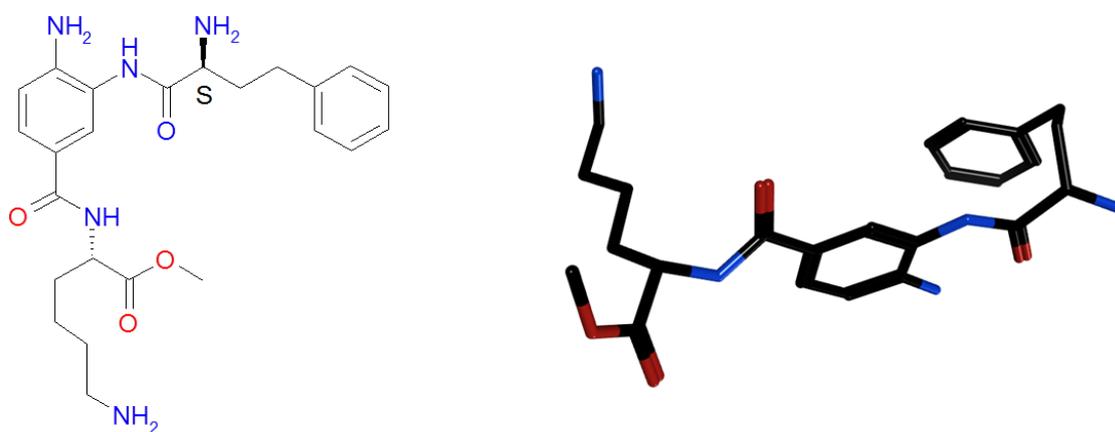


Figure 34 | Structure du composé aminobenzamide 16 dans son état énergétiquement favorable. Réalisé avec le logiciel MOE®.

La conception de ces inhibiteurs aminobenzamide repose sur plusieurs caractéristiques clés. Dans un premier temps l'aniline en position 1 interagit avec l'acide glutamique polarisant la molécule d'eau nécessaire pour l'hydrolyse catalytique (Glu354, 371 et 465 respectivement pour ERAP1, ERAP2 et IRAP). L'amide en position 2 est un chélateur monodentate du Zn²⁺.

¹²⁵ S. Brown et al. Quest for selectivity in inhibition of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem.* **2004**, vol. 4, 1227-1238.

¹²⁶ A. Agrawal et al. Zinc-binding groups modulate selective inhibition of MMPs. *Chem Med Chem.* **2008**, vol. 3(5), 812-820.

¹²⁷ A. Papakyriakou et al. Novel selective inhibitors of aminopeptidases that generate antigenic peptides. *BMCL letters.* **2013**, vol. 23, 4832-4836.

¹²⁸ DF. Wang et al. Toward selective histone deacetylase inhibitor design: homology modeling, docking studies, and molecular dynamics simulations of human class I histone deacetylases. *J Med Chem.* **2005**, vol. 48(22), 6936-6947.

L'amine libre en α de la liaison amide mime la partie N-terminal des substrats naturels et interagit de façon forte avec deux acides glutamiques (hautement conservés). Dans un second temps les groupements chimiques en position 1 (P1) sont sélectionnés en fonction de la sélectivité et de l'efficacité sur cible (la poche S1 varie selon l'enzyme dans cette famille). Enfin la substitution de l'acide carboxylique en position 4 permet l'orientation de la molécule d'une façon intéressante dans la poche latérale Sn' des groupements en position n' (Pn') (Figure 35).

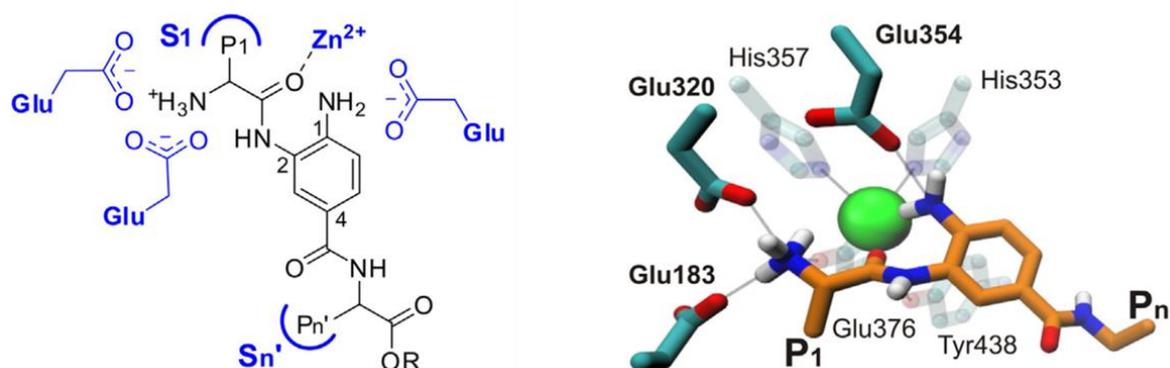


Figure 35 | Modèle moléculaire générique des inhibiteurs aminobenzamides en complexe avec l'ERAP1.

D'après A. Papakyriakou et al. *BMCL letters*. 2013, vol. 23, 4836-4836.

L'étude de la spécificité de la poche S1 entre ERAP1, ERAP2 et IRAP a été étudiée en criblant une librairie de 82 substrats fluorogéniques sur ces trois enzymes¹²⁹. Ces études suggèrent que l'ERAP1 a une préférence pour les substrats avec une longue chaîne aromatique ou aliphatique en P1 (poche S1). Au contraire, l'ERAP2 a une meilleure affinité pour les groupements chargés positivement en position P1 (poche S1). La cible préférentielle des composés comportant la L-homo-phénylalanine (hPhe) introduite en position P1 est ERAP1. Cette hPhe entretient un π stacking avec une Phénylalanine pour chacune de ces trois enzymes (Phe433, Phe450, Phe544 respectivement pour ERAP1, ERAP2 et IRAP). Basé sur ces observations la hPhe a été conservée et les modifications ont été apportées en position Pn' (Figure 35).

¹²⁹ E. Zervoudi et al. Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides. *J Bio Chem*. 2011, vol. 435(2), 411-420.

Table 1
Results of the in vitro evaluation for **12–22**

ID	R	IC ₅₀ (μM)		
		ERAP1	ERAP2	IRAP
12	L-Ala-OMe	NI	NI	38 ± 3
13	L-Val-OBn	95.5 ± 3.3	11.5 ± 0.6	3.9 ± 0.1
14	L-Val-OH	NI	NI	>100 ^a
15	L-Thr-OMe	NI	NI	46 ± 2
16	L-Lys-OMe	2.0 ± 0.6	24.9 ± 1.2	10.3 ± 0.6
17	L-Lys-OH	2.6 ± 0.2	8.9 ± 0.5	6.0 ± 0.2
18	L-Arg-OMe	NI	NI	9.6 ± 0.5
19	L-Tyr-OMe	7.7 ± 0.4	>100 ^a	2.8 ± 0.2
20	L-Trp-OBn	NI	23.9 ± 0.8	1.3 ± 0.1
21	OMe	NI	>100 ^a	16.3 ± 0.8
22	OH	NI	>100 ^a	>100 ^a

NI = No inhibition observed at 50 μM.

^a Limited inhibition (up to 20%) was evident in the 50–100 μM range indicating an IC₅₀ value >100 μM.

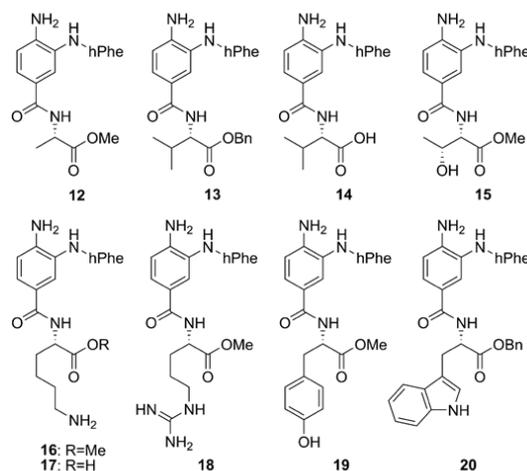


Figure 36 | Modifications structurales en position n' (Pn') des dérivés aminobenzamides.
Adapté de A. Papakyriakou et al. *BMCL letters*. **2013**, vol. 23, 4836-4836.

Le composé **16** est le plus puissant inhibiteur de l'ERAP1 dans cette série chimique, quant au composé **20** il inhibe ERAP2 et IRAP sélectivement face à ERAP1. Les concentrations inhibitrices 50 (IC₅₀) sont de l'ordre du micromolaire (μM), de plus la fenêtre de sélectivité des composés pour ces trois enzymes est restreinte (d'un facteur 10 concernant le composé **16** entre ERAP1 et ERAP2). L'acide aminé lévogyre incorporé à l'acide carboxylique en position 4 permet l'introduction de variabilité en termes d'activité et de sélectivité vis-à-vis de ces trois enzymes (Figure 36).

Afin d'étudier les mécanismes pharmacologiques d'inhibition des ERAPs par cette famille chimique, des essais enzymatiques utilisant un test standard de Michaelis-Menten (MM) ont été réalisés. Ces essais enzymatiques ont utilisés des substrats chromogéniques afin d'explorer la cinétique de la réaction enzymatique¹³⁰. Le composé **16** (le plus actif) affecte uniquement la constante de Michaelis (K_M) mais n'affecte pas la vitesse maximale (V_{max}) ni le rapport substrat chromogénique (nmol) / Enzyme (nmol).s⁻¹ (Kcat). ce qui traduit un mécanisme d'inhibition compétitive de ces inhibiteurs (Figure 37).

¹³⁰ A. Papakyriakou et al. Novel selective inhibitors of aminopeptidases that generate antigenic peptides. *BMCL letters*. **2013**, vol. 23, 4836-4836.

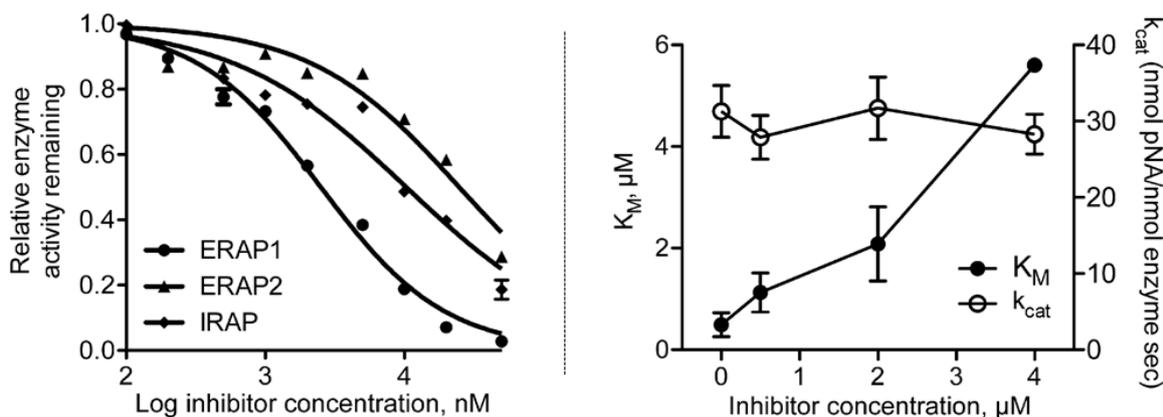


Figure 37 | Inhibition des ERAPs et IRAP par un composé aminobenzamide avec une sélectivité modérée.

A gauche, activité d'un inhibiteur discriminant les trois enzymes de cette famille. A droite, la modification des valeurs composantes du test de Michaelis-Menten en fonction de la concentration en inhibiteur dans le milieu. D'après A. Papakyriakou et *al.* BMCL letters. **2013**, vol. 23, 4836-4836.

Ces inhibiteurs miment les substrats naturels. C'est pourquoi des essais de stabilité *in vitro* ont été réalisés afin de s'assurer que les ERAPs n'hydrolysent pas ces substrats. La stratégie développée par les équipes française, américaine et grecque est basée sur l'utilisation volontaire d'un ligand faible du zinc aminobenzamide. La sélectivité dans cette famille est apportée en mimant les chaînes latérales des peptides naturels. Tout cela pour épouser au mieux l'espace et la surface électrostatique des poches latérales S1 et Sn' et ainsi augmenter la sélectivité du composé. Le composé **16** est le plus actif (Figure 36), de l'ordre du μM , avec une sélectivité d'un facteur 10 vis à vis d'ERAP1 et d'ERAP2. Les inhibiteurs de cette famille sont des inhibiteurs compétitifs aux substrats naturels et résistent à l'hydrolyse catalytique des ERAPs. Toutefois, le choix d'utiliser un ligand de faible affinité pour le zinc afin d'inhiber le site catalytique hautement conservé au sein des métalloprotéases n'a jusqu'alors pas permis l'obtention d'inhibiteurs avec une puissance de l'ordre du nanomolaire (nM) (Figure 38). Ces inhibiteurs compétitifs peptidomimétiques constituent d'intéressantes sondes chimiques pour explorer l'impact de l'inhibition des ERAPs.

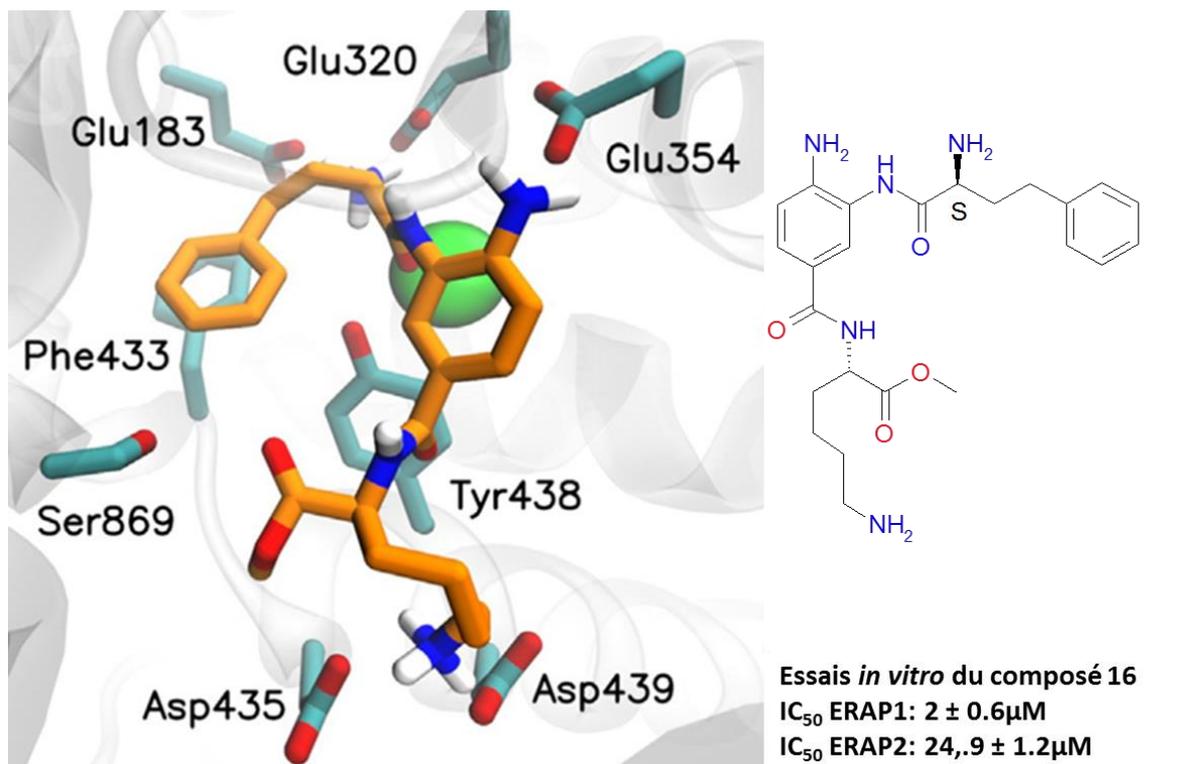


Figure 38 | Modélisation du composé aminobenzamide 16 lié au site catalytique de l'ERAP1.

Carbones du composé représenté en bâton orange; résidus de l'ERAP1 représenté en bâton sarcelle; atome d'oxygène représenté en rouge; atome d'azote représenté en bleu; atome d'hydrogène représenté en blanc. D'après A. Papakyriakou et al. *BMCL letters*. 2013, vol. 23, 4836-4836.

2] Composés phosphiniques

Le groupement phosphinique est un ligand monodentate du zinc¹³¹. Afin d'obtenir une activité et une sélectivité satisfaisante de ces composés phosphiniques, il est essentiel de considérer les interactions spécifiques du reste de la molécule avec les poches latérales de l'enzyme (S1, S1' et S2'). Des pseudopeptides phosphiniques ont été développés par le passé produisant des inhibiteurs puissants et sélectifs de métalloprotéases à zinc^{132,133}. Du fait que l'ERAP1, l'ERAP2 et l'IRAP ont le même mécanisme protéolytique à zinc que les métalloprotéases citées précédemment la stratégie d'obtention de composés phosphiniques spécifiques est basée sur un squelette carboné articulé autour du groupement phosphinique apportant la spécificité tout comme les composés aminobenzamides.

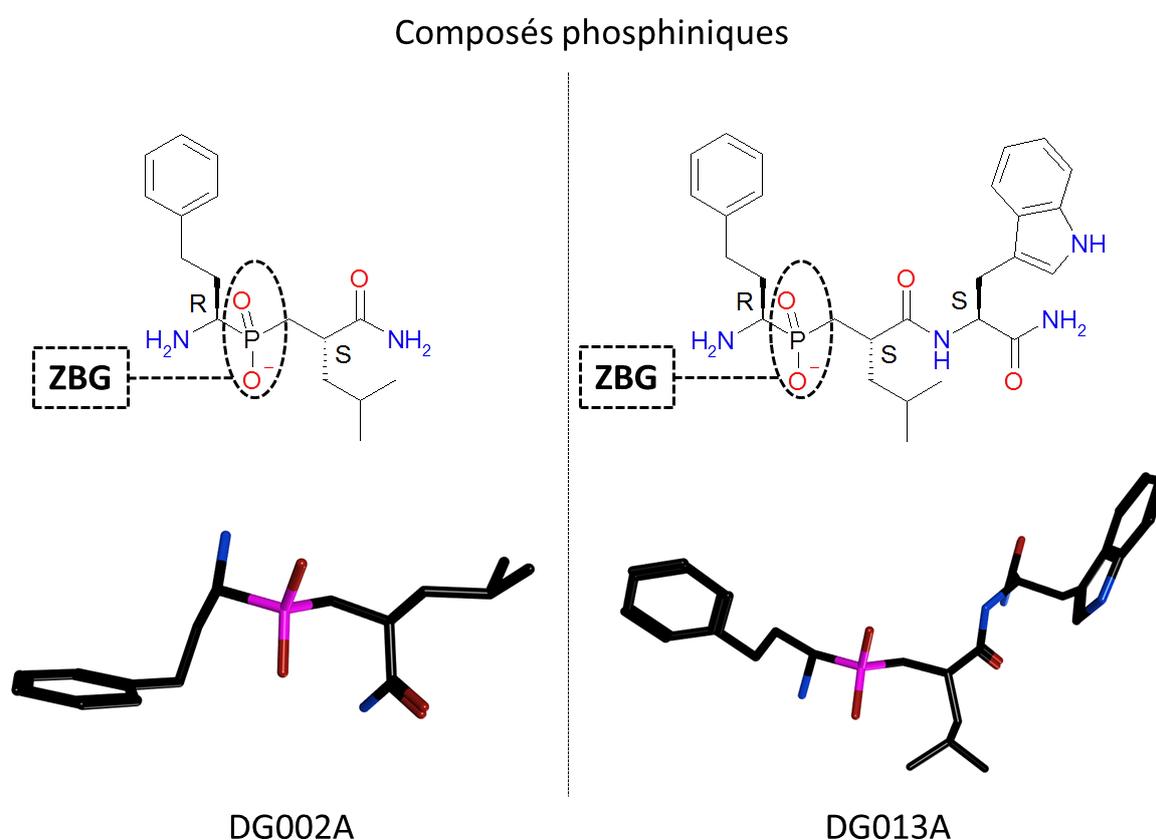


Figure 39 | Structure des composés DG002A et DG013A dans leur état énergétiquement favorable.
Réalisé avec le logiciel MOE®.

Dans le but de développer des inhibiteurs phosphiniques sélectifs et puissants des ERAPs, l'exploitation des informations concernant les poches latérales de l'ERAP1 et de l'ERAP2 pour la synthèse rationnelle est capitale. Ces trois enzymes partagent des caractéristiques

¹³¹ FE. Jacobsen et *al.* The design of inhibitors for medically relevant metalloproteins. *Chem Med Chem.* **2007**, vol. 2, 152-171.

¹³² D. Georgiadis et *al.* Phosphinic peptides as potent inhibitors of zinc-metalloproteases. *Top Curr Chem.* **2015**, vol. 360, 1-38.

¹³³ V. Dive et *al.* Phosphinic peptides as zinc metalloproteinase inhibitors. *Cell Mol Life Sci.* **2004**, vol. 61, 2010-2019.

communes dans leur poche S1. En effet elles sont structurellement rigides¹³⁴ et majoritairement hydrophobes dû aux résidus tapissant¹³⁵ les cavités hydrophobes.

Basé sur cela, la chaîne phényléthyle latérale du peptide non naturel L-homo-phénylalanine (hPhe) a été sélectionnée pour la poche S1 car l'affinité de ce groupement pour cette poche est élevée. De plus la poche S1' de l'ERAP1 comme vu précédemment a une préférence pour les petites chaînes latérales hydrophobes¹³⁶. Dans ce contexte la chaîne latérale d'une leucine a été sélectionnée en position β du groupement phosphinique. Enfin la structure récente cristallisée de l'ERAP2 (PDB : 3SE6) met en évidence l'acide 2-(N-morpholino)-ethanesulfonique qui avec son cycle morpholine stabilise par π stacking la tyrosine 455 (Tyr455) et la tyrosine 892 (Tyr892) formant en partie la poche S2' hydrophobe spécifique de l'ERAP2¹³⁷ (Figure 40).

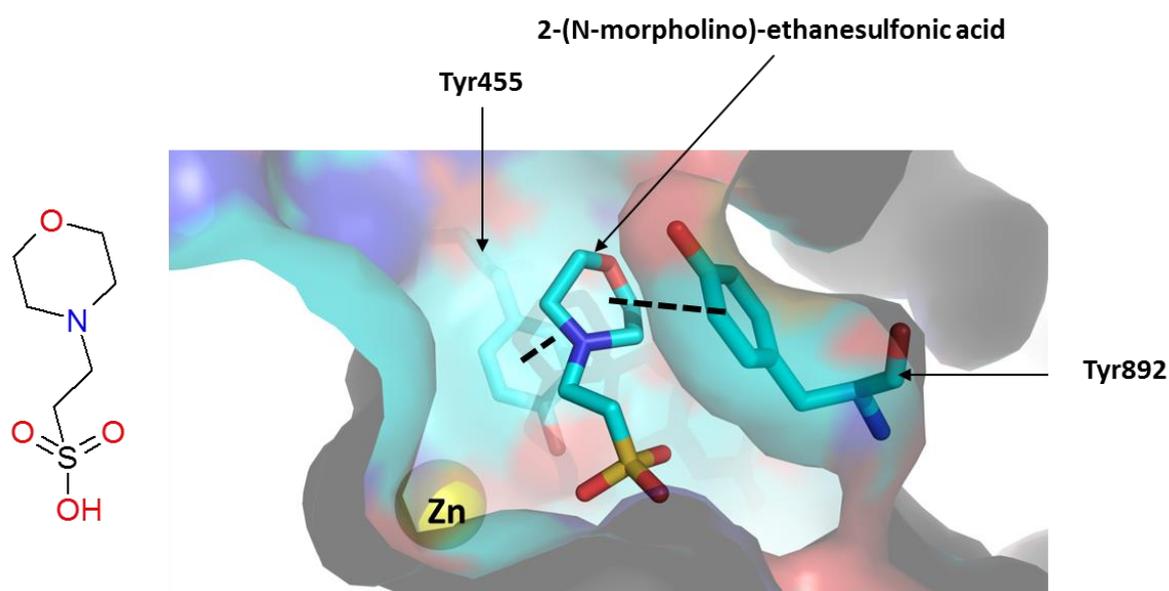


Figure 40 | Stabilisation de la poche S2' de l'ERAP2 par l'acide 2-(N-morpholino)-ethanesulfonique.

Deux composés phosphiniques inhibiteurs puissants contiennent les groupements L-homo-phénylalanine et leucine : DG002A et DG002B. De plus les molécules DG013A et DG013B possèdent en leur partie C-terminal un groupement tryptophane supplémentaire (π stacking stabilisant la poche S2') afin de vérifier l'exactitude des informations avancées précédemment et d'exploiter cette poche hydrophobe S2' spéculée (Figure 40).

¹³⁴ E. Zervoudi et al. Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides. *J Biochem.* **2011**, vol. 435(2), 411-420.

¹³⁵ E. Stratikos et al. Antigenic peptide trimming by ER aminopeptidases-insights from structural studies. *Molecular Immunology.* **2013**, vol. 55, 212-219.

¹³⁶ I. Evnouchidou et al. The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. *PLoS ONE.* **2008**, vol. 3(11), e3658.

¹³⁷ JR. Birtley et al. The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing. *Biochemistry.* **2012**, vol. 51, 286-295.

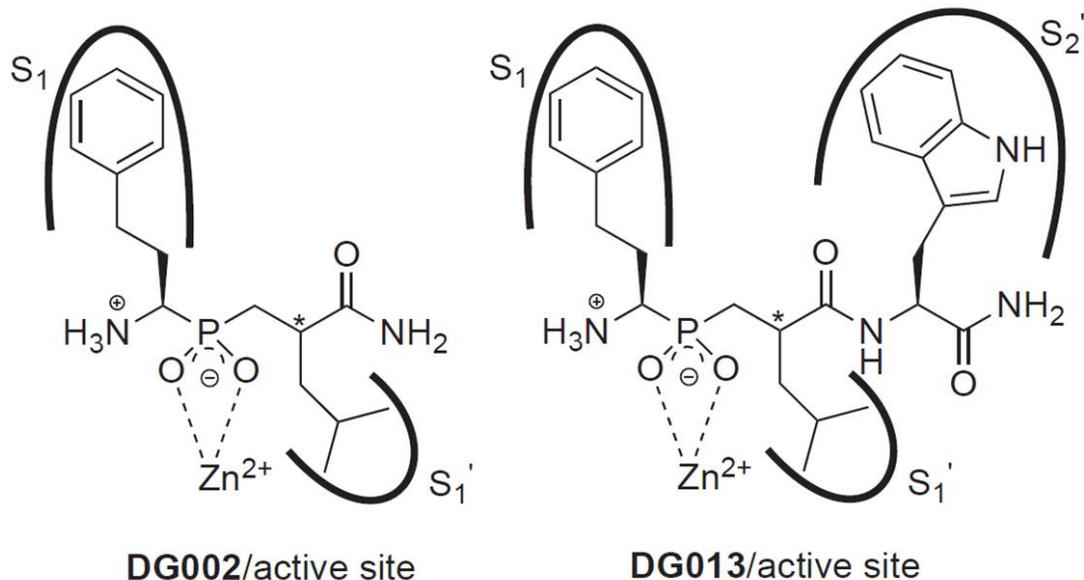


Figure 41 | Ajout d'un acide aminé L-tryptophane au composé DG002 formant ainsi le composé DG013.
D'après E. Zervoudi et *al.* PNAS. 2013, vol. 110(49), 19890-19895.

Ces pseudopeptides inhibent ERAP2 en mimant l'état de transition empêchant ainsi la coupure protéolytique. Les différents stéréoisomères obtenus par le carbone racémique de la leucine ont leur dénomination détaillée dans la figure suivante (Figure 42).

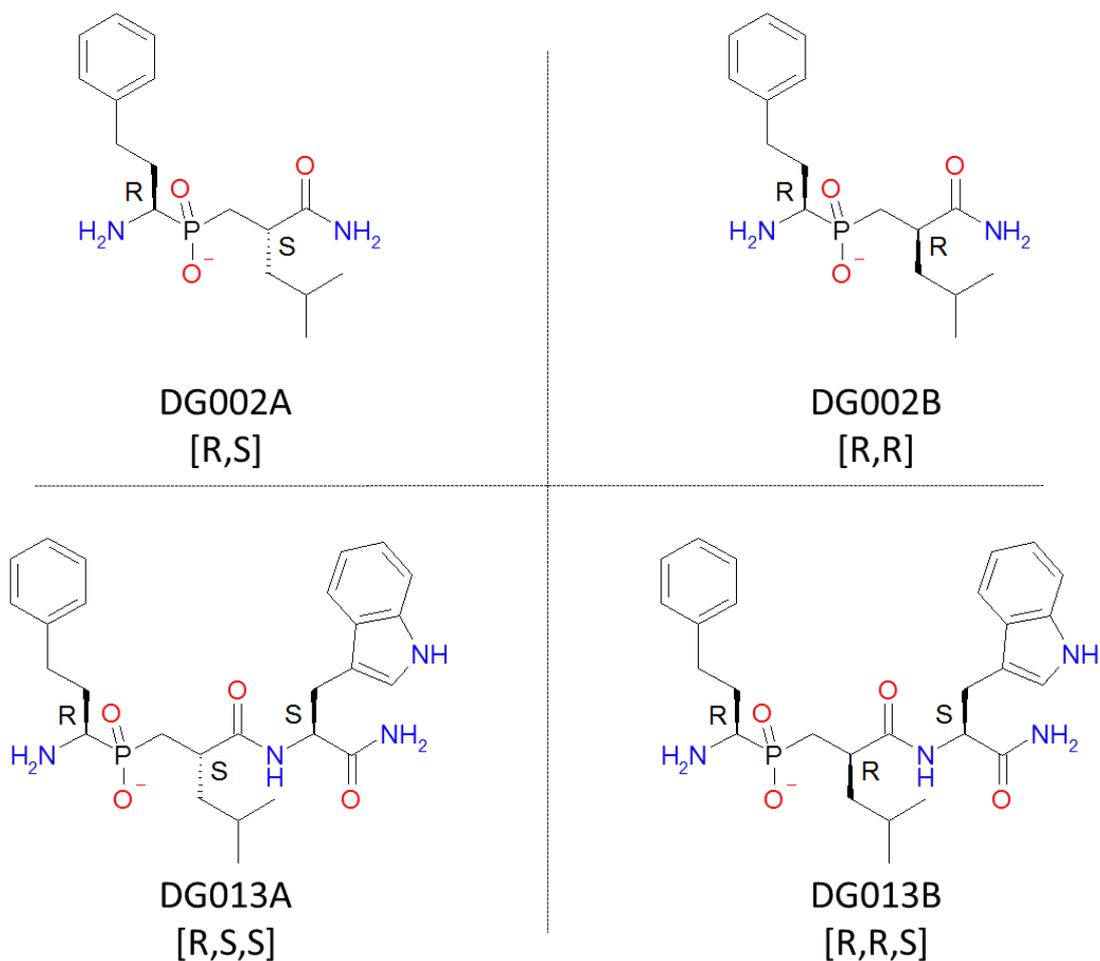


Figure 42 | Structures semi-développées des composés DG002A, DG002B, DG013A et DG013B.

DG002 au-delà de la stéréochimie est un inhibiteur modéré puissant des trois enzymes humaines (ERAP1, ERAP2 et IRAP). La composante stéréochimie est plus importante pour le composé DG013 avec une activité nettement supérieure pour le composé DG013A [R,S,S]. Bien qu'une légère sélectivité soit entrevue concernant ERAP2 et le DG013A, les autres enzymes (ERAP1 et IRAP) sont fortement inhibées par cette molécule (Tableau 7).

Compound name	ERAP1	ERAP1	Mouse ERAAP	ERAP2	IRAP
	IC ₅₀ , nM*	IC ₅₀ , nM [†]	IC ₅₀ , nM*	IC ₅₀ , nM*	IC ₅₀ , nM*
DG002A [R,S]	520 ± 75	403 ± 71	650 ± 148	547 ± 110	218 ± 37
DG002B [R,R]	513 ± 51	481 ± 98	872 ± 137	571 ± 95	344 ± 68
DG013A [R,S,S]	33 ± 5	55.7 ± 5.8	69 ± 13	11 ± 2	30 ± 4
DG013B [R,R,S]	3,600 ± 500	1,574 ± 754	1,333 ± 451	1,700 ± 200	2,200 ± 300

*X-AMC substrate.

[†]10-mer substrate.

Tableau 7 | Puissance de DG002 A & B et de DG013 A & B sur les ERAPs, IRAP et ERAAP.

Adapté de E. Zervoudi et al. PNAS. 2013, vol. 110(49), 19890-19895.

DG013A et les deux stéréoisomères de DG002A et DG002B sont des inhibiteurs compétitifs de l'ERAP1 et de l'ERAP2. En effet à l'aide d'une analyse Michaelis Menten (MM) en présence et en absence de composés seul la valeur K_M (constante de Michaelis) des substrats est modifiée (Figure 43).

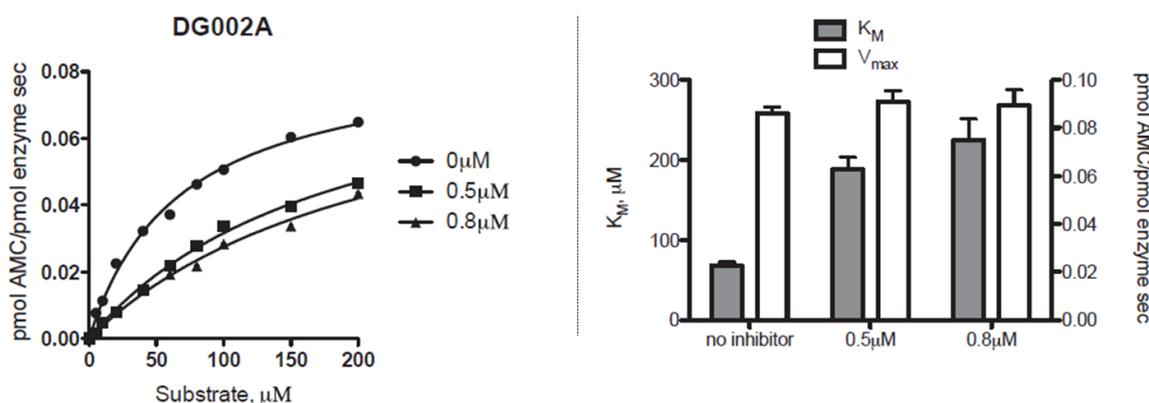


Figure 43 | Paramètres enzymatiques du composé DG002A.

A gauche, activité du DG002A en fonction de la concentration d'ERAP2. A droite, la modification des valeurs composantes du test de Michaelis-Menten en fonction de la concentration en inhibiteur dans le milieu. Profils similaires pour DG002B et DG013A. D'après E. Zervoudi et al. PNAS. 2013, vol. 110(49), 19890-19895.

Au contraire pour le composé DG013B seule la V_{max} de l'enzyme est diminuée alors que le K_M du substrat reste constant. Cela traduit un mécanisme d'inhibition non compétitif pour DG013B face à ERAP1 et ERAP2.

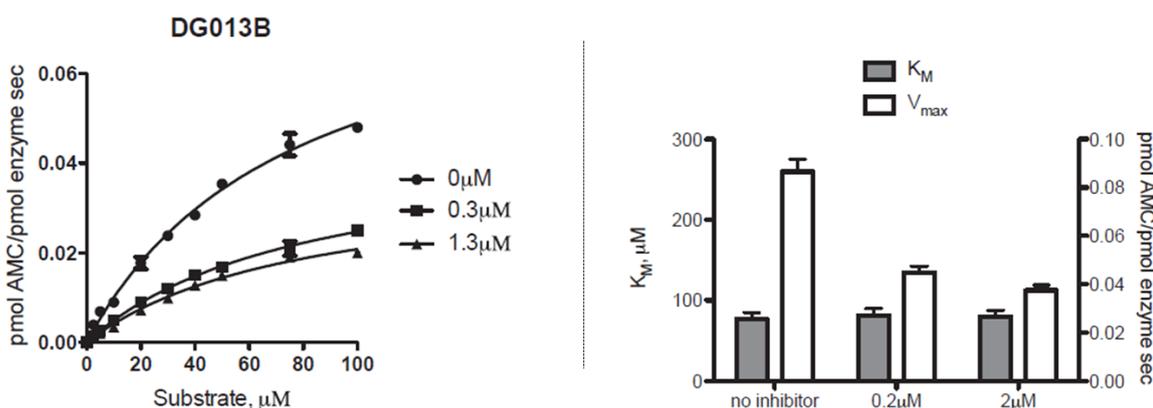


Figure 44 | Paramètres enzymatiques du composé DG013B.

A gauche, activité du DG013B en fonction de la concentration d'ERAP2. A droite, la modification des valeurs composantes du test de Michaelis-Menten en fonction de la concentration en inhibiteur dans le milieu. D'après E. Zervoudi et *al.* PNAS. **2013**, vol. 110(49), 19890-19895.

La différence de mode d'inhibition entre DG013A et DG013B suggère un site de liaison différent ou supplémentaire pour ces deux composés. D'une façon intéressante DG013B se comporte comme un inhibiteur compétitif lorsque le substrat utilisé *in vitro* est plus encombrant. Ce qui corrobore le fait que le site de liaison de DG013A et de DG013B soit différent. Le site de liaison de DG013B est probablement éloigné d'une façon plus importante du site catalytique de l'ERAP1 et de l'ERAP2. Enfin le composé DG013A a été co-cristallisé avec ERAP2 (allèle N392K). Allèle pour lequel DG013A est un inhibiteur puissant¹³⁸.

Le groupement phosphinique coordonne l'atome de zinc du site actif, de plus les deux atomes d'oxygènes portés par le phosphore stabilisent le complexe par liaisons hydrogènes de l'acide glutamique 371 et de l'hydroxyle de la tyrosine 455. Ainsi le pseudopeptide stabilise l'enzyme en position intermédiaire (carbanion intermédiaire tétraédrique) et joue pleinement son rôle d'inhibiteur par mimesis de l'état de transition. De nombreux acides aminés sont impliqués dans la stabilisation du composé DG013A dans le site catalytique de l'ERAP2. La majorité de ces acides aminés sont conservés dans ERAP1 et IRAP ce qui explique le peu de sélectivité de ce composé vis-à-vis de ces trois métalloprotéases à zinc de la famille M1 (Tableau 7).

¹³⁸ I. Evnouchidou et *al.* A common single nucleotide polymorphism in endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 induces a specificity switch that leads to altered antigen processing. J Immunol. **2012**, vol. 189, 2383-2392.

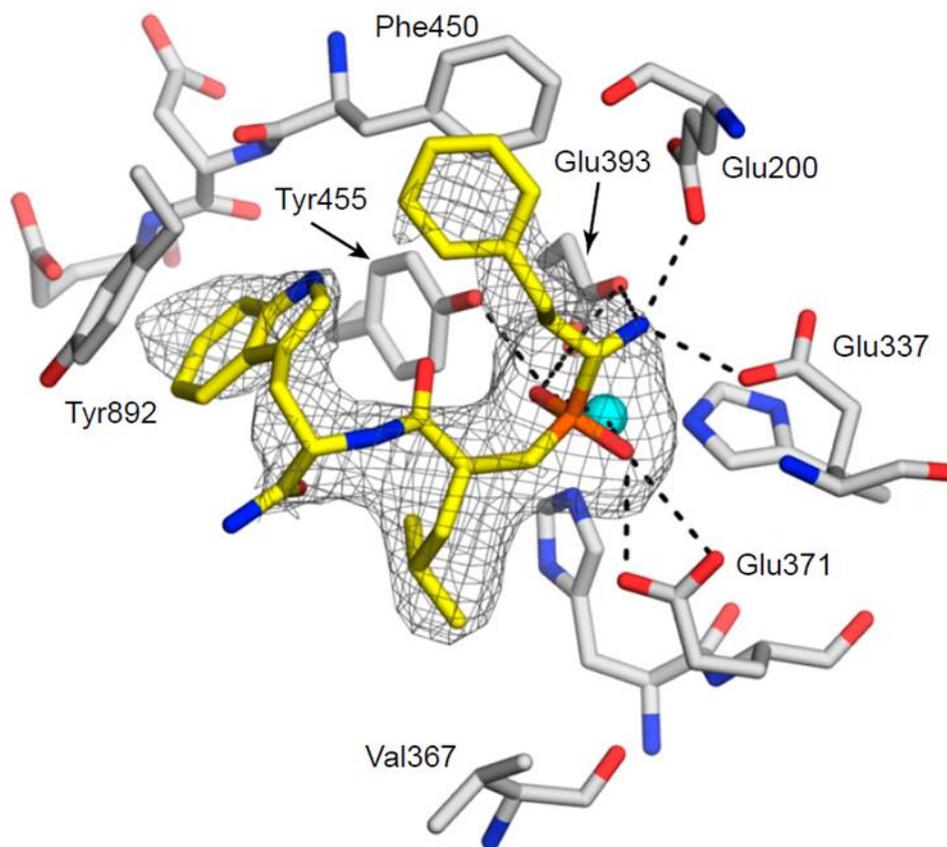


Figure 45 | Stabilisation de l'ERAP2 en position fermée intermédiaire par le composé DG013A.
 D'après E. Zervoudi et al. PNAS. 2013, vol. 110(49), 19890-19895.

L'exploration des fonctions biologiques des ERAPs nécessite l'obtention d'outils pharmacologiques tels que des composés inhibiteurs de ces enzymes. Précédemment des inhibiteurs non sélectifs de la famille des ERAPs (AHA, LeuSH, amastatine et bestatine) ont été décrits. De plus des inhibiteurs sélectifs de la famille des ERAPs avec des puissances et sélectivités variables sont présent dans la littérature (dérivés aminobenzamides et phosphiniques). L'inhibition des ERAPs par des molécules organiques doit être développée, avec pour objectif l'obtention de molécules puissantes (de l'ordre du nanomolaire) et sélectives de la famille des ERAPs et d'une ERAP vis-à-vis d'une autre. Ces inhibiteurs hypothétiques permettront une meilleure compréhension des phénomènes biologiques imputables aux ERAPs dans des modèles complexes (*in cellulo* & *in vivo*). En effet des molécules puissantes mais non sélectives sont adaptées à un test enzymatique sur enzyme isolée. Toutefois, pour une avancée en thérapeutique des molécules puissantes et sélectives seront indispensables pour explorer des systèmes avec une complexité croissante : dans un premier temps des essais cellulaires sur un type cellulaire ou un tissu spécifique puis dans un second temps l'application à un modèle *in vivo* où cohabite divers niveaux de régulations et tissus.

CONCLUSION

La découverte

Les ERAPs (ERAP1 et ERAP2) appartiennent à la famille M1 des métalloprotéases à zinc. Elles ont été découvertes par l'identification et la caractérisation d'une protéine orthologue : l'ERAAP. L'ERAAP est présente chez la souris et se substitue à l'ERAP1 et à l'ERAP2 chez l'Homme. Il est à noter que l'IRAP (aminopeptidase régulée par l'insuline) a contribué à la découverte de l'ERAP1 et de l'ERAP2.

Le rôle physiologique des ERAPs

Précédemment des rappels concernant la présentation antigénique, le système HLA, les mécanismes immunitaires de défenses, le CMH-I et le CHM-II ont été apportés pour situer l'implication des ERAPs dans l'homéostasie de l'organisme et plus précisément leur implication dans la présentation antigénique.

Les ERAPs par leur activité aminopeptidase et leur spécificité de substrat ont un rôle d'édition antigénique. En effet les substrats naturels des ERAPs sont majoritairement issus du protéasome et certains produits de catalyse des ERAPs sont complexés au CMH-I. Le complexe antigène-CMH-I est reconnu par le système immunitaire, ce qui induit des réactions immunitaires. De nombreuses investigations dans trois grandes aires thérapeutiques telles que l'infectiologie, l'oncologie et les maladies auto-immunes sont en cours. Ces investigations ont mis en évidence le rôle prépondérant des ERAPs dans certaines pathologies telles que la spondylarthrite ankylosante, la maladie de Behcet, des infections au cytomégalovirus et des cancers immuno-évasifs. A cela s'ajoute l'importance fondamentale des mutations nucléotidiques ponctuelles des ERAPs prédisposant certains patients aux pathologies précédemment citées de manière non exhaustives. Ces mutations ponctuelles sont à prendre en compte dans le développement de futurs agents thérapeutiques. Dans ce contexte un réel besoin en outils pharmacologiques est mis en exergue dans le but d'explorer les rôles biologiques fondamentaux des ERAPs.

Leurs structures et localisations

Les ERAPs sont des protéases traduites et directement co-transloquées dans le réticulum endoplasmique où elles exercent leurs activités catalytiques. Ces deux enzymes partagent des motifs structuraux communs tels que le motif GAMEN et le motif HEXXH₁₈E. Toutefois, les poches S1 et S1' leur sont spécifiques et apportent une première explication quant à la sélectivité de substrat constatée pour ces deux enzymes. De plus, ces deux enzymes ont la capacité d'adopter une conformation ouverte et fermée avec des différences significatives concernant les chaînes latérales polaires et ionisables. Tous ces éléments confirment le fait qu'il est possible d'inhiber sélectivement ERAP1 vis-à-vis d'ERAP2 et inversement. Cette

inhibition sélective permettrait d'accroître la compréhension du rôle spécifique d'une enzyme et de souligner l'importance de la coopération de ces deux protéines

Inhibiteurs décrits et potentiel en thérapeutique

Un modèle de souris transgénique KO en ERAAP ainsi que des structures cristallographiques de l'ERAAP, l'ERAP1 et de l'ERAP2 ont été décrits dans la littérature. Ces outils précieux ont été utilisés pour comprendre le rôle d'édition antigénique exercé par ces protéines. Toutefois, ces outils de recherche ont des limites mais sont d'excellentes bases pour lancer un projet de recherche dans le domaine de la chimie médicinale. De plus des inhibiteurs sélectifs et non sélectifs des ERAPs sont décrits dans la littérature et permettent l'exploration des fonctions biologiques primordiales des ERAPs. Bien que des molécules non sélectives de la famille des ERAPs tel que l'AHA, l'amastatine, la bestatine et le L-leucinethiol soient limitées aux modèles enzymatiques sur les ERAPs isolées dans le but d'éviter des effets « off target » liés à l'inhibition d'autres cibles biologiques. Les composés sélectifs quant à eux (aminobenzamide et dérivés phosphiniques) permettent d'évoluer dans des modèles avec une complexité croissante tels que dans des modèles cellulaires. Mais des propriétés de ces produits comme la pénétration cellulaire et la stabilité métabolique limitent l'utilisation de ces produits *in vivo*. C'est pourquoi la conception, la synthèse et l'évaluation de nouvelles molécules chimiques inhibitrices sélectives des ERAPs possèdent un potentiel élevé dans le domaine de la recherche biomédicale.

Validation de ces cibles en thérapeutique et obstacles à surmonter

Les données précédemment évoquées ouvrent des perspectives quant à l'inhibition quantitative et qualitative des ERAPs. Des hypothèses telles que la formation d'hétérodimères ERAP1-ERAP2 et la validation des ERAPs en tant que cible en thérapeutique sont encore à investiguer. De plus les mécanismes de régulation, de transcription et de modifications épigénétiques de ces enzymes doivent être évalués pour mieux comprendre et cerner les nombreuses implications des ERAPs dans la physiologie cellulaire et tissulaire.

TABLE DES FIGURES

Tableau 1 Aligement des séquences et pourcentage d'homologie réalisé par ClustalW2®.....	11
Tableau 2 Allèles codants pour le CMH-I, le CMH-II et mention du groupe de troisième classe.....	14
Tableau 3 Composition des domaines I à IV des ERAPs.....	39
Tableau 4 Acides aminés, de la cavité interne, à polarité remarquable pour ERAP1 et ERAP2.....	44
Tableau 5 Les SNPs prépondérants dans la population pour ERAP1 et ERAP2.	47
Tableau 6 Puissance de l'AHA sur les MMPs 1 à 3.	51
Tableau 7 Puissance de DG002 A & B et de DG013 A & B sur les ERAPs, IRAP et ERAAP.....	66
Figure 1 Reconnaissance par un lymphocyte B d'un antigène par l'association épitope-paratope.....	13
Figure 2 Macrostructure du CMH-I et du CMH-II.....	15
Figure 3 Mécanisme de présentation antigénique médié par le CMH-I.....	16
Figure 4 Mécanisme de présentation antigénique par le CMH-II.....	17
Figure 5 Immunité innée et adaptative.....	18
Figure 6 Immunité humorale et cellulaire.....	20
Figure 7 Modèle de l'immunosurveillance médié par l'ERAAP.....	22
Figure 8 Localisation du réticulum endoplasmique (RE) dans une cellule eucaryote animale.....	23
Figure 9 Catabolisme protéique d'une cellule nucléé et présentation antigénique croisée.....	25
Figure 10 Modification quantitative et qualitative de l'activité des ERAPs et potentiels effets dans le domaine thérapeutique du cancer et de l'auto-immunité.....	27
Figure 11 Modification quantitative et qualitative de l'activité des ERAPs et potentiels effets dans le domaine de l'infectiologie.....	28
Figure 12 Motif GAMEN situé dans la séquence de l'ERAP1 et de l'ERAP2 avec illustration.....	30
Figure 13 Motif HEXXH(X) ₁₈ E de l'ERAP1 et de l'ERAP2 avec illustration.....	31
Figure 14 Aligement de la séquence des acides aminés de l'ERAP1 et de l'ERAP2.....	32
Figure 15 Modèle de reconnaissance bilatérale des ERAPs.....	33
Figure 16 Aire sous la courbe cumulée de peptides en fonction du temps.....	35
Figure 17 Les ERAPs sont localisées dans le réticulum endoplasmique.....	36
Figure 18 Localisation des ERAPs en fonction de certains types cellulaires.....	37
Figure 19 Confirmation de la localisation des ERAPs dans le réticulum endoplasmique.....	38
Figure 20 Adoption d'une conformation ouverte et fermée par les ERAPs.....	40
Figure 21 Site catalytique d'ERAP2 en conformation fermée.....	41
Figure 22 Poche S1 de l'ERAP2.....	42
Figure 23 Potentiel électrostatique d'une fraction de la poche S1 reconnaissant l'acide aminé N-terminal des substrats.....	43
Figure 24 Homodimérisation de l'ERAP2.....	45
Figure 25 Single Nuclear Polymorphism de l'ERAP2 : rs2549782.....	48
Figure 26 Hydrolyse du substrat R-AMC par ERAP2 ^N et ERAP2 ^K	49
Figure 27 La molécule AHA et son état énergétiquement favorable en trois dimensions.....	51
Figure 28 Le Leucinethiol et son agent réducteur associé le dithiothreitol dans leur état énergétiquement favorable.....	52
Figure 29 Inhibition des ERAPs par le LeuSH et impact de cette inhibition sur le raccourcissement d'un substrat.....	53
Figure 30 Inhibition des ERAPs par le LeuSH et induction de la réponse immunitaire cytotoxique.....	54
Figure 31 Sélection de clones avec le plasmide d'intérêt par inhibition des d'ERAAP par le LeuSH.....	55
Figure 32 Structure de l'amastatine et de la bestatine dans leur état énergétiquement favorable.....	56
Figure 33 La bestatine co-cristallisé dans le site catalytique de l'ERAP1 (PDB 2YD0).....	57
Figure 34 Structure du composé aminobenzamides 16 dans son état énergétiquement favorable.....	58
Figure 35 Modèle moléculaire générique des inhibiteurs aminobenzamides en complexe avec l'ERAP1.....	59
Figure 36 Modifications structurales en position n' (Pn') des dérivés aminobenzamides.....	60
Figure 37 Inhibition des ERAPs et IRAP par un composé aminobenzamide avec une sélectivité modérée.....	61
Figure 38 Modélisation du composé aminobenzamide 16 lié au site catalytique de l'ERAP1.....	62
Figure 39 Structure des composés DG002A et DG013A dans leur état énergétiquement favorable.....	63
Figure 40 Stabilisation de la poche S2' de l'ERAP2 par l'acide 2-(N-morpholino)-ethanesulfonique.....	64
Figure 41 Ajout d'un acide aminé L-tryptophane au composé DG002 formant ainsi le composé DG013.....	65
Figure 42 Structures semi-développées des composés DG002A, DG002B, DG013A et DG013B.....	65
Figure 43 Paramètres enzymatiques du composé DG002A.....	66
Figure 44 Paramètres enzymatiques du composé DG013B.....	67
Figure 45 Stabilisation de l'ERAP2 en position fermée intermédiaire par le composé DG013A.....	68

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier le Professeur Rebecca Deprez-Poulain, tutrice de thèse, pour ses conseils avisés, les nombreuses relectures du manuscrit, sa réactivité et son énergie associée au temps investit dans ces travaux.

Je remercie le Professeur Hélène Gras-Masse, présidente du jury de thèse, pour son enthousiasme et son attention critique et constructive portée sur ce travail.

Je remercie le Maître de conférences Benjamin Bertin pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse en y apportant une spécialisation immunologique.

Je voudrais remercier le Docteur Toufik Abache, pour son apport scientifique précieux et pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Je souhaite remercier le Professeur Benoit Deprez pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et aidé à poursuivre en thèse universitaire.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire Inserm U1177 pour leur énergie, leur bonne humeur, les échanges constructifs et l'excellente dynamique insufflée au quotidien.

Je remercie tous mes confrères qui ont rendu cette aventure étudiante trépidante et riche. Avec une pensée particulière pour la BT's team et les AdR composés de personnes remarquables.

Je remercie Julie pour son soutien, la relecture du manuscrit et toutes ces joies partagées sources motrices au quotidien et contribuant à l'aboutissement de ce manuscrit.

Enfin, je remercie Pierre, Isabelle, Julien et Céline pour leur soutien indéfectible, tous les bons moments passés ensemble et leurs valeurs qui sont les miennes. Merci.

BIBLIOGRAPHIE

Organisé par ordre alphabétique.

1. A. Addlagatta et al. Structure of aminopeptidase N from Escherichia coli suggests a compartmentalized, gated active site. PNAS. **2006**, vol. 103(36), 13339-13344.
2. A. Agrawal et al. Zinc-binding groups modulate selective inhibition of MMPs. Chem Med Chem. **2008**, vol. 3(5), 812-820.
3. A. Diefenbach et al. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. Nature. **2001**, vol. 413, 165-171.
4. A. Hattori et al. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biochemistry, physiology and pathology. J Biochem. **2013**, vol. 154(3), 219-228.
5. A. Niranjana et al. Nonclassical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. Nature Immunology. **2012**, vol. 13(6), 579-586.
6. A. Papakyriakou et al. Novel selective inhibitors of aminopeptidases that generate antigenic peptides. BMCL letters. **2013**, vol. 23, 4832-4836.
7. A. Radbruch et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. Nature reviews. **2006**, vol. 6, 741-750.
8. A. Strange et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. Nature Genet. **2010**, vol. 42, 985-990.
9. AHM. Wong et al. The X-ray Crystal Structure of Human Aminopeptidase N Reveals a Novel Dimer and the Basis for Peptide Processing. Journal of Bio Chem. **2012**, vol. 287(44), 36804-36813.
10. AL. Albiston et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. J Biochem. **2001**, vol. 276, 48623-48626.
11. Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. Nat Genet. **2010**, vol. 42(2), 123-127.
12. D. Fruci et al. Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues. J Cell Physiol. **2008**, vol. 216, 742-749.
13. D. Fruci et al. Natural killer cells efficiently reject lymphoma silenced for the endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing. AACR. **2011**, vol. 10, 1597-1606.
14. D. Georgiadis et al. Phosphinic peptides as potent inhibitors of zinc-metalloproteases. Top Curr Chem. **2015**, vol. 360, 1-38.
15. D. Lopez et al. Concerted In Vitro Trimming of Viral HLA-B27-Restricted Ligands by Human ERAP1 and ERAP2 Aminopeptidases. Plos one. **2013**, vol. 8(11), e79596.
16. D. Vourloumis et al. Novel selective inhibitors of aminopeptidases that generate antigenic peptides. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. **2013**, vol. 23, 4832-4836.
17. DB. Ascher et al. Regulation of insulin-regulated membrane aminopeptidase activity by its C-terminal domain. Biochemistry. **2011**, vol. 50(13), 2611-2622.
18. DF. Wang et al. Toward selective histone deacetylase inhibitor design: homology modeling, docking studies, and molecular dynamics simulations of human class I histone deacetylases. J Med Chem. **2005**, vol. 48(22), 6936-6947.

19. DM. Evans et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet.* **2011**, vol. 43, 761-767.
20. DT. Puerta et al. Heterocyclic zinc-binding groups for use in next-generation matrix metalloproteinase inhibitors: potency, toxicity, and reactivity. *J Biol Inorg Chem.* **2006**, vol. 11, 131-138.
21. DT. Puerta et al. New Beginnings for Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Identification of High-Affinity Zinc-Binding Groups. *JACS.* **2004**, vol. 126, 8388-8389.
22. E. Firat et al. The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol.* **2007**, vol. 178(4), 2241-2248.
23. E. James et al. Induction of protective antitumor immunity through attenuation of ERAAP function. *Journal of immunology.* **2013**, vol. 190, 5839-5846.
24. E. Lorente et al. Concerted in vitro Trimming of Viral HLA-B27-Restricted Ligands by Human ERAP1 and ERAP2 Aminopeptidases. *PLoS ONE.* **2013**, vol. 8(11), e79596.
25. E. Stratikos et al. A Common Single Nucleotide Polymorphism in Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Induces a Specificity Switch That Leads to Altered Antigen Processing. *J Immunol.* **2012**, vol. 189, 2383-2392.
26. E. Stratikos et al. A role for naturally occurring alleles of endoplasmic reticulum aminopeptidases in tumor immunity and cancer pre-disposition. *Frontiers in oncology.* **2014**, vol. 4(363), 1-10.
27. E. Stratikos et al. Antigenic peptide trimming by ER aminopeptidases-insights from structural studies. *Molecular Immunology.* **2013**, vol. 55, 212-219.
28. E. Zervoudi et al. Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides. *J Bio Chem.* **2011**, vol. 435(2), 411-420.
29. FE. Jacobsen et al. A new role for old ligands: Discerning chelators for zinc metalloproteinases. *JACS.* **2006**, vol. 128, 3156-3157.
30. FE. Jacobsen et al. The design of inhibitors for medically relevant metalloproteins. *Chem Med Chem.* **2007**, vol. 2, 152-171.
31. FM. Karlhofer et al. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2 activated natural killer cells. *Nature.* **1992**, vol. 358, 66-70.
32. FW. Tsui et al. Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Ann rheum dis.* **2010**, vol. 69, 733-736.
33. G. Kochan et al. Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *PNAS.* **2011**, vol. 108(19), 7745-7750.
34. G. Vazeux et al. A glutamate residue contributes to the exopeptidase specificity in aminopeptidase A. *J Biochem.* **1998**, vol. 334, 407-413.
35. G. Vazeux et al. Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. *J Biol Chem.* **1996**, vol. 271, 9069-9074.
36. GE. Hammer et al. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nature immunology.* **2006**, vol. 8(1), 101-108.
37. GE. Hammer et al. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat immunol.* **2006**, vol. 7, 103-112.

38. H. Matsumoto et al. Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. *Eur J Biochem.* **2001**, vol. 268, 3259-3266.
39. H. Zeng et al. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature.* **2013**, vol. 499(7459), 485-490.
40. I. Bertini et al. Exploring the subtleties of drug-receptor interactions: the case of matrix metalloproteinases. *JACS.* **2007**, vol. 129, 2466-2475.
41. I. Evnouchidou et al. A common single nucleotide polymorphism in endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 induces a specificity switch that leads to altered antigen processing. *J Immunol.* **2012**, vol. 189, 2383-2392.
42. I. Evnouchidou et al. The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. *PLoS ONE.* **2008**, vol. 3(11), e3658.
43. IA. York et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat immunol.* **2002**, vol. 3, 1177-1184.
44. International genetics of ankylosing spondylitis consortium (IGAS). A. Cortes et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat genet.* **2013**, vol. 45, 730-738.
45. J. Braun et al. Dissemination and evaluation of ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis in Europe. *Z Rheumatol.* **2009**, vol. 68, 417-419.
46. J. Neefjes et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews.* **2011**, vol. 11, 823-836.
47. J. Wang et al. Histidine residue in the zinc-binding motif of aminopeptidase A is critical for enzymatic activity. *PNAS.* **1993**, vol. 90, 1222-1226.
48. JB. Swann et al. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* **2007**, vol. 117, 1137-1146.
49. JR. Birtley et al. The crystal structure of human endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 reveals the atomic basis for distinct roles in antigen processing. *Biochemistry.* **2012**, vol. 51, 286-295.
50. JW. Yewdell et al. Don't mess with ERAAP. *Nature immunology.* **2012**, vol. 13(6), 526-528.
51. JW. Yewdell et al. Making sense of mass destruction: Quantitating MHC class I antigen presentation. *Nature reviews.* **2003**, vol. 3, 952-961.
52. K. Anderson et al. Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. *J Exp Med.* **1991**, vol. 174, 489-492.
53. L. Hill et al. Fetal ERAP2 variation is associated with preeclampsia in African Americans in a case-control study. *BMC Med Genet.* **2011**, vol. 12(64).
54. L. Saveanu et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat immunol.* **2005**, vol. 6, 689-697.
55. L. Saveanu et al. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science.* **2009**, vol. 325, 213-217.
56. LL. Lanier et al. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat rev immunol.* **2008**, vol. 8(4), 259-268.
57. M. Mavridis et al. The Crystal Structure of Human Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Reveals the Atomic Basis for Distinct Roles in Antigen Processing. *Biochemistry.* **2012**, vol. 51, 286-295.

58. M. Shapiro-Shelef et al. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. **2003**, vol. 19, 607-620.
59. M. Tsujimoto et al. Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. *Heart Fail Rev*. **2008**, vol. 13, 285-291.
60. M. Weimershaus et al. Peptidases trimming MHC class I ligands. *Curr Opin Immunol*. **2013**, vol. 25(1), 90-96.
61. MA. Brown et al. Genetics and the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol*. **2009**, vol. 21, 318-323.
62. MA. Brown et al. Progress in spondylarthritis. Progress in studies of the genetics of ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*. **2009**, vol. 11, 254-259.
63. MA. Holmes et al. Structure of thermolysin refined at 1.6Å resolution. *Journal of molecular biology*. **1982**, vol. 160(4), 623-639.
64. MJ. Ombrello et al. Behcet disease-associated MHC class I residues implicate antigen binding and regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2014**, vol. 111, 8867-8872.
65. MJ. Shlomchik et al. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunological reviews*. **2012**, vol. 247, 52-63.
66. MJ. Smyth et al. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. **2006**, vol. 90, 1-50.
67. MK. Thorson et al. Inhibition of the lymphoid tyrosine phosphatase: the effect of zinc(II) ions and chelating ligand fragments on enzymatic activity. *Bioorganic & Medicinal chemistry letters*. **2014**, vol. 24, 4019-4022.
68. MS. Wolfe et al. Intramembrane-cleaving proteases. *J Biochem*. **2009**, vol. 284(21), 13969-13973.
69. MT. Orr et al. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat immunol*. **2010**, vol. 11(4), 321-327.
70. N. Blanchard et al. Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells. *J Immunol*. **2010**, vol. 184(6), 3033-3042.
71. N. Haroon et al. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: Biologie and pathogenic potential. *Nature Reviews Rheumatology*. **2010**, vol. 6, 461-467.
72. N. Shastri et al. Non-classical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunol*. **2012**, vol 13(13), 579-588.
73. N. Yamahara et al. Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placenta during normal pregnancy. *Life Sci*. **2000**, vol. 66, 1401-1410.
74. NA. Nagarajan et al. Nonclassical MHC-I class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nature immunology*. **2012**, vol. 13(6), 579-586.
75. P. Cascio et al. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO*. **2001**, vol. 20, 2357-2366.
76. PB. Wright et al. Ankylosing spondylitis patients display altered dendritic cell and T cell populations that implicate pathogenic roles for the IL-23 cytokine axis and intestinal inflammation. *Rheumatology*. **2015**, vol. 245, 263-275.
77. PJ. Hajduk et al. NMR-Based Modification of Matrix Metalloproteinase Inhibitors with Improved Bioavailability. *J Med Chem*. **2002**, vol. 45, 5628-5639.
78. PM. Kloetzel et al. Antigen processing by the proteasome. *Nature rev Mol Cell Biol*. **2001**, vol. 2, 179-187.

79. PR Burton et al. Association scan of 14,500 non synonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet.* **2007**, vol. 39(11), 1329-1337.
78. Psoriasis consortium. A. Strange et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet.* **2010**, vol. 42(11), 985-990.
79. R. Cagliani et al. Genetic diversity at endoplasmic reticulum aminopeptidases is maintained by balancing selection and is associated with natural resistance to HIV-1 infection. *Hum Mol Genet.* **2010**, vol. 19(23), 4705-4714.
80. R. Croxatto et al. Destruction of hypertensin and pepsitensin by an aminopeptidase obtained from yeast. *Science.* **1942**, vol. 96(2501), 519-520.
81. R. Deprez et al. Structure–Activity Relationships and Blood Distribution of Antiplasmodial Aminopeptidase -1 Inhibitors. *J Med Chem.* **2012**, vol. 55, 10909-10917.
82. R. Fluhrer et al. Intramembrane proteolysis by signal peptide peptidases: A comparative discussion of GXGD-type aspartyl proteases. *J Biochem.* **2009**, vol. 284(21), 13975-13979.
83. R. Toes et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med.* **2001**, vol. 194, 1-12.
84. S. Brown et al. Quest for selectivity in inhibition of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem.* **2004**, vol. 4, 1227-1238.
85. S. Crotty et al. Follicular helper CD4 T cells (THF). *Annu rev immunol.* **2001**, vol. 29, 621-663.
86. S. Henikoff et al. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *PNAS.* **1992**, vol. 89, 10915-10919.
87. S. Hulpke et al. The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptative immunity. *Trends Biochem Sci.* **2013**, vol. 38, 412-420.
88. S. Kim et al. Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8+ T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nature Immunology.* **2011**, vol. 12, 984-991.
89. SA. Ross et al. Characterization of the insulin-regulated membrane aminopeptidase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem.* **1996**, vol. 271, 3328-3332.
90. SC. Chang et al. The ER aminopeptidase, ERAP1 trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a ‘molecular ruler’ mechanism. *PNAS.* **2005**, vol. 102(47), 17107-17112.
91. SR. Keller et al. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biochem.* **1995**, vol. 270, 23612-23618.
92. T. Biedermann et al. Th1 and Th2 lymphocyte development and regulation of Th cell-mediated immune responses of the skin. *Journal of investigative dermatology symposium proceedings.* **2004**, vol. 9(1), 5-14.
93. T. Kanaseki et al. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity.* **2006**, vol. 25, 795-806.
94. T. Rogi et al. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *J. Biochem.* **1996**, vol. 271, 56-61.
95. T. Serwold et al. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nature immunology.* **2001**, vol. 2(7), 644-651.
96. T. Serwold et al. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature.* **2002**, vol. 419, 480-483.

97. T. Tanioka et al. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem.* **2003**, vol. 278(34), 32275-32283.
98. TJ. Kenna et al. Endoplasmic reticulum aminopeptidases in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* **2015**, vol. 54(9), 1549-1556.
99. TT. Nguyen et al. Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat Struct mol biol.* **2011**, vol. 18(5), 604-613.
100. U. Boehm et al. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol.* **1997**, vol. 15, 749-795.
101. V. Dive et al. Phosphinic peptides as zinc metalloproteinase inhibitors. *Cell Mol Life Sci.* **2004**, vol. 61, 2010-2019.
102. WW. Chan. L-leucinethiol a potent inhibitor of leucine aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun.* **1983**, vol. 116(1), 297-302.
103. Y. Goto et al. Glutamine-181 is crucial in the enzymatic activity and substrate specificity of human endoplasmic-reticulum aminopeptidase-1. *J Biochem.* **2008**, vol. 416(1), 109-116.
104. Y. Goto et al. Secretion of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Is Involved in the Activation of Macrophages Induced by Lipopolysaccharide and Interferon- γ . *JCB.* **2011**, vol. 24, 21906-21914.
105. Y. Kirino et al. Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behcet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nat Genet.* **2013**, vol. 45, 202-207.

DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE



Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr/>



DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : HERNANT PAUL

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 17 | 06 | 2016 à 18...h...00 Amphithéâtre ou salle : Cune

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : Déprez Paulan

Prénom : Rebecca

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 10 mars 2016

Signature: 

Avis du Président de Jury

Nom : GRAS

Prénom : Helene

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 10 mars 2016

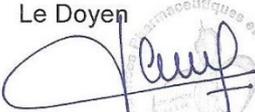
Signature: 

Décision de Monsieur le Doyen

Favorable

Défavorable

Le Doyen


D. CUNY

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

NA/ 2015

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2015/2016

Nom : HERMANT

Prénom : PAUL

Titre de la thèse : Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase 1 & 2, cibles thérapeutiques émergentes pour la modulation de la présentation antigénique.

Mots clés : Aminopeptidase du réticulum endoplasmique 1 & 2, Système immunitaire, Présentation antigénique, CMH-I, Métalloprotéase, Chimie médicinale.

Résumé :

Les ERAPs (Endoplasmic Reticulum AminoPeptidases) sont des métalloprotéases ubiquitaires à Zinc. Elles appartiennent à la famille M1 des métalloprotéases et présentent un motif GAMEN et HEXXH₁₈E dans leur structure protéique. Les ERAPs sont des aminopeptidases et ont la particularité d'avoir pour localisation subcellulaire la lumière du réticulum endoplasmique. L'ERAP1 et l'ERAP2 adoptent une conformation ouverte et fermée en fonction de l'évolution de leur site catalytique. De plus ces enzymes ont la capacité de former des homodimères et des hétérodimères ce qui leur confère un avantage coopératif.

Des peptides substrats des ERAPs issus des dégradations protéasomales, dans le cytoplasme des cellules, sont transportés dans le réticulum endoplasmique par la protéine de transport TAP. La fonction physiologique des ERAPs est le raccourcissement de ces peptides substrats par leur extrémité N-terminale. Ces substrats sont soit raccourcis à une taille adéquate pour être complexé avec le CMH-I ; soit raccourcis excessivement ne permettant pas leur complexation avec le CMH-I. La complexation du CMH-I avec un épitope étant un facteur principal dans la présentation antigénique croisée. Les ERAPs sont des éditeurs de peptides et jouent un rôle dans la réponse immunitaire cytotoxique.

A ce jour, des inhibiteurs sélectifs et non sélectifs des ERAPs ont été décrits dans la littérature. Les inhibiteurs non sélectifs ont permis d'explorer le rôle des ERAPs *in vitro*. Des familles inhibitrices sélectives des ERAPs sont en développement dans le but de repousser notre compréhension des phénomènes imputables aux ERAPs dans des systèmes complexes *in vivo*. Faut-il, par exemple, cibler sélectivement l'ERAP1 vis-à-vis de l'ERAP2 ? L'inhibition des ERAPs aura-t-elle un impact qualitatif ou quantitatif sur la production d'épitope ?

Membres du jury :

Président : Hélène Gras, Professeur des universités, laboratoire de Chimie Thérapeutique, faculté de Pharmacie de Lille

Assesneur : Rebecca Deprez-Poulain, Professeur des universités, laboratoire de Chimie Générale, faculté de Pharmacie de Lille

Assesneur : Benjamin Bertin, Maître de conférences des universités, laboratoire d'immunologie, faculté de Pharmacie de Lille

Membre extérieur : Toufik Abache, Docteur en Biochimie, Responsable de laboratoire au laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies (LFB), parc Eurasanté, Loos