



HAL
open science

Identification de mécanismes de régulation des fonctions des interférons: Rôle de la palmitoylation du récepteur de l'interféron de type I

Julie Claudinon

► **To cite this version:**

Julie Claudinon. Identification de mécanismes de régulation des fonctions des interférons: Rôle de la palmitoylation du récepteur de l'interféron de type I. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT: . tel-00354695

HAL Id: tel-00354695

<https://theses.hal.science/tel-00354695>

Submitted on 20 Jan 2009

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

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

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

Année 2007-2008

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Ecole doctorale de rattachement :

Signalisations, Neurosciences, Endocrinologie, Reproduction

Présentée et soutenue publiquement par

Julie CLAUDINON

Le 2 décembre 2008

Identification de mécanismes de régulation des fonctions
des interférons :
Rôle de la palmitoylation du récepteur de l'interféron de type I.

Directeur de recherche : Christophe LAMAZE

JURY (*y compris le directeur de thèse*)

Mme Micheline MISRAHI	Présidente
Mme Anne-Odile HUEBER	Rapporteur
M. Bruno BEAUMELLE	Rapporteur
Mme Florence NIEDERGANG	Examineur
M. Jean KANELLOPOULOS	Examineur

Identification de mécanismes de régulation des fonctions
des interférons :
Rôle de la palmitoylation du récepteur de l'interféron de type I.

Thèse réalisée au laboratoire
« Trafic, signalisation et ciblage intracellulaires »
Institut Curie – UMR144 Institut Curie-CNRS
26 rue d'Ulm 75248 PARIS Cedex 05

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres du Jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail : Micheline Misrahi (Présidente), Anne-Odile Hueber (rapporteur), Bruno Beaumelle (rapporteur), Florence Niedergang (examineur) et Jean Kanellopoulos (examineur). J'exprime en particulier ma gratitude à Florence Niedergang, également ma tutrice de thèse, pour son aide et ses conseils durant ces derniers mois.

Je voudrais ensuite remercier Ludger Johannes et Christophe Lamaze de m'avoir accueillie dans leur laboratoire, et de m'avoir ainsi donné la chance de travailler dans les conditions exceptionnelles de l'institut Curie.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe « trafic, signalisation et ciblage intracellulaires » avec qui j'ai vécu ces trois années de thèse. Merci à mes collègues de l'équipe « interféron », Emilie B, avec qui j'ai partagé les joies et déceptions de nos projets, Richard, et Christine. Un grand merci aussi à Valérie, Bahne, Yoko, Romain, Getao, Siau, Emilie H, Marianne, Estelle, Vincent, Darius et Bidisha.

Merci à Fatima, pour son aide précieuse, sa sagesse et son sourire. Je remercie bien sûr également tous les membres du premier étage, et toutes les personnes de l'institut Curie avec lesquelles j'ai été amenée à travailler.

Je voudrais remercier Pierre Eid, avec qui nous avons collaboré sur les projets palmitoylation et mutants d'endocytose, pour son aide et sa gentillesse. Merci aussi à Pauline, pour avoir partagé avec moi l'aventure du projet palmitoylation.

J'adresse un merci tout particulier à Winni, pour m'avoir soutenue et aidée tout au long de ma thèse, pour m'avoir supportée dans les moments difficiles, et toujours bien conseillée.

Enfin, je remercie naturellement ma famille et mes amis, avec une attention particulière à ma mère et ma grand-mère, à William, et avec un clin d'œil à Solène, pour leur soutien inébranlable.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu oublier, avec toutes mes excuses. Merci à toutes les personnes qui ont lu et liront ce manuscrit.

Résumé

Les interférons (IFNs) de type I sont des cytokines qui jouent un rôle capital dans les défenses immunes, antivirales et antiprolifératives de l'organisme. En se liant à leur récepteur de surface, composé des deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2, ils induisent la cascade de signalisation JAK/STAT qui aboutit à leur effets biologiques. L'objectif de ma thèse était d'identifier des mécanismes de régulation de la signalisation des IFNs. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la palmitoylation du récepteur de l'IFN de type I, une modification lipidique souvent impliquée dans le trafic et la signalisation des protéines. Par marquage métabolique au palmitate tritié, nous avons montré qu'IFNAR1 et IFNAR2 sont palmitoylés. Le domaine cytoplasmique d'IFNAR1 contient deux cystéines, Cys⁴⁶³ et Cys⁵⁰², qui sont des sites potentiels de palmitoylation. A l'aide de mutants sur chacune de ces cystéines, nous avons montré qu'IFNAR1 est palmitoylée uniquement sur sa cystéine la plus proche de la membrane plasmique, la Cys⁴⁶³. Un mutant non palmitoylé dans lequel cette cystéine a été remplacée par une alanine nous a permis de constater que la palmitoylation d'IFNAR1 n'est pas impliquée dans son trafic intracellulaire, dans son endocytose ni dans sa stabilité, mais qu'en revanche elle joue un rôle crucial dans l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT. De façon concordante, la palmitoylation d'IFNAR1 est requise pour l'activation transcriptionnelle des gènes induits spécifiquement par l'IFN- α . Par contre, un défaut de palmitoylation n'influence nullement l'activité antiproliférative de l'IFN- α , en dépit du rôle de cette modification dans la signalisation.

MOTS CLES

Palmitoylation, interféron, récepteurs des interférons, signalisation, JAK/STAT, trafic intracellulaire, microdomaines membranaires, modifications lipidiques

Abstract

Type I interferons (IFNs) play key roles in mediating innate and acquired immune responses, in host defense against viral infections, and exhibit antiproliferative and tumoricidal activity. Through the binding to their shared cell surface receptor, composed of the two subunits IFNAR1 and IFNAR2, they induce the JAK/STAT signaling cascade, thus leading to their biological effects.

The goal of my thesis was to identify regulatory mechanisms of IFNs signaling. In this context, we analyzed the role of protein palmitoylation, a lipid modification which is known to be involved in trafficking and signaling of proteins. We found that pharmacological inhibition of palmitoylation results in severe defects of IFN receptor endocytosis and signaling. We generated mutants of IFNAR1 where each or both of the two cysteines present in the cytoplasmic domain were replaced by alanines. We found that only Cys⁴⁶³, the most proximal of the two cytoplasmic cysteines, is palmitoylated. A thorough microscopic and biochemical analysis of the palmitoylation-deficient IFNAR1 mutant revealed that IFNAR1 palmitoylation is not required for receptor endocytosis, intracellular distribution, or stability at the cell surface. Nevertheless, the lack of IFNAR1 palmitoylation results in major defects in JAK/STAT signaling and gene transcription activated by IFN- α . Surprisingly, it had no effect on IFN- α antiproliferative activity, in spite of the importance of palmitoylation for signaling.

KEY WORDS

Palmitoylation, interferon, interferons receptors, signalisation, JAK/STAT, intracellular trafficking, rafts, lipid modifications

SOMMAIRE

Index des illustrations	10
Abbréviations.....	11
Préface	16
INTRODUCTION	18
<i>Partie I : Les interférons et leurs récepteurs</i>	19
I.I Les interférons	19
I.I.1 Généralités	19
I.I.2 Spécificité d'espèce.....	20
I.I.3 Structure des IFNs	20
I.I.4 Cellules sécrétant les IFNs	22
I.I.5 Induction de la production des IFNs	22
I.II Les récepteurs des IFNs	24
I.II.1 Généralités.....	24
I.II.2 Formation du complexe ligand-récepteur pour l'IFN de type I	24
I.III Voies de signalisation des IFNs.....	29
I.III.1 La voie JAK/STAT	29
I.III.2 Les autres voies de signalisation des IFNs.....	31
<i>I.III.2.1 Les protéines CRK dans la signalisation de l'IFN.....</i>	<i>33</i>
<i>I.III.2.2 La voie des MAPK dans la signalisation de l'IFN</i>	<i>33</i>
<i>I.III.2.3 La voie de la PI3K dans la signalisation de l'IFN.....</i>	<i>36</i>
I.III.3 Modulation complexe de la signalisation par l'IFN de type I	38
<i>I.III.3.1 Régulation négative de la signalisation de l'IFN de type I</i>	<i>38</i>
I.III.3.1.1 Diminution des récepteurs présents à la surface cellulaire	38
I.III.3.1.2 Tyrosine phosphatases	38
I.III.3.1.3 Les SOCS	38
I.III.3.1.4 Les PIAS.....	39
<i>I.III.3.2 Induction différentielle des STATs par l'IFN selon les types cellulaires.....</i>	<i>39</i>
<i>I.III.3.3 Réponse différentielle aux sous-types d'IFN de type I.....</i>	<i>39</i>
<i>I.III.3.4 Comment l'exposition antérieure à d'autres cytokines influence la réponse des IFNs de type I.....</i>	<i>40</i>
<i>I.III.3.5 Conclusion sur la complexité de la signalisation de l'IFN de type I.....</i>	<i>40</i>

I.IV Activités biologiques des IFNs.....	43
I.IV.1 Activités antivirales.....	43
<i>I.IV.1.1 ISG15</i>	<i>43</i>
<i>I.IV.1.2 Protéines Mx</i>	<i>43</i>
<i>I.IV.1.3 PKR.....</i>	<i>43</i>
<i>I.IV.1.4 Système OAS/RNaseL</i>	<i>44</i>
I.IV.2 Inhibition de la prolifération cellulaire et contrôle de l'apoptose.....	45
<i>I.IV.2.1 Rôle des IFNs dans l'inhibition de la prolifération cellulaire.....</i>	<i>45</i>
<i>I.IV.2.2 Rôle des IFNs dans l'apoptose</i>	<i>45</i>
I.IV.3 Effet des IFNs sur le système immunitaire.....	46
<i>I.IV.3.1 Augmentation de la présentation de l'antigène</i>	<i>46</i>
<i>I.IV.3.2 Différenciation des cellules T CD4+ en Th1</i>	<i>46</i>
<i>I.IV.3.3 Immunité humorale.....</i>	<i>46</i>
<i>I.IV.3.4 Recrutement des leucocytes au site d'infection</i>	<i>47</i>
<i>I.IV.3.5 Activation des effecteurs de la réponse immunitaire</i>	<i>47</i>
I.V Utilisation thérapeutique des IFNs.....	47
I.V.1 Lutte antivirale.....	47
I.V.2 Sclérose en plaques	48
I.V.3 Cancer	48
I.VI Trafic cellulaire des récepteurs des IFNs	51
Revue	53
 Partie II: Palmitoylation.....	 62
II.I Modifications lipidiques des protéines.....	62
II.I.1 Prenylation.....	62
II.I.2 Acylation.....	63
<i>II.I.2.1 N-myristoylation</i>	<i>63</i>
<i>II.I.2.2 Palmitoylation</i>	<i>64</i>
II.II Mécanismes et régulation de la palmitoylation	69
II.II.1 Motifs de palmitoylation.....	69
II.II.2 Mécanismes de palmitoylation	69
<i>II.II.2.1 Autoacylation</i>	<i>69</i>
<i>II.II.2.2 Action enzymatique.....</i>	<i>69</i>
II.II.2.2.1 Découverte des PATS	70

II.II.2.2.2 Famille DHHC	72
II.II.2.3 Mécanismes potentiels	73
II.II.3 Régulation de la palmitoylation.....	75
II.II.3.1 Formation du thiolate	75
II.II.3.2 Disponibilité du palmitoyl-CoA	75
II.II.3.3 Palmitoyltransférases/Palmitoylthioestérases	75
II.II.2.4 Inductibilité de la palmitoylation/dépalmitoylation	76
II.III Fonctions de la palmitoylation	77
II.III.1 Attachement aux membranes lipidiques/relocalisation dans les rafts	77
II.III.1.1 Attachement aux membranes lipidiques	77
II.III.1.2 Localisation dans les rafts.....	77
II.III.2 Rôle de la palmitoylation dans le trafic intracellulaire.....	81
II.III.2.1 Rôle de la palmitoylation dans le trafic des protéines H-Ras et N-Ras	81
II.III.2.2 Rôle de la palmitoylation dans l'endocytose	83
II.III.2.3 Prévention de la dégradation lysosomale.....	83
II.III.2.4 Rôle de la palmitoylation dans le recyclage	85
II.III.2.5 Régulation de l'export du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi	85
II.III.2.6 Recrutement dans des régions synaptiques spécifiques.....	86
II.III.3 Rôle de la palmitoylation dans la stabilité protéique	86
II.III.4 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation	88
II.III.4.1 Palmitoylation des récepteurs immuns	88
II.III.4.1.1 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation du récepteur des cellules T.....	88
II.III.4.1.2 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation du récepteur des cellules B.....	91
II.III.4.1.3 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation des récepteurs Fc.....	91
II.III.4.2 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation des GPCRs et des protéines G	91
II.III.4.2.1 Palmitoylation des récepteurs couplés aux protéines G	91
II.III.4.2.2 Palmitoylation des protéines G.....	93
II.III.4.3 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation de Fas	93
II.III.4.4 Palmitoylation des protéines Ras et signalisation	96
OBJECTIFS DE LA THESE.....	97
RESULTATS.....	99
Article.....	101

<i>Résultats complémentaires</i>	120
Endocytose de l'IFN- α couplé à des marqueurs fluorescents	120
Rôle de la palmitoylation dans l'action antiproliférative de l'IFN- α	122
DISCUSSION	124
<i>I. Système d'étude utilisé</i>	125
<i>II. Palmitoylation</i>	126
II.1 Probabilités de palmitoylation	126
II.2 Environnement peptidique.....	128
<i>III. Trafic d'IFNAR1</i>	129
III.1 Rôle de la palmitoylation dans le trafic d'IFNAR1	129
III.2 Autres considérations sur le trafic d'IFNAR1	131
<i>IV. Signalisation de l'IFN-α</i>	131
IV.1 Rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans la signalisation de l'IFN- α	131
IV.2 Autres modifications post-traductionnelles impliquées dans la signalisation de l'IFN- α	133
<i>V. Rôle de la palmitoylation sur les effets biologiques de l'IFN-α</i>	134
<i>VI. Relation entre le trafic d'IFNAR1 et l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN-α</i>	135
<i>VII. Impact thérapeutique</i>	137
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	138
REFERENCES	141

Index des illustrations

Tableaux

- Tableau 1. Les trois types d'IFN: nom, locus génique et récepteurs. **p 20**
- Tableau 2. Traitement du cancer : trois catégories de réponses à l'IFN- α . **p 50**
- Tableau 3. Séquences des protéines palmitoylées. **p 66**
- Tableau 4. Homologie entre les formes humaines et murines des protéines de la voie JAK/STAT. **p 126**
- Tableau 5. Prédiction des sites de palmitoylation à l'aide du programme CSS-Palm 2.0. **p 127**

Figures

- Figure 1. Représentation structurale « en rubans » des IFNs de type I. **p 21**
- Figure 2. Activation des Toll-like receptors (TLRs). **p 23**
- Figure 3. Activation des récepteurs des IFNs de type I, de type II et de type III. **p 26**
- Figure 4. Modélisation du complexe IFN-récepteur. **p 27**
- Figure 5. Assemblage en deux étapes du complexe ternaire. **p 28**
- Figure 6. Représentation schématique des sous-unités du récepteur de l'IFN- α , IFNAR1 et IFNAR2. **p 30**
- Figure 7. La protéine CRKL dans la signalisation de l'IFN de type I. **p 32**
- Figure 8. Voie de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinases). **p 34**
- Figure 9. Signalisation de l'IFN de type I par la voie des MAPK. **p 35**
- Figure 10. Voie de signalisation de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). **p 37**
- Figure 11. Complexité de la signalisation par l'IFN de type I. **p 42**
- Figure 12. Mécanismes antiviraux de l'action de l'IFN. **p 44**
- Figure 13. Structures des modifications lipidiques des protéines. **p 62**
- Figure 14. Typologie des protéines palmitoylées. **p 68**
- Figure 15. Topologie membranaire des PATs de la famille DHHC. **p 71**
- Figure 16. Diagramme schématique d'une PAT à domaine DHHC. **p 71**
- Figure 17. Mécanismes potentiels de palmitoylation. **p 74**
- Figure 18. Régulation de la palmitoylation. **p 76**
- Figure 19. Modèle des « deux signaux » d'adressage aux membranes lipidiques des protéines. **p 79**
- Figure 20. Modèle «Kinetic bilayer trapping» des protéines doublements modifiées par des lipides. **p 80**
- Figure 21. Trafic des protéines H-Ras et N-Ras en fonction de leur statut de palmitoylation dans les cellules de mammifères. **p 82**
- Figure 22. Implication des protéines palmitoylées dans les événements de signalisation précoce du TCR. **p 89**
- Figure 23. Représentation schématique de la signalisation apoptotique de Fas et du rôle de la palmitoylation. **p 95**
- Figure 24. Environnement peptidique des cystéines cytoplasmiques d'IFNAR1. **p 128**
- Figure 25. Mutants des motifs potentiels d'endocytose d'IFNAR1. **p 136**
- Figure 26. Proposition de modèle des événements gouvernant la signalisation de l'IFN de type I, intégrant le rôle de la palmitoylation et le rôle de l'endocytose. **p 140**

Index des abréviations

A

Aa: acides aminés
ACBP: acyl-CoA binding protein
ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
Akr: ankyrin repeat
AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate
APT: acyl protein thioesterase
ARN: acide ribonucléique
ATP: adenosine triphosphate

B

BCR: B cell receptor

C

CBP: CREB (*cAMP response element binding protein*) binding protein
CD-M6PR: cation-dependent mannose-6-phosphate receptor
Chs: chitine synthétase
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CMV: cytomegalovirus
CoA: Coenzyme A
CRD: cystein rich domain
Cys: cystéine

D

DAP: death associated proteins
DHHC-CRD: Asp-His-His-Cys cysteine rich domain
DISC: death inducing signaling complex
DRMs: detergent resistant membranes

E

EGF: epidermal growth factor
EIF2: eukaryotic translation inhibition factor 2
EIRE: Ets-IRF response element

eNOS: endothelial nitric oxid synthase

ERF: effect on ras function

ERGIC: Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment

ERK: extracellular signal regulated kinase

F

FACS: fluorescence-activated cell sorting

FADD: Fas-associated death domain

FNIII: fibronectine de type III

G

GAF: IFN- γ activation factor

GAS: IFN- γ activated site

GATE: IFN- γ activated transcriptional element

GDP: guanosine diphosphate

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GFP: green fluorescent protein

Gly: glycine

GPCR: G protein coupled receptor

GPI: glycosylphosphatidylinositol

GRK: G protein coupled receptor kinase

GTP: guanosine triphosphate

H

HSV: herpes simplex virus

I

ICAM: intracellular adhesion molecule

IFN: interféron

IFNAR1: chaîne 1 du récepteur de l'IFN de type I

IFNAR2: chaîne 2 du récepteur de l'IFN de type I

IFNGR1: chaîne 1 du récepteur de l'IFN- γ

IFNGR2: chaîne 2 du récepteur de l'IFN- γ

IFNLR1: chaîne 1 du récepteur de l'IFN- λ

IKK: inhibitor of NF- κ B kinase

IL: interleukine

IL10R: récepteur de l'IL10

iNOS: inducible nitric oxid synthase
IPS1: IFN- β promoter stimulator 1
IRF: IFN regulatory factor
IRM: imagerie par résonance magnétique
IRS: insulin receptor substrate
ISG: interferon stimulated gene
ISGF3: ISG factor 3.
ISRE: IFN stimulated response element
ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

J

JAK: Janus kinase
JNK: JUN amino-terminal kinase

K-L

LAT: linker for activation of T cells
LPS: lipopolysaccharide
Lys: lysine

M

MAPK: mitogen activated protein kinase
MDA5: melanoma differentiation associated protein 5 (hélicase à ARN)
Met: méthionine
MNK1: MAPK interacting protein kinase 1
MSK1: mitogen and stress activated
kinase 1
MTOR: mammalian target of rapamycin
Mx: myxovirus resistance

N

NK: natural killer
NMT: N-myristoyltransferase
nSMase: neutral sphingomyelinase

O

OAS: oligoadenylate synthase

P

P: phosphate
PAT: palmitoyl acyltransferase
Pfa: protein fatty acyl transferase
PI: phosphatidylinositol
PI3K: phosphatidyl inositol 3 kinase
PIAS: protein inhibitor of activated Stats
PKA: protéine kinase A
PKC: protéine kinase C
PKR: protein kinase RNA dependent
PLC: phospholipase C
PPT: protein palmitoyl thioesterase
PRR: pattern recognition receptor
PSD: post-synaptic density
pSTAT1: forme phosphorylée de STAT1
PTP: protein tyrosine phosphatase

Q-R

RE: réticulum endoplasmique
RGS: regulator of protein G signaling
RIG-I: retinoic acid inducible gene I (hélicase à ARN)
RNaseL: ribonucléase L

S

SDS: sodium dodecyl sulfate
Ser: sérine
SFK: Src family of tyrosine kinase
SH2: Src Homology 2 Domain
SNARE: soluble NSF attachment receptor
SOCS: suppressor of cytokine signaling

T

TAP: transporter activated protein
TBK1: TANK binding kinase
TCR: T cell receptor
TF: transcription factor

TGF- β : transforming growth factor

Th: T helper

TLR: Toll-like receptor

TNF: tumor necrosis factor

TRAIL: TNF related apoptosis inducing ligand

TRIF: TLR adapter molecule I

Tyr: tyrosine

U-Z

VHB: virus de l'hépatite B

VHC: virus de l'hépatite C

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

Yck: yeast casein kinase

Préface

Les interférons (IFNs) de type I sont de petites molécules appartenant à la famille des cytokines hélicoïdales qui possèdent des propriétés antivirales, antiprolifératives et immunomodulatrices. Ces fonctions en ont fait un traitement de choix pour certaines maladies virales chroniques et pour certains types de cancers. La liaison des IFNs de type I à leur récepteur, composé des deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2, induit les événements de signalisation qui conduisent à leurs effets biologiques. L'étude des voies de signalisation induites par les IFNs ont permis au cours des années 1980-1990 la découverte de la voie JAK/STAT, élément majeur de leur signalisation. Toutefois, d'autres voies ont également été impliquées par la suite, telles que la voie des MAPK et de la PI3K, et la modulation de la signalisation des IFNs apparaît être réellement complexe, dépendant de facteurs multiples. Il est important de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'IFN de type I, notamment pour améliorer son efficacité en tant qu'agent thérapeutique.

Mon laboratoire d'accueil a exploré le rôle de l'endocytose des récepteurs des IFNs dans l'induction de la voie JAK/STAT, et a ainsi lié l'endocytose dépendante de la clathrine à la signalisation JAK/STAT induite par l'IFN- α . L'objectif de notre travail est d'identifier des modes de régulation de la signalisation des IFNs, en particulier en étudiant le trafic intracellulaire de leurs récepteurs. Les modifications post-traductionnelles des récepteurs, telles que la phosphorylation ou l'acétylation, apparaissent jouer un rôle important dans la signalisation : c'est pourquoi nous avons envisagé cette direction. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la palmitoylation du récepteur de l'IFN de type I, une modification lipidique souvent impliquée dans le trafic et la signalisation des protéines.

La palmitoylation, ou S-acylation, consiste en l'attachement d'un acide gras saturé à longue chaîne, le plus souvent un palmitate, sur un ou plusieurs résidus cystéines d'une protéine par l'intermédiaire d'une liaison thioester. De nombreuses protéines sont concernées par cette modification lipidique qui a lieu au niveau des membranes. La palmitoylation est impliquée dans diverses fonctions, telles que l'ancrage membranaire des protéines cytosoliques, l'endocytose, l'export des protéines vers la surface ou leur localisation dans le compartiment cellulaire approprié, la localisation dans les microdomaines membranaires de type raft, la stabilité protéique, et également, de façon importante, dans la signalisation. IFNAR1 et IFNAR2 possèdent chacune deux résidus cystéines dans leur domaine cytoplasmique, nous avons donc voulu savoir si le récepteur de l'IFN de type I était palmitoylé et si cela pouvait jouer un rôle dans la signalisation, en particulier par l'intermédiaire de fonctions sur le trafic.

Lors d'études préliminaires, j'ai montré qu'un traitement des cellules par un inhibiteur général de la palmitoylation, le 2-bromopalmitate, provoque une inhibition importante de l'endocytose d'IFNAR1 et de l'induction de la voie de signalisation JAK/STAT par l'IFN- α . Ceci a laissé penser

que le récepteur de l'IFN de type I pouvait être palmitoylé et que cette modification pouvait être nécessaire à son endocytose ainsi qu'à ses fonctions de signalisation, bien que les effets observés puissent être dus à la palmitoylation d'autres protéines.

Afin de démontrer si IFNAR1 et IFNAR2 sont elles-mêmes palmitoylées, nous avons effectué un marquage métabolique au palmitate tritié. Nous nous sommes ensuite focalisés sur IFNAR1, qui est la sous-unité la plus importante pour la transduction du signal. Par mutation des cystéines cytoplasmiques d'IFNAR1, nous avons pu identifier la cystéine palmitoylée. Afin d'explorer les fonctions de la palmitoylation d'IFNAR1, nous avons caractérisé un mutant non palmitoylé pour son trafic et son aptitude à induire la voie de signalisation JAK/STAT ainsi que l'activité transcriptionnelle et les effets biologiques de l'IFN- α .

A l'aide d'expériences d'immunofluorescence dans lesquelles nous avons effectué des co-localisations avec des marqueurs spécifiques de différents compartiments cellulaires, nous avons analysé par microscopie confocale le rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans sa localisation intracellulaire. Nous avons effectué des essais d'endocytose par cytométrie de flux et par immunofluorescence pour regarder le rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans son internalisation, et nous avons réalisé des essais de demie-vie à la membrane plasmique par cytométrie de flux pour explorer le rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans sa stabilité. Afin d'étudier le rôle de la palmitoylation dans l'activation de la voie JAK/STAT, nous avons analysé par des méthodes biochimiques l'induction de la phosphorylation de TYK2 et de JAK1 par l'IFN- α , et nous avons regardé par immunofluorescence la translocation nucléaire de la forme phosphorylée de STAT1. Nous avons également cherché à étudier le rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans l'activation de la transcription à l'aide d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément ISRE, spécifiquement activé par l'IFN de type I. Enfin, nous avons exploré le rôle de la palmitoylation sur les effets biologiques de l'IFN de type I, en mesurant l'action antiproliférative de l'IFN- α sur les cellules exprimant le mutant non palmitoylé ou la forme sauvage d'IFNAR1.

Dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, je m'attacherai dans la première partie à décrire les connaissances actuelles sur notre modèle d'étude, l'IFN de type I et son récepteur. Je détaillerai ses voies de signalisation, ses activités biologiques et ses applications thérapeutiques, ainsi que le trafic intracellulaire du récepteur. Dans la deuxième partie de l'introduction, je ferai le tour des connaissances actuelles sur la palmitoylation, ses mécanismes et ses fonctions. L'objectif et les résultats de mon travail de thèse seront ensuite présentés, puis discutés.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Partie I : Les interférons et leurs récepteurs

1.1 Les interférons

1.1.1 Généralités

Les cytokines sont de petites protéines sécrétées par certaines cellules qui affectent le comportement d'autres cellules. Les interférons (IFNs) sont des cytokines qui possèdent des effets antiviraux, antiprolifératifs et immunomodulateurs. Ils ont été découverts en 1957 par Isaacs et Lindenmann, comme une substance qui protégeait les cellules des infections virales (Isaacs and Lindenmann, 1957).

Il existe trois types d'IFNs, le type I, le type II et le type III. L'IFN de type I regroupe 7 classes différentes : l'IFN- α (qui est lui-même divisé en 13 sous-types, l'IFN- α 1, - α 2, - α 4, - α 5, - α 6, - α 7, - α 8, - α 10, - α 13, - α 14, - α 16, - α 17, et - α 21), l'IFN- β , l'IFN- ϵ , l'IFN- κ , l'IFN- ω , l'IFN- δ et l'IFN- τ . Les gènes qui codent les IFNs de type I sont localisés sur le chromosome 9 chez l'homme, et sur le chromosome 4 chez la souris. Tous les IFNs de type I se lient à un récepteur commun, le récepteur de l'IFN de type I (Pestka et al., 2004).

En revanche, il n'y a qu'un seul type d'IFN de type II, l'IFN- γ . Le gène qui code pour cette cytokine se trouve sur le chromosome 12 chez l'homme et sur le chromosome 10 chez la souris. L'IFN- γ se lie à un récepteur différent du type I, le récepteur de l'IFN de type II. L'IFN- γ ne possède pas vraiment d'homologie avec les IFNs de type I, mais a été classifié dans la famille des IFNs en raison de sa capacité à interférer avec les infections virales, ce qui correspond à la définition originale de l'IFN (Pestka et al., 2004).

Une nouvelle classe d'IFNs, ou « molécules similaires aux IFNs », a émergé récemment (Sheppard et al., 2003). Il s'agit de l'interleukine-29 (IL-29), de l'IL-28A et de l'IL-28B, nommées aussi IFN- λ 1, IFN- λ 2 et IFN- λ 3, respectivement. Les IFN- λ ont également des propriétés antivirales, mais sont structurellement distincts des IFNs de type I et de type II. Ils lient un récepteur de surface différent composé de deux chaînes, IFNLR1 (connu aussi comme IL-28R α) et IL-10R β . Cette nouvelle classe représente les IFNs de type III (Kotenko et al., 2003; Uze and Monneron, 2007) (tableau 1).

Type d'IFN		Locus du gène humain	Récepteur: chaîne 1	Récepteur: chaîne 2
Type I	IFN- α	9p21+3 (T)	IFN- α R1	IFN- α R2
	IFN- β	9p21+3 (T)		
	IFN- δ	aucun		
	IFN- ϵ	9p21+3 (C)		
	IFN- κ	9p21+1 (T)		
	IFN- τ	aucun		
	IFN- ω	9p21+3 (T)		
Type II	IFN- γ	12q14+3 (C)	IFN- γ R1	IFN- γ R2
Type III	IFN- λ 1 (IL-29)	19q13+2 (T)	IFNLR1 (IL-28R α)	IL-10R β
	IFN- λ 2 (IL-28A)	19q13+2 (C)		
	IFN- λ 3 (IL-28B)	19q13+2 (T)		

Tableau 1. Les trois types d'IFN: nom, locus génique et récepteurs.

Les colonnes de gauche à droite indiquent les types, les sous-classes, la localisation du gène dans le génome humain, et les composants du récepteur. Seules les localisations des gènes humains sont indiquées. La désignation (C) indique que la transcription se déroule vers le centromère, tandis que (T) indique que la transcription se déroule vers les télomères.

I.1.2 Spécificité d'espèce

Si la plupart des IFNs sont exprimés chez beaucoup d'espèces mammifères, l'IFN- δ et l'IFN- τ sont exprimés uniquement chez le cochon et les bovins respectivement, tandis que l'IFN- β et l'IFN- ω ne sont exprimés que chez l'homme (Pestka et al., 2004).

I.1.3 Structure des IFNs

L'IFN de type I appartient à la famille des cytokines hélicoïdales et a pour structure cinq hélices- α qui sont liées par une boucle qui connecte les hélices A et B (boucle AB) et trois autres segments (boucles BC, CD, et DE). La boucle AB contient de courts segments de 310 hélices, et est subdivisée en trois parties, AB1, AB2 et AB3. Elle joue un rôle critique dans l'affinité pour la chaîne 2 du récepteur (IFNAR2). Une comparaison de tous les IFNs de type I connus montre une structure de base conservée qui comprend les hélices A, B, C, D et E et la boucle AB (figure 1). L'IFN de type I existe sous forme d'un monomère de 166 acides aminés.

Par contraste, l'IFN- γ forme un homodimère, chaque partie étant constituée de 6 hélices. La séquence protéique mature de l'IFN- γ comporte 143 acides aminés.

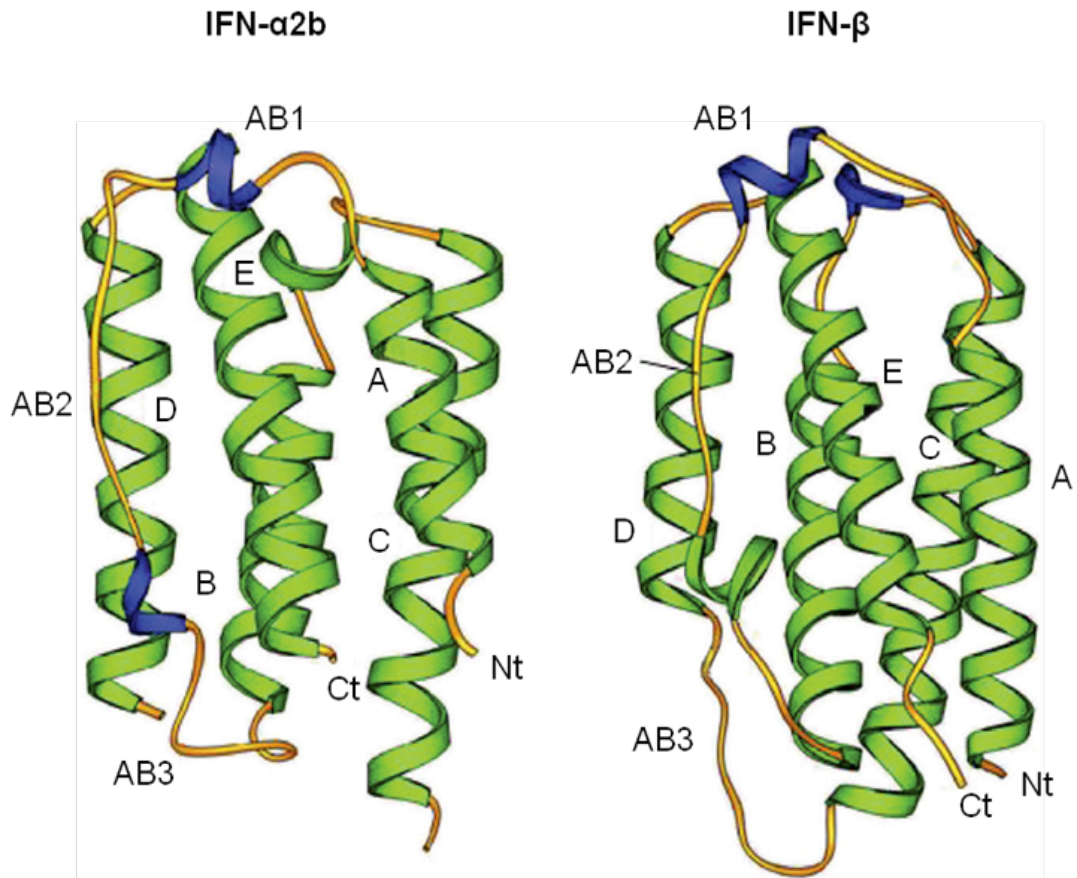


Figure 1. Représentation structurale « en rubans » des IFNs de type I.

La structure de l'IFN- α 2b est représentée à gauche, celle de l'IFN- β à droite. Les hélices alpha sont colorées en vert, les boucles en doré, et les segments à 310 hélices de la boucle AB en bleu. Ct = domaine C-terminal, Nt = domaine N-terminal. Voir le texte pour plus de détails. D'après Pestka et al., 2004.

I.1.4 Cellules sécrétant les IFNs

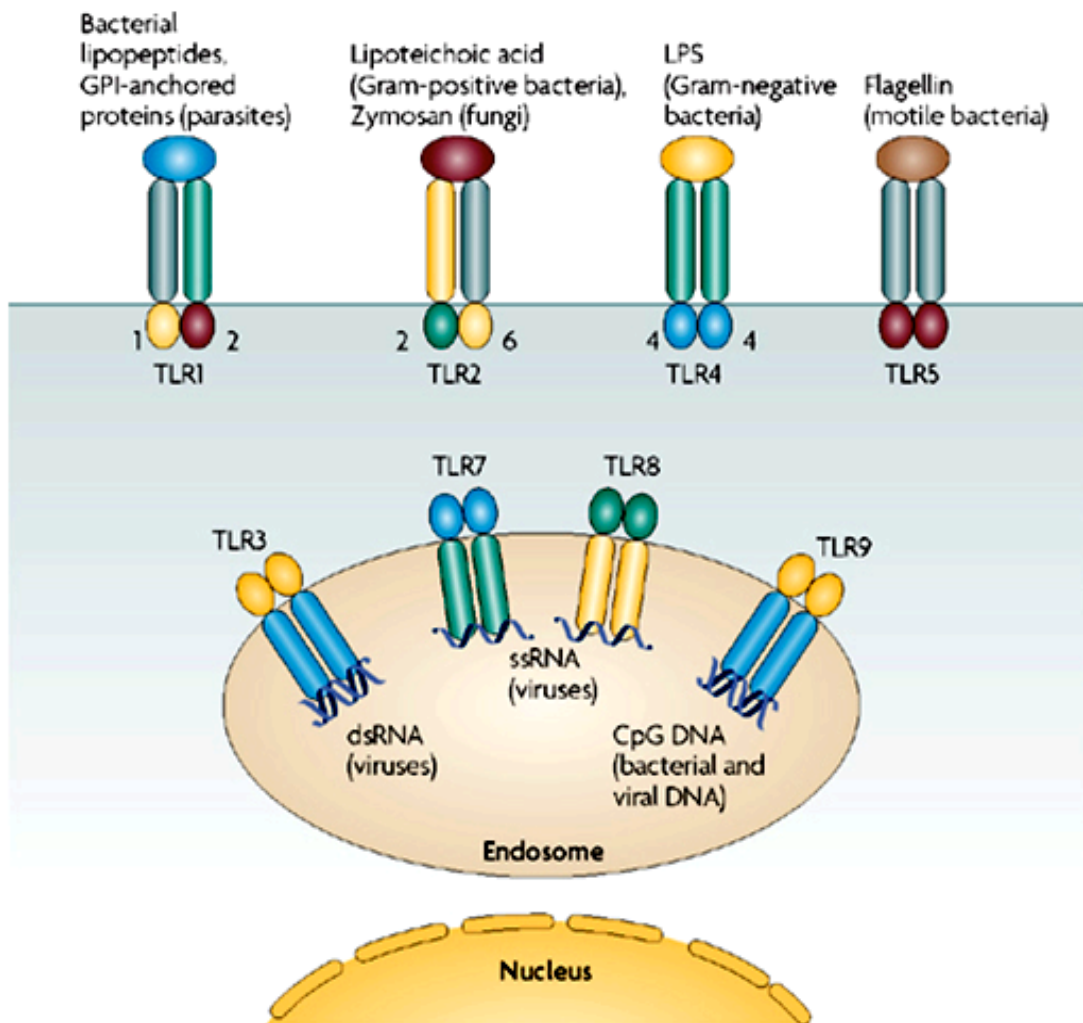
L'IFN- α est sécrété principalement par les leucocytes et les cellules dendritiques, l'IFN- β par les fibroblastes, et l'IFN- γ par les cellules T et les cellules NK (natural killer). Néanmoins, il semble que les IFNs de type I soient également sécrétés par de nombreux autres types cellulaires (Pestka et al., 2004).

I.1.5 Induction de la production des IFNs

La production des IFNs est transitoire et nécessite la stimulation par des virus ou des produits microbiens. A l'origine, lors de la découverte des IFNs, le virus Influenza a été identifié comme inducteur de leur production (Isaacs and Lindenmann, 1957). Plus tard, d'autres inducteurs ont été découverts, incluant des produits de bactéries et de protozoaires, de virus à ADN et à ARN, mais aussi des acides nucléiques microbiens, des lipides, des polysaccharides et des protéines (Borden et al., 2007). Tous ces produits microbiens induisent la production de l'IFN via l'activation de leurs TLRs (Toll-like receptors) respectifs (figure 2).

La plupart des efforts de recherche pour comprendre les mécanismes cellulaires responsables de l'induction des IFNs ont été réalisés avec l'ARN double-brin. L'ARN double-brin est reconnu par le TLR3, présent principalement sur les membranes endocytiques, mais également par deux hélicases à ARN cytoplasmiques, RIG-I (retinoic acid inducible gene I) et MDA5 (melanoma differentiation associated protein 5). TRIF (TLR adapter molecule I) est une protéine adaptatrice pour la signalisation du TLR3, et IPS1 (IFN- β promoter stimulator 1) est une protéine adaptatrice pour RIG-I et MDA5. TRIF et IPS1 recrutent IKK (inhibitor of NF- κ B kinase) et TBK1 (TANK binding kinase).

L'induction de la transcription des gènes codant pour les IFNs est induite par la liaison des facteurs de transcription activés par les TLRs à leurs promoteurs. Ces facteurs de transcription incluent des protéines de la famille des IRF (IFN regulatory factor), en particulier IRF3 et IRF7, et NF- κ B. Les IRFs sont activées par TBK1 et IKK ϵ , elles se dimérisent ensuite et sont transloquées dans le noyau. IKK phosphoryle I κ B ce qui induit son relargage de NF- κ B, NF- κ B est ensuite activé par phosphorylation par d'autres kinases (Borden et al., 2007).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 2. Activation des Toll-like receptors (TLRs).

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont localisés à la surface de la cellule. Leurs domaines extracellulaires (représentés par des cylindres) se lient spécifiquement à des produits microbiens qui agissent comme des ligands. Les domaines intracellulaires (représentés par des sphères) transduisent le signal via des protéines de signalisation cytoplasmiques spécifiques. Les TLRs fonctionnent en tant qu'homodimères ou hétérodimères. Les ligands spécifiques pour plusieurs de ces dimères sont listés en haut de la figure. Plusieurs autres TLRs, tels que TLR3, TLR7/8 et TLR9, reconnaissent spécifiquement les acides nucléiques qui sont produits par les virus. Ils sont localisés sur la membrane endosomale avec les domaines de liaison du ligand dirigés vers la lumière et les domaines de signalisation dirigés vers le cytoplasme. Ils fonctionnent également en tant que dimères et reconnaissent l'ARN double brin (dsRNA), l'ARN simple brin (ssRNA) ou l'ADN double brin contenant des séquences CpG. GPI, glycosylphosphatidylinositol; LPS, lipopolysaccharide. D'après Borden et al., 2007.

I.II Les récepteurs des IFNs

I.II.1 Généralités

Les IFNs de type I se lient à un récepteur commun composé de deux chaînes, IFNAR1 et IFNAR2, dont les gènes se trouvent sur le chromosome 21. IFNAR1 est une protéine transmembranaire de 110 kDa dont l'ADNc a été cloné en 1990 (Uze et al., 1990). IFNAR2 a été purifiée quatre ans plus tard, puis caractérisée en 1995 (Domanski et al., 1995; Novick et al., 1994). IFNAR2, également transmembranaire, existe sous deux formes résultant d'un épissage alternatif du même gène : une forme de 55 kDa dont la partie intracellulaire est courte (IFNAR2b) et une forme longue (IFNAR2c) d'environ 95 à 100 kDa (Mogensen et al., 1999). La forme courte est non fonctionnelle. Dans la suite de ce manuscrit, nous considérerons par l'abréviation IFNAR2 uniquement la forme longue.

L'unique IFN de type II, l'IFN- γ , se lie à un récepteur composé également de deux chaînes, IFNGR1 (90 kDa) et IFNGR2 (62 kDa). Le gène codant pour IFNGR1 est localisé sur le chromosome 6, son ADNc a été cloné en 1988 (Aguet et al., 1988). IFNGR2, qui a été isolé en 1994, est localisé sur le chromosome 21 (Soh et al., 1994). La liaison de l'IFN- γ induit la formation d'un complexe tétramérique composé de deux de chacune des deux chaînes du récepteur (figure 3).

Si IFNAR est exprimé par une majorité de cellules, IFNGR est exprimé principalement par les macrophages, les monocytes, les cellules B et les cellules endothéliales.

I.II.2 Formation du complexe ligand-récepteur pour l'IFN de type I

o Sites de liaison

Les IFNs de type I se lient à IFNAR2 au niveau des boucles 43-53, 76-80 et des résidus inter-domaines 100-110 (figure 4) (Chill et al., 2003). IFNAR1 possède plusieurs domaines structuraux fibronectine de type III (FNIII). Des études *in vitro* ont montré que les trois domaines FNIII N-terminaux sont requis pour la reconnaissance du ligand. De plus, la liaison de l'IFN induit un changement conformationnel du domaine extracellulaire d'IFNAR1 (Lamken et al., 2005).

Tous les IFNs de type I se lient au même épitope sur IFNAR2, bien qu'ils présentent des centres de liaison différents (Peleg-Shulman et al., 2004). Les IFN- α et - β lient également le même épitope sur IFNAR1 (Uze et al., 2007).

o Affinités des IFNs de type I pour les deux sous-unités du récepteur

Les IFNs de type I se lient à IFNAR2 avec une affinité beaucoup plus forte que pour IFNAR1, de 1000 fois supérieure. Il existe aussi des différences d'affinité entre les sous-types d'IFNs de type I pour IFNAR2 et IFNAR1. Ainsi, les affinités pour IFNAR2 vont de 100 nM (IFN- α 1) à 100 pM

(IFN- β). Les affinités pour IFNAR1 sont seulement de l'ordre du μM , à l'exception de l'IFN- β qui se lie à IFNAR1 avec une affinité plus élevée ($K_d = 100 \text{ nM}$). Les différences d'affinité avec lesquelles les IFNs de type I lient leur récepteur ont été impliquées dans des différences de signalisation (Jaks et al., 2007).

○ *Formation du complexe ternaire IFNAR1-IFNAR2-IFN*

Les données d'analyse fonctionnelle d'IFNAR1 et IFNAR2 et les études de liaison qui ont été réalisées jusqu'alors sont en faveur d'un complexe entre IFNAR1, IFNAR2 et IFN présentant une stoechiométrie 1:1:1 (Uze et al., 2007). Aucune interaction entre les deux sous-unités du récepteur n'a pu être observée (Lamken et al., 2004), l'existence d'un complexe pré-assemblé à la membrane plasmique peut donc être exclue. En accord avec les études de liaison qui ont été réalisées, un mécanisme de liaison à deux étapes a été expérimentalement confirmé, dans lequel l'IFN se lie d'abord à une sous-unité puis recrute l'autre (figure 5) (Gavutis et al., 2005). Deux voies différentes possibles sont représentées (figure 5). Si la liaison initiale de l'IFN à IFNAR2 semble plus probable en raison de sa haute affinité (voie 1), la voie 2 dans laquelle l'IFN se lie d'abord à IFNAR1 est aussi possible (Gavutis et al., 2006). La disponibilité d'IFNAR1, dont les concentrations sont souvent basses, semble être l'élément limitant dans la formation du complexe ternaire.

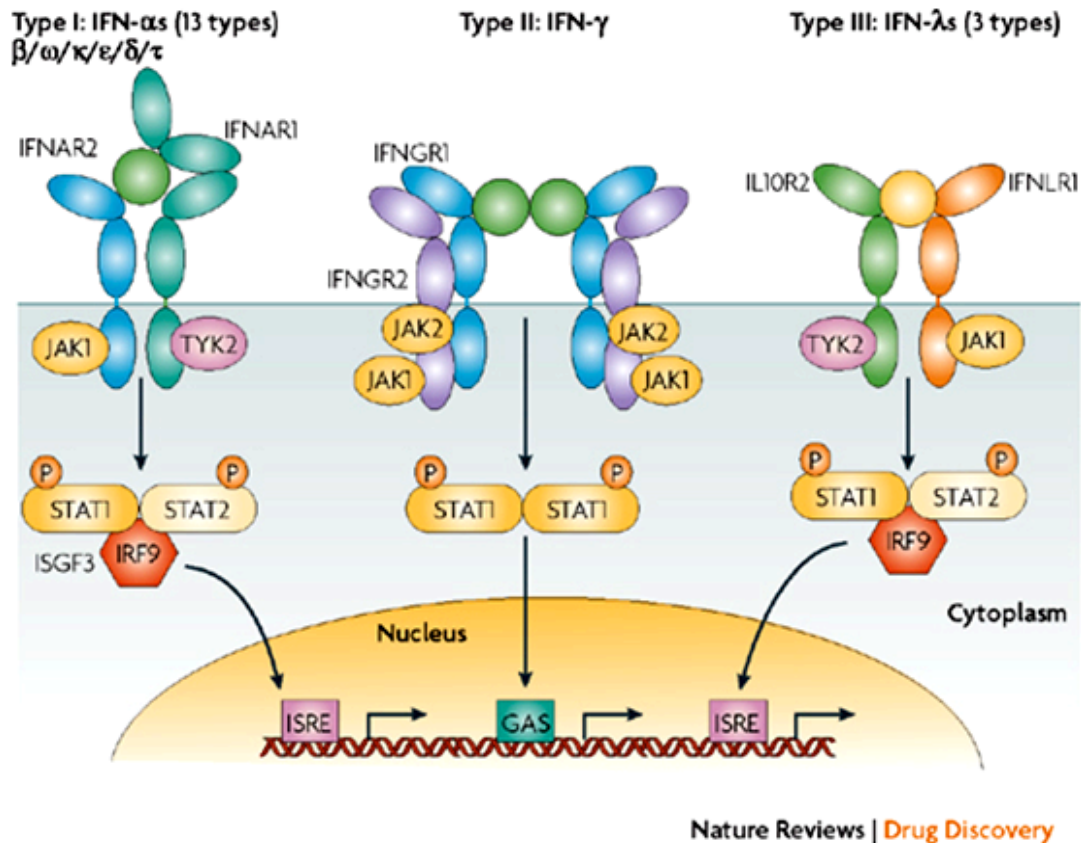


Figure 3. Activation des récepteurs des IFNs de type I, de type II et de type III.

Les IFNs de type I interagissent avec les chaînes IFNAR1 et IFNAR2 du récepteur de l'IFN de type I; l'IFN- γ , unique représentant de l'IFN de type II, avec les chaînes IFNGR1 et IFNGR2 du récepteur de l'IFN de type II; et les IFNs de type III ou IFN- λ s avec la chaîne 1 du récepteur de l'IFN- λ (IFNLR1, aussi nommée IL28RA) et la chaîne 2 du récepteur à l'IL-10 (IL10R2, aussi nommée IL10RB). L'IFN- γ est un homodimère antiparallèle qui se lie de façon symétrique à deux récepteurs : deux chaînes IFNGR1 et deux chaînes IFNGR2.

Chaque chaîne des récepteurs est associée à une tyrosine kinase de la famille JAK: IFNAR1 et IFNAR2 sont associées à TYK2 et JAK1, respectivement ; IFNGR1 et IFNGR2 à JAK2 et JAK1 ; IL10R2 et IFNLR1 à TYK2 et JAK1. La liaison de l'IFN induit l'activation par phosphorylation des JAKs, qui à leur tour phosphorylent les STATs. Une fois activées, les STATs se dimérisent et sont transloquées dans le noyau. Les IFNs de type I et de type III induisent la formation d'hétérodimères STAT1-STAT2, qui s'associent avec IRF9 pour former le complexe de transcription ISGF3. ISGF3 reconnaît les éléments ISRE des promoteurs de certains gènes induits par les IFNs. L'IFN- γ induit la formation d'homodimères STAT1-STAT1, qui reconnaissent les éléments GAS.

Toutes les chaînes des récepteurs aux IFNs appartiennent à la classe 2 des récepteurs aux cytokines hélicoïdales, qui est définie par la structure des domaines extracellulaires de leurs membres : environ 200 acides aminés structurés en deux domaines de 100 acides aminés (modules fibronectine de type III), eux-mêmes structurés en sept feuillettes- β arrangés en β -sandwich. Le domaine extracellulaire contient le site de liaison au ligand. IFNAR2, IFNLR1, IL10R2, IFNGR1 et IFNGR2 sont des représentants classiques de cette famille, tandis qu'IFNAR1 est atypique en raison de son domaine extracellulaire dupliqué. GAS, IFN- γ -activated site; IRF9, IFN regulatory factor 9; ISGF3, IFN-stimulated gene factor 3 (complexe STAT1-STAT2-IRF9); ISRE, IFN-stimulated response element; P, phosphate; STAT1/2, signal transducers and activators of transcription 1/2. D'après Borden et al., 2007.

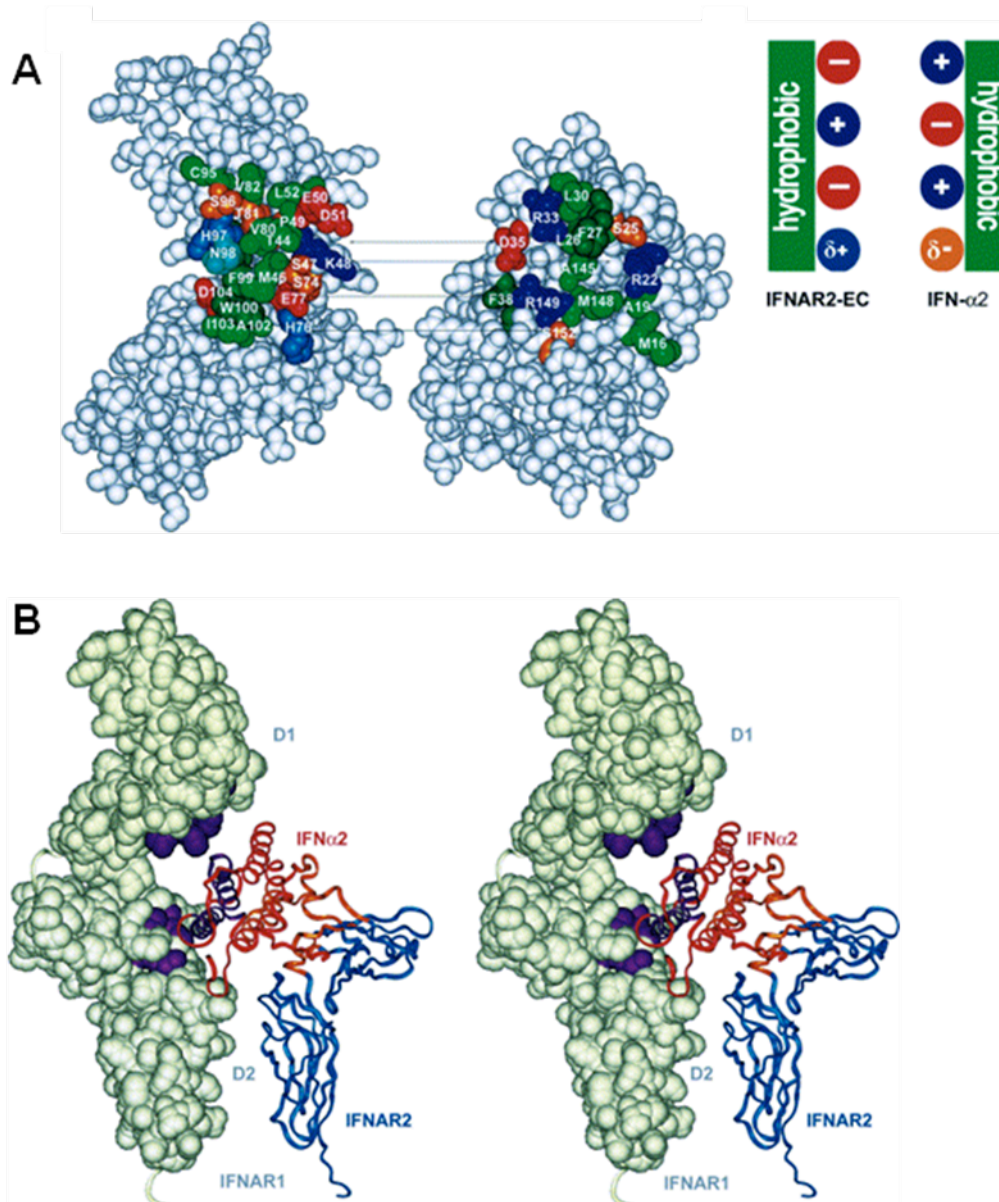


Figure 4. Modélisation du complexe IFN-récepteur.

(A) Représentation du site de liaison entre IFNAR2-EC (domaine extracellulaire) et IFN- α 2. Les six paires de résidus interagissant (déterminées par des études de double mutants) sont connectées par des lignes. Les résidus de liaison sont nommés et colorés ainsi: vert clair, aliphatique; vert foncé, aromatique; rouge et bleu, résidus chargés respectivement négativement et positivement; bleu clair, histidine; cyan, asparagine et glutamine; orange, sérine et thréonine.

(B) Organisation du complexe ternaire IFNAR1-IFNAR2-IFN. Le complexe IFNAR2-EC/IFN- α 2 est représenté par des rubans bleu (IFNAR2-EC) et rouge (IFN- α 2), leur interface de liaison est représentée en orange. Les deux domaines de 200 acides aminés d'IFNAR1 (D1 et D2) sont représentés en représentation de surface. Les régions d'interaction entre IFNAR1 et IFN- α 2 sont représentées en violet.

D'après Chill et al., 2003.

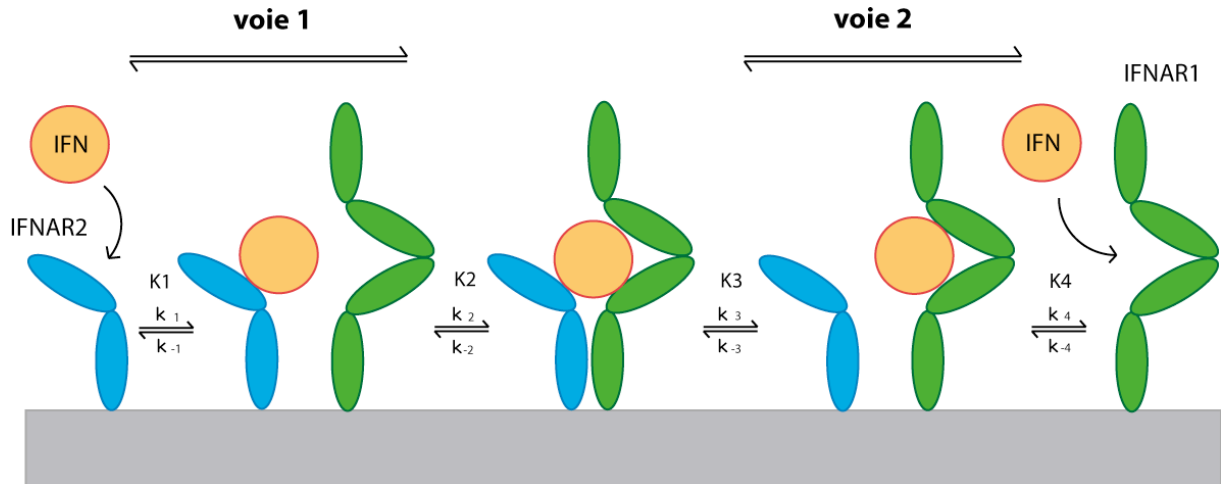


Figure 5. Assemblage en deux étapes du complexe ternaire.

Après liaison du ligand à l'une des sous-unités du récepteur, la seconde sous-unité est recrutée par interaction latérale dans la membrane. Deux voies d'assemblage sont possibles. Etant donné que la première étape de liaison du ligand à l'une des sous-unité du récepteur est limitante, la population des deux voies dépend uniquement des constantes d'association $K1$ et $K4$, et des concentrations relatives d'IFNAR1 et IFNAR2. Le complexe ternaire est dans un équilibre dynamique avec les complexes binaires, ce qui est déterminé par l'affinité des constantes $K2$ et $K3$. En particulier pour les sous-types IFN- α , la faible affinité envers IFNAR1 ($K2$) limite son recrutement vers le complexe ternaire. Adapté d'après Gavutis et al., 2006.

I.III Voies de signalisation des IFNs

Si l'on pensait à l'origine que toute la signalisation des IFNs se faisait par la voie JAK/STAT, il est aujourd'hui évident que cette voie seule n'est pas suffisante pour l'induction de tous les effets biologiques des IFNs. D'autres voies de signalisation, telles que la voie des MAP kinases et la voie de la PI3 kinase, sont également impliquées. La modulation de la signalisation des IFNs apparaît être réellement complexe, dépendant de nombreux paramètres et aboutissant à des réponses différentes.

I.III.1 La voie JAK/STAT

La voie de signalisation majeure et la mieux connue induite par les IFNs est la voie JAK (Janus Activated Kinase) – STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Platanias, 2005; Stark et al., 1998). Cette voie de signalisation a été découverte dans les années 1990 lors des recherches sur les voies de signalisation induites par les IFNs (Fu et al., 1992; Velazquez et al., 1992).

Chaque sous-unité des récepteurs aux IFNs est liée constitutivement à un membre de la famille des JAKs. Ainsi, IFNAR1 est liée à TYK2 (tyrosine kinase 2) et IFNAR2 à JAK1, IFNGR1 est liée à JAK1 et IFNGR2 à JAK2, quant aux sous-unités du récepteur du type III, IL-10R2 est liée à TYK2 et IFNLR1 à JAK1 (figures 3 et 6) (Platanias, 2005; Sadler and Williams, 2008). La liaison de l'IFN à son récepteur induit la dimérisation des sous-unités du récepteur puis l'autophosphorylation et la transactivation des JAKs associées, qui ensuite phosphorylent et activent les STATs. Une fois activées, les STATs se dimérisent et sont transportées dans le noyau où elles initient la transcription des gènes stimulés par les IFNs (ISGs) (Stark, 2007; Stark et al., 1998).

Dans le cas de l'IFN de type I, STAT2, qui est liée constitutivement à IFNAR2, est recrutée suite à son activation sur la tyrosine 466 (Tyr⁴⁶⁶) d'IFNAR1, préalablement phosphorylée par TYK2. STAT2 recrute ensuite STAT1, qui peut seulement alors être activée par phosphorylation sur sa Tyr⁷⁰¹ (figure 6) (Mogensen et al., 1999). L'IFN- γ , quant à lui, induit la phosphorylation des Tyr⁴⁴⁰ des deux sous-unités IFNGR1, qui peuvent alors recruter STAT1 (Shuai et al., 1992).

L'IFN de type I induit la formation d'hétérodimères STAT1-STAT2, qui s'associent ensuite à l'IRF9 (IFN Regulatory Factor 9, aussi connu sous le nom de p48) pour former le complexe de transcription ISGF3 (ISG factor 3). Ce complexe se lie aux éléments ISREs (IFN stimulated response elements) qui sont présents dans les promoteurs de certains ISGs, initiant ainsi leur transcription (Platanias, 2005). L'IFN- γ induit la formation d'homodimères STAT1-STAT1 qui constituent le complexe GAF (IFN- γ activation factor), qui se lie à des éléments différents, les éléments GAS (IFN- γ activated site). Comme l'IFN de type I, l'IFN de type III induit la formation de l'ISGF3. L'IFN de type I, de façon mineure, peut aussi induire la formation d'homodimères STAT1-STAT1, mais l'IFN- γ ne peut pas induire la formation d'hétérodimères STAT1-STAT2 ; l'activation des promoteurs contenant des ISREs est donc spécifique aux IFNs de type I et de type III (Platanias, 2005; Sadler and Williams, 2008).

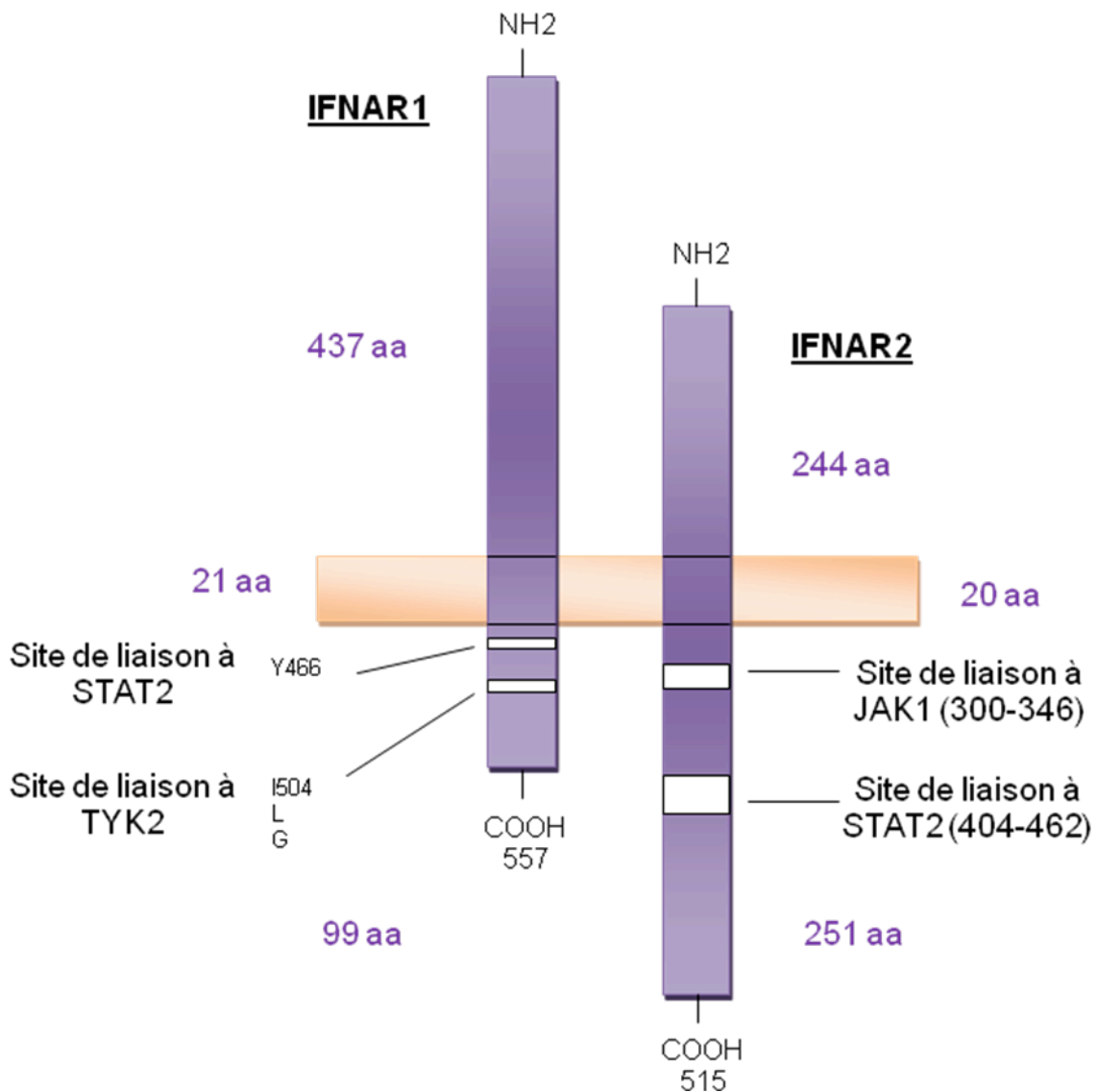


Figure 6. Représentation schématique des sous-unités du récepteur de l'IFN- α , IFNAR1 et IFNAR2.

IFNAR1 et IFNAR2 (rectangles violets) sont des protéines transmembranaires ayant leur extrémité NH₂ dirigée vers l'extérieur de la cellule et leur extrémité COOH dirigée vers le cytoplasme. La membrane plasmique est représentée par un rectangle orange. Les tailles respectives, en acides aminés (aa), de leurs domaines extracellulaires, transmembranaires et cytoplasmiques sont indiquées en violet. Les positions des sites de liaison à TYK2, JAK1 et STAT2 sont indiquées. Dans les conditions restantes, STAT2 est liée à IFNAR2 ; après stimulation par l'IFN, STAT2 se lie au résidu Tyr⁴⁶⁶ phosphorylé de IFNAR1 et recrute STAT1. Informations issues des références suivantes : Mogensen et al., 1999; Nadeau et al., 1999; Domanski et al., 1997 ; Yan, Krishnan, Greenlund et al., 1996; Yan, Krishnan, Lim et al., 1996.

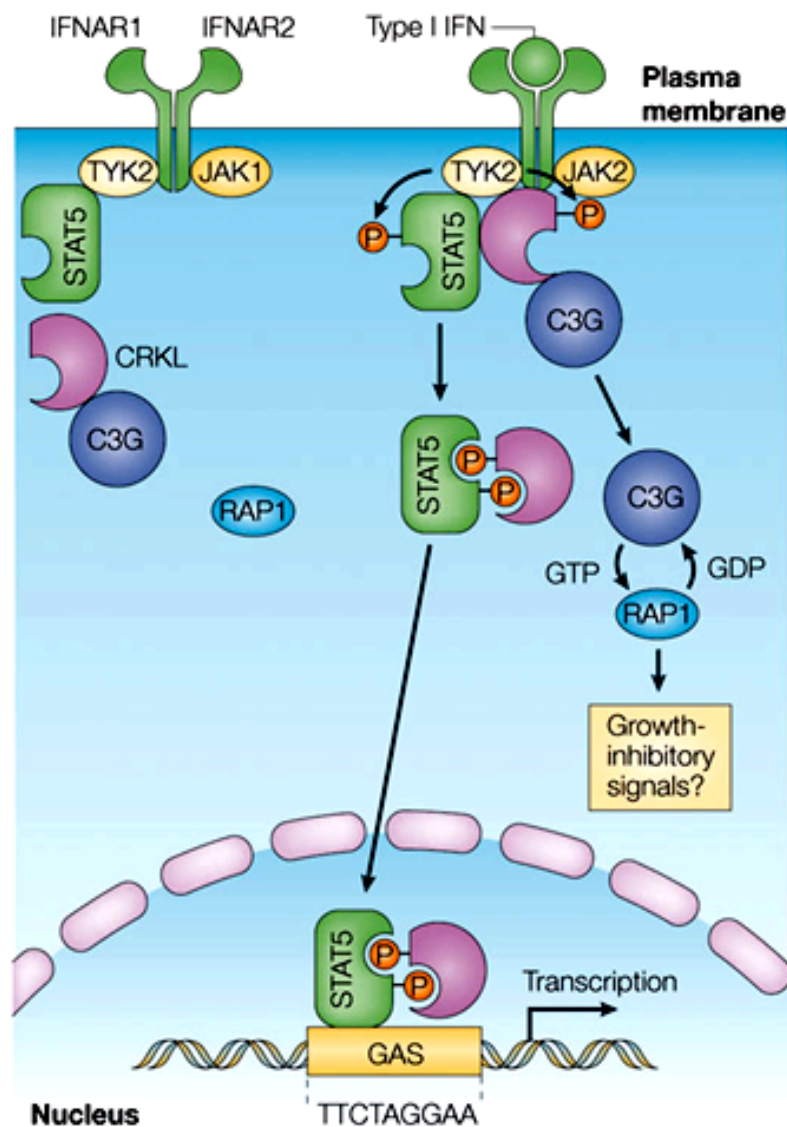
La famille des STATs comprend sept membres (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6), qui peuvent tous être activés par l'IFN de type I (van Boxel-Dezaire et al., 2006). Tous les IFNs de type I peuvent activer STAT1, STAT2, STAT3 et STAT5, quant à l'activation de STAT4 et STAT6, elle est induite par seulement par l'IFN- α et restreinte à certains types cellulaires. Les complexes de STATs pouvant être formés par l'IFN de type I incluent les homodimères STAT1-STAT1, STAT3-STAT3, STAT4-STAT4, STAT5-STAT5 et STAT6-STAT6, ainsi que les hétérodimères STAT1-STAT2, STAT1-STAT3, STAT1-STAT4, STAT1-STAT5, STAT2-STAT3, et STAT5-STAT6 (Brierley and Fish., 2005).

L'activation des STATs implique leur phosphorylation sur un résidu tyrosine par les JAKs, ainsi, STAT1 est phosphorylé sur la Tyr⁷⁰¹. La phosphorylation en tyrosine des STATs permettrait leur dimérisation par l'intermédiaire de leurs domaines SH2 (Src Homology 2 Domain, domaines qui interagissent avec les tyrosines phosphorylées). Les IFNs de type I et de type II induisent également la phosphorylation de STAT1 et de STAT3 sur un résidu sérine en position 727 (Ser⁷²⁷). Cette phosphorylation n'est pas requise pour la translocation nucléaire ni pour la liaison aux promoteurs des ISGs, mais est essentielle à l'activation complète de l'activité transcriptionnelle. Il semble qu'une des sérine kinases impliquées soit un membre de la famille des protéines kinases C (PKC), la PKC- δ (Platanias, 2005).

Plusieurs études semblent remettre en cause le modèle classique de la signalisation des STATs (Sehgal, 2008). Tout d'abord, contrairement au modèle qui veut que les STATs existent à l'état latent sous forme de monomères qui se dimérisent suite à leur phosphorylation en tyrosine, il se trouve que les STATs semblent ne pas exister sous forme monomérique mais plutôt sous forme dimérique voire même de macrocomplexes nommés « Statosomes » (Lackmann et al., 1998; Ndubuisi et al., 1999; Sehgal, 2003). Ensuite, il a été montré que les formes non phosphorylées des STATs sont également transcriptionnellement actives, mais au niveau de gènes cibles différents de ceux des STATs phosphorylés (Chatterjee-Kishore et al., 2000; Yang et al., 2005). Enfin, s'il est pensé que les STATs sont dirigés vers le noyau suite à leur activation, il apparaît que les STATs même non phosphorylés transitent entre le cytoplasme et le noyau et inversement de manière constitutive. En revanche, la stimulation par des cytokines induirait une diminution de leur export du noyau (Frahm et al., 2006; Lodige et al., 2005; Meyer and Vinkemeier, 2004; Pranada et al., 2004).

I.III.2 Les autres voies de signalisation des IFNs

Si l'importance de la voie JAK/STAT dans la signalisation des IFNs a été largement démontrée, cette voie seule n'est pas suffisante pour la génération de toutes les activités biologiques des IFNs. D'autres voies de signalisation sont requises, qui peuvent agir indépendamment de la voie JAK/STAT ou en coopération avec elle (Kalvakolanu, 2003).



Nature Reviews | Immunology

Figure 7. La protéine CRKL dans la signalisation de l'IFN de type I.

CRKL est présente sous une forme latente cytoplasmique constitutivement associée avec C3G (voir texte). STAT5 est associé avec TYK2 qui est liée à IFNAR1. Après la liaison de l'IFN de type I à son récepteur, CRKL s'associe avec TYK2 et est rapidement phosphorylée sur un résidu tyrosine. Une fois activée par phosphorylation, CRKL forme un complexe de signalisation avec STAT5, également phosphorylé sur un résidu tyrosine par TYK2. Le complexe CRKL-STAT5 est transporté dans le noyau et se lie spécifiquement aux éléments GAS présents dans les promoteurs de certains ISGs (IFN-stimulated genes), ce qui initie la transcription de ces gènes. L'activation de CRKL par l'IFN induit également l'activité GEF (guanine nucleotide exchange factor) de C3G. C3G régule alors l'échange du GTP de la petite protéine G RAP1, ce qui résulte en l'activation de cette GTPase, laquelle induit probablement des réponses antiprolifératives. D'après Platanius, 2005.

1.III.2.1 Les protéines CRK dans signalisation de l'IFN

Les CRKs sont une famille de protéines adaptatrices qui comprend trois membres, CRKL, CRKI et CRKII. CRKL a été impliquée dans une voie de signalisation induite par l'IFN de type I (figure 7) (Ahmad et al., 1997). La stimulation des cellules par l'IFN- α , l'IFN- β ou l'IFN- ω induit l'association de CRKL avec TYK2 et sa phosphorylation sur un résidu tyrosine. Une fois activée, CRKL s'associe avec STAT5 qui est également phosphorylé par TYK2. Le complexe CRKL-STAT5 est ensuite transloqué dans le noyau, où il lie des éléments GAS présents dans les promoteurs de certains ISGs, initiant ainsi leur transcription. L'activation de CRKL induit également l'activité GEF (guanine nucleotide exchange factor) de C3G, qui régule alors l'échange du GTP de RAP1, une petite GTPase apparentée à RAS qui induit probablement des effets antiprolifératifs (Feller, 2001).

1.III.2.2 La voie des MAPK dans la signalisation de l'IFN

Les MAPK (mitogen activated protein kinase) sont des sérine/thréonine kinases qui induisent des signaux impliqués dans la régulation de fonctions cellulaires importantes telles que la transcription de gènes, les régulations post-transcriptionnelles, l'apoptose et la progression du cycle cellulaire. Il existe trois groupes principaux de MAPK, qui sont les ERK (extracellular signal regulated kinase), les p38, et les JNK (JUN amino-terminal kinase) (Chang and Karin, 2001 ; Krishna and Narang, 2008). La voie de signalisation des MAPK est schématisée et expliquée figure 8.

La voie des MAPK la plus importante dans la signalisation de l'IFN est celle dépendante de la p38. Il a été montré que l'isoforme p38 α est phosphorylée et activée par l'IFN de type I dans plusieurs lignées cellulaires (Goh et al., 1999; Uddin, 2000). De plus, l'inhibition de p38 par des inhibiteurs ou par mutation empêche la transcription de gènes induits par l'IFN- α régulés par des éléments ISREs ou des éléments GAS (Uddin et al., 2000; Uddin et al., 1999), et ces effets sont indépendants des STATs (Li et al., 2004). En revanche, contrairement aux IFNs de type I, la transcription des gènes induite par l'IFN- γ n'est pas perturbée lorsque la p38 α est inhibée (Li et al., 2004).

La voie de la p38 joue un rôle important dans les propriétés antiprolifératives et antivirales de l'IFN de type I (Platanias, 2005). Cette voie est représentée figure 9. Additionnellement à la p38, la voie ERK est aussi stimulée par les IFNs de type I et de type II (David et al., 1995; Hu et al., 2001).

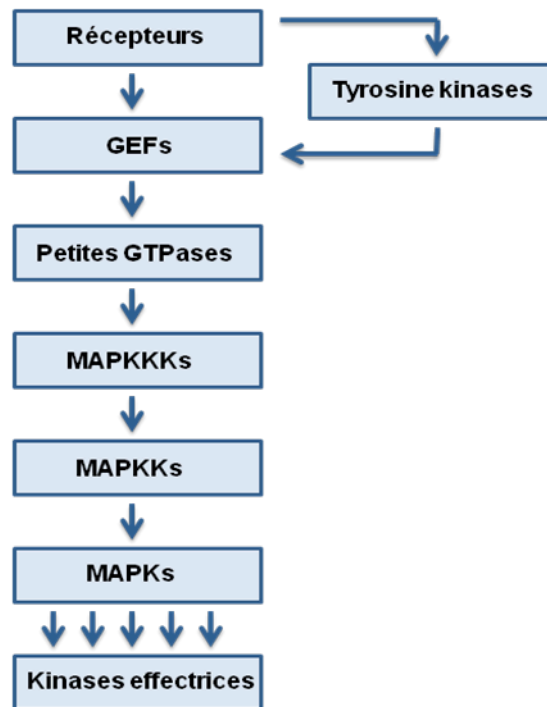


Figure 8. Voie de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinases). La stimulation des récepteurs active les tyrosine kinases intrinsèques ou non, qui phosphorylent alors des GEFs (guanine nucleotide exchange factors), qui à leur tour régulent l'activité de petites GTPases. Les petites GTPases activent alors les MAP kinase-kinase-kinases (MAPKKK), qui activent par phosphorylation les MAP kinase-kinases (MAPKK), lesquelles activent les MAP kinases (MAPK). Enfin, les MAPK activent par phosphorylation diverses kinases effectrices en aval (Chang and Karin, 2001).

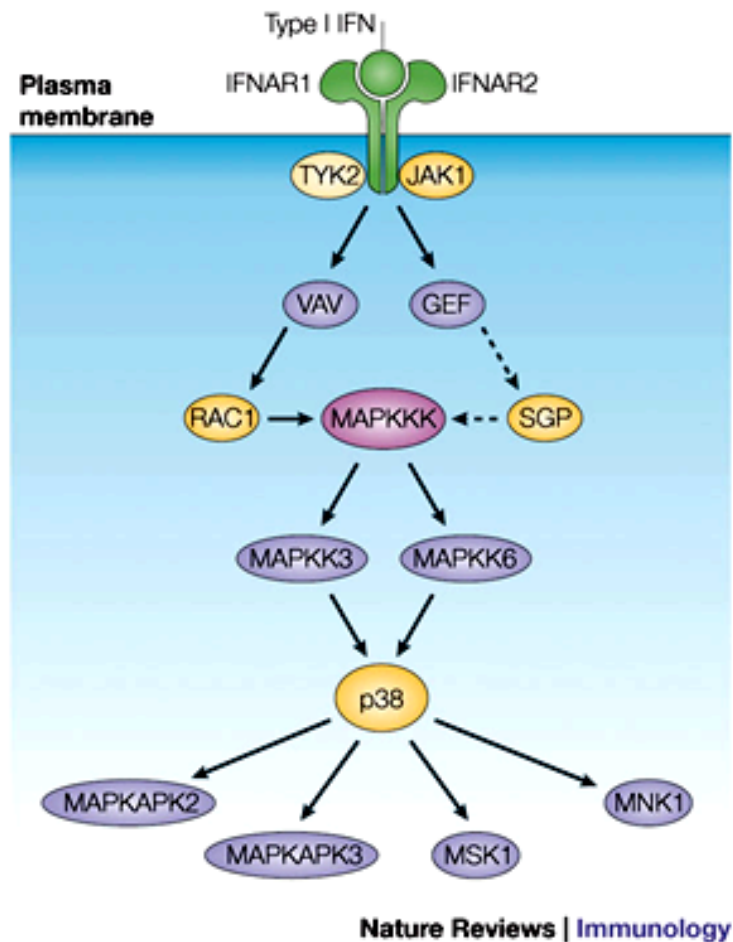


Figure 9. Signalisation de l'IFN de type I par la voie des MAPK.

Les JAKs activées par l'IFN régulent la phosphorylation de VAV ou d'autres GEFs, résultant en l'activation en aval de RAC1 et probablement d'autres petites protéines G (SGPs) qui peuvent réguler la voie de signalisation de la MAPK p38. Une MAPKKK est alors activée et régule l'activation en aval des MAPKK3 et MAPKK6, lesquelles phosphorylent directement p38, résultant ainsi en son activation. La p38 activée régule alors l'activation en aval d'effecteurs multiples, incluant MAPKAPK2 (MAPK-activated protein kinase 2), MAPKAPK3, MSK1 (mitogen- and stress-activated kinase 1) et MNK1 (MAPK-interacting protein kinase 1). D'après Platanias, 2005.

I.III.2.3 La voie de la PI3K dans la signalisation de l'IFN

L'implication de la voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), schématisée et expliquée figure 10, a été mise en évidence par le fait que plusieurs IFNs de type I sont capables d'induire la phosphorylation en tyrosine d'IRS1 (membre de la famille des protéines adaptatrices IRS, insulin receptor substrate) (Uddin et al., 1995). IRS1 est une protéine de signalisation qui, une fois phosphorylée, s'associe avec la sous-unité p85 de la PI3K. Cette interaction résulte en l'activation de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K. Les IFNs de type I induisent ainsi la voie de signalisation de la PI3K en aval des JAKs et indépendamment des STATs (Uddin, 2000).

Contrairement aux IFNs de type I, l'IFN- γ est également capable d'induire la voie de la PI3K mais indépendamment d'IRS1 et d'IRS2 (Uddin, 2000). L'IFN- γ induit par cette voie la phosphorylation de STAT1 sur le résidu Ser⁷²⁷. Ceci se fait par l'intermédiaire de l'activation de la PKC- δ , et montre un exemple de collaboration entre les différentes voies de signalisation induites par les IFNs (Nguyen et al., 2001).

AKT, un effecteur en aval de la PI3K, induit à la fois des signaux apoptotiques et anti-apoptotiques. Certains IFNs induisent la survie cellulaire par l'intermédiaire de cette voie, c'est le cas de l'IFN- β dans les astrocytes et de l'IFN- α dans certaines cellules lymphoïdes. En revanche, l'IFN- α utilise aussi cette voie pour induire l'apoptose des cellules U266 de myélome, il semble donc l'activation de la PI3K par les IFNs puisse conduire à des effets pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques selon le contexte cellulaire et, probablement, l'activation ou non d'autres voies de signalisation. La voie de la PI3K induite par les IFNs est aussi impliquée dans l'expression de la synthétase d'oxide nitrique inductible (iNOS), la régulation de la phosphorylation la sous-unité p65 de NF- κ B, et l'activation de MTOR (mammalian target of rapamycin) qui permet l'initiation de la traduction (Platanias, 2005).

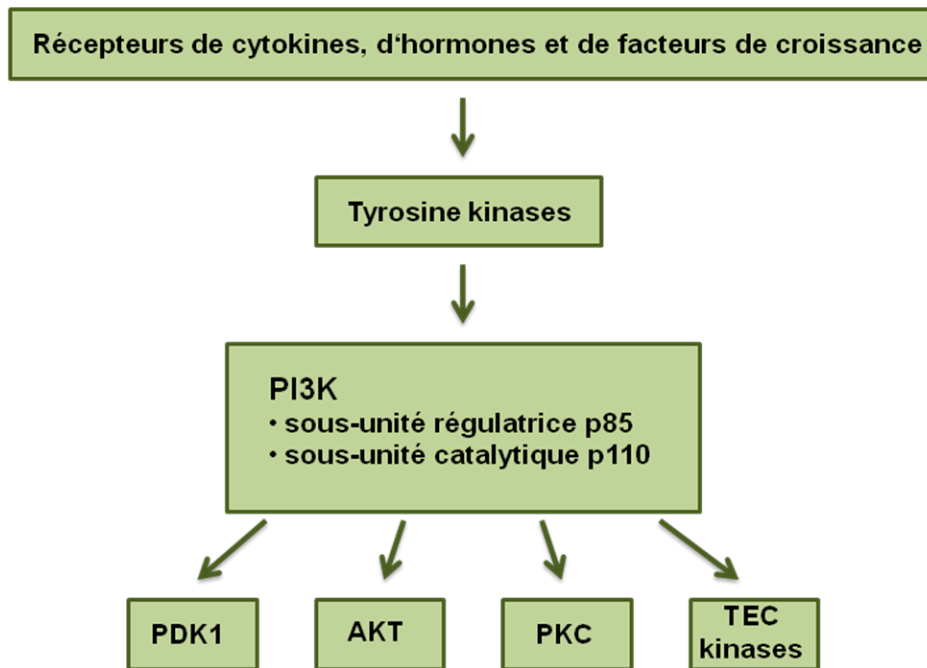


Figure 10. Voie de signalisation de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). La stimulation par des cytokines, des hormones ou des facteurs de croissance induit l'activation de tyrosine kinases, qui phosphorylent la PI3K. La PI3K est composée d'une sous-unité de régulation, p85 et d'une sous-unité catalytique, p110 qui sont codées par des gènes distincts. Une fois activée, la PI3K phosphoryle un lipide phosphatidylinositol (PI) membranaire, le PI-4,5-biphosphate pour générer un PI-3,4,5-triphosphate auquel certaines protéines de signalisation se lient par l'intermédiaire de domaines spécifiques (pleckstrin homology domain, phox homology domain). Il existe plusieurs effecteurs en aval de cette voie de signalisation qui aboutissent à des voies de signalisation diverses, notamment les sérine/thréonine kinases AKT, la PDK1 (3-phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1), diverses isoformes de la PKC (protein kinase C) et certains membres de la famille de tyrosine kinases TEC (Cantley, 2002).

I.III.3 Modulation complexe de la signalisation par l'IFN de type I

I.III.3.1 Régulation négative de la signalisation de l'IFN de type I

Les réponses de l'IFN de type I deviennent délétères lorsqu'elles sont trop fortes ou qu'elles se prolongent dans le temps, il est donc nécessaire pour l'organisme de les réguler négativement. Il existe plusieurs mécanismes de régulation négative de la signalisation de l'IFN de type I : l'internalisation et la dégradation des récepteurs, la déphosphorylation des récepteurs, des JAKs et des STATs par des tyrosine phosphatases, l'inhibition des fonctions de STAT dans le noyau, la régulation négative de la transcription par certaines IRFs (Coccia et al., 2006).

I.III.3.1.1 Diminution des récepteurs présents à la surface cellulaire

La disponibilité des sites de liaison de l'IFN à la surface de la cellule représente un premier niveau de régulation de la signalisation des IFNs. La liaison de l'IFN de type I à son récepteur induit son ubiquitination, suivie de son internalisation et de sa dégradation dans les lysosomes (voir I.VI, *Trafic cellulaire des récepteurs des IFNs*), permettant ainsi la terminaison des événements de signalisation initiés à la membrane plasmique (Kumar et al., 2004).

I.III.3.1.2 Tyrosine phosphatases

Plusieurs protéines tyrosine phosphatases (PTPs) déphosphorylent les résidus tyrosine des JAKs. PTP-1B et TC-PTP sont deux PTPs principalement localisées dans le réticulum endoplasmique (RE) qui déphosphorylent TYK2, JAK2 et JAK1, JAK3, respectivement. Bien que PTP-1B et TC-PTP peuvent être localisées dans le cytoplasme, il n'est pas bien compris comment ces enzymes du RE interagissent avec les JAKs associées au récepteur. Une possibilité serait que cette interaction ait lieu au niveau des endosomes. Deux PTPs cytoplasmiques, SHP-1 et SHP-2, déphosphorylent les résidus tyrosine des récepteurs et des JAKs, inhibant ainsi la signalisation de l'IFN de type I. CD45 est une PTP transmembranaire exprimée dans toutes les cellules hématopoïétiques et qui régule négativement la signalisation des récepteurs des lymphocytes B et T, elle agit également comme tyrosine phosphatase des JAKs. Enfin, TC-PTP peut aussi se trouver dans le noyau où elle déphosphoryle STAT1, participant ici encore à la régulation négative de la voie JAK/STAT (Coccia et al., 2006).

I.III.3.1.3 Les SOCS

La famille des SOCS (suppressor of cytokine signaling) comprend huit membres (CIS, SOCS1 à 7), qui se lient via leur domaine SH2 aux motifs phosphotyrosine présents dans les récepteurs de cytokine ou dans les JAKs. Il a été proposé que les SOCS permettent l'adressage des récepteurs vers la

voie de dégradation protéasomale (Krebs and Hilton, 2001). L'expression des SOCS est induite par la voie JAK/STAT, permettant ainsi un rétrocontrôle négatif.

I.III.3.1.4 Les PIAS

Les PIAS (protein inhibitor of activated STAT) sont des protéines qui régulent négativement l'activité des STATs dans le noyau en les empêchant de lier l'ADN (Shuai and Liu, 2005). Elles sont exprimées constitutivement, et leurs mécanismes de régulation ne sont pas bien compris. Additionnellement aux STATs, les PIAS sont également capables de moduler l'activité transcriptionnelle d'autres facteurs de transcription tels que NF- κ B. Il semble que les PIAS aient la capacité de discriminer entre les ISGs, inhibant de manière spécifique certains gènes induits par l'IFN (Coccia et al., 2006).

I.III.3.2 Induction différentielle des STATs par l'IFN selon les types cellulaires

Les IFNs de type I sont capables d'activer toutes les STATs connues, néanmoins, il existe des différences importantes selon les types cellulaires. Ainsi, des études de FACS (fluorescence activated cell sorting) intracellulaires sur des cellules sanguines avec des anticorps spécifiques de chaque forme phosphorylée des différentes STATs ont montré des différences majeures d'activation de STAT1, STAT3 et STAT5 en réponse à l'IFN- β dans les monocytes, les cellules B et les cellules T CD4+ et CD8+ (Stark, 2007; van Boxel-Dezaire et al., 2006).

Si STAT1 induit souvent des effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs, STAT3, STAT4 et STAT5 induisent plutôt des signaux de survie. Néanmoins, dans certaines cellules, STAT3 peut aussi avoir des fonctions apoptotiques.

L'induction de signaux de survie par STAT3, STAT4 et STAT5 nécessite que le niveau d'expression de STAT1 soit suffisamment bas. D'une manière générale, la balance des niveaux des différents STATs dans la cellule influence la réponse induite par l'IFN (van Boxel-Dezaire et al., 2006).

I.III.3.3 Réponse différentielle aux sous-types d'IFN de type I

Les ISGs sont induits plus fortement par l'IFN- β que par l'IFN- α , c'est ce que révèlent uniformément plusieurs études par puces ADN. De plus, il a également été montré que le gène CXCL11 est sélectivement induit par l'IFN- β et non par l'IFN- α , et que le gène TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand), impliqué dans l'apoptose, est induit préférentiellement par l'IFN- β comparé à l'IFN- α .

Des différences sont également à noter au niveau de l'activation de la voie de signalisation des MAPK. Si tous les IFNs de type I sont capables d'activer ERK1 et ERK2, JNK n'est phosphorylée

qu'après stimulation par l'IFN- β et non par l'IFN- α . Inversement, la p38 est activée uniquement par l'IFN- α et non par l'IFN- β . Enfin, il a été montré dans plusieurs types cellulaires que l'IFN- β induit une activité apoptotique, et non l'IFN- α (van Boxel-Dezaire et al., 2006).

Il est probable que ces différences d'activité entre l'IFN- α et l'IFN- β soient dues à des différences d'affinité pour le récepteur (voir chapitre I.II.2, *Formation du complexe ligand-récepteur pour l'IFN de type I*).

I.III.3.4 Comment l'exposition antérieure à d'autres cytokines influence la réponse des IFNs de type I

L'exposition antérieure à d'autres cytokines influence profondément la façon dont les cellules répondent aux IFNs. Un mécanisme évident par lequel ceci a lieu est l'induction de l'augmentation de l'expression ou de l'activité de facteurs de transcription spécifiques.

La stimulation par l'IFN- γ augmente les concentrations des trois composants de l'ISGF3 (STAT1, STAT2 et IRF9) et augmente ainsi la réponse des cellules à l'IFN de type I. En revanche, une exposition à long terme à l'IFN- γ (3-6 jours) diminue l'activation de STAT1, STAT2 et STAT3 (Radaeva et al., 2004; Wong et al., 1998).

La stimulation des cellules par l'IL-1 β et l'IFN- β diminue l'activation de STAT1 en raison de l'augmentation de l'activité de la tyrosine phosphatase TC-PTP. Une exposition antérieure à l'IL-1 β et à l'IFN- β présente donc des effets inhibiteurs sur la signalisation de l'IFN de type I (Tian et al., 2000).

Enfin, l'IL-6 augmentant l'expression de STAT3, il est probable que l'exposition des cellules à l'IL-6 avant l'IFN de type I influence des réponses de type anti-apoptotique (Yang et al., 2005).

En résumé, l'exposition antérieure à d'autres cytokines peut influencer positivement ou négativement la signalisation des IFNs de type I, de manière quantitative et qualitative. Ce phénomène joue probablement un rôle important en situation d'infection ou d'inflammation en raison de l'explosion de la sécrétion de cytokines qui a lieu alors.

I.III.3.5 Conclusion sur la complexité de la signalisation de l'IFN de type I

Une représentation de la complexité de la signalisation de l'IFN de type I est présentée figure 11. Les différentes voies d'activation des STATs aboutissent à l'activation des gènes uniquement activés par les STATs (« STAT-only genes »). D'autres kinases que les JAKs peuvent être activées (PI3K, p38, ERK, JNK) et peuvent contribuer à la phosphorylation des STATs. D'autres facteurs de transcription que les STATs peuvent également être activés par ces kinases (par exemple NF- κ B, AP1, IRF1). Les voies de signalisation additionnelles à la voie STAT peuvent soit coopérer avec les STATs au niveau du promoteur et induire l'activation des gènes « STATs + transcription factors (TF) genes » ou agir indépendamment des STATs pour induire l'activation des gènes « TF-only genes ».

L'exposition antérieure à d'autres cytokines (« priming ») influence positivement ou négativement l'activation des STATs.

L'IFN de type I peut ainsi induire des réponses différentes en fonction de la combinaison utilisée (prolifération ou antiprolifération, apoptose ou survie), qui dépend elle-même du sous-type utilisé, du type cellulaire et de la variabilité individuelle et environnementale (van Boxel-Dezaire et al., 2006).

Une autre composante de la modulation de la signalisation de l'IFN de type I pourrait être le trafic intracellulaire du récepteur. En effet, une étude menée précédemment par mon laboratoire d'accueil indique une relation entre l'endocytose et l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN- α . On pourrait supposer que différentes voies de trafic du récepteur mèneraient à une signalisation différentielle, comme cela a été montré pour le récepteur de l'EGF ou du TGF- β (Hoeller et al., 2005) (voir I.VI, *Trafic cellulaire des récepteurs des IFNs*).

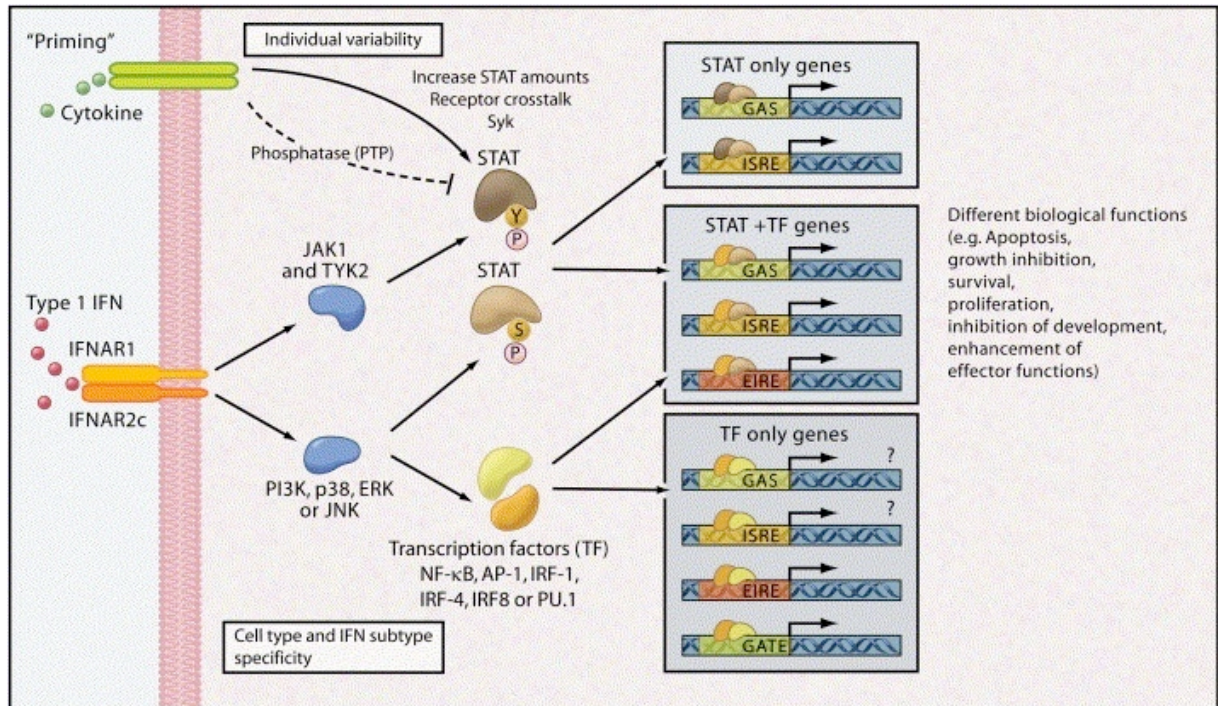


Figure 11. Complexité de la signalisation par l'IFN de type I.

Voir le texte (chapitre I.III.3.5, *Conclusion sur la complexité de la signalisation de l'IFN de type I*) pour les explications. EIRE (Ets-IRF response element) et GATE (IFN- γ activated transcriptional element) sont deux éléments apparentés à ISRE présents dans les promoteurs de certains ISGs. D'après van Boxel-Dezaire et al., 2006.

I.IV Activités biologiques des IFNs

Les IFNs exercent leurs actions à travers l'induction des ISGs (IFN stimulated genes). Il existe plus de 300 ISGs, qui induisent les réponses antivirales, antiprolifératives et immunomodulatrices des IFNs (Borden et al., 2007).

I.IV.1 Activités antivirales

Parmi les ISGs induits par l'IFN de type I qui jouent un rôle important dans l'activité antivirale, on peut noter ISG15 (IFN stimulated protein of 15 kDa), les protéines Mx (myxovirus resistance), la PKR (protéine kinase dépendante de l'ARN double-brin), et le système OAS (oligoadenylate synthase) / RNaseL (ribonucléase L) (Sadler and Williams, 2008) (figure 12).

I.IV.1.1 ISG15

ISG15 est une protéine de 15 kDa homologue de l'ubiquitine et qui modifie les protéines à travers un processus nommé « ISGylation ». Son mécanisme d'action exacte dans l'activité antivirale est inconnu, mais provient certainement de ses propriétés similaires aux cytokines et de sa capacité à se conjuguer aux protéines et à modifier leur fonction (Borden et al., 2007).

I.IV.1.2 Protéines Mx

Les protéines Mx sont des GTPases abondantes de 70 à 80 kDa de la superfamille de la dynamine dont l'expression est induite par les IFNs de type I et de type III (Sadler and Williams, 2008; Stark et al., 1998). Il en existe deux chez l'homme, MxA et MxB, et deux chez la souris, Mx1 et Mx2 ; chez l'homme, seule MxA présente une activité antivirale. Les cibles virales principales de MxA semblent être les structures des nucléocapsides. Une fois leur expression activée par l'IFN de type I, les protéines MxA s'accumulent dans le cytoplasme sur les membranes intracellulaires telles que le RE, où elles peuvent surveiller les événements exocytiques. Lors d'une infection virale, elles piègent ainsi les nucléocapsides virales ; ou d'autres composants viraux. Les protéines MxA et Mx1 s'associent aussi avec les polymérases virales pour bloquer la transcription des gènes viraux (Sadler and Williams, 2008; Stark et al., 1998).

I.IV.1.3 PKR

La PKR (aussi appelée EIF2 α K2) appartient à une famille de protéines kinases répondant à des stress environnementaux pour réguler la synthèse protéique (Sadler and Williams, 2008). Si elle est constitutivement exprimée à un niveau basal, son expression est augmentée par les IFNs de type I et de

type III. Dans les conditions normales, la PKR est inactive, mais la liaison de ses ligands, tels que l'ARN double-brin, l'héparine, le céramide, ou des activateurs protéiques, induit son autophosphorylation et son activation. L'activité antivirale de la PKR est due à l'inhibition par phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction EIF2, ce qui résulte en une inhibition rapide de la traduction.

I.IV.1.4 Système OAS / RNaseL

Les OAS (2',5'-oligoadenylate synthase) sont des protéines qui polymérisent l'ATP en oligomères d'adénosine en générant des liaisons phosphodiester 2',5'. Ces oligomères 2',5' activent spécifiquement la forme latente de la RNaseL, qui peut alors induire la dégradation de l'ARN (cellulaire et viral). De plus, l'ARN dégradé par la RNaseL peut activer d'autres PRRs (pattern recognition receptors) et induire ainsi la production d'IFN de type I (voir chapitre I.I.5, *Induction de la production des IFNs*).

Les OAS sont exprimées constitutivement à un faible niveau, leur expression est augmentée par l'IFN de type I (Sadler and Williams, 2008).

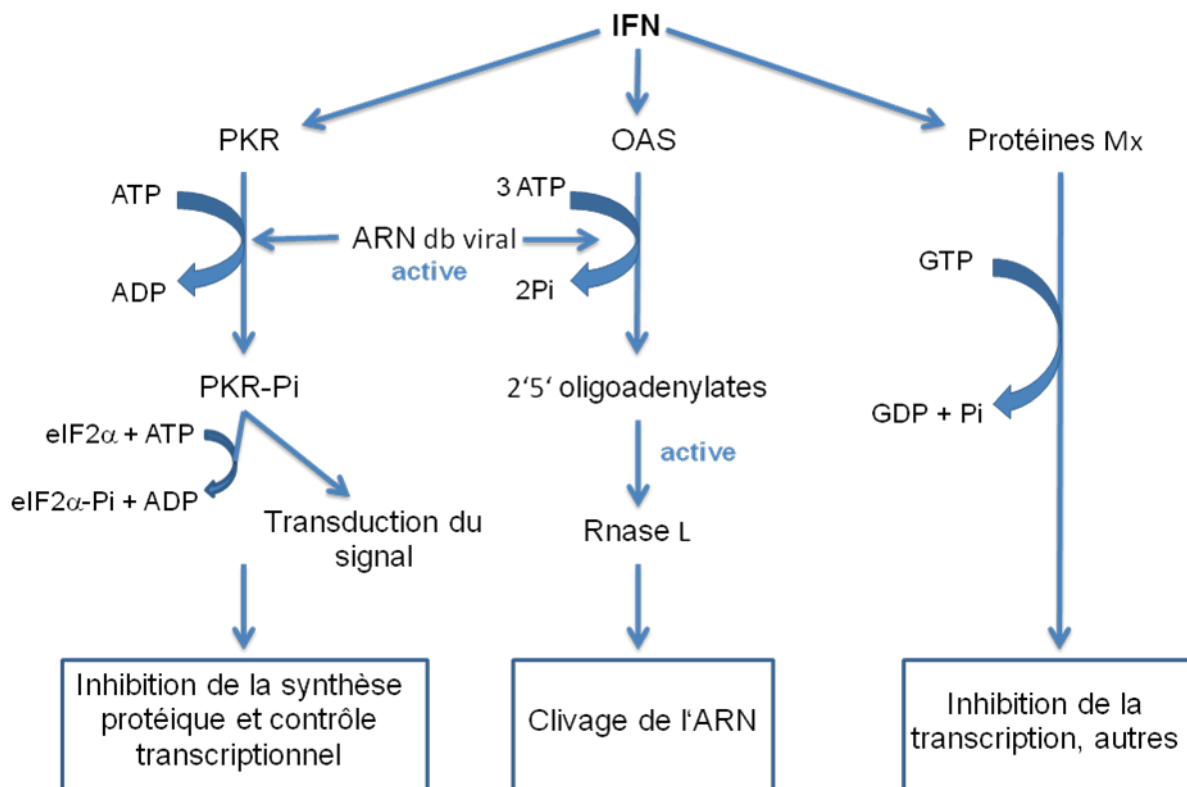


Figure 12. Mécanismes antiviraux de l'action de l'IFN.

Voir le texte (chapitre I.IV.1, *Activités antivirales*) pour plus de détails.

I.IV.2 Inhibition de la prolifération cellulaire et contrôle de l'apoptose

Les IFNs inhibent la prolifération cellulaire et contrôlent l'apoptose, ce qui permet le contrôle des processus cancéreux et des infections. Les mécanismes d'action des IFNs dans ces phénomènes ont été relativement peu décrits, en revanche, il semble que certains ISGs jouant un rôle dans l'activité antivirale régulent aussi la prolifération cellulaire et l'apoptose (Stark et al., 1998).

I.IV.2.1 Rôle des IFNs dans l'inhibition de la prolifération cellulaire

Si des ISGs directement impliqués dans l'inhibition de la prolifération cellulaire n'ont pas été identifiés, l'IFN- α cible des composants spécifiques du cycle cellulaire, tels que c-myc, pRB, la cycline D3, et cdc25A. Il a été montré par exemple que l'IFN- α diminue la transcription de c-myc dans des cellules Daudi (Stark et al., 1998). La PKR (voir chapitre I.IV.1, *Activités antivirales*) est également impliquée dans les activités antiprolifératives des IFNs : en effet, une déficience de la PKR aboutit à une croissance accrue des cellules en culture et induit la formation de tumeurs chez la souris. L'activité antiproliférative de la PKR pourrait être due à la phosphorylation de EIF2 α (Stark et al., 1998).

I.IV.2.2 Rôle des IFNs dans l'apoptose

Dépendant du contexte, les IFNs peuvent avoir des effets pro- ou anti-apoptotiques. Plusieurs gènes impliqués dans les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques de l'IFN- γ ont été clonés, parmi eux les protéines DAP 1 à 5 (death associated proteins) (Stark et al., 1998). La PKR joue également un rôle important dans l'apoptose induite par les IFNs. Additionnellement à sa fonction de régulation de la traduction par phosphorylation du facteur d'initiation EIF2, elle agit comme kinase dans les voies de transduction du signal, aboutissant ainsi à l'activation de facteurs de transcription tels de NF- κ B et IRF1 (figure 11). De cette façon, la PKR régule l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, Fas en particulier. Il semble que la PKR induise l'apoptose à travers la régulation de l'activité de IRF1 (Stark et al., 1998). La RNaseL est un autre exemple d'ISG impliqué dans la réponse antivirale qui participe aussi à l'apoptose ; en effet, en dégradant l'ARN cellulaire, la RNaseL endommage la machinerie cellulaire ce qui provoque l'apoptose de la cellule (Castelli et al., 1998). TRAIL/APO2L est également un ISG qui contribue à l'apoptose (Borden et al., 2007). Enfin, si la plupart des ISGs ont un rôle pro-apoptotique, d'autres sont plutôt impliqués dans la survie, comme l'ISG G1P3 qui induit entre autres l'inhibition de la caspase-3 (Tahara et al., 2005).

Les IFNs jouent un rôle important dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et dans l'induction de l'apoptose, ce qui permet de lutter à la fois contre les tumeurs et les virus. Cette

fonction est également assurée par l'intermédiaire de la stimulation de certains éléments du système immunitaire (voir chapitre suivant).

I.IV.3 Effets des IFNs sur le système immunitaire

Un aspect important de l'action des IFNs est leur rôle dans la modulation de la réponse immunitaire, qui a été largement décrit. Dans la famille des IFNs, l'IFN- γ joue un rôle immunomodulateur prédominant. Il est produit par un répertoire réduit de cellules immunitaires, les cellules T et les cellules NK (Natural Killer) en réponse à une stimulation immunologique ou inflammatoire.

I.IV.3.1 Augmentation de la présentation de l'antigène

Une des fonctions importantes des IFNs dans l'induction des réponses immunes est l'augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'activation des cellules T CD4⁺ a lieu lors de la reconnaissance par leur TCR (T cell receptor) de leur antigène qui est présenté par le CMH de classe II (CMHII), exprimé à la surface de certaines cellules spécialisées dans la présentation d'antigène. Le CMHI, présent à la surface de toutes les cellules, est reconnu par les cellules T CD8⁺ qui éliminent ainsi les cellules « anormales » c'est à dire infectées ou tumorales. L'IFN- γ augmente l'expression du CMHII, et l'expression du CMHI est augmentée à la fois par l'IFN de type I et l'IFN- γ . Additionnellement aux molécules du CMH, d'autres ISGs sont impliquées dans la présentation de l'antigène, codant pour diverses protéines impliquées dans ce processus (composants du protéasome, TAPs, chaîne invariante, ...) (Borden et al., 2007; Stark et al., 1998).

I.IV.3.2 Différenciation des cellules T CD4⁺ en Th1

Les cellules T CD4⁺, ou « T helper », peuvent se différencier en deux types : les cellules Th1 (T helper 1), qui facilitent le développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (activation des T CD8⁺), et les cellules Th2, qui facilitent le développement d'une réponse immunitaire humorale (production d'anticorps). L'IFN- γ possède un rôle important dans l'induction du phénotype Th1, ce qui permet une augmentation de la réponse immunitaire contre les virus et les tumeurs (Stark et al., 1998).

I.IV.3.3 Immunité humorale

Les IFNs de type I et de type II ont également un rôle dans la réponse immunitaire humorale, car ils sont impliqués dans la régulation des cellules B à trois niveaux : (1) développement et

prolifération, (2) sécrétion des anticorps, (3) commutation de classe des immunoglobulines (Stark et al., 1998).

I.IV.3.4 Recrutement des leucocytes au site d'infection

Par l'induction de la production de molécules d'adhésion vasculaires telles que ICAM1 (intracellular adhesion molecule 1), et de chimiokines telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11, les IFNs participent à l'accumulation des leucocytes au site d'infection (Borden et al., 2007).

I.IV.3.5 Activation des effecteurs de la réponse immunitaire

Enfin, les IFNs, en particulier l'IFN- γ , induisent l'activation de cellules effectrices de la réponse immunitaire telles que les cellules NK, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules T (Borden et al., 2007; Stark et al., 1998).

I.V Utilisation thérapeutique des IFNs

L'IFN de type I est l'IFN le plus largement utilisé en thérapeutique, en effet, il a prouvé son efficacité dans un certain nombre de maladies virales, de cancers, mais aussi dans le traitement de la sclérose en plaque. L'IFN- γ , quant à lui, est utilisé dans le traitement de la granulomatose familiale chronique, il diminue alors la fréquence et la gravité des infections bactériennes (Parmar and Platanias, 2003).

I.V.1 Lutte antivirale

Les IFNs ont initialement été utilisés en recherche clinique en raison de leurs propriétés antivirales. Néanmoins, s'ils ont la capacité d'agir sur une grande variété de virus, on leur a souvent préféré d'autres antiviraux plus efficaces et moins toxiques, à l'exception de l'hépatite B et de l'hépatite C pour lesquelles l'IFN- α reste le traitement de choix.

Le virus de l'hépatite B (VHB) engendre souvent une infection chronique, qui peut mener à une cirrhose et à un hépatocarcinome. L'infection débute par une phase immunotolérante, suivie d'une phase immunoactive durant laquelle les hépatocytes infectés sont éliminés (Lok et al., 2007). L'IFN- α 2 est actif sur le VHB durant la phase immunoactive, où il induit une réponse chez plus de 40% des patients. L'IFN- α 2 existe maintenant sous forme pegylée (PEGASYS, Roche; VIRAFERONPEG; Schering Plough), qui agit plus longtemps et permet une meilleure stabilité des concentrations plasmatiques.

Le virus de l'hépatite C (VHC), identifié en 1989, infecte plus de 170 millions de personnes à travers le monde et mène dans 80% des cas à une hépatite chronique avec risque d'évolution vers une cirrhose ou un hépatocarcinome. L'hépatite C a été originellement traitée par l'IFN- α 2 en monothérapie, et menait ainsi à une réponse chez 20% des patients. La combinaison de l'IFN- α 2 avec la ribavirine a augmenté la réponse à 40% des patients ; aujourd'hui, l'utilisation d'IFN- α 2 pegylé en association avec la ribavirine permet de guérir plus de 60% des patients. La sensibilité du VHC au traitement dépend du génotype du virus, ainsi, les génotypes 2 et 3 sont plus sensibles que ne le sont les génotypes 1 et 4 (Heathcote and Main, 2005).

Les IFN- α et IFN- β ont prouvé leur efficacité sur les virus de la famille de l'herpès, tels que l'herpes zoster, le HSV (herpes simplex virus) ou le CMV (cytomégalovirus). Néanmoins, d'autres antiviraux plus efficaces et ayant moins d'effets secondaires tels que l'acyclovir ont achevé le développement clinique des IFNs pour ces indications (Borden et al., 2007).

L'IFN de type I est aussi actif sur le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), mais n'apporte pas d'avantage par rapport à la trithérapie usuelle (azidothymidine + inhibiteurs de protéases) (Lane et al., 1990).

Enfin, l'IFN de type I pourrait être efficace contre le SRAS (syndrome respiratoire aigu sévère), et devenir ainsi agent de traitement de première ligne en cas de pandémie (Loutfy et al., 2003).

I.V.2 Sclérose en plaques

La sclérose en plaque est une maladie neurologique chronique, il s'agit d'un désordre inflammatoire démyélinisant du système nerveux central. La maladie débute en général par des épisodes annuels de dysfonctionnement neurologique transitoire.

Des études ayant suggéré que les cellules de patients atteints de sclérose en plaques secrètent moins d'IFN, ajoutées à la notion qu'une infection virale serait impliquée dans la maladie, ont conduit à l'évaluation clinique de l'IFN pour cette pathologie. L'IFN- β s'est avéré avantageux, tandis que les essais avec l'IFN- α 2 étaient non concluants et l'IFN- γ délétère (Borden et al., 2007).

L'IFN- β est aujourd'hui indiqué dans le traitement de fond de la sclérose en plaques, il permet une diminution des rechutes de 30% et apporte une réduction notable des lésions détectées sur IRM (imagerie par résonance magnétique) (Lam et al., 2008).

I.V.3 Cancer

Si les recherches cliniques sur l'IFN se sont d'abord intéressées à ses propriétés antivirales, la première autorisation de mise sur le marché de l'IFN- α 2 fût pour le traitement de la leucémie à tricholeucocytes. Néanmoins, l'émergence de nouveaux agents pharmacologiques tels que le

2-chlorodeoxydenosine a rattrapé l'usage de l'IFN- α 2 dans cette maladie (Parmar and Platanias, 2003).

L'IFN- α 2 est efficace contre la leucémie myéloïde chronique, 90% des patients étant en rémission à 10 ans. Les meilleurs résultats sont obtenus en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques. Cependant, l'Imatinib (GLIVEC, Novartis, inhibiteur de tyrosine kinase), plus efficace et présentant moins d'effets secondaires, a remplacé l'IFN- α 2 comme traitement de premier choix (Mauro and Druker, 2001).

L'IFN- α 2 donne de bons résultats dans le traitement des lymphomes, il permet la régression des tumeurs chez la moitié des patients, même lorsque ceux-ci ont été préalablement traités par chimiothérapie. Mais, ici aussi, les inhibiteurs de tyrosine kinase ont souvent dépassé l'usage de l'IFN- α 2. Toutefois, l'IFN- α reste un composant important du traitement des lymphomes cutanés à cellules T, et un des agents les plus actifs dans le traitement des mycosis fongicoïdes (Borden et al., 2000).

Un rôle bénéfique de l'IFN- α comme adjuvant en prévention des métastases dans le traitement du mélanome a été validé. Une efficacité clinique de l'IFN- α a également été démontrée dans le sarcome de Kaposi et dans le traitement du myélome multiple, en particulier utilisé en combinaison avec d'autres thérapies (Parmar and Platanias, 2003).

L'IFN- α a été approuvé pour le traitement du cancer du rein, bien que les résultats ne soient pas impressionnants, dépassant rarement 20% de taux de réponse. Plus le stade de la tumeur est avancé, moins l'IFN- α est actif (Wirth, 1993).

Une synthèse des réponses de différentes tumeurs à l'IFN de type I est présentée tableau 2.

Enfin, il faut noter que l'IFN provoque des effets secondaires importants, tels que malaise, fièvre, frissons, fatigue, anorexie et dépression, ce qui réduit les possibilités d'administration à fortes doses. Des efforts sont donc nécessaires pour parvenir à augmenter leur efficacité tout en diminuant leur toxicité.

Type de réponse	Exemples
Tumeurs fortement répondantes	Leucémie à tricholeucocytes Mycosis fongoïdes Leucémie myéloïde chronique Lymphomes
Tumeurs modérément répondantes	Myélome multiple Sarcomatose multiple hémorragique de Kaposi Cancer du rein Mélanome
Tumeurs non répondantes	Cancer du poumon Cancer du colon Cancer du sein Tumeurs volumineuses

Tableau 2. Traitement du cancer : trois catégories de réponses à l'IFN- α .

I.VI Trafic cellulaire des récepteurs des IFNs

Si la signalisation et les activités biologiques induites par les IFNs ont été largement étudiées, le trafic intracellulaire des récepteurs aux IFNs, en revanche, est beaucoup moins bien connu.

Où sont localisés les récepteurs à la membrane plasmique ? Que deviennent-ils après avoir été stimulés par leur ligand ? Où se passent les événements des cascades de signalisation, et comment les STATs sont-ils transportés jusqu'au noyau ? Toutes ces questions ont encore peu de réponses, ce champ d'investigation ayant été peu exploré. Dans la revue « *Interfering with interferon receptor sorting and trafficking : impact on signaling* » que nous avons publiée dans le journal *Biochimie* en 2007 (Claudinon et al., 2007), présentée p. 53, nous avons tenté de faire un état des lieux sur cette problématique.

Ainsi, plusieurs études s'accordent à dire que le récepteur de l'IFN- γ serait localisé dans des microdomaines membranaires de type raft, mais les résultats concernant IFNAR1 sont divergents (Marchetti et al., 2006; Subramaniam and Johnson, 2002; Takaoka et al., 2000; Truchet et al., 2001). Les travaux de mes prédécesseurs au laboratoire « Trafic, Signalisation et Ciblage intracellulaires » ont montré que les récepteurs des IFNs de type I et de type II sont internalisés constitutivement par la voie d'endocytose classique dépendante de la clathrine, et sont ainsi dirigés vers l'endosome de recyclage (Marchetti et al., 2006). D'autres études indiquent que suite à la stimulation par l'IFN- α , IFNAR1 est ubiquitiné ce qui a pour conséquence son adressage vers les lysosomes et aboutit ainsi à sa dégradation (Kumar et al., 2004). Enfin, certaines études controversées suggèrent que IFNAR1, IFNGR1 et une partie clivée d'IFNAR2 seraient importées dans le noyau suite à la stimulation par l'IFN (Larkin et al., 2000; Saleh et al., 2004; Subramaniam and Johnson, 2004).

Une question intéressante est de savoir quel peut être le lien entre le trafic des récepteurs des IFNs et la signalisation induite. Il est admis que l'internalisation des récepteurs permet de mettre fin au signal, empêchant ainsi une stimulation prolongée. Cependant, dans plusieurs études, il a été montré que l'endocytose était une étape requise pour la signalisation (Di Fiore and De Camilli, 2001). Afin de tester cette possibilité dans le cadre de l'IFN, Marchetti et al ont inhibé l'endocytose dépendante de la clathrine par voie moléculaire, et ont ainsi montré que l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN- α était inhibée ; en revanche la signalisation de l'IFN- γ n'était pas affectée (Marchetti et al., 2006). Ces travaux suggèrent un rôle de l'endocytose du récepteur de l'IFN- α dans la signalisation, néanmoins, l'inhibition de la voie clathrine étant générale, un rôle de l'endocytose d'un autre facteur qu'IFNAR1 lui-même dans la signalisation n'est pas à exclure.

Les connaissances actuelles sur le trafic des récepteurs aux IFNs laissent plusieurs zones d'ombre. Il semble qu'en absence de stimulation, les récepteurs sont endocytés de manière constitutive par la voie clathrine et sont recyclés, tandis que l'IFN- α induit l'ubiquitination du récepteur et sa

dégradation dans les lysosomes. Il est probable que l'internalisation induite par l'ubiquitination fasse intervenir également la clathrine, l'ubiquitine serait alors l'élément décendant du devenir du récepteur (lysosomes plutôt qu'endosome de recyclage). Toutefois, si le récepteur est sujet à la dégradation lysosomale, une question se pose : comment peut-il être adressé au noyau, comme l'ont montré certaines études ?

Il serait intéressant de connaître quelles peuvent être les autres voies d'endocytose des récepteurs des IFNs. Une utilisation différentielle de plusieurs voies de trafic pourrait être liée à des voies de signalisation différentes, comme cela a été montré pour le TGF- β (Di Guglielmo et al., 2003), et permettrait d'expliquer un aspect supplémentaire de la complexité de la signalisation.

Le concept de « l'endosome de signalisation » propose que les événements de signalisation initiés à la membrane plasmique se propagent depuis l'endosome, tandis que d'autres y sont activés (Miaczynska et al., 2004). Néanmoins, on ignore encore quels sont les événements de trafic en aval, notamment par exemple comment les STATs sont dirigés vers le noyau. Utilisent-ils une voie de transport rétrograde qui leur permet de remonter jusque là ? Y vont-ils seuls, où sont-ils accompagnés du récepteur comme le suggèrent certaines études ? Les réponses à ces questions nécessitent davantage de recherches.



Interfering with interferon receptor sorting and trafficking: Impact on signaling

Julie Claudinon, Marie-Noëlle Monier¹, Christophe Lamaze*

Laboratoire Trafic et Signalisation, UMRI44 Curie/CNRS, Institut Curie, 75248 Paris Cedex 05, France

Received 9 February 2007; accepted 23 March 2007
Available online 2 April 2007

Abstract

Interferons (IFNs) and their receptors (IFN-Rs) play fundamental roles in a multitude of biological functions. Many articles and reviews emphasize that the JAK/STAT machinery is obligatory for relay of the information transmitted by IFNs after binding to their cognate receptors at the plasma membrane. In contrast, very few studies have addressed the endocytosis and the intracellular trafficking of IFN-Rs, the immediate step following IFN binding. However, recent findings have shed light on the importance of IFN-R sorting and trafficking in the control of IFN signaling. Thus, IFN-Rs can be included in the growing family of signaling receptors for which regulation of biological activity critically involves endocytosis and trafficking.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Interferon; Endocytosis; Intracellular transport; Signaling; Endosome

1. Introduction

IFN was discovered 50 years ago as a molecule endowed with strong antiviral activity [1]. Several species of IFN were identified later that have antiviral and antibacterial activity and are important for the regulation of immune defenses [2,3]. The type I IFN family in humans includes 13 subtypes of IFN- α encoded by 13 IFN- α genes and IFN- β encoded by a single IFN- β gene. The first protein complex responsible for the binding of type I IFNs at the plasma membrane was identified over 30 years later. The cDNA coding for the subunit IFNAR1 was isolated in 1990 and the second component of the type I IFN-R, IFNAR2, was isolated in 1994 [4,5]. IFN- γ was discovered in 1965, the sole member of the type II IFN family [6]. The human gene coding for the IFNGR1 subunit was cloned in 1988 [7] and the cDNA of the second subunit, IFNGR2, was isolated in 1994 [8].

IFNs have been among the most studied cytokines for the last 50 years. They and their specific receptors represent the

paradigm of the JAK/STAT signaling pathway. Contrasting with the wealth of data published on IFN signaling and biological activity, little information exists on the characteristics of IFN-R trafficking. Ten years ago, pioneering studies showed that EGF receptor endocytosis and trafficking play a critical and unsuspected role in the regulation of EGF signaling [9,10]. Today, it is established that membrane sorting in endocytic compartments can participate in regulation and specificity of signal transduction through various signaling receptors, involving spatial and temporal compartmentalization of activated receptors and downstream signaling effectors [11,12]. There is little known about trafficking of IFN-R and thus its role in IFN signaling, possibly due to its relatively recent identification. New findings have emphasized the need for more defined molecular characteristics of IFN-R trafficking to better understand the complexity of IFN signaling.

2. Entering the cell through classic clathrin-dependent endocytosis

Since the early visualization of clathrin-coated pits (CCPs) by electron microscopy in the 1960s [13,14], most transmembrane receptors have been shown to enter the cell through

* Corresponding author. Tel.: +33 1 42 34 63 51; fax: +33 1 42 34 65 07.
E-mail address: christophe.lamaze@curie.fr (C. Lamaze).

¹ Present address: Recherche Exploratoire et Unité Mixte CNRS/UEVE/ Généthon, Evry, France.

clathrin-dependent endocytosis. This is the best described endocytic pathway in mammalian cells. CCPs are specialized invaginations of the plasma membrane which efficiently concentrate receptors needing to be internalized from the cell surface ([15]; Fig. 1). Initial experiments using iodinated ligands showed that type I and type II IFNs were actively internalized and degraded in various cell types. Electron microscopy studies from the early 1980s demonstrated that colloidal gold-conjugated IFN- α and ferritin-conjugated murine IFN- β type I IFNs, associated with CCPs at the plasma membrane of

kidney cells and murine fibroblasts, respectively [16,17]. Gold-labeled IFN- γ , the sole type II IFN, and the IFNGR1 subunit also associated with CCPs [18,19]. IFN- γ and the IFNGR1 subunit localized also, albeit to a lesser extent, in caveolae ([19]; see Fig. 1).

Candidate receptors are recruited into CCPs through direct binding to the AP-2 complex, another major component of the clathrin machinery. There are two major AP-2 binding motifs in the cytoplasmic domain of the receptors. These include the tyrosine-based motif YXXF, first identified in the

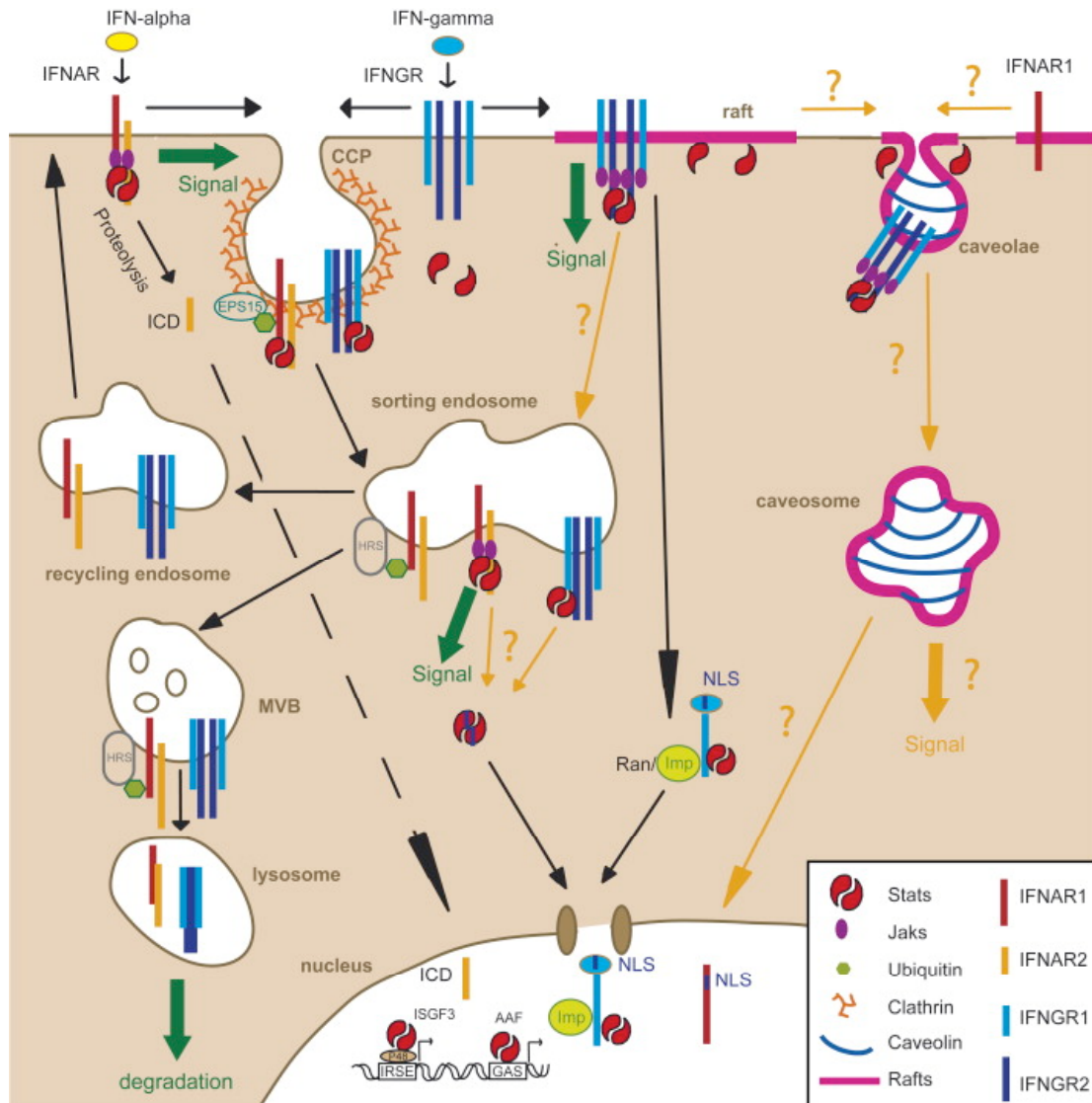


Fig. 1. Several endocytic pathways can be distinguished by morphological and molecular means in mammalian cells [25]. IFN-R have been localized in clathrin-coated pits, caveolae and lipid rafts. Inhibition of IFNAR and IFNGR endocytosis through clathrin-coated pits impairs STAT-dependent signaling induced by IFN- α , but not IFN- γ [25]. Pharmacological disruption of lipid rafts inhibits IFNGR activation and STAT1 and IFNGR1 nuclear translocation [32]. IFNGR and IFN- γ have been detected in caveolae by EM [19]. Whether IFNAR1 association with lipid rafts [30] corresponds to caveolae association is unknown. Internalized IFN-R have been found in the sorting and recycling endosomes in mammalian cells [25] and in late endosomes (MVB) in *Drosophila*. Black arrows indicate identified IFN-R intracellular pathways. Green arrows refer to sorting steps that have been involved in IFN-R signaling. Orange arrows point to putative IFN-R trafficking pathways and potential control of IFN-R signaling.

transferrin receptor, and the dileucine-based motif (LL), mostly found in immune receptors (CD3 γ chain, invariant chain). These receptors are sorted by direct interaction between the μ 2 and β 2 subunits of AP-2 with the YXXF and dileucine motifs (reviewed in [20]). There are two putative AP-2 binding motifs in the cytoplasmic domain of IFNGR1. These include a leucine-isoleucine doublet in position 270–271 and a tyrosine-based motif, YVSL, in position 287–290. Deletion of these residues impairs internalization of IFN- γ , suggesting that IFNGR1 is endocytosed by clathrin-dependent endocytosis [21,22]. Likewise, a typical tyrosine-based motif, YRGL, has been found in position 273–276 of the second subunit IFNGR2, indicating that this subunit may also be recruited to CCPs [23]. However, the same study showed that prevention of clathrin polymerization, and thus endocytosis, by potassium depletion inhibited only 35% of IFNGR2 uptake. This finding implies that other endocytic pathways may participate in IFNGR2 endocytosis. Furthermore, a recent study showed that the deletion of a dileucine motif or its replacement with two alanines in IFNGR2 led to accumulation of the subunit at the cell surface [24]. It is not known if there are similar motifs in IFNAR subunits. Nonetheless, a study using molecular inhibitors of this pathway provided definite evidence that IFN-R are endocytosed by the classic clathrin-dependent endocytic pathway [25]. Down-expression of clathrin by RNA interference or inhibition of dynamin activity, a GTPase required for detachment of CCPs from the plasma membrane, strongly inhibited IFNAR1 and IFNGR1 endocytosis. This led to the accumulation of the IFN-R at the plasma membrane.

3. Association of IFN-R with lipid rafts

The concept of lipid rafts in membrane trafficking emerged about 10 years ago [26]. It is believed that lipid rafts are made of microdomains resulting from heterogeneous distribution of certain lipids in the lateral plane of cellular membranes. These stable domains, enriched in glycosphingolipids and cholesterol, are thought to diffuse dynamically within the membrane and thereby facilitate protein interactions by inclusion in or exclusion from these domains [27]. Caveolae are enriched in glycosphingolipids and cholesterol. Thus, they are considered a subtype of lipid raft with a morphology generated by caveolin, an integral membrane protein with high affinity for cholesterol (Fig. 1). The existence of noncaveolar lipid rafts *in vivo* is still debated [28]. However, cholesterol-dependent partitioning of various lipid-anchored and transmembrane proteins into submicroscopic domains has been demonstrated in live cells [29]. With the exception of caveolae, lipid rafts are too small to be visualized by microscopy. Thus, their existence is based mainly on biochemical experiments. Detergent-resistant membranes (DRMs), the fraction collected after detergent solubilization of cell membranes and flotation on a density gradient, are believed to reflect the composition of lipid rafts in living cells. Indeed, most of the transmembrane receptors associated with lipid rafts have been isolated in DRM fractions.

Several studies have shown the association of IFN-R with lipid microdomains of the raft type. An initial study in murine

embryonic fibroblasts by Taniguchi's group [30] found IFNAR1, IFNGR1 and IFNGR2 in microdomains isolated from the plasma membrane by a detergent-free method. The downstream signaling effectors JAK1, JAK2 and STAT1 were also associated with these domains. IFNGR1 and IFNGR2 were detected by indirect immunofluorescence at the surface of mouse oocytes and shown to colocalize partly with the ganglioside GM1, a classic marker of lipid rafts [31]. IFNGR subunits were associated with lipid microdomains at steady state in WISH cells and in an hepatoma cell line [32]. In contrast, this association was detected only for activated IFNGR in Jurkat cells. A recent study comparing the distribution of both IFNAR and IFNGR found that no IFN-Rs in HeLa cells were enriched in DRM fractions under resting conditions. However, IFNGR complexes were present in DRM fractions isolated from the plasma membrane after IFN- γ stimulation. In contrast, IFN- α had no effect on basal distribution of IFNAR complexes at the plasma membrane [25]. Whether these differences are due to cell types or variations in the DRM isolation protocol is unknown. These differences emphasize the need for caution in interpreting significance of DRM association [33].

4. Role of lipid rafts in the endocytosis of IFN-R

Regardless of these reservations, clustering of lipids and proteins in lipid rafts has been widely implicated in various membrane-based processes [34]. We will not detail these processes in this review, but will focus on the possible role that dynamic lipid assembly at the plasma membrane plays in the endocytosis and the signaling of IFN-R. Even if clathrin-dependent endocytosis remains the main endocytic pathway for transmembrane receptors, various studies have suggested there are alternate pathways. These other pathways, grouped under the generic name of clathrin-independent endocytosis, have long been considered nonspecific and restricted to the uptake of nonphysiological cargo, including bacterial or plant toxins [35–37]. This view was reconsidered in 2001 with the demonstration that the interleukin-2 (IL-2) receptor was efficiently internalized without CCPs [38]. Instead, the IL-2 receptor associated with DRM fractions, suggesting that uptake was driven by the special organization of lipid rafts at the plasma membrane. The existence of several clathrin-independent pathways in mammalian cells has been established by studies that blocked clathrin-dependent endocytosis in a selective manner with dominant negative mutants and, more recently, silencing RNAs [36,37]. Though these pathways are poorly defined at the molecular level, there is a consensus that they use cholesterol- and sphingolipid-enriched membrane domains, i.e. lipid rafts and caveolae. These pathways are differentially sensitive to members of the small GTPases of the Rho family and to the GTPase dynamin [29].

Molecular inhibition of clathrin-dependent endocytosis strongly inhibited IFNAR uptake in HeLa cells, indicating that uptake was exclusively mediated by CCPs [25]. Accordingly, IFNAR subunits were not enriched in DRM fractions. Whether the association of IFNAR with lipid rafts in mouse

embryonic fibroblasts is due to cell peculiarities or to the association with caveolae is unknown (Fig. 1; [30]). The distribution of IFNGR has been studied in various cell types, with various interpretations of the association of IFNGR subunits with DRMs. One study that inhibited IFN- γ and IFNGR1 translocation to the nucleus by filipin, a cholesterol-binding drug that disrupts lipid rafts, concluded that this particular route was exclusively driven by lipid rafts [32]. Although another study found that STAT1 activation and nuclear translocation induced by IFN- γ were also unaffected by molecular inhibitors of clathrin-dependent endocytosis, immunofluorescence and biochemical assays clearly showed that most IFNGRs entered the cell by clathrin-dependent endocytosis [25]. The use of a clathrin-dependent endocytosis pathway is consistent with the presence of a typical clathrin-dependent dileucine motif in IFNGR1, which is required for efficient internalization of IFN- γ [21,22]. The question thus is whether the association of IFNGR with DRMs necessarily implies that it is endocytosed by clathrin-independent endocytosis. The limit between lipid rafts and the clathrin-dependent machinery appears more plastic than initially thought. The small size of lipid rafts is compatible with internalization through CCPs, as recently demonstrated for the B-cell receptor (BCR). In this case, activated BCR uptake occurred only when clathrin was associated with DRMs and tyrosine phosphorylated through a Src-family kinase [39]. Such a scenario has also been suggested for the endocytosis of the EGF-R [40]. Likewise, Marchetti et al. showed that DRM association of activated IFNGRs occurred before their endocytosis through CCPs. However, no tyrosine phosphorylation of clathrin was detected in DRMs and the pharmacological inhibition of Src-family kinase did not block IFNGR uptake [25].

A certain degree of plasticity exists within the endocytic pathways, as shown by the presence of the same receptor in clathrin and nonclathrin endocytic structures. For example, the TGF- β receptor was recently shown to be internalized by both clathrin-dependent endocytosis and by a caveolar raft-associated pathway, each pathway involved in distinct signaling events [41]. An electron microscopy study showing the presence of IFNGR in caveolae and in CCPs suggested previously that IFNGR can use two internalization pathways [19]. Though caveolae are not present in Jurkat cells, the possibility remains that the IFNGR can use two separate endocytic pathways. The study by Subramaniam and Johnson followed the pathway by which IFNGR1 is translocated to the nucleus by a nuclear localization signal (NLS) present in IFN- γ [42]. The study by Marchetti et al. investigated a more typical endocytic pathway that brings the IFNGR into the recycling compartment whether or not IFN- γ is bound to IFNGR. Thus, whereas the raft-associated pathway carries IFNGR1 and associated STAT1 to the nucleus, the clathrin-dependent pathway brings IFNGR1 to the recycling compartment (Fig. 1).

5. Role of caveolae in IFN-R endocytosis

Caveolae are typical omega-shaped membrane invaginations that were discovered more than 50 years ago [43].

Caveolae are abundant in endothelial cells, adipocytes and smooth muscle cells, but absent in lymphocytes and neurons. Their precise role in clathrin-independent endocytosis is unclear [44]. It appears that caveolae remain static at the plasma membrane and do not contribute to overall endocytic activity of most cells. However, various stimuli, including tyrosine phosphorylation, can trigger the endocytic potential of caveolae in a dynamin- and actin-dependent process [45]. Recent microscopy analysis has shown that both types of behavior coexist in the cell: there is a population of immobile multicaveolar structures at the plasma membrane and another population that continuously cycles in a kiss-and-run mechanism within a short distance from the plasma membrane [46]. Cargo internalized through caveolae is directed in some cases to a specialized endosome called caveosome, which is distinct from conventional endosomes (Fig. 1). A direct pathway from the caveosome to the perinuclear smooth endoplasmic reticulum has been described [47]. IFNAR and IFNGR subunits have been shown to cofractionate with caveolin in murine embryonic fibroblasts, but their localization in caveolae has not been documented by microscopic studies [30]. IFN- γ and IFNGR1 have been detected in caveolae in human lymphoma cells by electron microscopy [19]. The role of caveolae in the transport and intracellular distribution of IFN-R has not been investigated. It is also unknown whether the IFN- γ -induced association of IFNGR with DRMs corresponds to recruitment of activated IFNGR complexes to caveolae (Fig. 1; [25]).

6. Role of IFN-R ubiquitination

Ubiquitination is a key post-translational process for the efficient internalization and sorting of cell surface receptors into endosomes in yeast and mammalian cells [48]. It is also involved in protein degradation either by proteosomal machinery or through sorting into lysosomes. Eps15/Eps15R and epsins, initially described as part of the clathrin machinery [49,50] were recently shown to contain a highly conserved ubiquitin-interacting motif (UIM) that directly binds to ubiquitinated receptors to sort them into CCPs [51]. Consistent with IFNAR and IFNGR requiring functional Eps15 for their endocytosis [25], ubiquitination has been recently implicated in the sorting of both receptors. Thus, IFN- α promotes phosphorylation of IFNAR1 on Ser⁵³⁵, which then recruits SCF^{HOS} E3 ubiquitin ligase involved in ubiquitination of IFNAR1. Ubiquitinated IFNAR1 is efficiently internalized and degraded into the lysosomal network (Fig. 1; [52,53]). Furthermore, the Tyk2 kinase has been shown to control the amount of IFNAR1 at the cell surface by regulating serine phosphorylation preceding ubiquitination and lysosomal degradation of IFNAR1 [54]. IFNGR ubiquitination has not been addressed, but recent findings suggest that this mechanism is also involved in regulation of IFNGR endocytosis and signaling. The K3 and K5 proteins of a human tumor-inducing herpesvirus, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), were shown to induce IFNGR1 ubiquitination through their E3 ubiquitin ligase activity [55]. KSHV virus induction of IFNGR1 ubiquitination increases downregulation and degradation of IFNGR at the

plasma membrane, thereby inhibiting IFN- γ antiviral activity. It is unknown whether this process occurs naturally in uninfected cells. The cell's ubiquitin ligases that are involved in IFNGR ubiquitination remain to be identified. Ubiquitination can also mediate the internalization of receptors in a clathrin-independent and lipid raft-dependent manner, as recently shown for the EGF-R [56].

7. Intracellular distribution of IFN-R after endocytosis

IFN-Rs have been localized in various structures at the plasma membrane, including CCPs, caveolae and lipid rafts. It is tempting to link the various endocytic pathways to distinct distributions of internalized receptors and thus different signaling events, as recently shown for the TGF- β receptor [41].

Older studies have shown that IFNs are degraded and secreted in several cell types after endocytosis; there are two to four times more IFNGRs inside the cell than at the plasma membrane in most cell lines [57–59]. However, IFNGR is recycled in most cell types [60,61], in agreement with accumulation of IFNGR1 and IFNGR2 subunits in the recycling compartment [23,25]. Likewise, IFNAR1 and IFNAR2 accumulate in the recycling compartment after internalization [25]. Various receptors and cytokines have been found in the nucleus, although these studies are often controversial [62]. Electron microscopy showed the presence of murine IFN- β in the nucleus as early as 3 min after internalization [63]. Import to the nucleus was mediated by interaction through an NLS motif, as described previously for other large proteins. After 1 h stimulation with IFN- β , IFNAR1 translocated to the nucleus through a NLS motif in the IFNAR1 extracellular domain (Fig. 1; [64]). The effect of IFN- α was not investigated in this study. The IFNAR2 subunit has been reported to be proteolytically cleaved in a regulated manner in response to IFN- α , releasing an intracellular domain ICD that can translocate to the nucleus ([65]; Fig. 1). In contrast, there is no NLS motif in the extracellular domain of IFNGR1. An NLS signal has been identified, however, in murine and human IFN- γ [42,66]. Consistent with electron microscopy studies, the IFN- γ NLS signal was later confirmed to allow translocation of IFNGR1, but not IFNGR2, into the nucleus, presumably through the Ran/importin pathway (Fig. 1; [19,67]). Whether the caveosome, which can drive internalized molecules by caveolae to the endoplasmic reticulum, participates in targeting of IFN-R to the nucleus remains to be tested. Though the significance of IFN-R nuclear localization needs further investigation, recent findings allow to draw a parallel with the possibility to activate specific signaling pathways, as described for the EGF and the Notch receptors [68,69]. It was reported that nuclear EGF-R associated with promoter region of cyclin D1 suggesting that it might function as a transcription factor to activate genes required for EGF-induced activities [70]. Similar results were recently reported for IFN- γ and IFNGR1 since they can interact directly with the promoter region of IFN- γ -activated genes, a process that led to increased activity, thus suggesting a transcriptional role for IFN- γ /IFNGR1 [71].

8. Role of IFN-R trafficking in IFN signaling and biological activity

Receptor endocytosis has long been viewed as a passive means to terminate signaling at the plasma membrane through downmodulation and lysosomal degradation of activated receptors [12,72]. This consensus was challenged by groundbreaking studies demonstrating that EGF receptor sorting through CCPs and the endosomal network was required to ensure the specificity of EGF signaling [9,10].

IFN-R trafficking has two possible functions in controlling IFN signaling: control of response magnitude and/or its specificity. The first aspect has already been addressed. Various studies have linked downmodulation and ubiquitin-dependent degradation of IFN-Rs to restriction in the extent and duration of signaling. The second aspect has been less investigated. Initial findings indicated that deletion of a dileucine stretch—a classic signal for receptor recognition by the clathrin-dependent machinery—in IFNGR inhibited IFN- γ endocytosis, but not IFN- γ signaling [21,22]. This led to the general assumption that IFN-R trafficking and IFN signaling are two separate events [73]. However, recent findings about IFNAR trafficking and signaling have refuted this assumption: molecular inhibition of the clathrin-dependent machinery by dynamin inactivation or clathrin downexpression completely inhibited both IFNAR and IFNGR endocytosis in HeLa cells and fibroblasts [25]. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis of IFNAR led to early decrease in JAK1 and TYK2 activation, STAT1 and STAT2 phosphorylation and the inhibition of their nuclear translocation. Consequently, IFN- α transcriptional activity was impaired as much as its antiviral and antiproliferative activity. Inhibition of IFNGR endocytosis through CCPs had no effect on IFN- γ -induced signaling and biological activities, consistent with older studies [25]. Thus, in contrast to IFNGR, these findings demonstrate that clathrin-dependent endocytosis of activated IFNAR complexes is required for STAT-dependent signaling and for IFN- α -induced biological responses. This possibility was suggested more than 20 years ago: Raji cells, which are insensitive to the antiviral activity of IFN- α , did not internalize it; however, other Burkitt's lymphoma cells—Daudi and Namalwa—that are sensitive did internalize IFN- α [74].

Control of IFN- α signaling by clathrin-dependent endocytosis possibly occurs in several ways. Further studies are needed to validate the various scenarios. The concept of the “signaling endosome” has emerged from various studies exploring the link between EGF-R trafficking and signaling. This concept proposes that signaling events initiated at the cell surface are propagated from the signaling endosome whereas others are activated [12,75,76]. If IFNAR follows this model of endocytosis, activated IFNAR complexes and associated signaling molecules, including STAT1 and STAT2, would be transported to endosomes, an intracellular step required for propagating signal transduction. For example, this occurs for the EGF-R in the JAK/STAT pathway: activated EGF-R complexes and STAT3 colocalize in clathrin-derived vesicles; functional endocytosis is required for STAT3 nuclear

translocation and gene transcription [77]. STAT1 and STAT2 have not been found in clathrin-derived vesicles. However, recent findings in *Drosophila* suggest that the transit of signaling complexes through the endosomal network is required for STAT signaling. There is only one *Drosophila* receptor gene (*Domeless*), which is structurally similar to the human IFNAR, one JAK (*Hopscotch*) and one STAT (STAT92E). Blocking clathrin-dependent endocytosis inhibited STAT signaling, which is required for cell migration in *Drosophila*, consistent with findings in mammalian cells [78]. Other mutations affecting various steps of endosomal trafficking also inhibited STAT signaling, indicating that trafficking through the endosomal network was required (Devergne and Noselli, personal communication). This is somewhat in contradiction with the dogma that STATs are released from the IFN-R soon after being recruited to activated receptors at the plasma membrane. However, this hypothesis is consistent with localization of a cleaved part of IFNAR2 (ICD) and IFNAR1 with STAT1 in the nucleus [64,65]. Whether this process relies on the transit through specialized endosomes is unknown.

Another possibility, not necessarily exclusive, is that assembly of CCPs organizes signaling platforms at the plasma membrane where activated receptors and their signaling partners are recruited. This scenario was proposed for activated G protein-coupled receptors that are connected to CCPs and signaling partners through the scaffolding protein β -arrestin [79]. CCPs may regulate the association/dissociation cycle of factors controlling the activation of IFN-R over time. For example, the defect in JAK/STAT activation may be due to a factor for which endocytosis is required for the phosphorylation of JAKs. Conversely, negative regulators of the JAK/STAT pathway accumulating in CCPs that are immobilized at the plasma membrane may inactivate the signaling process. Tyrosine phosphatases, SOCS and PIAS are candidates for the negative control of IFN signaling by this mechanism [80], but their associations with the endocytic process have not been investigated.

9. Role of lipid-dependent compartmentalization in IFN signaling

Combined *in vivo* cell imaging with theoretical modeling have recently demonstrated the highly dynamic characteristics of lipid rafts at the plasma membrane [27]. The kinetics of lipid raft assembly/disassembly fit well with the dynamics of the recruitment of downstream effectors to activated receptors at the plasma membrane. Various studies have provided solid arguments for involvement of lipid rafts in signal transduction, especially for immune receptor-mediated signaling [81]. Association of activated IFNGR complexes with lipid rafts of the plasma membrane supports the possibility that IFN- γ -induced signaling is regulated through lipid-based clustering of the JAK/STAT machinery [25,32]. Consistent with this hypothesis, filipin, a cholesterol-binding drug that prevents lipid raft assembly, inhibited IFN- γ -dependent signaling in several cell types [19,25,32]. Though specificity of cholesterol-binding drugs is questionable, various studies have found

that several members of the JAK/STAT family associate with lipid microdomains after activation [30,82].

Indeed, only the pool of IFNGR1 that was tyrosine phosphorylated after IFN- γ stimulation associated with lipid microdomains. Thus, IFNGR activation is initiated in lipid microdomains where STAT1 is recruited, activated and released to the cytoplasm before receptor uptake through CCPs [25]. This may explain why, unlike for IFN- α , inhibition of clathrin-dependent endocytosis of activated IFNGR complexes had no effect on STAT1 activation. Alternatively, various activated receptors may travel directly from lipid rafts to the nucleus (Fig. 1; [32,67]). Whether the two pathways can operate simultaneously and whether they are linked to distinct signaling events is unknown. Though no evidence has implicated caveolae in the endocytosis of IFN-R, it is possible that caveolae regulate IFN-R signaling by confining activated receptors at the plasma membrane.

10. Perspectives

Novel molecular inhibitors, including silencing RNAs, make it possible to block several trafficking pathways in a selective manner. Thus, the role of IFN-R endocytosis and intracellular trafficking in IFN signaling can be examined precisely. This review focuses on IFN-R subunits, JAK kinases and STATs, central molecules in IFN signaling. Additional signaling pathways can be activated by IFNs [83]. It would be interesting to analyze whether receptor trafficking can control activation of JAK/STAT independent signaling events. For example, IFN- γ can activate the MAP kinase-dependent signaling cascade, a pathway that, in contrast to STAT1 and IFN- γ , is regulated by clathrin-dependent endocytosis for various growth factor receptors [84]. In this context, analysis of the impact of receptor trafficking on other members of the STAT family that are not common to type I and type II IFNs would be informative. For example, STAT3 can be activated by IFN- γ [85], and in contrast to STAT1 and IFN- γ , its nuclear translocation after EGF activation is clathrin-dependent [23, 24]. Whereas STAT3 is a tumor oncogene, STAT1 is a tumor suppressor [85]. One may hypothesize that these opposing activities are due to differences in receptor trafficking.

Most studies have addressed trafficking characteristics of one subunit of the IFN-R complex, essentially IFNGR1 or IFNAR1. Expression levels can differ between the subunits and may be a critical factor in regulating IFN responsiveness [23,24]. For example, IFNGR2 has been shown to remain at the plasma membrane, but IFNGR1 translocates to the nucleus in WISH cells [67]. Another example of the interconnection between ligand independent endocytosis of IFNGR2 and negative down-modulation of STAT1 activation was given by the finding that iron uptake by the transferrin receptor or treatment by insulin-like growth factor-1 led to IFNGR2 down-regulated surface expression and inhibited both IFN- γ -dependent STAT-1 activation and apoptosis in T-cell lines [86]. Whether the two subunits remain associated after endocytosis and in which compartment they finally dissociate are questions that need to be answered to better understand the complexity of IFN signaling.

Another key issue concerns the trafficking of JAK/STAT pathway members themselves. Dogma holds that JAK kinases are pre-associated with the receptor, and that STATs are recruited from the cytoplasm to the activated receptors at the cell surface, then released to reach the nucleus by unknown pathways. However, various studies suggest that under certain conditions, STAT travels with the receptor, reaching different intracellular locations, including the nucleus (Fig. 1). Various members of the JAK family have been shown to modulate the trafficking of IFNAR complexes. For example, TYK2 can control the steady-state level of IFNAR1 subunits at the plasma membrane through ubiquitin-dependent proteolysis of IFNAR1 in response to ligand binding [23,24]. Two members of the JAK family, JAK1 and TYK2, have been found to bind JAMIP, a microtubule interacting protein, in Jurkat cells, suggesting that vesicular trafficking of these kinases is involved in IFN [87].

Various intracellular compartments are probably important for trafficking and/or signaling of the IFN-R. This is suggested by studies of other members of the STAT family in mammalian cells and studies of JAK/STAT in *Drosophila*. Several clathrin-independent pathways have been described recently (Fig. 1). Thus, it is expected that progress in the molecular understanding of their regulation will facilitate better understanding of their roles in IFN signaling control. Novel approaches, including real-time cell imaging of interactions between IFN-R, JAK/STAT members and participants of the various trafficking pathways, will probably reveal novel aspects of IFN signaling. The significance of IFN-R association with lipid microdomains should be re-evaluated using less controversial methods than biochemical isolation of DRMs. Finally, various reports have documented differences in response patterns of IFNs, particularly between IFN- α and IFN- β . It has been reported recently that differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation [88]. Association of these differences with specific trafficking pathways selected by the type of IFN bound to IFNAR is an attractive possibility that remains to be tested.

11. Conclusion

The IFN-R system illustrates the paradox of signaling, in that 18 closely related molecules bind to and activate only two receptors, achieving specific cellular functions through a common JAK/STAT circuit. It is established that, for various growth factor receptors, receptor trafficking and signal transduction can be tightly coordinated. Receptor sorting at the plasma membrane has been shown to be much more diverse and complex than initially thought. Thus, it is tempting to link the higher level of complexity and diversity of endocytosis and trafficking with the high level of complexity and promiscuity characterizing signal transduction. Recent findings have provided new insights into the interplay between membrane sorting, endocytosis and JAK/STAT signaling of IFN-R. The versatility and plasticity of the endocytic pathways combined with cell type specificities results in a large variety and high complexity of signaling outputs for IFNs. In the

relatively new field of signaling and receptor trafficking, new technologies, including live cell imaging, should facilitate further understanding of the contribution of membrane sorting to signaling specificity of cytokines and the regulation of their biological activities within the JAK/STAT pathway.

Acknowledgments

J.C. is supported by a “Ligue contre le Cancer” thesis fellowship. C.L. wishes to acknowledge support by “Association pour la Recherche sur le Cancer” (3143), “Agence Nationale de la Recherche”, the Institut Curie, and to thank the members of the “Trafic et Signalisation” laboratory.

References

- [1] A. Isaacs, J. Lindenmann, Virus interference. I. The interferon, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 147 (1957) 258–267.
- [2] G. Stark, I. Kerr, B. Williams, R. Silverman, R. Schreiber, How cells respond to interferons, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 227–264.
- [3] C. Schindler, S. Brutsaert, Interferons as a paradigm for cytokine signal transduction, *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 1509–1522.
- [4] G. Uze, G. Lutfalla, I. Gresser, Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA, *Cell* 60 (1990) 225–234.
- [5] D. Novick, B. Cohen, M. Rubinstein, The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning, *Cell* 77 (1994) 391–400.
- [6] E.F. Wheelock, Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin, *Science* 149 (1965) 310–311.
- [7] M. Aguet, Z. Dembic, G. Merlin, Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor, *Cell* 55 (1988) 273–280.
- [8] J. Soh, R.J. Donnelly, S. Kotenko, T.M. Mariano, J.R. Cook, N. Wang, S. Emanuel, B. Schwartz, T. Miki, S. Pestka, Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor, *Cell* 76 (1994) 793–802.
- [9] G.M. Di Guglielmo, P.C. Baass, W.J. Ou, B.I. Posner, J.J. Bergeron, Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma, *EMBO J.* 13 (1994) 4269–4277.
- [10] A.V. Vieira, C. Lamaze, S.L. Schmid, Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis, *Science* 274 (1996) 2086–2089.
- [11] B.P. Ceresa, S.L. Schmid, Regulation of signal transduction by endocytosis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000) 204–210.
- [12] A. Sorkin, M. Von Zastrow, Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 600–614.
- [13] A. Policard, M. Bessis, Micropinocytosis and rhopocytosis, *Nature* 194 (1962) 110–111.
- [14] T.F. Roth, K.R. Porter, Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*, *L. J. Cell Biol.* 20 (1964) 313–332.
- [15] F.M. Brodsky, C.Y. Chen, C. Knuehl, M.C. Towler, D.E. Wakeham, Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17 (2001) 517–568.
- [16] K.C. Zoon, H. Ambeiter, D. Zur Nedden, D.J. Fitzgerald, M.C. Willingham, Human interferon alpha enters cells by receptor-mediated endocytosis, *Virology* 130 (1983) 195–203.
- [17] V.M. Kushnaryov, H.S. MacDonald, J.J. Sedmak, S.E. Grossberg, Murine interferon-beta receptor-mediated endocytosis and nuclear membrane binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 3281–3285.
- [18] L. Filgueira, P. Groscurth, M. Aguet, Binding and internalization of gold-labeled IFN-gamma by human Raji cells, *J. Immunol.* 142 (1989) 3436–3439.
- [19] R. Sadir, A. Lambert, H. Lortat-Jacob, G. Morel, Caveolae and clathrin-coated vesicles: two possible internalization pathways for IFN-gamma and IFN-gamma receptor, *Cytokine* (2001) 19–26.

- [20] L.M. Traub, Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 203–208.
- [21] M.A. Farrar, J. Fernandez-Luna, R.D. Schreiber, Identification of two regions within the cytoplasmic domain of the human interferon-gamma receptor required for function, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 19626–19635.
- [22] M.A. Farrar, J.D. Campbell, R.D. Schreiber, Identification of a functionally important sequence in the C terminus of the interferon-gamma receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 11706–11710.
- [23] L. Rigamonti, S. Ariotti, G. Losana, R. Gradini, M.A. Russo, E. Jouanguy, J.L. Casanova, G. Forni, F. Novelli, Surface expression of the IFN-gamma R2 chain is regulated by intracellular trafficking in human T lymphocytes, *J. Immunol.* 164 (2000) 201–207.
- [24] S.D. Rosenzweig, O.M. Schwartz, M.R. Brown, T.L. Leto, S.M. Holland, Characterization of a dipeptide motif regulating IFN-gamma receptor 2 plasma membrane accumulation and IFN-gamma responsiveness, *J. Immunol.* 173 (2004) 3991–3999.
- [25] M. Marchetti, M.N. Monier, A. Fradagrada, K. Mitchell, F. Baychelier, P. Eid, L. Johannes, C. Lamaze, Stat-mediated signaling induced by type I and type II interferons (IFNs) is differentially controlled through lipid microdomain association and clathrin-dependent endocytosis of IFN receptors, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 2896–2909.
- [26] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 (1997) 569–572.
- [27] P. Sharma, R. Varma, R.C. Sarasij, K. IraGousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, S. Mayor, Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes, *Cell* 116 (2004) 577–589.
- [28] S. Munro, Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115 (2003) 377–388.
- [29] R.G. Parton, A.A. Richards, Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms, *Traffic* 4 (2003) 724–738.
- [30] A. Takaoka, Y. Mitani, H. Suemori, M. Sato, T. Yokochi, S. Noguchi, N. Tanaka, T. Taniguchi, Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains, *Science* 288 (2000) 2357–2360.
- [31] S. Truchet, J. Wietzerbin, P. Debey, Mouse oocytes and preimplantation embryos bear the two sub-units of interferon-gamma receptor, *Mol. Reprod. Dev.* 60 (2001) 319–330.
- [32] P.S. Subramaniam, H.M. Johnson, Lipid microdomains are required sites for the selective endocytosis and nuclear translocation of IFN-gamma, its receptor chain IFN-gamma receptor-1, and the phosphorylation and nuclear translocation of STAT1alpha, *J. Immunol.* 169 (2002) 1959–1969.
- [33] J.F. Hancock, Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 456–462.
- [34] D.A. Brown, E. London, Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annu. Rev. Cell Biol.* 14 (1998) 111–136.
- [35] C. Lamaze, S.L. Schmid, The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 573–580.
- [36] S.D. Conner, S.L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell, *Nature* 422 (2003) 37–44.
- [37] L. Johannes, C. Lamaze, Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* 3 (2002) 443–451.
- [38] C. Lamaze, A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, A. Dautry-Varsat, Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway, *Mol. Cell* 7 (2001) 661–671.
- [39] A. Stoddart, M.L. Dykstra, B.K. Brown, W. Song, S.K. Pierce, F.M. Brodsky, Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization, *Immunity* 17 (2002) 451–462.
- [40] C. Puri, D. Tosoni, R. Comai, A. Rabellino, D. Segat, F. Caneva, P. Luzzi, P.P. Di Fiore, C. Tacchetti, Relationships between EGFR signaling-competent and endocytosis-competent membrane microdomains, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 2704–2718.
- [41] G.M. Di Guglielmo, C. Le Roy, A.F. Goodfellow, J.L. Wrana, Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 410–421.
- [42] P.S. Subramaniam, M.G. Mujtaba, M.R. Paddy, H.M. Johnson, The carboxyl terminus of interferon-gamma contains a functional polybasic nuclear localization sequence, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 403–407.
- [43] G.E. Palade, The fine structure of blood capillaries, *J. Appl. Phys.* 24 (1953) 1424.
- [44] M. Kirkham, R.G. Parton, Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers, *Biochim. Biophys. Acta.* 1745 (2005) 273–286.
- [45] L. Pelkmans, A. Helenius, Endocytosis via caveolae, *Traffic* 3 (2002) 311–320.
- [46] L. Pelkmans, M. Zerial, Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae, *Nature* 436 (2005) 128–133.
- [47] L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Helenius, Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 473–483.
- [48] S. Dupre, D. Urban-Grimal, R. Haguenaer-Tsapis, Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1695 (2004) 89–111.
- [49] A. Benmerah, C. Lamaze, B. Bègue, S.L. Schmid, A. Dautry-Varsat, N. Cerf-Bensussan, AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 1055–1062.
- [50] H. Chen, S. Fre, V.I. Slepnev, M.R. Capua, K. Takei, M.H. Butler, P.P. Di Fiore, P. De Camilli, Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis, *Nature* 394 (1998) 793–797.
- [51] S. Polo, S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M.R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli, P.P. Di Fiore, A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins, *Nature* 416 (2002) 451–455.
- [52] K.G. Kumar, J.J. Krolewski, S.Y. Fuchs, Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 46614–46620.
- [53] K.G. Kumar, W. Tang, A.K. Ravindranath, W.A. Clark, E. Croze, S.Y. Fuchs, SCF(HOS) ubiquitin ligase mediates the ligand-induced down-regulation of the interferon-alpha receptor, *EMBO J.* 22 (2003) 5480–5490.
- [54] Z. Marjanovic, J. Ragimbeau, K.G. Kumar, S.Y. Fuchs, S. Pellegrini, TYK2 activity promotes ligand-induced IFNAR1 proteolysis, *Biochem. J.* 397 (2006) 31–38.
- [55] Q. Li, R. Means, S. Lang, J.U. Jung, Downregulation of interferon gamma receptor 1 by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K3 and K5, *J. Virol.* 13 (2006) 13.
- [56] S. Sigismund, T. Woelk, C. Puri, E. Maspero, C. Tacchetti, P. Transidico, P.P. Di Fiore, S. Polo, Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 2760–2765.
- [57] P. Anderson, Y.K. Yip, J. Vilcek, Human interferon-gamma is internalized and degraded by cultured fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6497–6502.
- [58] A. Celada, R.D. Schreiber, Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling, *J. Immunol.* 139 (1987) 147–153.
- [59] A. Celada, R. Allen, I. Esparza, P.W. Gray, R.D. Schreiber, Demonstration and partial characterization of the interferon-gamma receptor on human mononuclear phagocytes, *J. Clin. Invest.* 76 (1985) 2196–2205.
- [60] D.G. Fischer, D. Novick, P. Orchansky, M. Rubinstein, Two molecular forms of the human interferon-gamma receptor. Ligand binding, internalization, and down-regulation, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 2632–2637.
- [61] D.S. Finbloom, Regulation of cell-surface receptors for human interferon-gamma on the human histiocytic lymphoma cell line U937, *Biochem. J.* 274 (1991) 775–780.
- [62] A. Wells, U. Marti, Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 697–702.
- [63] V.M. Kushnaryov, H.S. MacDonald, G.P. Lemense, J. DeBruin, J.J. Sedmak, S.E. Grossberg, Quantitative analysis of mouse interferon-beta receptor-mediated endocytosis and nuclear entry, *Cytobios* 53 (1988) 185–197.
- [64] P.S. Subramaniam, H.M. Johnson, The IFNAR1 subunit of the type I IFN receptor complex contains a functional nuclear localization sequence, *FEBS Lett.* 578 (2004) 207–210.
- [65] A.Z. Saleh, A.T. Fang, A.E. Arch, D. Neupane, A. El Fiky, J.J. Krolewski, Regulated proteolysis of the IFNAR2 subunit of the interferon-alpha receptor, *Oncogene* 23 (2004) 7076–7086.

- [66] T. Bader, J. Wietzerbin, Nuclear accumulation of interferon gamma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 11831–11835.
- [67] J. Larkin 3rd, H.M. Johnson, P.S. Subramaniam, Differential nuclear localization of the IFNGR-1 and IFNGR-2 subunits of the IFN-gamma receptor complex following activation by IFN-gamma, *J. Interferon Cytokine Res.* 20 (2000) 565–576.
- [68] H.M. Johnson, P.S. Subramaniam, S. Olsnes, D.A. Jans, Trafficking and signaling pathways of nuclear localizing protein ligands and their receptors, *Bioessays* 26 (2004) 993–1004.
- [69] S. Olsnes, O. Klingenberg, A. Wiedlocha, Transport of exogenous growth factors and cytokines to the cytosol and to the nucleus, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 163–182.
- [70] S.Y. Lin, K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K.Y. Kwong, L. Bourguignon, M.C. Hung, Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 802–808.
- [71] C.M. Ahmed, H.M. Johnson, IFN-gamma and its receptor subunit IFNGR1 are recruited to the IFN-gamma-activated sequence element at the promoter site of IFN-gamma-activated genes: evidence of transactivational activity in IFNGR1, *J. Immunol.* 177 (2006) 315–321.
- [72] P.P. Di Fiore, P. De Camilli, Endocytosis and signaling. An inseparable partnership, *Cell* 106 (2001) 1–4.
- [73] I.M. Kerr, A.P. Costa-Pereira, B.F. Lillemeier, B. Strobl, Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains, *FEBS Lett.* 546 (2003) 1–5.
- [74] S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara-Takahashi, Cell surface receptor-mediated internalization of interferon: its relation to the antiviral activity of interferon, *J. Gen. Virol.* 64 (1983) 2409–2418.
- [75] M. Miaczynska, L. Pelkmans, M. Zerial, Not just a sink: endosomes in control of signal transduction, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 400–406.
- [76] C. Le Roy, J.L. Wrana, Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signaling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 112–126.
- [77] A.H. Bild, J. Turkson, R. Jove, Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis, *EMBO J.* 21 (2002) 3255–3263.
- [78] D.L. Silver, E.R. Geisbrecht, D.J. Montell, Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*, *Development* 132 (2005) 3483–3492.
- [79] R.J. Lefkowitz, S.K. Shenoy, Transduction of receptor signals by beta-arrestins, *Science* 308 (2005) 512–517.
- [80] E.M. Coccia, G. Uze, S. Pellegrini, Negative regulation of type I interferon signaling: facts and mechanisms, *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 52 (2006) 77–87.
- [81] M. Dykstra, A. Chenukuri, H.W. Sohn, S.J. Tzeng, S.K. Pierce, Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 457–481.
- [82] P.B. Sehgal, G.G. Guo, M. Shah, V. Kumar, K. Patel, Cytokine signaling: STATs in plasma membrane rafts, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12067–12074.
- [83] M.P. Gil, E. Bohn, A.K. O'Guin, C.V. Ramana, B. Levine, G.R. Stark, H.W. Virgin, R.D. Schreiber, Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 6680–6685.
- [84] B.N. Kholodenko, MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: a marriage of convenience? *Trends Cell Biol.* 12 (2002) 173–177.
- [85] Y. Qing, G.R. Stark, Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27.
- [86] G. Regis, L. Conti, D. Boselli, F. Novelli, IFN-gammaR2 trafficking tunes IFN-gamma-STAT1 signaling in T lymphocytes, *Trends Immunol.* 27 (2006) 96–101.
- [87] C. Steindler, Z. Li, M. Algarte, A. Alcover, V. Libri, J. Ragimbeau, S. Pellegrini, Jam1p (marlin-1) defines a family of proteins interacting with janus kinases and microtubules, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 43168–43177.
- [88] E. Jaks, M. Gavutis, G. Uze, J. Martal, J. Piehler, Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation, *J. Mol. Biol.* 366 (2007) 525–539.

Partie II : Palmitoylation

II.I Modifications lipidiques des protéines

Les protéines peuvent être modifiées de façon covalente par des lipides à travers des mécanismes multiples (figure 13). Les trois types de lipides les plus couramment attachés aux protéines sont les isoprénoïdes, les acides gras, et les ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI). Je m'intéresserai ici uniquement à la **prénylation**, qui est l'ajout d'isoprénoïdes, et à l'**acylation**, c'est-à-dire l'ajout d'acides gras aux protéines.

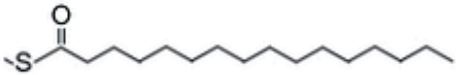
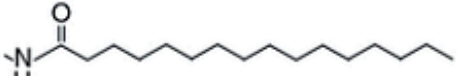
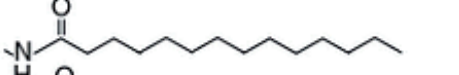
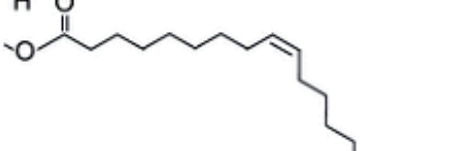
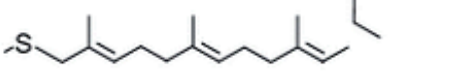

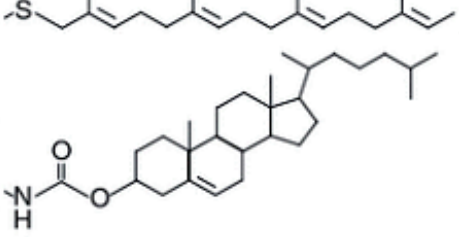
Modification	Modifying Group
S-Palmitoylation	
N-Palmitoylation	
N-Myristoylation	
O-Acylation	
Farnesylation	
Geranylgeranylation	
Cholesterol	

Figure 13. Structures des modifications lipidiques des protéines.
D'après Nadolski and Linder, 2007.

II.I.1 Prénylation

La prénylation est l'addition covalente d'un isoprénoïde de 15 carbones (le farnesyl) ou de 20 carbones (le geranylgeranyl) à un résidu cystéine C-terminal à travers une liaison thioether (Zhang and Casey, 1996).

La plupart des protéines prénylées le sont au niveau d'une « boîte CAAX » (Cys-aliphatic-aliphatic-X), où le résidu « X » détermine si la cystéine sera farnesylée ou geranylgeranylée (si « X » est une méthionine, une sérine ou une glutamine, la protéine sera reconnue par une farnesyltransferase, tandis que si « X » est une leucine, elle le sera par une geranylgeranyltransferase). Après prénylation, les trois acides aminés C-terminaux (AAX) sont clivés par une endoprotéase et la cystéine C-terminale prénylée est carboxyméthylée par une méthyltransferase spécifique. Certaines protéines peuvent être également geranylgeranylées au niveau d'une séquence CXC.

La prénylation, comme la myristoylation et la palmitoylation, a été souvent impliquée dans des interactions membranaires ainsi que dans des interactions protéine-protéine.

II.I.2 Acylation

Il existe deux types principaux d'acylation, qui sont la N-myristoylation et la palmitoylation. Ces modifications lipidiques ont été découvertes dans le début des années 1980, et mises en évidence par marquage métabolique au ^3H -palmitate et ^3H -myristate (Magee and Courtneidge., 1985).

II.I.2.1 N-myristoylation

La N-myristoylation est l'addition covalente d'un acide gras saturé de 14 carbones, le myristate (C14:0), à un résidu glycine N-terminal à travers une liaison amine (Resh, 1999). Cette modification a lieu au niveau d'une séquence Met-Gly, souvent au cours de la synthèse protéique. Après le clivage de la méthionine initiateur par une méthionine amino-peptidase, le myristate est lié à la glycine par une liaison amine. Cette réaction est catalysée par une N-myristoyltransferase (NMT).

La myristoylation aurait principalement un rôle d'adressage et d'attachement des protéines aux membranes, néanmoins un myristate seul n'étant pas suffisant, la myristoylation est souvent accompagnée d'un deuxième signal qui peut être un groupe d'acides aminés chargés positivement ou un palmitate (voir chapitre II.III.1.1, *Attachement aux membranes*).

II.I.2.2 Palmitoylation

La palmitoylation est l'addition covalente d'un acide gras saturé de 16 carbones, le palmitate (C16:0), à un résidu cystéine à travers une liaison thioester. D'autres acides gras à longue chaîne tels que le stéarate (C18:0), l'oléate (C18:1) ou l'arachidonate (C 20:0) peuvent également être liés aux protéines de la même manière, c'est pourquoi le terme « S-acylation » (le S faisant référence à la liaison thioester X-S-X), plus correct, est souvent utilisé dans la littérature. Cette modification ferait intervenir des protéines de la famille DHHC-CRD (Asp-His-His-Cys cysteine rich domain), qui seraient des palmitoyltransférases (PATs). Il n'existe pas de séquence consensus pour la palmitoylation (voir chapitre II.II, *Mécanismes et régulation de la palmitoylation*). Contrairement à la N-myristoylation et à la prénylation, la S-palmitoylation est réversible.

Certaines protéines N-palmitoylées ont également été identifiées, comme les sous-unités G α et les protéines Hedgehog et Spitz (Kleuss and Krause, 2003; Miura et al., 2006; Pepinsky et al., 1998). Dans ce cas, le palmitate est lié à une cystéine ou à une glycine par une liaison amine. La N-palmitoylation est similaire à la N-myristoylation par le fait qu'il s'agit d'une modification irréversible.

Dans la suite de ce manuscrit, le terme « palmitoylation » sera utilisé uniquement pour décrire la S-acylation.

II.II Mécanismes et régulation de la palmitoylation

II.II.1 Motifs de palmitoylation

Si la myristoylation et la prénylation ont des séquences consensus bien définies, il n'en est pas de même pour la palmitoylation qui ne requiert aucune séquence spécifique à part la présence d'un résidu cystéine. Cependant, même s'il n'existe pas de motif universel de palmitoylation, plusieurs facteurs influents ont été décrits.

Tout d'abord, la palmitoylation se trouve fréquemment à proximité d'autres modifications lipidiques. Ainsi, les protéines qui possèdent des résidus cystéines adjacents ou proches d'un résidu glycine myristoylé sont palmitoylées (Resh, 1999); c'est le cas par exemple des sous-unités α de petites protéines G et de plusieurs tyrosine kinases non associées à des récepteurs telles que Src, Hck, Fyn et Lck (Mumby, 1997). De cette façon, pour ce type de protéines, la séquence « Met-Gly-Cys » au domaine NH₂ terminal représente une séquence consensus de palmitoylation. De même, les protéines H-Ras et N-Ras sont palmitoylées à une ou deux cystéines, respectivement, d'un site de farnesylation. La palmitoylation a souvent lieu à proximité d'une série d'acides aminés hydrophobes, comme ceux des domaines transmembranaires. Un environnement particulier a été décrit pour plusieurs récepteurs couplés aux protéines G : les cystéines palmitoylées sont précédées par des groupes d'acides aminés

hydrophobes et suivies par des groupes d'acides aminés chargés positivement (Bijlmakers and Marsh, 2003; Mumby, 1997). Dans le cas des protéines cytosoliques, des acides aminés chargés positivement sont souvent retrouvés aux alentours des sites de palmitoylation, leur rôle pourrait être d'accroître leur liaison à la membrane avant la palmitoylation et faciliter ainsi le recrutement des PATs.

Dans le cas des protéines transmembranaires, les cystéines palmitoylées se trouvent la plupart du temps proches de la membrane plasmique ; en général dans les 10 acides aminés suivant le domaine transmembranaire (Bijlmakers and Marsh, 2003). Néanmoins, des cystéines plus éloignées peuvent également être palmitoylées. C'est le cas par exemple pour le récepteur du mannose 6 phosphate cation-dépendant (CD-M6PR) qui est palmitoylé sur ses cystéines 30 et 34, respectivement localisées à 29 et 33 acides aminés du domaine transmembranaire (Schweizer et al., 1996). De plus, la longueur et la composition des queues cytoplasmiques des protéines transmembranaires influencerait le choix de la chaîne carbonée utilisée pour l'acylation, ainsi, les protéines ayant une courte queue basique seraient modifiées par le stéarate tandis que celles ayant des queues plus longues seraient plutôt modifiées par le palmitate (Resh, 1999).

Une typologie des protéines palmitoylées tenant compte de ces différents critères a été proposée par M. Resh (Resh, 1996): le type I comprend les protéines membranaires, dont les protéines transmembranaires typiquement palmitoylées sur les cystéines proches de la membrane plasmique (tels que le récepteur de la transferrine) ; le type II les protéines doublement modifiées par palmitoylation et prénylation (telles que les protéines Ras) ; le type III les protéines palmitoylées dans leur région N- ou C-terminale (telles que les sous-unités $G\alpha$) ; et le type IV les protéines doublement modifiées par palmitoylation et myristoylation contenant la séquence Met-Gly-Cys (telles que les kinases de la famille Src) (tableau 3).

Une typologie légèrement différente est illustrée figure 14.

Un programme capable de prédire les sites de palmitoylation, CSS-Palm, a été mis au point par Xue et Ren, en se basant sur ce qui est connu dans la littérature (Ren et al., 2008 ; Zhou et al., 2006). Je l'ai utilisé lors de mes travaux pour connaître les probabilités de palmitoylation des cystéines cytoplasmiques d'IFNAR.

Tableau 3. Séquences des protéines palmitoylées. D'après Resh, 1999.

Type I : Protéines membranaires (transmembranaires ou périphériques)	
TGF α	...EKPSALLKGRTA CC HSETVV
Récepteur de la transferrine	...KANVTKPKR CS GSICYGT...
P-Selectine	...KDDGK C PLNPHS
CD4	...GIFF C VR C RHRRRQ...
CD36	MG C DRNC... C ACRSKTIK
Cavéoline-1	...VP C IKSFLIEIQ C ISRVSIIYVHTF C DPFF...
Band 3	...FTGIQII C LAVLMVV...
SNAP-25	...LGKF C GL C V C P C NKLSDA...
Protéines virales	
Influenza HA, sous-type H1	...M C SNGSLO C RI C I
Protéine E2 du virus Sindbis	...PTSLALL CC VRSANA
Protéine 6K du virus Sindbis	...R CC SC C LPF
Protéine G du VSV	...RVGIHL C IKLKHTKK...
HIV-1 gp 160	...DDLRS L CLFSYHRLRD...
Rift valley fever virus G2	...FSSIAII C LAVL...
Récepteurs à 7 domaines transmembranaires	
Récepteur adrénergique α 2A	...RRAFKKIL C RGDRKRIV
Récepteur β 2-adrénergique	...FOELL C LRRSSLK...
Récepteur de la dopamine D1	...LGCYRLCPAT...
Récepteur LH/hCG	...LLSRFG CC KRRAELYRRK...
Récepteur de l'endothéline A	...FQ S CL CCCC YQSKS...
Récepteur de l'endothéline B	...KRFKNCFKSCL CC W C QSFEE...
Récepteur de la vasopressine	...SVSSELRSL CC ARGRTPPS...
Récepteur de la neurokinine B	...RAGFKRAFRW C PFIOVSSYD...
Récepteur de la sérotonine	...HKLIRFK C TS
Récepteur 5 de la stomatostatine	...FRQSFKKVL C LRKGSKAKDA...
Rhodopsine	...MVTTL CC GKNPLGD...
Type II : Protéines prénylées et palmitoylées	
H-Ras	...SGPG C MS C KCVLS
N-Ras	...GTQG C MGLPCVVM
K-Ras(A)	...TPG C VKIKKCVIM
Paralemmine	...DMKKHR C K C SIM
Type III : Palmitoylation dans une région N-terminale ou C-terminale	
Sous-unités G α	
α s	MG C LGNSTEDQNE
α q	MTLESIMA CC LSEEAKEA
α 12	MSGVVRTL SR CLLPAAEAG
α 13	MADFLPSRSV C FP C VLTN
α 16	MARSLRWR CC PW C LTEDEKAA
GAP43	ML CC MRRTKQVEKNDDQKIEQDGI
Sous-unité β 2a du canal Ca ²⁺	MQ CC GLVHRRRVRV
PSD-95	MD C L C IVTTKKYRYQDEDTP
RGS4	M C KGLAGLPAS C LRSAKDMK

GRK6

...FSRQDCCGNCSDSEEELPTRL

Type IV : Protéines myristoylées et palmitoylées

Tyrosine kinases de la famille Src

Yes	MG <u>C</u> IKSKEDKGPAMKY
Fyn	MG <u>C</u> VQ <u>C</u> KDKEATKLTE
Lyn	MG <u>C</u> IKSKRKDNLNDDE
Lck	MG <u>C</u> V <u>C</u> SSNPEDDWMEN
Hck	MG <u>C</u> MKSKFLQVGGNTG
Fgr	MG <u>C</u> V <u>F</u> <u>C</u> KKLEPVATAK
Yrk	MG <u>C</u> V <u>H</u> <u>C</u> KEKISGKGQG

Sous-unités G α

α 1	MG <u>C</u> TLSAEDKAAVERS
α o	MG <u>C</u> TLSAEERAALERS
α z	MG <u>C</u> ROSSEEKEAARRS

AKAP18

MGQLCCFPFSRDEGK

eNOS

MGNLKS $\overline{\text{V}}$ QEPGPPCGLGLGLGLGLCGK

Les résidus cystéine palmitoylés sont représentés en gras et soulignés.

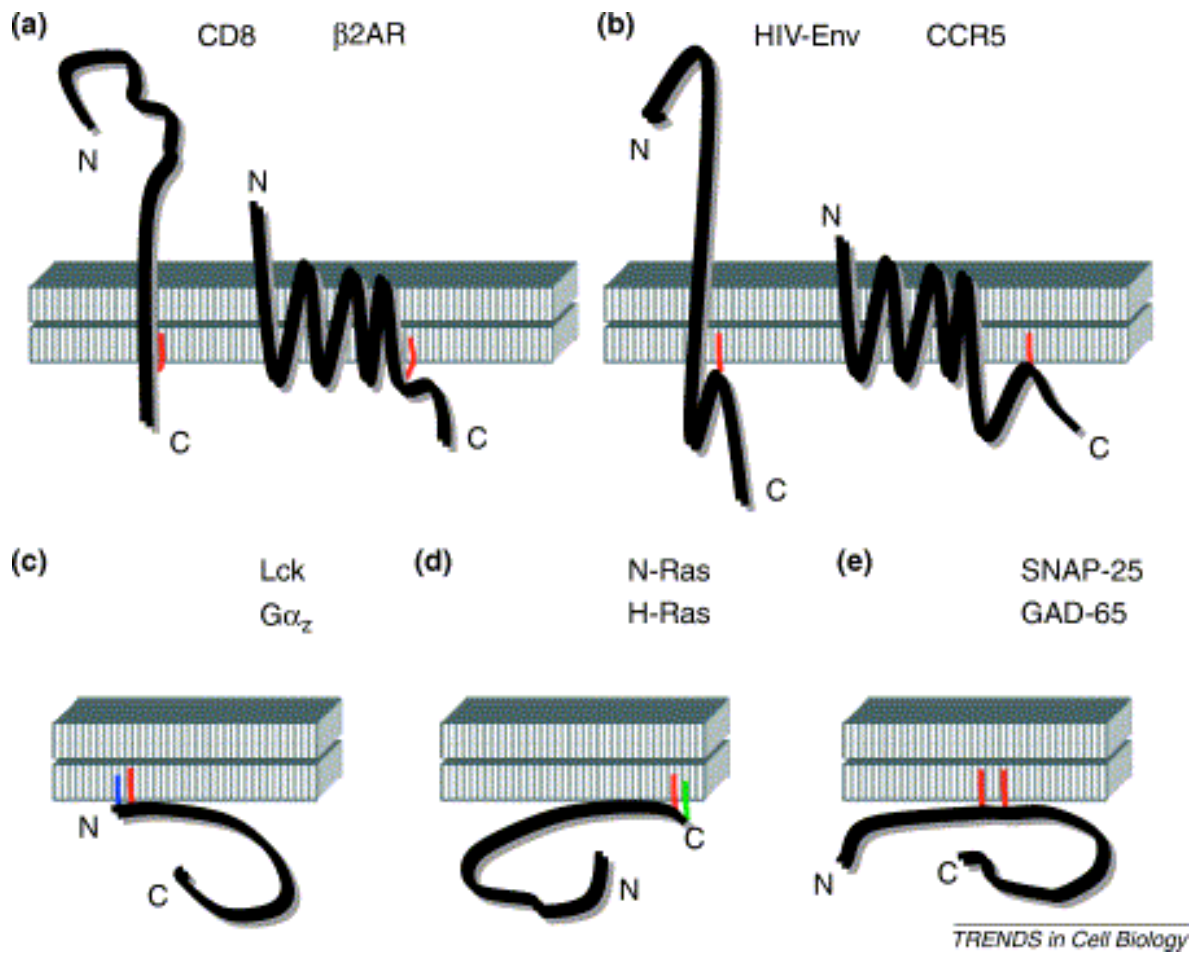


Figure 14. Typologie des protéines palmitoylées.

(a) Protéines transmembranaires palmitoylées au niveau juxtamembranaire. **(b)** Protéines transmembranaires palmitoylées sur des cystéines distantes de la région juxtamembranaire. Dans ce cas, la palmitoylation peut rapprocher le domaine cytoplasmique de la membrane plasmique. **(c)** Protéines cytosoliques palmitoylées et myristoylées, **(d)** Protéines cytosoliques palmitoylées et prénylées, **(e)** Protéines cytosoliques doublement palmitoylées. La palmitoylation est indiquée en rouge, la myristoylation en bleu et la prénylation en vert. D'après Bijlmakers and Marsh, 2003.

II.II.2 Mécanismes de palmitoylation

II.II.2.1 Autoacylation

Le fait que les protéines contenant une cystéine palmitoylée pouvaient être auto-acylées *in vitro* en présence de palmitoyl-CoA a suggéré que cette modification pouvait survenir spontanément, en l'absence de toute activité enzymatique.

Le groupement SH d'une cystéine, qui est nucléophile, attaque la liaison thioester existant entre le CoA et l'acide palmitique. Cette réaction *in vitro* montre des similarités avec la palmitoylation qui se produit *in vivo*. Elle se produit aux mêmes sites et dépend des mêmes conditions, par exemple d'une myristoylation ou de la présence d'autres protéines partenaires (Duncan and Gilman, 1996; Veit, 2000).

Il existe néanmoins certaines différences entre la palmitoylation qui se produit *in vitro* ou *in vivo*. Souvent, la réaction qui se produit *in vitro* est plus lente. Certaines sous-unités $G\alpha$ sont palmitoylées plus efficacement que d'autres *in vitro*, ce qui n'est pas le cas *in vivo*. De plus, certaines protéines qui ne sont pas palmitoylées *in vivo* le sont *in vitro*.

L'existence de l'ACBP (acyl-CoA binding protein) est certainement l'argument le plus important contre l'existence de l'autoacylation *in vivo*. Il s'agit d'une protéine cytosolique abondante qui lie les acides gras à longue chaîne avec une forte affinité, et qui régule probablement la concentration cytosolique d'acyl-CoA de manière à prévenir l'autoacylation des protéines. *In vitro*, l'autoacylation de la protéine $G\alpha$ est totalement inhibée en présence de l'ACBP, tandis que la présence supplémentaire d'une palmitoyltransférase permet une palmitoylation partielle (Dunphy et al., 2000; Leventis et al., 1997).

II.II.2.2 Action enzymatique

L'existence des palmitoyltransférases (PATs) a longtemps été remise en question pour plusieurs raisons. Tout d'abord, à la différence de la myristoylation et de la prénylation, il n'existe pas de site consensus pour la palmitoylation qui puisse être reconnu spécifiquement par une enzyme. Ensuite, il apparaît évident qu'une action enzymatique est plus coûteuse en énergie pour la cellule qu'une simple autoacylation. Ainsi, Bizzozero et collaborateurs ont remarqué que l'énergie requise pour le simple transfert d'un palmitate-CoA à un peptide était de cinq fois inférieure à celle nécessaire aux acylations catalysées par des enzymes (Bharadwaj and Bizzozero, 1995). Enfin, la grande difficulté pendant un certain nombre d'années à mettre en évidence une activité palmitoyltransférase a continué de renforcer le doute existant sur ces enzymes.

II.II.2.2.1 Découverte des PATS

Malgré la difficulté à les purifier en raison de leur instabilité, en 1995 et 1996, deux équipes sont parvenues à isoler des activités palmitoyl acyltransférases (PAT). Resh et collaborateurs ont purifié une activité PAT à partir de cerveaux bovins capable de palmitoyler des kinases de la famille Src (Berthiaume and Resh, 1995). Ils ont montré que cette activité était associée aux membranes, résistante aux pH élevés et sensible à l'extraction par des détergents, suggérant que l'enzyme impliquée est intégrée dans les membranes. Une autre étude du laboratoire de M. Linder a montré l'existence d'une activité PAT enrichie à la membrane plasmique palmitoylant les protéines G (Dunphy et al., 1996). Les rapports d'identification de PATs se sont ensuite succédés. Une protéine de 70 kDa ayant la capacité de palmitoyler une sous-unité de la spectrine, une protéine du cytosquelette, a été purifiée à partir d'érythrocytes humain (Das et al., 1997). Un dimère constitué de deux polypeptides de tailles respectives de 260 et 270 kDa, capable de palmitoyler un peptide dérivé d'une protéine Ras de drosophile *in vitro*, a été purifié à partir de pattes abdominales de *Bombyx Mori* et cloné (Ueno and Suzuki, 1997).

Une avancée significative a eu lieu avec la découverte du complexe Erf2/Erf4 par le groupe de R. Deschenes (Lobo et al., 2002). Leur travail dans la levure leur ayant montré qu'un mutant de Ras non farnesylé est dépendant de la palmitoylation pour sa viabilité, ils ont fait l'hypothèse que des mutations létales dans ce mutant pourraient intervenir dans des gènes codant pour des PATs. Deux gènes, *ERF2* et *ERF4* (Effect on Ras Function), ont été identifiés. *ERF2* était un gène non caractérisé du génome de la levure, et *ERF4* avait déjà été caractérisé dans un criblage de suppresseurs de la fonction de Ras, nommé alors *SHR5* et impliqué dans la palmitoylation de Ras (Bartels et al., 1999; Jung et al., 1995). Erf2 est une protéine transmembranaire de 42 kDa qui a été localisée dans le RE, et qui forme un complexe protéique avec Erf4. L'activité PAT de ce complexe sur Ras a été démontrée *in vitro* (Lobo et al., 2002). Une caractéristique importante d'Erf2 est la présence d'un motif DHHC (Asp-His-His-Cys) situé dans un domaine CRD (cysteine rich domain), critique pour l'activité PAT.

Deux homologues mammifères de Erf2 et Erf4 ont été identifiées, il s'agit de DHHC9 et GCP16, respectivement (Swarthout et al., 2005). Ces deux protéines sont également associées et sont localisées dans l'appareil de Golgi. Le complexe DHHC9/GCP16 palmitoyle H-Ras et N-Ras *in vitro*. Simultanément à la découverte du complexe Erf2/Erf4 comme PAT de Ras, le groupe de N. Davis a identifié la protéine Akr1 (Ankyrin repeat protein) comme étant la PAT de Yck2 (yeast casein kinase 2) (Roth et al., 2002). Comme Erf2, Akr1 est une protéine transmembranaire avec un motif DHHC-CRD responsable de son activité PAT.

Une recherche dans le génome de la levure a permis d'identifier six autres protéines porteuses d'un domaine DHHC : Akr2, Pfa3 (Protein fatty acyltransferase 3), Swf1, Pfa4, Pfa5 et Yn1155W. Pour certaines, les substrats ont été identifiés : ainsi, Pfa3 palmitoyle la protéine Vac8, swf1 palmitoyle les SNAREs de levure Tlg1, Snc1 et Syn8, et Pfa4 palmitoyle la chitin synthase chs3 (Lam et al., 2006; Smotryst et al., 2005; Valdez-Taubas and Pelham, 2005).

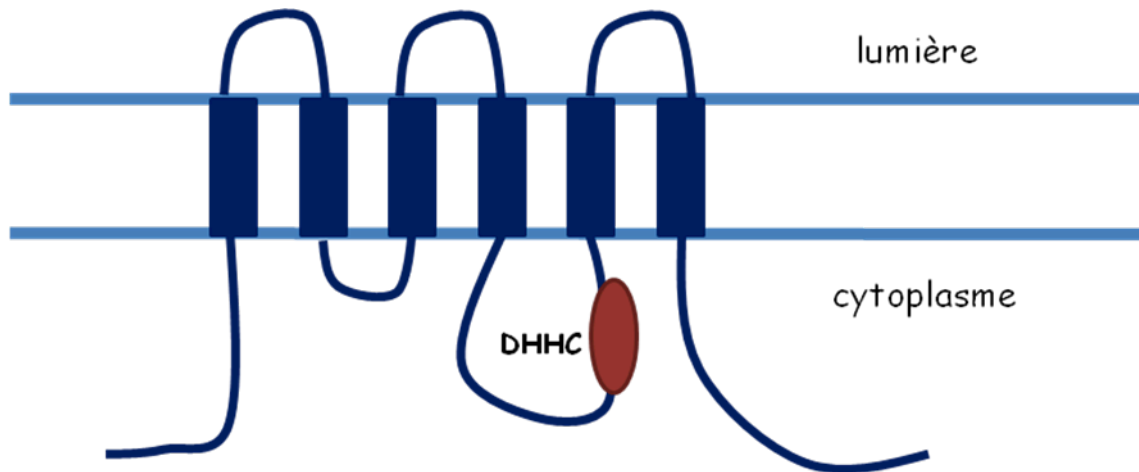


Figure 15. Topologie membranaire des PATs de la famille DHHC.

Les PATs à domaine DHHC-CRD ont en général de 4 à 6 domaines transmembranaires, le domaine DHHC-CRD se trouve toujours du côté cytoplasmique.

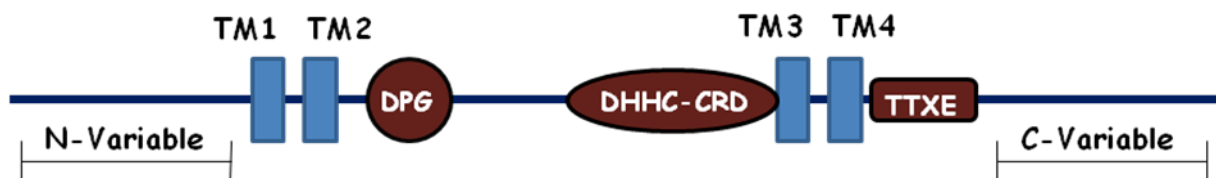


Figure 16. Diagramme schématique d'une PAT à domaine DHHC.

La région N-terminale, les domaines transmembranaires (boîtes bleues, TM), les motifs DPG, DHHC-CRD et TTXE, ainsi que la région C-terminale sont indiqués. D'après Mitchell et al., 2006.

II.II.2.2.2 Famille DHHC

Les protéines porteuses d'un domaine DHHC-CRD définissent ensemble une famille de PATs, comprenant 8 membres chez la levure et 23 chez l'homme (Mitchell et al., 2006; Ohno et al., 2006). Ce sont des protéines intégrées aux membranes avec de multiples domaines transmembranaires, le domaine DHHC est toujours localisé sur la face cytosolique (figure 15).

Leur localisation intracellulaire est variée : certaines sont retrouvées dans le RE, d'autres dans l'appareil de Golgi, d'autres encore à la membrane plasmique, et dans la levure certaines sont localisées dans la vacuole (Nadolski and Linder, 2007; Ohno et al., 2006). La localisation des palmitoyltransférases pourrait être directement liée à la localisation de leur substrats spécifiques.

Le groupe de N. Davis a remarqué que la palmitoylation in vitro de Yck2 par Akr1 était stimulée par l'ATP, bien que ceci soit surprenant (Roth et al., 2002). D'une part, Akr1 n'a pas de séquence consensus de liaison de nucléotides ni de domaine hydrolytique, et d'autre part, le palmitoyl-CoA est un réactif très énergétique qui est capable de se transférer à une protéine substrat en l'absence d'action enzymatique. Il serait intéressant d'examiner quel est le rôle joué par l'ATP dans la palmitoylation induite par Akr1.

La question de savoir si l'action des PATs DHHC est catalytique ou si elles agissent seulement de façon stœchiométrique comme des protéines de transfert du palmitate a été pendant un temps débattue (Dietrich and Ungermann, 2004). Une analyse cinétique de la palmitoylation de N-Ras par DHHC9/GCP16 a montré que la réaction était rapide, linéaire et atteignait un maximum à 10 minutes, suggérant une réaction catalytique (Swarthout et al., 2005).

Toutes les PATs DHHC examinées jusqu'à aujourd'hui sont palmitoylées lorsqu'elles sont incubées avec du palmitoyl-CoA. En revanche, une mutation de la cystéine du motif DHHC abolit à la fois l'autopalmitoylation de la PAT et la palmitoylation du substrat (Mitchell et al., 2006). L'auto-palmitoylation a lieu très rapidement et précède le transfert du palmitate au substrat, suggérant un rôle des protéines DHHC comme intermédiaires de palmitoylation.

Le domaine DHHC possède des similarités avec le motif doigt de zinc C_2H_2 , en revanche la capacité de protéines DHHC à lier le zinc n'a pas été testée (Mitchell et al., 2006).

Certaines PATs, telles que Akr1, Akr2 et Pfa5, possèdent un motif DHYC à la place de DHHC. Akr1 possède plusieurs substrats, Yck1, Yck2 et Lcb4, qui ont chacun des sites de palmitoylation différents. Akr1 comporte un domaine de répétitions d'ankyrine, ces domaines étant impliqués dans les interactions protéine-protéine, il probable que ceci permette à Akr1 d'interagir avec ses substrats indépendamment de la séquence entourant la cystéine palmitoylée.

Un alignement avec ClustalX des protéines DHHC humaines et de levure a permis de proposer la séquence consensus suivante (Mitchell et al., 2006):



Deux autres séquences apparaissent également conservées : un motif DPG (aspartate-proline-glycine) à la suite du TM2 (deuxième domaine transmembranaire) et un motif TTxE (threonine-threonine-x-glutamate) adjacent au TM4 (figure 16). Le rôle fonctionnel de ces motifs n'a pas été étudié, mais il est intéressant de noter qu'ils se trouvent du même côté de la membrane que le motif DHHC.

Contrairement aux N-myristoyltransférases (NMT) qui sont spécifiques du myristoyl-CoA (C14:0), les protéines DHHC utilisent comme substrats lipidiques différents acyl-CoA à longue chaîne, principalement C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, et sont indifférentes à la saturation des chaînes carbonées. En revanche, des chaînes plus courtes comme C14:0, C12:0 ou C10:0 sont beaucoup moins compétitives face à des acyl-CoA radiomarqués dans des tests de palmitoylation (Lobo et al., 2002; Mitchell et al., 2006).

II.II.2.3 Mécanismes potentiels

Dietrich et Ungermann ont proposé plusieurs mécanismes potentiels de palmitoylation (Dietrich and Ungermann, 2004) (figure 17). Dans le mécanisme de base, qu'il y ait intervention enzymatique ou non, la réaction commence par la formation d'une cystéine déprotonée, donc d'un thiolate, sur la protéine cible. L'anion thiolate agit comme un nucléophile sur la liaison thioester d'un palmitoyl-CoA, aboutissant ainsi à la formation d'une protéine palmitoylée (figure 17A). Dans le cas d'une action enzymatique, la PAT pourrait elle-même présenter un thiolate qui réagirait avec un palmitoyl-CoA, formant ainsi un thioester intermédiaire (figure 17B). La PAT lierait ensuite la protéine substrat, et catalyserait le transfert du palmitate.

Certaines études ont suggéré que les PATs pouvaient agir seulement comme des protéines de transfert de palmitate. Ainsi, Dietrich et al ont montré que la protéine Ykt6 palmitoyle Vac8 *in vitro* avec un ratio 1:1, de plus, Ykt6 est capable de lier le palmitoyl-CoA mais aussi le CoA seul (Dietrich et al., 2004). Un autre modèle en accord ces observations serait que certaines PATs lient le palmitoyl-CoA de façon non covalente, puis la protéine substrat qui est alors palmitoylée par l'attaque nucléophile de son thiolate sur la liaison thioester du palmitate-CoA (figure 17C). Le CoA reste ensuite lié à la PAT, empêchant ainsi l'incorporation d'un nouveau palmitate-CoA et une nouvelle réaction. Néanmoins, ce modèle est assez peu probable, d'autres travaux plus récents ayant confirmé une action catalytique des PATs (Mitchell et al., 2006; Swarthout et al., 2005).

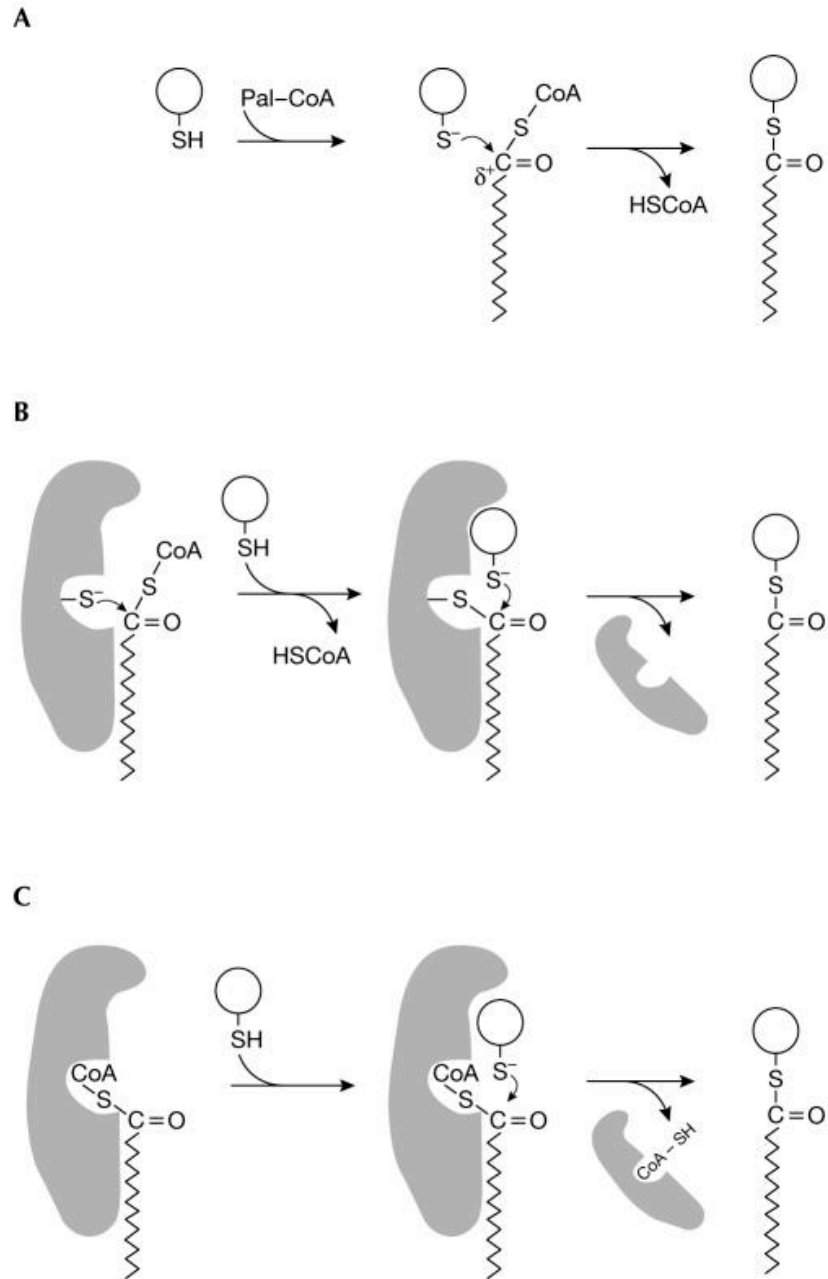


Figure 17. Mécanismes potentiels de palmitoylation.

(A) Mécanisme de base. Le groupe sulphydryl sur la protéine cible est déprotoné pour former un thiolate. La liaison thioester entre la protéine et le palmitate résulte d'une attaque nucléophile du thiolate sur le carbone- α du palmitoyl-CoA (Pal-CoA). **(B)** Formation d'un thioester intermédiaire. La palmitoyltransférase forme un thioester intermédiaire avec le palmitate, se lie ensuite à la protéine cible et catalyse le transfert du palmitate. **(C)** Palmitoylation assistée par une protéine de transfert. La protéine de transfert du palmitate lie le CoA ou Pal-CoA à l'aide d'une poche de liaison et présente le Pal-CoA à une protéine cible. Après la formation de la liaison thioester, le CoA reste lié à la protéine de transfert. D'après Dietrich and Ungermann, 2004.

II.II.3 Régulation de la palmitoylation

La régulation de la palmitoylation peut survenir à plusieurs niveaux : la formation du thiolate, la disponibilité du palmitoyl-CoA, l'action de palmitoyltransférases et de palmitoylthioestérases (Dietrich and Ungermann, 2004).

II.II.3.1 Formation du thiolate

Le sulphhydryl d'une cystéine a un pK_a de 8,5 ce qui rend improbable la formation d'un thiolate dans les conditions physiologiques (pH 7,2-7,4). Néanmoins, l'environnement peptidique de la cystéine peut influencer son pK_a et permettre ainsi la formation d'un thiolate.

II.II.3.2 Disponibilité du palmitoyl-CoA

L'acyl-CoA binding protein (ACBP) joue un rôle important dans les cellules eucaryotes en séquestrant les palmitoyl-CoA libres et en maintenant ainsi leur concentration dans le cytosol de l'ordre de quelques nanomolaires (Faergeman and Knudsen, 1997). L'ACBP a ainsi un rôle crucial dans la prévention de l'autoacylation, cependant, la palmitoylation médiée par les PATs est résistante à l'action de l'ACBP. Il est donc probable que les PATs entrent en compétition avec l'ACBP pour la liaison du palmitoyl-CoA.

II.II.3.3 Palmitoyltransférases / Palmitoylthioestérases

Enfin, l'action de palmitoyltransférases et de palmitoylthioestérases régule également la palmitoylation/dépalmitoylation des protéines.

Les palmitoyltransférases catalysent la palmitoylation des protéines (voir chapitre II.II.2.2, *Action enzymatique*). Les palmitoylthioestérases, elles, catalysent la dépalmitoylation des protéines, deux enzymes de ce type ont été décrites à ce jour. La première, APT1 (acylprotein thioesterase 1), est une protéine de 29 kDa qui agit sur la face cytosolique des membranes et qui dépalmitoyle les petites protéines G, H-Ras et eNOS (endothelial nitric-oxide synthase) (Duncan and Gilman, 1998; Duncan and Gilman, 2002; Yeh et al., 1999). A l'origine, APT1 avait été décrite comme une lysophospholipase (Sugimoto et al., 1996), bien que cette enzyme aie plus d'affinité pour les protéines palmitoylées que pour les lipides. La deuxième, PPT1 (protein palmitoyl thioesterase 1), intervient durant la dégradation protéique et est localisée dans les lysosomes (Verkruyse and Hofmann, 1996). L'hydrolyse des acides gras des protéines est une étape essentielle dans la dégradation protéique. Des mutations dans le gène PPT1 sont responsables d'une maladie d'accumulation lysosomale, la céréoïde lipofuscinose neuronale infantile, qui aboutit à des troubles neurodégénératifs sévères (Gupta et al., 2001; Vesa et al., 1995). Une palmitoyl thioesterase proche, PPT2, a été décrite (Soyombo and Hofmann, 1997). Par contre, PPT2 n'hydrolyse le palmitate qu'à partir de palmitoyl-CoA, et non de protéines palmitoylées.

Un schéma récapitulatif des mécanismes de régulation de la palmitoylation est présenté figure 18.

II.II.3.4 Inductibilité de la palmitoylation/dépalmitoylation

Il a été reporté dans plusieurs contextes que la palmitoylation et la dépalmitoylation pouvaient être inductibles. Ainsi, la dépalmitoylation des sous-unités $G\alpha$ associées au récepteur β -adrénergique est induite par la stimulation du récepteur par ses ligands (Mumby, 1997). Par contre, la palmitoylation du récepteur β -adrénergique lui-même est accrue par l'exposition des cellules à un agoniste (Mouillac et al., 1992). Dans les cellules B, il a été montré que CD81 n'était palmitoylé qu'après l'association du complexe CD19/CD21/CD81 avec le récepteur des cellules B (BCR) (Cherukuri et al., 2004). Enfin, la dépalmitoylation de eNOS, du récepteur de l'œstradiol ainsi que du récepteur AMPA est induite par des agonistes (Acconcia et al., 2005; Hayashi et al., 2005; Robinson et al., 1995).

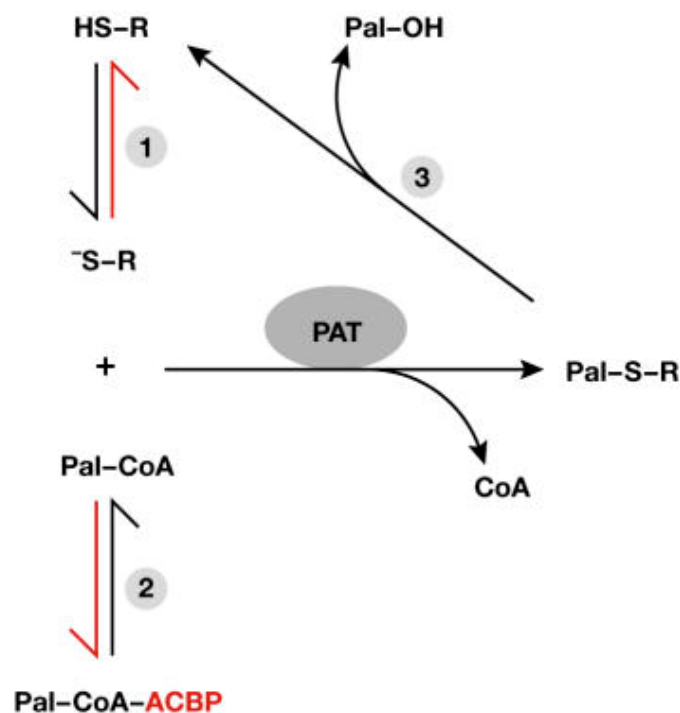


Figure 18. Régulation de la palmitoylation.

(1) Formation du thiolate sur la protéine substrat (R). (2) Disponibilité du palmitoyl-CoA (Pal-CoA), tamponnée par l'ACBP (acyl-CoA binding protein). (3) La palmitoylation médiée par les PATs est reversée par l'action de thioestérases. D'après Dietrich and Ungermann, 2004.

II.III Fonctions de la palmitoylation

II.III.1 Attachement aux membranes lipidiques/relocalisation dans les rafts

II.III.1.1 Attachement aux membranes lipidiques

La fonction la plus décrite de la palmitoylation est l'augmentation de l'affinité des protéines pour les membranes lipidiques.

Dans le cas des protéines cytosoliques, une myristoylation ou une palmitoylation seules ne sont pas suffisantes pour lier les membranes, un deuxième signal est alors nécessaire. Ce peut être une deuxième modification lipidique ou une série d'acides aminés hydrophobes, qui augmente alors l'affinité pour les membranes en interagissant avec les têtes des phospholipides chargées négativement (Resh, 1999). Les protéines doublement myristoylées et palmitoylées peuvent ainsi lier les membranes (comme par exemple les kinases de la famille Src, les petites protéines G), ainsi que les protéines portant deux sites de palmitoylation ou plus (GAP43, certaines protéines G) et les protéines doublement palmitoylées et farnesylées (H-Ras) (figure 19).

L'hypothèse du « kinetic bilayer trapping » explique le comportement des protéines modifiées par des lipides dans les cellules (Shahinian and Silvius, 1995). Dans ce modèle, les protéines modifiées par un seul lipide, myristoyl ou farnesyl, interagissent de manière transitoire avec différentes membranes dans la cellule. Lorsque la protéine rencontre la membrane où est localisée sa PAT, elle devient palmitoylée et liée de façon stable à cette membrane. Ensuite, la protéine doublement modifiée peut changer de compartiment mais uniquement par l'intermédiaire d'un transport vésiculaire. La dépalmitoylation de la protéine lui permet de retourner à son état basal, où elle circule librement entre les compartiments intracellulaires de manière non vésiculaire (figure 20).

II.III.1.2 Localisation dans les rafts

Dans de nombreux cas, il a été reporté que la palmitoylation était responsable de la localisation des protéines dans des microdomaines membranaires de type raft. C'est le cas par exemple des kinases de la famille Src Fyn et Lck, de LAT (linker for activation of T cells) ou de Fas (Chakrabandhu et al., 2007; Liang et al., 2001; Zhang et al., 1998).

Les rafts sont des zones de la membrane plasmique enrichies en sphingolipides et en cholestérol qui sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la signalisation ou l'endocytose. Ils ont été identifiés biochimiquement comme des fractions de membrane résistantes aux détergents, ou DRMs (detergent resistant membranes). Il s'agit de microdomaines membranaires où les lipides se trouvent dans une phase liquide ordonnée, nommée L_o (liquid ordered).

Le concept des rafts comme étant des domaines préexistants à la membrane plasmique a été récemment remis en cause (Hancock, 2006). En fait, il s'agirait plutôt à l'origine de petits domaines en

phase L_o instables qui seraient ensuite stabilisés par des protéines, transmembranaires ou à ancre lipidique. Les protéines joueraient un rôle non négligeable dans la formation des rafts. Les ancres lipidiques ont elles-mêmes la capacité de modifier leur environnement lipidique immédiat, tout comme les domaines transmembranaires des protéines. De plus, l'interaction des protéines entre elles stabilise encore les rafts. Dans ce modèle actualisé, on peut définir deux classes de protéines : celles qui sont capables de stabiliser des petits domaines L_o (protéines dites associées aux rafts), et celles qui ne le sont pas (protéines « exclues » des rafts).

La taille des rafts serait relativement limitée, de l'ordre de quelques nanomètres. Des expériences de modélisation avec la protéine GFP-tH (GFP (green fluorescent protein) couplée avec le motif doublement palmitoylé et farnesylé de Ras) montrent que 40% de cette protéine se trouve dans des domaines de 12 à 20 nm de diamètre qui comprennent une moyenne de 6 à 7 protéines (Plowman et al., 2005).

La phase liquide ordonnée contient principalement des acides gras saturés. Ainsi, l'insertion des protéines acylées dans les domaines L_o est facilitée, tandis que les protéines prénylées, en raison de la structure encombrante de l'isoprénoïde, en sont exclues.

Une fonction des rafts serait d'augmenter la concentration locale des protéines pour faciliter les interactions protéiques. En accord avec ce concept, il a été suggéré que les vitesses de diffusion étant plus faibles dans les rafts, les interactions entre protéines seraient facilitées (Hancock, 2006).

Certaines protéines palmitoylées, comme des kinases de la famille Src, eNOS, ou les sous-unités $G\alpha$ sont enrichies dans un type particulier de rafts, les cavéoles. Les cavéoles sont de petites invaginations de la membrane plasmique de composition similaire aux rafts et qui sont enrichies d'une protéine qui les caractérise, la cavéoline. La cavéoline elle-même est palmitoylée, ce qui pourrait promouvoir son interaction avec d'autres protéines palmitoylées et induire ainsi leur recrutement dans les cavéoles (Dietzen et al., 1995; Parat et al., 2001; Lee et al., 2001).

Enfin, si la palmitoylation permet le plus souvent l'association des protéines avec les rafts, elle peut aussi la prévenir, c'est le cas par exemple du récepteur de l'anthrax (Abrami et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs ont montré que si la localisation du récepteur sauvage dans les rafts était induite par la toxine, un mutant non palmitoylé était localisé dans les rafts de manière constitutive. Néanmoins, le fait que l'association du récepteur avec les DRMs soit sensible au 2-bromopalmitate, un inhibiteur général de la palmitoylation, indique que d'autres protéines palmitoylées sont nécessaires à l'association du récepteur avec les rafts. Ils proposent donc un modèle dans lequel la palmitoylation du récepteur régulerait son interaction avec une protéine partenaire, la palmitoylation de cette dernière étant requise pour l'association avec les rafts induite par la toxine. Il est tentant de proposer que l'interaction du récepteur avec cette protéine partenaire se produit lorsque le récepteur est dépalmitoylé, évènement qui serait déclenché par la liaison de la toxine.

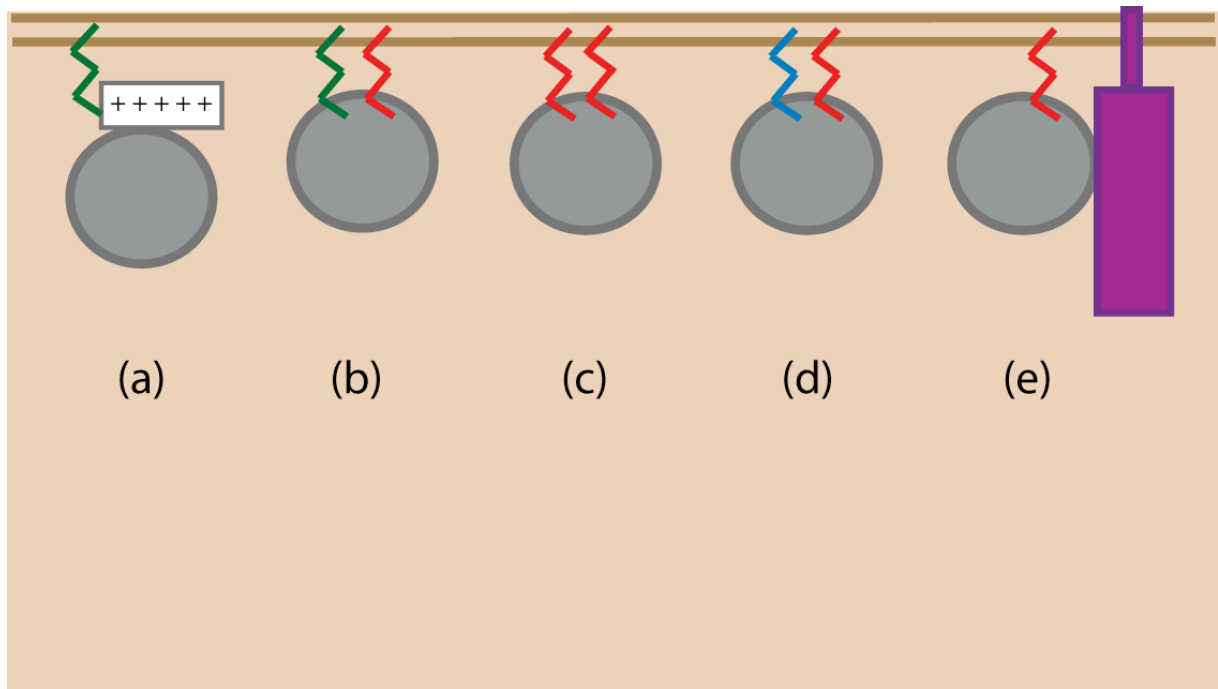


Figure 19. Modèle des « deux signaux » d'adressage aux membranes lipidiques des protéines.

Pour être stablement associées avec les membranes, les protéines ont besoin de deux signaux, l'un étant une modification lipidique (palmitoylation, myristoylation, prénylation) et l'autre soit une deuxième modification lipidique, soit un motif polybasique qui apporte des interactions électrostatiques avec les têtes des phospholipides chargées négativement sur la face interne des membranes. Ainsi, on trouve des protéines farnesylées accompagnées d'un motif polybasique, des protéines myristoylées accompagnées d'un motif polybasique **(a)**, des protéines myristoylées et palmitoylées **(b)**, des protéines doublement palmitoylées **(c)**, des protéines prénylées et palmitoylées **(d)** mais également, la stabilité à la membrane des protéines palmitoylées peut être apportée par l'interaction avec une autre protéine associée à la membrane **(e)**. La myristoylation est indiquée en vert, la palmitoylation en rouge et la prénylation en bleu.

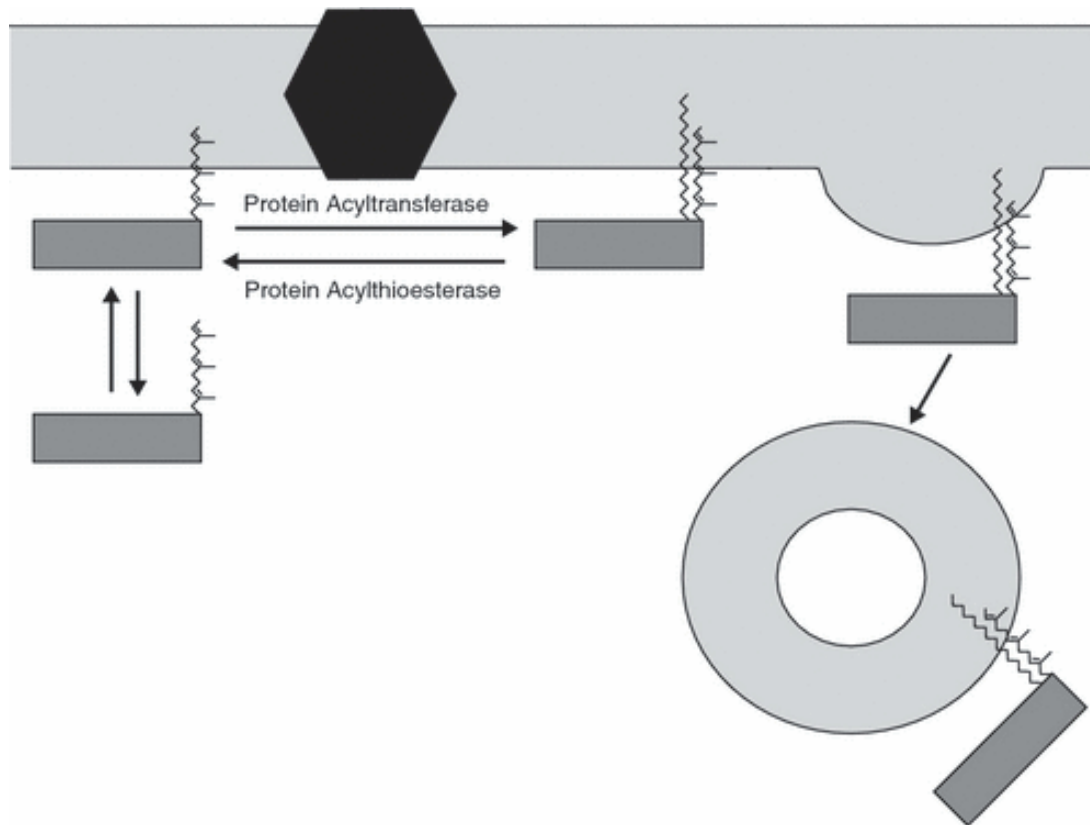


Figure 20. Modèle “Kinetic bilayer trapping” des protéines doublement modifiées par des lipides.

La protéine farnesylée (rectangle gris) interagit transitoirement avec les différentes membranes dans la cellule. Après rencontre avec la membrane contenant sa PAT (hexagone noir), la protéine farnesylée est palmitoylée et devient ainsi stablement associée avec ce compartiment. La protéine doublement “lipidée” se déplace vers les autres compartiments par transport vésiculaire (cercle gris clair). Des palmitoylthioestérases retirent le palmitate (non montré), la protéine farnesylée est de nouveau capable de se déplacer rapidement et librement entre les membranes. D’après Nadolski and Linder, 2007.

II.III.2 Rôle de la palmitoylation dans le trafic intracellulaire

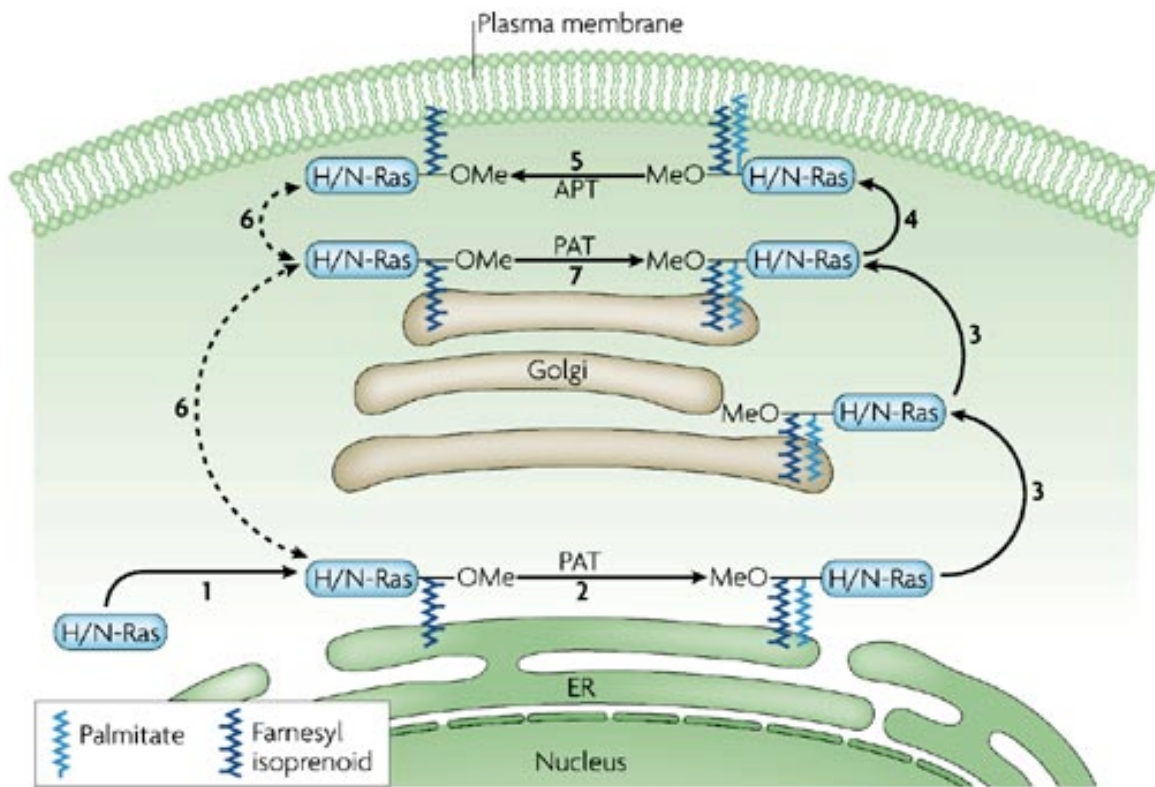
Il a souvent été décrit qu'un défaut de palmitoylation affecte le trafic intracellulaire des protéines, et cela peut se produire de manières diverses. Il est facile de comprendre le rôle que peut avoir la palmitoylation dans le trafic de par sa fonction initiale d'attachement aux membranes.

Comme il est décrit ci-dessus dans le modèle « kinetic bilayer trapping » (chapitre II.III.1.1, *Attachement aux membranes lipidiques*), la palmitoylation d'une protéine dans un compartiment donné l'ancre de façon stable dans ce compartiment, ou bien lui permet d'en partir par l'intermédiaire d'un transport vésiculaire. Ce phénomène est particulièrement bien illustré dans le cas des protéines Ras.

II.III.2.1 Rôle de la palmitoylation dans le trafic des protéines H-Ras et N-Ras

Les protéines Ras sont de petites GTPases qui régulent la croissance cellulaire et la différenciation. Les trois isoformes majeures de Ras, H-Ras, N-Ras et K-Ras, sont modifiées par farnesylation dans leur boîte CAAX C-terminale (Plowman and Hancock, 2005). Les Ras ainsi farnesylés sont ciblés vers le RE où le traitement post-prénylation a lieu, la séquence AAX est clivée et la cystéine C-terminale est carbométhylée. Les Ras sont alors capables de trafiquer librement entre les différentes membranes cellulaires, car elles ont besoin d'un deuxième signal de liaison aux membranes pour être stabilisées. Dans le cas de H-Ras et N-Ras, ce sera une palmitoylation, dans le cas de K-Ras un motif polybasique (Apolloni et al., 2000; Choy et al., 1999; Hancock et al., 1990).

H-Ras et N-Ras vont être palmitoylés dans le RE, et ensuite atteindre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique par transport vésiculaire. Une fois à la membrane plasmique, des palmitoyl thioesterases dépalmitoylent Ras, qui peut de nouveau circuler librement dans la cellule de manière non vésiculaire et retourne ainsi rapidement au RE (Goodwin et al., 2005). Ce modèle est illustré figure 21.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 21. Trafic des protéines H-Ras et N-Ras en fonction de leur statut de palmitoylation dans les cellules de mammifères.

(1) La farnesylation adresse H-Ras et N-Ras (H/N-Ras) au réticulum endoplasmique (ER), où a lieu la réaction de post-prénylation (carboxyméthylation). H/N-Ras farnesylé peut circuler rapidement vers les autres membranes ou (2) être palmitoylé par une PAT ce qui maintient H/N-Ras dans le réticulum endoplasmique. H/N-Ras doublement lipidé peut alors se diriger vers l'appareil de Golgi (3) et la membrane plasmique (4) via la voie de sécrétion vésiculaire classique. (5) Une fois à la membrane plasmique, l'action d'une palmitoylthioestérase (APT) retire le palmitate et permet ainsi à H/N-Ras farnesylé de circuler rapidement de manière non-vésiculaire (6) avec les endomembranes, notamment l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. (7) Une autre PAT potentielle peut retenir H/N-Ras farnesylé dans l'appareil de Golgi. Le cycle de dépalmitoylation–repalmitoylation est responsable du trafic dynamique Ras par voie vésiculaire (flèches pleines) et par voie non vésiculaire (flèches en pointillés). D'après Linder and Deschenes, 2006.

II.III.2.2 Rôle de la palmitoylation dans l'endocytose

Il a été démontré pour plusieurs protéines transmembranaires que la palmitoylation régule leur endocytose, le plus souvent négativement.

Le récepteur de la transferrine est palmitoylé au niveau des cystéines Cys⁶² et Cys⁶⁷. Des mutants dans lesquels ces deux cystéines ont été remplacées par des résidus sérine ou alanine montrent un taux d'endocytose accru, en revanche, les mutations n'ont aucun effet sur le recyclage (Alvarez et al., 1990).

Un autre exemple récent de régulation négative de l'endocytose par la palmitoylation est le récepteur de la toxine de l'anthrax. La toxine de l'anthrax est composée de trois peptides indépendants, PA, EF et LF. Les deux récepteurs du peptide PA, TEM8 et CMG2, sont palmitoylés et leur palmitoylation empêche leur localisation dans les rafts. Comme le récepteur de l'anthrax (un large complexe hétéro-oligomérique contenant les récepteurs des trois peptides) est internalisé par une voie qui dépend à la fois des rafts et de la clathrine, la palmitoylation de TEM8 et CMG2 empêche ainsi l'endocytose du complexe, de par sa fonction de « non-localisation » dans les rafts (Abrami et al., 2006).

Si la palmitoylation des protéines transmembranaires a le plus souvent un rôle stabilisateur et empêche l'internalisation, elle peut aussi la réguler positivement. C'est ce qui est observé pour CD44 et pour le récepteur Fas, qui sont internalisés par une voie dépendante des rafts. La palmitoylation joue ici un rôle majeur dans l'internalisation de par sa fonction d'adressage dans les rafts (Chakrabandhu et al., 2007; Thankamony and Knudson, 2006).

Le récepteur de l'AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate) est palmitoylé sur deux cystéines. La palmitoylation de la deuxième cystéine, localisée à la fin de la queue C-terminale, module l'endocytose induite par des agonistes. Ainsi, un traitement par l'AMPA ou le NMDA stimule l'internalisation du récepteur sauvage tandis qu'il n'a pas d'effet sur un mutant non palmitoylé sur cette cystéine (Hayashi et al., 2005).

II.III.2.3 Prévention de la dégradation lysosomale

Il a souvent été décrit qu'un défaut de palmitoylation induisait l'adressage des protéines dans les lysosomes. Le récepteur du mannose-6-phosphate cation dépendant (CD-M6PR) est palmitoylé sur deux cystéines, Cys³⁰ et Cys³⁴, et un mutant du récepteur sur le résidu Cys³⁴ s'accumule dans les lysosomes (Schweizer et al., 1996). Le récepteur de chimiokines CCR5 est palmitoylé sur trois résidus cystéines, Cys³²¹, Cys³²³ et Cys³²⁴ (Percherancier et al., 2001). Les mutations des trois cystéines aboutissent à une diminution de l'expression de surface du récepteur et à une demie-vie raccourcie, qui sont en fait dues à une dégradation accrue. En effet, contrairement au CCR5 sauvage, le triple mutant

non palmitoylé s'accumule dans les lysosomes lorsque les cellules sont traitées par des inhibiteurs des enzymes lysosomales. La sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2), une enzyme transmembranaire impliquée dans la production de céramide en réponse au stress, est palmitoylée de façon multiple sur deux groupes de cystéines (Tani and Hannun, 2007). La mutation de tous les sites de palmitoylation aboutit également à une demi-vie à la membrane raccourcie de nSMase2 et à un adressage vers les lysosomes. Il semble donc que la palmitoylation joue souvent un rôle protecteur important en évitant le trafic des protéines vers les lysosomes et leur dégradation.

Certaines études ont lié l'adressage aux lysosomes des protéines déficientes pour la palmitoylation à une augmentation de leur ubiquitination. L'ubiquitination est l'ajout d'un groupe ubiquitine sur les lysines cytoplasmiques des protéines membranaires par des ubiquitine ligases, cette modification a été impliquée dans l'endocytose des protéines de la membrane plasmique et dans leur dégradation par les lysosomes ou par le protéasome dépendant du type d'ubiquitination (Hicke and Dunn, 2003).

La première étude ayant établi un lien entre défaut de palmitoylation et ubiquitination a été réalisée dans la levure par le groupe de H. Pelham, qui a montré que Swf1 est la PAT de Snc1, Syn8 et Tlg1 (Valdez-Taubas and Pelham, 2005). Dans un mutant n'exprimant pas Swf1, *Swf1Δ*, Tlg1 s'accumule dans la vacuole (équivalent des lysosomes chez la levure), et Tlg1 est ubiquitiné par Tull1. En effet, dans un double mutant *Swf1Δ Tull1Δ*, Tlg1 est protégé de la dégradation. Un tel lien entre défaut de palmitoylation et ubiquitination a également été fait pour un récepteur transmembranaire humain, le récepteur de l'anthrax. L'étude de la palmitoylation de ce récepteur a montré qu'un mutant non palmitoylé possède une demi-vie beaucoup plus courte à la membrane plasmique que le récepteur sauvage (Abrami et al., 2006). Ce mutant a également un niveau basal d'expression plus bas, ce qui a conduit les auteurs à suspecter une dégradation accrue. Un traitement des cellules exprimant le récepteur sauvage ou muté par la leupeptine, un inhibiteur des enzymes lysosomales, aboutit à un fort effet protecteur pour le mutant et non pour le récepteur sauvage ; en immunofluorescence le traitement par la leupeptine permet de voir une accumulation du récepteur mutant dans les lysosomes tandis qu'il est indétectable autrement. Il apparaît donc que la palmitoylation du récepteur TEM8 de la toxine de l'anthrax le protège de la dégradation lysosomale. Ces auteurs ont également démontré que le mutant non palmitoylé était constitutivement ubiquitiné, ce qui a pour effet d'induire l'internalisation du récepteur et son adressage vers les lysosomes.

La palmitoylation de certaines cystéines semble ainsi prévenir le recrutement des ubiquitines ligases, et régule de cette manière la dégradation protéique via la voie lysosomale induite par l'ubiquitination.

II.III.2.4 Rôle de la palmitoylation dans le recyclage

Une étude publiée par Kinlough et al en 2006 rapporte un rôle de la palmitoylation dans le recyclage de la protéine MUC1 (Kinlough et al., 2006). MUC1 est une protéine transmembranaire exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales et qui a un rôle protecteur de la surface cellulaire, elle est palmitoylée sur deux résidus cystéine au niveau juxtamembranaire. Les auteurs ont d'abord étudié les capacités endocytiques de la protéine MUC1 sauvage ou mutée sur ces cystéines palmitoylées. Brièvement, ils ont pour cela réalisé une biotinylation de surface des cellules à 4°C, les ont incubées à 37°C pour permettre l'endocytose, ont décapé la biotine restée à la surface par traitement au MESNA (agent réducteur qui ne pénètre pas dans les cellules) et ont analysé la biotinylation des immunoprécipitats de MUC1. Ils ont pu ainsi observer que l'internalisation du mutant non palmitoylé était accrue, néanmoins, les résultats de ce test pouvaient aussi refléter un défaut de recyclage du mutant. Pour tester cette possibilité, ils ont répété cette expérience en incubant après le traitement au MESNA de nouveau les cellules à 37°C, avant de réaliser un deuxième décapage au MESNA. Après traitement des résultats, il est apparu que les taux d'endocytose étaient identiques pour les protéines MUC1 sauvages et mutantes, mais qu'en revanche le recyclage de la protéine MUC1 non palmitoylée était inhibée de moitié. Enfin, ils ont également montré que contrairement à la protéine sauvage, le mutant s'accumule dans des compartiments positifs pour Rab11, un marqueur de l'endosome de recyclage.

En conclusion, les résultats de cette étude indiquent un cas où la palmitoylation peut aussi être impliquée dans le recyclage des protéines transmembranaires.

II.III.2.5 Régulation de l'export du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi

Le récepteur de chimiokines CCR5 est palmitoylé sur les trois résidus cystéine Cys³²¹, Cys³²³ et Cys³²⁴ (Blanpain et al., 2001; Percherancier et al., 2001). Si une étude a impliqué la palmitoylation de CCR5 dans la prévention de sa dégradation par la voie lysosomale (Percherancier et al., 2001), une autre étude suggère qu'elle participe à son export à la membrane plasmique (Blanpain et al., 2001). En effet, à l'état basal, le triple mutant se retrouve très fortement accumulé à l'intérieur des cellules dans une région périnucléaire typique de l'appareil de Golgi. Il est possible que le défaut de palmitoylation de CCR5 aboutisse à une inhibition de l'export de son site présumé de palmitoylation, et qu'il en résulte une dégradation précoce.

La palmitoylation a aussi un rôle d'export à la surface pour d'autres récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), c'est par exemple le cas pour le récepteur opioïde-δ humain et le récepteur aux histamines H2 canin (Fukushima et al., 2001; Petaja-Repo et al., 2006). Les mutants non palmitoylés sont ainsi retenus dans des compartiments intracellulaires, principalement le RE ou le ERGIC (ER Golgi intermediate compartment), sites présumés de la palmitoylation des GPCRs.

Cette fonction de la palmitoylation a été montrée pour diverses protéines, dont récemment le co-récepteur LRP6 de la protéine Wnt. LRP6 est palmitoylé sur une cystéine juxtamembranaire, et un mutant non palmitoylé se trouve retenu dans le RE (Abrami et al., 2008). C'est également le cas de la chitine synthétase Chs3 (voir plus loin chapitre II.III.3 : *rôle de la palmitoylation dans la stabilité protéique*) (Lam et al., 2006).

Le récepteur de l'AMPA est palmitoylé sur deux cystéines. La première cystéine, localisée à la fin du TM2, est palmitoylée par GODZ, une PAT DHHC associée à l'appareil de Golgi. La palmitoylation du récepteur de l'AMPA sur cette cystéine induit son accumulation dans l'appareil de Golgi et inhibe son expression de surface (Hayashi et al., 2005). Il est probable que la dépalmitoylation du récepteur induite par ses ligands soit le signal déclencheur de son adressage à la surface cellulaire.

En conclusion, si la palmitoylation est souvent requise pour l'export des protéines, il y a aussi des situations où elle a pour fonction de retenir les protéines dans le RE et l'appareil de Golgi.

II.III.2.6 Recrutement dans des régions synaptiques spécifiques

Dans les neurones, pour transmettre le signal, les récepteurs doivent être recrutés dans une région nommée PSD (post-synaptic density). Les récepteurs de l'AMPA et du glutamate sont recrutés dans cette région par une protéine palmitoylée, PSD-95. La palmitoylation de PSD-95 est nécessaire au recrutement de ces récepteurs dans la PSD (Craven et al., 1999).

II.III.3 Rôle de la palmitoylation dans la stabilité protéique

La palmitoylation a souvent été impliquée dans la stabilité des protéines. Si ceci est particulièrement bien illustré par son rôle de prévention de la dégradation lysosomale (voir chapitre II.III.2, *Rôle de la palmitoylation dans le trafic intracellulaire*), d'autres cas font également état d'une fonction de régulation de la stabilité protéique.

La palmitoylation peut exercer cette fonction en tant que point de contrôle qualité, c'est ce qui se passe chez la levure pour la chitine synthétase Chs3. Chs3 est une protéine qui possède de 6 à 8 domaines transmembranaires. Lorsque la palmitoylation est bloquée, Chs3 forme des agrégats qui s'accumulent dans le RE. Il semble que la palmitoylation soit nécessaire pour permettre une conformation correcte de Chs3, étape indispensable à son export du RE (Lam et al., 2006). La palmitoylation de LRP6, co-récepteur de la protéine Wnt, est requise pour l'export du RE également par l'intermédiaire d'un contrôle qualité. La palmitoylation d'une cystéine juxtamembranaire aurait pour fonction de rabattre le long domaine transmembranaire de 23 acides aminés de LRP6 dans le plan

de la membrane, évitant ainsi un mis-appariement hydrophobe et la reconnaissance par la machinerie de contrôle qualité du RE (Abrami et al., 2008).

Si la palmitoylation régule le plus souvent positivement la stabilité des protéines, elle peut aussi la réguler négativement. C'est le cas de la protéine de levure Lcb4, une protéine soluble associée aux membranes par sa palmitoylation sur deux cystéines internes. Normalement, les niveaux de Lcb4 sont diminués lorsque les cellules entrent en phase stationnaire. Ceci n'a plus lieu lorsque la palmitoylation de Lcb4 est inhibée par mutation ou par délétion de sa PAT, Akr1 (Kihara et al., 2005).

II.III.4 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation

La palmitoylation des protéines peut influencer la signalisation dans des contextes divers. Le rôle de la palmitoylation dans les voies du signal a été particulièrement bien décrit dans le cadre des récepteurs immuns, mais également dans le cas des protéines G. Un rôle important de la palmitoylation dans la signalisation a également montré dans d'autres voies, telles que la signalisation de Fas. Enfin, les protéines Ras fournissent un exemple particulier dans lequel la palmitoylation influence la signalisation en régulant la localisation cellulaire.

II.III.4.1 Palmitoylation des récepteurs immuns

Ce sont les cascades de signalisation des récepteurs immuns dans les cellules hématopoïétiques qui illustrent le mieux l'importance de la palmitoylation des protéines dans la signalisation (Flaumenhaft and Sim, 2005). En immunologie, il est admis que l'ensemble des acteurs de la voie de signalisation doivent être redirigés dans les rafts, où ils peuvent alors interagir ensemble pour aboutir à une signalisation efficace. C'est à ce niveau précis que la palmitoylation jouerait un rôle important.

II.III.4.1.1 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation du récepteur des cellules T

La cascade de signalisation du récepteur des cellules T (TCR) est la suivante : lorsqu'un antigène présenté par le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) est reconnu par le TCR et ses co-récepteurs, CD4 ou CD8, cela induit l'activation des kinases SFKs (Src family of tyrosine kinases, incluant Lck et Fyn) qui phosphorylent des résidus tyrosines dans les ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), motifs d'activations présents sur les sous-unités ζ du TCR. Ces résidus phosphorylés recrutent ZAP70, une autre tyrosine kinase requise pour la signalisation du TCR. ZAP70 est alors activée par phosphorylation par Lck, et peut à son tour phosphoryler LAT (linker for activation of T cells). LAT est ensuite responsable du recrutement des protéines intervenant dans la signalisation (Grb2, phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), PI3K), aboutissant ainsi à l'activation en aval des voies de signalisation du TCR telles que la stimulation de Ras, la voie des MAPK (mitogen-activated protein-kinase), la signalisation par influx de Ca^{2+} , et la production d'interleukine 2.

Bien qu'aucune des sous-unités du TCR ne soit palmitoylée, la palmitoylation des co-récepteurs CD4 et CD8 ainsi que des autres molécules de signalisation en aval est requise pour une signalisation efficace (figure 22).

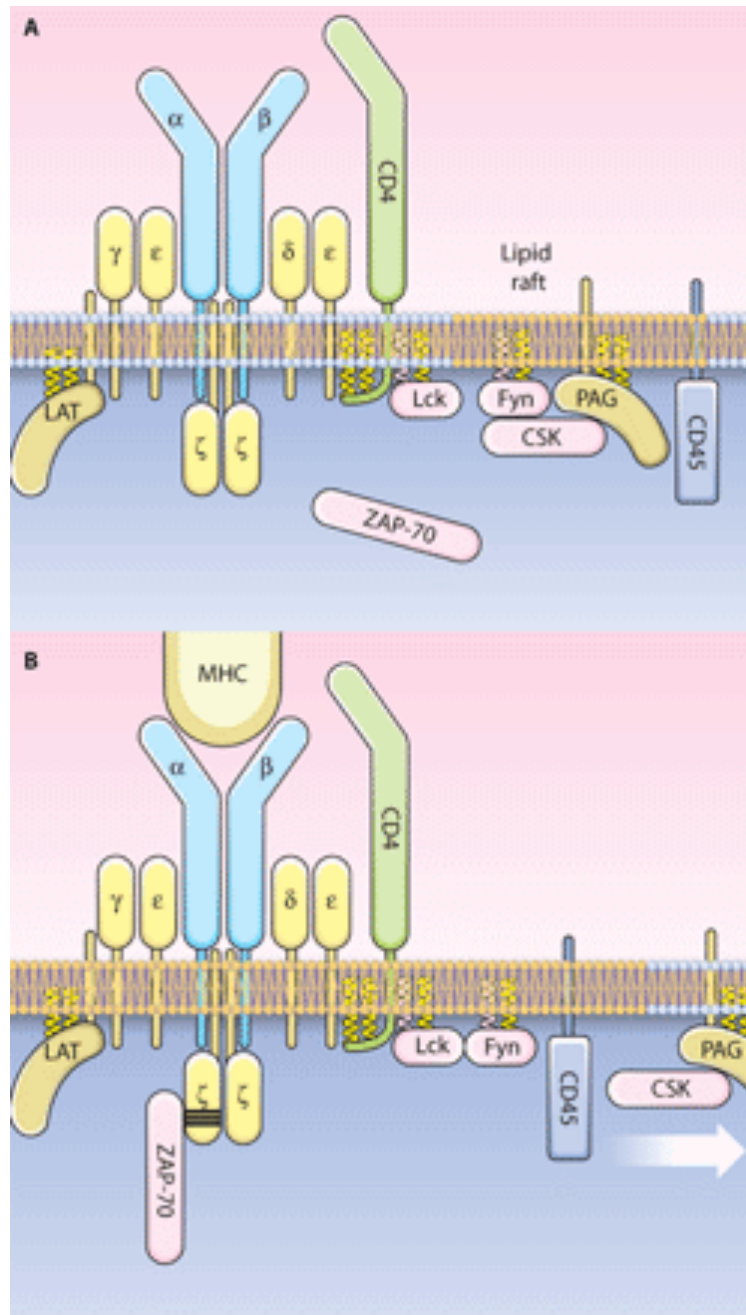


Figure 22. Implication des protéines palmitoylées dans les événements de signalisation précoce du TCR.

La phosphorylation des sous-unités du TCR par les SFKs (Lck et Fyn) myristoylées et palmitoylées génère un site de liaison pour le domaine SH2 de ZAP70, qui est recrutée sur les sous-unités ζ du TCR. ZAP-70 est phosphorylée et activée par les SFKs. Une fois activée, ZAP-70 phosphoryle la protéine LAT palmitoylée, générant ainsi des sites de liaison pour les domaines SH2 d'autres protéines de signalisation, incluant Grb2 et la PLC γ . (A), situation avant stimulation ; (B), situation après engagement du TCR avec le CMH. D'après Resh, 2006.

- *Co-récepteurs*

CD4 est palmitoylé sur deux cystéines, Cys³⁹⁶ et Cys³⁹⁹, au niveau juxtamembranaire. La palmitoylation de CD4 est requise pour sa localisation dans les rafts (Fragoso et al., 2003). CD8 est un hétérodimère composé des chaînes α et β . De la même manière, il a été montré que la palmitoylation de la chaîne CD8 β permettait la localisation du complexe CD8 $\alpha\beta$ dans les rafts (Arcaro et al., 2000).

- *SFKs*

Les SFKs Lck et Fyn sont des tyrosine kinases qui relaient le signal du TCR, elles sont liées aux membranes par un double signal myristoylation + palmitoylation. La double acylation des SFKs est nécessaire pour leur adressage à la membrane plasmique comme pour leur localisation dans les rafts, et l'inhibition de leur palmitoylation bloque la signalisation du TCR à des niveaux divers. De plus, la double acylation de Fyn est requise pour son association avec les ITAMS, et la double acylation de Fyn et de Lck pourrait faciliter le positionnement de leur domaine kinase et de leur domaine SH2 à proximité de la chaîne ζ du TCR (Kabouridis et al., 1997; van't Hof and Resh, 1999). Ce cas représente un exemple dans lequel la palmitoylation pourrait jouer un rôle dans les interactions protéine-protéine. Un fait particulier dans la palmitoylation des SFKs est le rôle joué par la nature de l'acide gras lié par S-acylation. Fyn peut être en effet S-acylé par le palmitoléate, le stéarate, l'oléate, ou par des acides gras polyinsaturés tels que l'arachidonate et l'eicosapentanoate. L'acylation de Fyn avec des acides gras saturés ou polyinsaturés induit des effets différents sur sa localisation et sa signalisation (Resh, 2006). L'attachement à Fyn d'acides gras saturés comme le palmitate ou le stéarate induit son insertion dans les rafts, probablement parce que les rafts sont composés d'acides gras saturés et sont organisés dans une phase liquide ordonnée. En revanche, la présence d'une double liaison induit une courbure dans les acides gras insaturés, ce qui rend leur insertion dans les rafts difficile. Les SFKs modifiées par des acides gras insaturés ne sont donc pas localisés dans les rafts, et ne peuvent donc pas induire certaines voies de signalisation spécifiques (influx de Ca²⁺, MAPK).

- *LAT*

LAT est une protéine transmembranaire à longue queue cytoplasmique, importante dans la transduction du signal du TCR. Elle est palmitoylée sur deux cystéines du domaine cytoplasmique, Cys²⁶ et Cys²⁹, au niveau juxtamembranaire. Les mutants de LAT non palmitoylés ne sont plus localisés dans les rafts et ne sont plus capables de relayer la signalisation du TCR, bien que ces faits soient débattus (Zhang et al., 1998; Zhu et al., 2005). De plus, la palmitoylation de LAT serait importante dans l'induction de l'anergie des cellules T, phénomène dans lequel ces cellules sont inactivées suite à une trop forte stimulation par un antigène (Hundt et al., 2006).

II.III.4.1.2 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation du récepteur des cellules B

Le contact du récepteur des cellules B (BCR) avec son antigène induit son association avec la SFK Lyn, et sa phosphorylation par cette dernière va induire la cascade de signalisation en aval. Dans certaines conditions, le BCR va aussi s'associer à un complexe de trois protéines, CD19/CD21/CD81. L'association du BCR avec CD19/CD21/CD81 induit la palmitoylation de CD81, ce qui stabilise cette association dans les rafts (Cherukuri et al., 2004), et permet d'augmenter l'intensité du signal de 1000 à 10000 fois. La palmitoylation de CD81 régule aussi son association avec certaines protéines adaptatrices (Flaumenhaft and Sim, 2005; Resh, 2006).

II.III.4.1.3 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation des récepteurs Fc

Les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines sont importants dans l'induction des réponses immunes. Comme le TCR et le BCR, ils dépendent aussi d'une SFK, Lyn, pour transduire le signal. Le FcεRI est le récepteur de haute affinité des IgE. Il induit la dégranulation des mastocytes, phénomène qui intervient dans l'allergie et les réponses inflammatoires. La myristoylation et la palmitoylation de Lyn sont requises pour sa capacité à phosphoryler FcεRI et à induire la transduction du signal (Honda et al., 2000). Un autre récepteur Fc, le FcγRIIB, induit la phagocytose des pathogènes suite à son interaction avec les immunoglobulines. L'association de FcγRIIB avec Lyn ainsi que l'activation de la signalisation sont dépendantes de la palmitoylation de Lyn et de sa localisation dans les rafts. Une autre isoforme, le FcγRIIA, est lui-même palmitoylé et sa palmitoylation est nécessaire à son recrutement dans les rafts ainsi qu'à sa capacité à induire la mobilisation du Ca²⁺ (Barnes et al., 2006).

Les rafts permettent de faciliter les interactions entre les protéines (discuté dans le chapitre II.III.1, *Attachement aux membranes lipidiques / relocalisation dans les rafts*). On peut donc conclure que la palmitoylation, de par son rôle d'association avec les rafts, facilite les interactions entre les différentes protéines impliquées dans le signal et permet ainsi l'induction de la voie de signalisation.

II.III.4.2 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation des GPCRs et des protéines G

II.III.4.2.1 Palmitoylation des récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) sont une superfamille de protéines à 7 domaines transmembranaires qui sont activés par des stimulations diverses, comme des neurotransmetteurs, des hormones, des chimiokines, des ions et des lipides. Plusieurs GPCRs sont palmitoylés sur des cystéines dans leur domaine C-terminal.

La palmitoylation des GPCRs est souvent requise pour un adressage correct de ces récepteurs à la surface cellulaire. Ainsi, certains mutants non palmitoylés des GPCRs sont retenus dans le RE ou

dans l'appareil de Golgi, qui sont leurs sites de palmitoylation. D'autres mutants non palmitoylés des GPCRs sont sujets à une dégradation accrue, c'est ce qui est observé par exemple pour CCR5 ou le récepteur de l'adénosine A1 (Gao et al., 1999; Percherancier et al., 2001). Il a été montré pour plusieurs GPCRs (récepteurs β -adrenergique, α_2 -adrenergique, m2 muscarinique acétylcholine, 5HT4A-serotonine et V1a vasopressine) que la stimulation par des agonistes augmente l'incorporation de palmitate tritié, ce qui peut refléter un plus grand turn-over du palmitate dans ces récepteurs (le palmitate froid étant remplacé par du palmitate tritié) (Hawtin et al., 2001; Hayashi and Haga, 1997; Kennedy and Limbird, 1994; Loisel et al., 1996; Ponimaskin et al., 2001; Qanbar and Bouvier, 2003).

Comment la palmitoylation peut-elle réguler la signalisation des GPCRs ?

Il est pensé que le défaut de signalisation observé dans les GPCRs déficients pour la palmitoylation serait dû simplement au défaut d'adressage de ces récepteurs à la membrane plasmique. Néanmoins, pour certains GPCRs, l'inhibition de la palmitoylation inhibe leur couplage aux protéines G (Hayashi and Haga, 1997; Moffett et al., 1993). Dans le cas de CCR5, il a été montré qu'un mutant non palmitoylé était moins bien capable d'induire la voie du relargage de calcium, et des tests de réponse par microphysiomètre (technique qui mesure des modifications de l'activité métabolique) montrent que le mutant non palmitoylé répond beaucoup moins bien et moins longtemps à l'activation déclenchée par son ligand MIP-1 β (Blanpain et al., 2001). La palmitoylation serait aussi un moyen d'empêcher la désensibilisation des GPCRs. Ainsi, dans le cas du récepteur β_2 -adrenergique, la palmitoylation régule l'accessibilité des sites de recrutement de la PKA (protéine kinase A). Quand le récepteur est dépalmitoylé, il devient un meilleur substrat pour la PKA qui peut alors le phosphoryler et induire ainsi sa désensibilisation (Moffett et al., 1993). Enfin, la palmitoylation régule la stabilité à la membrane plasmique de certains GPCRs en prévenant leur internalisation par l'intermédiaire de motifs d'endocytose, comme cela a été proposé pour le récepteur de la bradykinine B (Soskic et al., 1999).

Un autre niveau de la régulation de la signalisation des GPCRs par la palmitoylation se fait par l'intermédiaire des GRKs (G protein-coupled receptor kinases), une famille de kinases qui reconnaît les GPCRs activés par les agonistes. Les GPCRs phosphorylés par les GRKs se lient aux arrestines, ce qui induit la dissociation des protéines G et l'internalisation du récepteur. La palmitoylation des GPCRs régule leur association avec les GRKs. De plus, deux membres de la famille des GRKs, GRK4 et GRK6, sont palmitoylés. La palmitoylation de GRK6 a deux fonctions : son attachement à la membrane plasmique et l'augmentation de son activité kinase (Resh, 2006).

II.III.4.2.2 Palmitoylation des protéines G

Les protéines G transmettent le signal entre les GPCRs et leurs effecteurs. Pour cela, leurs sous-unités α et $\beta\gamma$ doivent être localisées sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Les sous-unités $\beta\gamma$ sont adressées à la membrane plasmique par la prénylation de γ , la sous-unité α par palmitoylation + myristoylation + association avec $\beta\gamma$. De plus, la palmitoylation de la sous-unité α augmente son affinité pour $\beta\gamma$.

La palmitoylation des sous-unités $G\alpha$ réduit leur affinité pour les RGS (regulator of protein G signaling), qui régulent négativement la signalisation des protéines G en hydrolysant le GTP. Les RGS sont aussi palmitoylés, pour certaines cela régule leur capacité à inhiber la signalisation des protéines G : pour RGS4 et RGS10, la palmitoylation peut exercer des effets inhibiteurs ou stimulateurs dépendant du site de palmitoylation, pour RGS16, la palmitoylation augmente son activité. La palmitoylation joue également un rôle additionnel dans l'adressage et la fonction des RGS : ainsi, RGS7 transite entre la membrane plasmique et le noyau en se liant à une protéine navette palmitoylée, R7BP. La dépalmitoylation de R7BP aboutit au relargage du complexe R7BP-RGS7 de la membrane plasmique et à sa translocation nucléaire, où se produisent probablement des fonctions de signalisation (Resh, 2006).

II.III.4.3 Rôle de la palmitoylation dans la signalisation de Fas

Le récepteur Fas (CD95/APO-1/TNFRSF6) fait partie de la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor). Son engagement avec son ligand, FasL, induit une cascade de signalisation qui aboutit à l'apoptose de la cellule. Après stimulation, Fas recrute FADD (Fas-associated death domain protein) et la procaspase-8 pour former le complexe de mort DISC (death-inducing signaling complex). Certaines études ont également montré que la stimulation de Fas peut aboutir à des voies de signalisation non-apoptotiques, comme la voie NF κ B ou la voie des MAPK (Barnhart et al., 2004; Legembre et al., 2004).

Pour pouvoir délivrer son signal apoptotique, Fas doit d'abord être recruté dans les rafts. L'engagement avec FasL induit sa connection avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de son association avec l'Ezrin, puis son internalisation, étape nécessaire pour la formation du complexe DISC et la mort cellulaire.

Chakrabandhu et al ont démontré que Fas était palmitoylé sur un résidu cystéine dans la région proximale de son domaine cytoplasmique (Chakrabandhu et al., 2007). Les Fas murins et humains sont tous deux palmitoylés, sur leur Cys¹⁹⁴ et Cys¹⁹⁹, respectivement. En mutant la cystéine palmitoylée, ils ont observé que la palmitoylation de Fas était requise pour l'apoptose induite par FasL, pour la localisation de Fas dans les rafts, pour son association avec l'Ezrin ainsi qu'avec le cytosquelette d'actine, et pour son internalisation.

Il apparaît donc qu'à travers son rôle dans l'adressage aux rafts, la palmitoylation joue un rôle important dans la signalisation apoptotique de Fas (figure 23).

Parallèlement à Chakrabandhu et al, Feig et al ont publié une étude montrant des résultats similaires et complémentaires (Feig et al., 2007). Ils suggèrent une étape additionnelle importante dans l'induction de la signalisation apoptotique de Fas, qui serait la formation de macrocomplexes moléculaires résultant de la forte oligomérisation du récepteur suite à la stimulation par le ligand. Ils démontrent également que la forme humaine de Fas est palmitoylée sur son résidu Cys¹⁹⁹, et que des mutants de ce résidu ne sont plus capables de former les macrocomplexes, détectés comme des agrégats de Fas résistants au SDS. Comme Chakrabandhu et al, ils observent que la palmitoylation de Fas est nécessaire à son internalisation et à l'induction de l'apoptose, et proposent que la formation des macrocomplexes serait une étape requise pour l'internalisation de Fas et l'activation de la voie de signalisation apoptotique. En revanche, ils ne constatent pas d'effet majeur de la palmitoylation de Fas dans l'adressage des macrocomplexes aux rafts.

Il semble donc que la palmitoylation de Fas puisse intervenir dans la signalisation de deux façons, qui ne sont pas mutuellement exclusives : la palmitoylation influence la formation de macrocomplexes de Fas et son adressage aux rafts. Il est probable que la localisation de Fas dans les rafts augmente sa capacité à s'oligomériser et à former ces macrocomplexes.

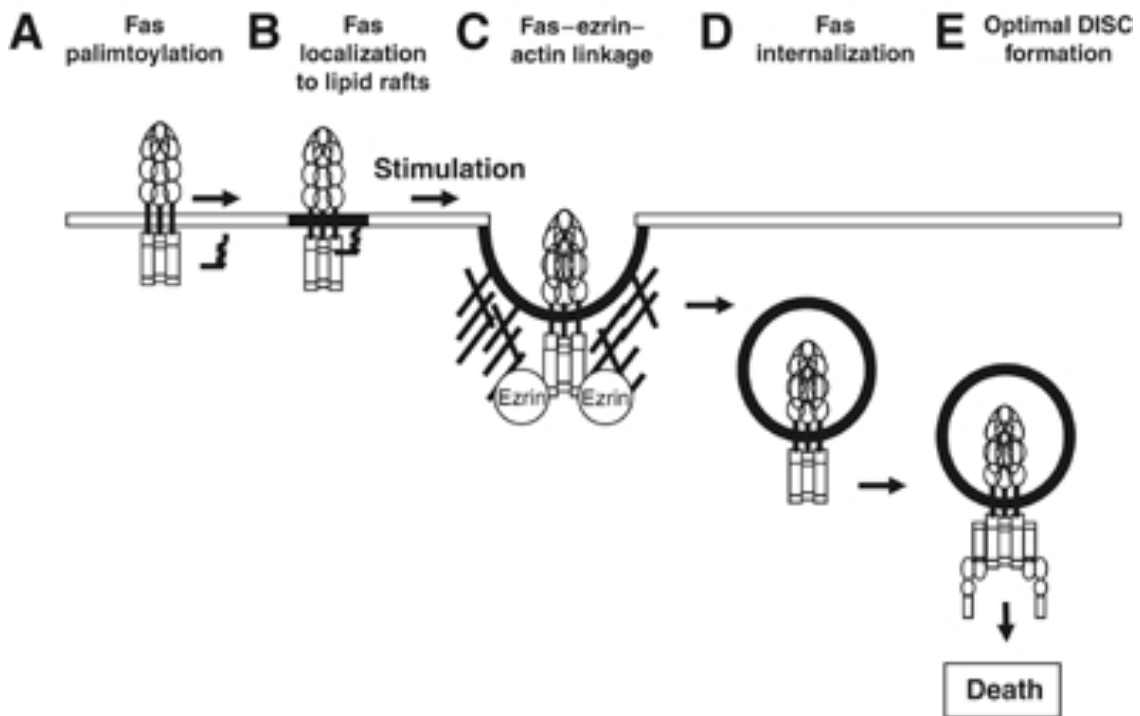


Figure 23. Représentation schématique de la signalisation apoptotique de Fas et du rôle de la palmitoylation.

La palmitoylation du récepteur Fas (A) permet son adressage dans les rafts (B) où, suite à la stimulation par FasL, la connection entre le récepteur Fas et le cytosquelette d'actine se produit via l'association de Fas avec ezrin (C). L'association avec le cytosquelette médiée par ezrin initie l'internalisation du récepteur (D), une étape requise pour la formation du complexe de mort DISC (E), ce qui induit l'activation des caspases et la mort cellulaire. D'après Chakrabandhu et al., 2007.

II.III.4.4 Palmitoylation des protéines Ras et signalisation

Nous avons vu chapitre II.III.2.1 : *Rôle de la palmitoylation dans le trafic des protéines H-Ras et N-Ras* que la palmitoylation régule le trafic de H-Ras et N-Ras entre la membrane plasmique et les endomembranes. Ainsi, Ras est depalmitoylée à la membrane plasmique et est ensuite internalisée par un mécanisme non vésiculaire pour rejoindre l'appareil de Golgi ou le RE, où elle est repalmitoylée. Les travaux de l'équipe de M. Philips ont montré que Ras, selon sa localisation (consécutive à son statut de palmitoylation), induit des voies de signalisation différentes et est également activée par des voies différentes. Localisées dans le RE ou l'appareil de Golgi, H-Ras et N-Ras signalent à travers la voie des MAPKs et sont activées par une voie dépendante de Src, de la PLC γ et du Ca²⁺. Dans le RE, H-Ras induit plutôt la MAPK Jnk, tandis que dans l'appareil de Golgi, H-Ras induit plutôt la MAPK Erk et Akt (indicateur de l'activation de la voie de la PI3K) (Chiu et al., 2002). Alors que le Ca²⁺ active Ras dans l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de RasGRP1, il désactive Ras à la membrane plasmique. Cette voie Src/PLC γ /RasGRP1 qui active Ras dans l'appareil de Golgi est distincte de la voie Grb2/SOS qui active Ras à la membrane plasmique (Bivona et al., 2003). Il est probable que par son rôle dans la régulation du trafic de Ras, la palmitoylation joue un rôle important dans l'induction de voies d'activation et de signalisation différentes.

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

Les IFNs de type I sont des cytokines qui jouent un rôle crucial dans les défenses antivirales et antitumorales, de ce fait, ils occupent une place important en thérapeutique. Néanmoins, dans un certain nombre de cas et en particulier dans certains types de cancers, les traitements s'avèrent inefficaces sans qu'on en connaisse la raison. Les modes d'actions des IFNs, notamment les voies de signalisations qu'ils induisent, sont relativement vastes et complexes, et il est important de mieux les connaître afin de pouvoir à l'avenir améliorer l'utilisation thérapeutique des IFNs.

L'objectif de ma thèse, ainsi que de mon équipe d'accueil, était d'identifier des mécanismes de régulation de la signalisation des IFNs. Mon laboratoire d'accueil s'intéresse en particulier au trafic intracellulaire, et au rôle du trafic des récepteurs aux IFNs dans la signalisation. Il a notamment montré que l'endocytose par la voie dépendante de la clathrine semble requise pour l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN- α .

Nous nous sommes demandés quelles pouvaient être les modifications post-traductionnelles des récepteurs susceptibles de jouer un rôle dans ces phénomènes. Nous nous sommes alors intéressés à la S-acylation, communément nommée palmitoylation, car il s'agit d'une modification lipidique aux fonctions variées qui est impliquée dans le trafic et dans la signalisation d'un certain nombre de protéines. Nous avons décidé de mener cette étude sur le récepteur de l'IFN de type I.

Les objectifs de mon projet de thèse étaient les suivants :

- Révéler si les sous-unités du récepteur de l'IFN de type I étaient palmitoylées,
- Identifier les résidus cystéine impliqués,
- Etudier le rôle de la palmitoylation sur le trafic du récepteur,
- Etudier le rôle de la palmitoylation sur la signalisation de l'IFN- α ,
- Etudier le rôle de la palmitoylation sur les effets biologiques de l'IFN- α

RESULTATS

RESULTATS

Au cours de ce travail de thèse, nous avons obtenu les résultats suivants :

- 1) Nous avons montré, par marquage métabolique au palmitate tritié (^3H -palmitate), qu'IFNAR1 et IFNAR2 étaient palmitoylées. Nous avons ensuite décidé de poursuivre cette étude sur IFNAR1, cette sous-unité jouant un rôle crucial dans la voie de signalisation JAK/STAT.
- 2) A l'aide de mutants sur les deux cystéines cytoplasmiques d'IFNAR1, nous avons identifié la Cys⁴⁶³ comme étant le seul résidu palmitoylé. Par la suite, nous avons utilisé un mutant dans lequel cette cystéine a été remplacée par une alanine afin d'étudier les rôles de la palmitoylation d'IFNAR1.
- 3) A l'aide d'analyses par microscopie à épifluorescence, microscopie confocale, et cytométrie de flux, nous avons montré que la palmitoylation d'IFNAR1 n'était requise ni pour sa distribution intracellulaire, ni pour son endocytose, ni pour sa stabilité à la membrane plasmique.
- 4) Nous avons montré que l'absence de palmitoylation d'IFNAR1 aboutissait à une forte inhibition de l'activation par phosphorylation de TYK2, de STAT1, et de la translocation nucléaire de pSTAT1 induite par l'IFN- α , indiquant un rôle important de la palmitoylation d'IFNAR1 dans la voie de signalisation JAK/STAT.
- 5) Nous avons observé que l'absence de palmitoylation d'IFNAR1 induisait une inhibition importante de l'activité transcriptionnelle induite par l'IFN- α .
- 6) En revanche, la présence ou l'absence de palmitoylation n'a aucun effet sur l'action antiproliférative de l'IFN- α .

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication soumise au journal *Journal of Biological Chemistry*, « *Palmitoylation of IFN- α receptor subunit IFNAR1 is not essential for receptor trafficking but is required for JAK/STAT signaling induced by IFN- α* », présentée p. 101. Des résultats supplémentaires non inclus dans l'article sont présentés dans la section « résultats complémentaires ».

Article

Palmitoylation of IFN- α receptor subunit IFNAR1 is not essential for receptor trafficking but is required for JAK/STAT signaling induced by IFN- α

Julie Claudinon, Emilie Beslard, Marta Marchetti, Keith Mitchell, Ludger Johannes, Pierre Eid et
Christophe Lamaze

PALMITOYLATION OF IFN- α RECEPTOR SUBUNIT IFNAR1 IS NOT ESSENTIAL FOR RECEPTOR TRAFFICKING BUT IS REQUIRED FOR JAK/STAT SIGNALING INDUCED BY IFN- α

Claudinon, Julie^{1,2}, Emilie Beslard^{1,2}, Marta Marchetti^{1,2}, Keith Mitchell^{1,2}, Ludger Johannes^{1,2}, Pierre Eid³ and Christophe Lamaze^{1,2}

From ¹Institut Curie, Centre de Recherche, Laboratoire Trafic, Signalisation et Ciblage Intracellulaires, 75248 Paris Cedex 05, France ; ²CNRS UMR144, ³INSERM U542, Université Paris-Sud, Hôpital Paul Brousse, 94807 Villejuif, France.

Running head: IFNAR1 palmitoylation

Address correspondence to: Christophe Lamaze; Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. Tel: 00-331-562-463-51; Fax: 00-331-562-465-07; E-mail: christophe.lamaze@curie.fr
Pierre Eid; , Hôpital Paul Brousse, 94807 Villejuif, France 14 avenue Paul Vaillant-Couturier, France. Tel: 00-3314-559-5325; Fax: 00-3314-559-5343; E-mail: Pierre.eid@inserm.fr

Type I interferons (IFNs) bind IFNAR receptors and activate Jak kinases and Stat transcription factors to stimulate the transcription of genes downstream from IFN-stimulated response elements (ISRE). In this study, we analyze the role of protein palmitoylation, a reversible posttranslational lipid modification, in the functional properties of IFNAR. We report that pharmacological inhibition of protein palmitoylation results in severe defects of IFN receptor endocytosis and signaling. We generated mutants of IFNAR1, a subunit of the type I IFN receptor, in which each or both of the two cysteines present in the cytoplasmic domain are replaced by alanines. We show that cysteine 463 of IFNAR1, the most proximal of the two cytoplasmic cysteines, is palmitoylated. A thorough microscopic and biochemical analysis of the palmitoylation-deficient IFNAR1 mutant revealed that IFNAR1 palmitoylation is not required for receptor endocytosis, correct intracellular distribution, or stability at the cell surface. However, the lack of IFNAR1 palmitoylation results in major defects in Jak/Stat signaling and IFN- α -activated gene transcription. Thus, receptor palmitoylation is a previously undescribed mechanism of regulating signaling activity by type I IFNs in the Jak/Stat pathway.

Type I interferons (IFN α/β) are potent cellular mediators essential for several key cell functions including immunomodulatory, antiviral and antiproliferative activities. These pleiotropic effects occur through the transcriptional regulation of many IFN-stimulated genes (ISGs) (1). IFN signal transduction relies mainly on the activation of the Janus tyrosine kinase (Jak) / signal transducing activators of transcription

(Stat) pathways, although several other signaling cascades have also been associated with IFN-regulated transcription (2,3). In general, the binding of type I IFNs to the cell surface receptor IFNAR1 and IFNAR2 subunits induces tyrosine phosphorylation *in trans* of the IFNAR-associated Jak kinases (Tyk2 with IFNAR1 and Jak1 with IFNAR2), which in turn leads to IFNAR tyrosine phosphorylation. Several members of the Stat family can be activated by type I IFNs, and Stat1 and Stat2 are the main downstream effectors of the type I IFN transcriptional response. Recruitment of cytosolic Stat1 to tyrosine phosphorylated IFNAR1 is required for its tyrosine phosphorylation by the Jak tyrosine kinases, Stat 2 is preferentially recruited to IFNAR2 whether or not IFNAR2 is tyrosine phosphorylated. Indeed, Stat2 serves as an adaptor to recruit Stat1 either to IFNAR2 for activation or to IRF9 to form the IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) complex. This series of sequential tyrosine phosphorylations precedes the translocation of the ISGF3 complex to the nucleus where it activates gene transcription from promoters containing an IFN-stimulated response element (ISRE) (4,5).

Recent data indicate that signal transduction through the Jak/Stat pathway cannot fully account for the diversity and complexity of the biological response elicited by type I IFNs (6), and that other factors, for example receptor configuration and alternate signaling pathways have to be considered. We recently showed that endocytosis plays an important role in the control of IFN- α signaling and biological activity (7). Little is known about the potential links between membrane trafficking and the control of the Jak/Stat signaling pathway, and the contribution of IFNAR trafficking to IFN signaling is just beginning to be appreciated (8). To study this

poorly investigated aspect of IFN signaling, we examined the role, if any, of receptor palmitoylation. Palmitoylation is a reversible lipid modification involving the specific attachment of a saturated fatty acid chain to cysteines via a thioester bond. Palmitoylation is among the most prevalent posttranslational modifications found on the cytoplasmic face of transmembrane proteins. Various functions have been proposed for protein palmitoylation although the mechanism by which it works remains to be established (9,10). Palmitoylation controls the stability of several proteins, including CCR5, yeast SNAREs, the anthrax toxin receptor, and the neutral sphingomyelinase 2, by promoting their ubiquitination and thereby their targeting to lysosomal degradation (11-14). In hematopoietic cells and lymphocytes, palmitoylation regulates signal transduction by promoting the association of the signaling molecules with lipid microdomains and by regulating protein-protein interactions (15). The chemokine receptor CCR5 and Fas are receptors whose palmitoylation is required for the induction of efficient signaling (16,17). Finally, palmitoylation is involved in various trafficking events including export from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus and recycling to the plasma membrane (16,18,19).

We investigated whether palmitoylation contributes to IFNAR1 trafficking and IFN- α induced signaling. We report that IFNAR1 is palmitoylated on cysteine 463, and although this modification has no major effect on IFNAR1 cellular trafficking, it strongly affects Jak/Stat signaling and the gene transcription induced by IFN- α .

EXPERIMENTAL PROCEDURES

IFNs and antibodies- Recombinant human IFN- α 2b (specific activity of 10^8 U/mg) from (Biosidus, Argentina) was kindly provided by J. Wietzerbin. Mouse anti-IFNAR1 mAb 34F10 and 64G12 and mouse anti-IFNAR2 mAbs 8F11 and 10E10 were described in (20). Mouse anti-IFNAR1 mAb AA3 and EA12 were a kind gift from Biogen (Boston, MA). Rabbit anti-phospho-Stat1 (Tyr701), anti phospho-Tyk2, anti-Stat1 and anti-tyk2 pAb were from Cell Signaling Technology. Rabbit anti-Lamp2, goat anti-EEA1, goat anti-calnexin and rabbit anti-rab6 were from Santa Cruz. Secondary antibodies were goat Alexa 488-conjugated anti-

mouse pAb, goat Cy3-conjugated anti-mouse pAb, goat Cy3-conjugated anti-rabbit pAb, donkey Cy3-conjugated anti-goat pAb, donkey HRP-conjugated anti-mouse pAb and donkey HRP-conjugated anti-rabbit pAb (Jackson ImmunoResearch).

Parental Plasmids and Mutagenesis- Wild-type human IFNAR1 was expressed from pEFIREShyg derived from pIRESHyg as described in (20). Mutagenesis of the IFNAR1 receptor chain was performed using the QuickChange site directed mutagenesis kit (Stratagene, Amsterdam). Plasmids from each bacterial colony were screened by restriction enzyme digestion and the accuracy of all cDNA was confirmed by DNA sequencing.

Cell Culture and transfection- L929R2 murine fibroblasts stably expressing human IFNAR2 (20) were transfected by wild-type or mutated forms of human IFNAR1 using FuGene6 (Roche). Mixed populations of transfected cells were selected under hygromycin selective pressure. The generated cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin 400 μ g/ml hygromycin and 1.5 mg/ml geneticin.

Drugs treatment- Palmitoylation was inhibited by incubating the cells with 100 μ M 2-bromopalmitate for 1h at 37°C before starting the experiments. Chemical removal of palmitoylation was performed by treating cell extracts with 1 M hydroxylamine pH 7 for 1h at room temperature. Protein synthesis was inhibited by a 1h treatment with 50 μ M cycloheximide at 37°C.

Immunoprecipitations- 40 X 10^6 cells were detached with PBS/EDTA 2 mM, lysed 30 min in immunoprecipitation buffer (1% Triton X-100, 40 mM TRIS pH 7.8, 10mM NEM, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and a cocktail of proteases inhibitors). Cell lysates were centrifuged for 30 min at 14000g, and supernatants were incubated overnight at 4°C on protein G sepharose beads (Amersham Biosciences) with 2.5 μ g of EA12 mAb for IFNAR1 or 2.5 μ g 8F11 mAb for IFNAR2. After washing of the beads, samples were boiled for 5 min before being analyzed by Western-blotting using 64G12 mAb for detecting IFNAR1 or 10E10 mAb for detecting IFNAR2.

Metabolic labeling with 3 H-palmitate- Cells were first starved for 1h in serum-free medium, then incubated for 4h at 37°C in DMEM containing 0.2% BSA with 200 μ CI/ml 3 H-palmitic acid

[9,10-³H]; American Radiolabeled Chemicals), washed, and were immunoprecipitated for IFNAR1 or IFNAR2. After fixation, (25% isopropanol, 65% H₂O, and 10% acetic acid), membranes were incubated for 30 min in enhanced Amplify NAMP100 (GE Healthcare), dried, and exposed for 3 weeks to a hyperfilm Multipurpose (GE Healthcare).

Immunofluorescence microscopy- For analysis of IFNAR1 endocytosis, cells grown on coverslips were incubated on ice with the 34F10 antibody for 30 min. Cells were then incubated at 37°C for 30 min, washed and fixed using PFA 4%, permeabilized with saponin treatment, and endocytosed antibody/IFNAR1 complexes were revealed with Cy3-conjugated anti-mouse antibody. Cells were imaged with an epifluorescent Leica microscope. For analysis of IFNAR1 intracellular co-localization experiments, cells were first fixed, then permeabilized, and incubated simultaneously with 34F10 and either anti-EEA1, anti-Rab6, anti-Rab11 or anti-lamp2 antibodies as indicated. Secondary Alexa488-conjugated anti-mouse antibody was used to reveal IFNAR1, Cy3-conjugated anti-goat antibody was used to reveal EEA1 and Cy3-conjugated anti-rabbit antibody was used to reveal Rab6, Rab11 and Lamp2. Cells were imaged with a confocal Leica microscope.

IFN-induced activation of Tyk2 and Stat- Cells were treated with or without 1000 U/ml IFN- α 2b at 37°C for the indicated times. For biochemical analysis, cells were washed with PBS at 4°C and lysed in SDS sample buffer. Total lysates were resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blot/ECL for activated Tyk2 using anti-pTyk2 or activated Stat1 using anti pStat1 antibody. Anti-Tyk2 and anti-Stat1 antibodies were used to determine the total amount of Tyk2 and Stat1. For immunofluorescent analysis of pStat1 nuclear translocation, cells grown on coverslips were treated with IFN- α 2b at 37°C for 30 min and fixed with cold methanol at -20°C for 10 min. pStat1 was then stained by successive incubations with anti-phosphoStat1 and Cy3-conjugated anti-rabbit antibodies.

Flow cytometry- Cells were detached with PBS/EDTA 2 mM and stained with AA3 antibody for 40 min in FACS buffer (phosphate-buffered saline supplemented with 3% fetal calf serum and 0.05% sodium azide) on ice. Goat anti-mouse alexa-488 conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch) was used as secondary antibody. Dead cells were excluded

by gating on forward/side light scatter. Events corresponding to 2 X 10⁴ gated cells were accumulated per sample. Flow cytometry was performed on a FACScalibur machine and data analyzed by CellQuest software (BD Biosciences).

Luciferase Reporter Assay- L929R1R2 cells were transfected with an ISG54-luciferase construct kindly provided by S. Pellegrini using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 48h, cells were treated with 1000 U/ml of IFN- α 2b for 8 h. Luciferase activity was quantified in cell lysates using a luminometer (Lumat LB9501, Berthold, Wildbald, Germany), and results were reported to the quantity of proteins as quantified with the Bradford method. Results were expressed as the ratio to the basal activity without IFN stimulation.

RESULTS

IFNAR1 endocytosis and IFN- α induced Jak/Stat signaling depend on palmitoylation events. We recently showed that IFNAR1 uptake at the plasma membrane proceeds through classical clathrin- and dynamin-dependent endocytosis: inhibition of IFNAR1 endocytosis by either siRNA downexpression of clathrin or inactivation of the GTPase dynamin by the dominant negative mutant K44A, inhibits both activation of the Jak/Stat signaling pathway and the antiviral and antiproliferative activities otherwise promoted by IFN- α (7). Based on previous studies of the contribution of palmitoylation to the regulation of membrane trafficking (13,21) and cell signaling pathways (15,16,17), we tested whether palmitoylation is involved in IFNAR1 endocytosis and IFN- α signaling. We first analyzed the effects of 2-bromopalmitate, a drug which blocks protein palmitoylation (Fig. 1A, left panel) (22). IFNAR1 is rapidly endocytosed and reaches the recycling compartment within 30 ss as previously reported (7). However, preincubation of cells with 100 μ M 2-bromopalmitate, strongly inhibited IFNAR1 endocytosis, and no IFNAR1 subunits were detected in the recycling compartment (Fig. 1A, right panel); this implicates palmitoylation in IFNAR1 endocytosis. We tested the effect of 2-bromopalmitate on the Jak/Stat signaling pathway activated by IFN- α , a process dependent on IFNAR1 endocytosis (7). Upon IFN- α binding, the Jak kinases associated to

IFNAR are activated by tyrosine phosphorylation, resulting in the phosphorylation of tyrosine 701 of Stat1. In L929R1R2 cells, tyrosine phosphorylation of Stat1 (pStat1) was complete after 10 min of stimulation with 1000U/ml IFN- α (Fig. 1C). Treatment with 2-bromopalmitate inhibited tyrosine phosphorylation of Stat1 in a dose-dependent manner with a maximum effect at 100 μ M. We also analyzed later steps of the Jak/Stat signaling pathway by testing for pStat1 in the nucleus (Fig. 1B, left panel). pStat1 accumulated in the nuclei of control cells after 30 min of IFN- α stimulation but not in the nuclei of cells treated with 100 μ M 2-bromopalmitate (Fig. 1B, right panel). Thus, IFNAR1 endocytosis and IFN- α -dependent Jak/Stat signaling require protein palmitoylation.

The IFNAR1 and IFNAR2 subunits of IFNAR are palmitoylated independently of IFN stimulation. We analyzed whether the type I IFN receptor subunits IFNAR1 and IFNAR2 were themselves palmitoylated. IFNAR1 and IFNAR2 were immunoprecipitated from lysates of 3 H-palmitic acid labeled L929R1R2 cells. Radiolabeled bands corresponding to both IFNAR1 and IFNAR2 were detected (Fig. 2A), with a stronger signal for IFNAR2. The difference of band intensity was probably due to the higher level of IFNAR2 than IFNAR1 expression in this cell line (20). A similar experiment with a Jurkat cell line expressing a Flag-tagged IFNAR1 showed that IFNAR1 was palmitoylated in this human lymphoid cell line also (data not shown). The two IFN- α receptor subunits are required for IFN- α activity, however IFNAR1 is essential for IFN- α -induced signaling and IFNAR2 is more involved in IFN- α binding; we focused therefore our analysis on IFNAR1 (23).

Several studies have reported an inducible cycle of palmitoylation and depalmitoylation. For example, stimulation of the β -adrenergic receptor by isoproterenol increases the binding of 3 H-palmitic acid reflecting a higher turn-over of bound palmitate whereas it induces the depalmitoylation of the G α subunits associated with the receptor (24,25). The association of the CD19/CD21/CD81 complex with the activated B cell antigen receptor (BCR) induces palmitoylation of CD81, thereby enhancing the stability of this association (26). Also, 17- β estradiol reduces the palmitoylation of the estradiol receptor in a time- and dose-dependent manner (27). This prompted us to investigate

whether IFN treatment regulates the turnover of palmitate on IFNAR1. However, stimulation of the cells with either IFN- α or IFN- β for one hour prior to and during radiolabeling with 3 H-palmitic acid had no effect on the quantity of palmitate bound to IFNAR1 (Fig. 2B), indicating that IFNAR1 palmitoylation turnover is independent of IFN binding.

IFNAR1 is palmitoylated on cysteine 463. We found that IFNAR1 palmitoylation occurs on cysteine residues via a thioester bond since hydroxylamine, which cleaves the thioester bond, removed the 3 H-palmitic acid incorporated in IFNAR1 (Fig. 3A). The cytoplasmic domain of IFNAR1 contains only two cysteines, at positions 463 and 502, that are likely to be palmitoylated. To determine which cysteines are palmitoylated, we mutated each of them to an alanine in single (AC and CA) and double (AA) mutants (Fig. 3A). We transfected L929R2 cells with either the wild-type form of human IFNAR1 or each of the three mutants. Mixed populations of transfected cells were generated, and mutant cell lines expressing levels of cell-surface IFNAR1 and IFNAR2 similar to that in cells expressing the wild-type subunits, as determined by flow cytometry, were used for metabolic labeling with 3 H-palmitic acid. The CA mutant incorporated as much palmitate as the wild type (Fig. 3B); in contrast, the AC mutant, carrying the cysteine 463 to alanine mutation, did not show any radioactive signal. Similarly, the double mutant AA showed no incorporation of 3 H-palmitic acid. Thus, IFNAR1 is palmitoylated on cysteine 463 but not on cysteine 502. This is in agreement with previous reports that transmembrane proteins are mostly palmitoylated on cysteine residues in close proximity to the plasma membrane, and near stretches of hydrophobic acids (28), an environment corresponding to that of the cysteine 463.

IFNAR1 palmitoylation is not required for receptor endocytosis or intracellular distribution. Next, we examined the effect of IFNAR1 palmitoylation on the functional properties of IFNAR. For several proteins, a lack of palmitoylation results in various trafficking defects including reduced export from the Golgi apparatus, accumulation in lysosomes and defective recycling to the plasma membrane (13,14,16,19). Therefore, we investigated whether IFNAR1 palmitoylation regulates any of the steps of IFNAR1 intracellular trafficking. We first examined the intracellular distribution

of wild-type and palmitoylation-deficient IFNAR1 (AC mutant) by colocalization studies with markers of various intracellular compartments including early endosomes (EEA1), the Golgi apparatus (Rab6), recycling endosomes (Rab11), and lysosomes (Lamp2; Fig. 4). The wild-type and the AC mutant displayed the same pattern of intracellular distribution: both localized mostly in early endosomes and to a lesser extent in Rab11-positive recycling compartments. The finding that the intracellular distribution of IFNAR1 was not modified at steady state by the absence of palmitoylation suggested that it does not play a major role in the secretory or in the intracellular trafficking pathways followed by IFNAR1. We tested whether IFNAR1 palmitoylation was required for IFNAR1 uptake from the plasma membrane. Indeed, a lack of protein palmitoylation has been associated with abnormalities in endocytosis in a number of cases (13,21). The endocytic characteristics of IFNAR1 were investigated as described in (7). Cells were incubated at 4°C with an anti-IFNAR1 antibody, and the uptake of the IFNAR1-antibody complexes was examined by immunofluorescence after 30 minutes of endocytosis at 37°C. The patterns of IFNAR1 uptake of the wild-type and the non-palmitoylated AC mutant were similar (Fig. 5A) suggesting that IFNAR1 endocytosis was not dependent on IFNAR1 palmitoylation. This was further confirmed by flow cytometry measurement of IFNAR1 uptake: the rate and extent of IFNAR1 endocytosis at early time points were identical for the wild-type and the AC mutant cell lines (Fig. 5B).

There are reports that a loss of palmitoylation may lead to ubiquitination resulting in increased lysosomal degradation. Tlg1 was the first described example of a yeast protein for which palmitoylation prevents interaction with the ubiquitin ligase Tull1, and thereby prevents its ubiquitination and targeting to the vacuole (12). Palmitoylation inhibits ubiquitination of the anthrax receptor by preventing its association with lipid rafts (13). Recently, Fuchs and collaborators have identified the SCF^{βTrep} as an E3 ubiquitin ligase that mediates IFNAR1 ubiquitination and degradation (29,30). We therefore investigated whether the palmitoylation-deficient IFNAR1 mutant would show increased degradation as a result of enhanced ubiquitination. We measured the half-life of IFNAR1 at the surface of cells stimulated

with IFN- α in the presence of cycloheximide to prevent the neosynthesis of IFNAR1 receptors. The kinetics of disappearance of cell surface IFNAR1 subunits was measured by flow cytometry in both cell lines: after 180 minutes of IFN stimulation, there was a 30% decrease in the amount of IFNAR1 subunit present at the cell surface of both cell lines (one expressing the wild-type and the other the non-palmitoylated AC mutant IFNAR1). Thus, IFNAR1 was not downmodulated further by the absence of IFNAR1 palmitoylation (Fig. 5C).

These various experiments demonstrate that IFNAR1 palmitoylation is not required for IFNAR1 endocytosis, intracellular distribution or stability at the plasma membrane.

IFNAR1 palmitoylation is required for the activation of the Jak/Stat signaling pathway by IFN- α . Our initial experiment with 2-bromopalmitate indicated that protein palmitoylation was required for IFN- α induced Jak/Stat signaling. We tested whether palmitoylation of IFNAR1 itself was necessary for IFN- α -induced signaling. IFN- α binding to its receptor triggers the activation of IFNAR1-bound Tyk2 kinase by tyrosine phosphorylation, followed by the recruitment of Stat1 to IFNAR1 and phosphorylation of tyrosine 701 of Stat1. In cells expressing wild-type IFNAR1, Tyk2 activation (pTyk2) was detected within 5 minutes of IFN- α stimulation, was maximal after 10 minutes, and decreased thereafter (Fig. 6A). The activation of Stat1 followed the same kinetics: maximal pStat1 after 10 minutes of IFN- α stimulation and a decrease thereafter. In cells expressing the AC mutant, we did not detect any significant activation of either Tyk2 or Stat1 (Fig. 6A & 6B).

We next investigated the effect of the absence of IFNAR1 palmitoylation on later steps of the Jak/Stat signaling pathway, and in particular the translocation of activated Stat1 to the nucleus. Cells expressing wild-type IFNAR1 or the AC IFNAR1 mutant were stimulated with IFN- α for 30 minutes, and immunofluorescence used to test for pStat1 translocation to the nucleus. Cells expressing wild-type IFNAR1 showed a substantial, albeit heterogeneous, translocation of pStat1 to the nucleus, whereas the amount of pStat1 translocated in cells expressing the AC IFNAR1 mutant was about 60% lower (Fig. 6C). Therefore, palmitoylation of IFNAR1 is required for full activation of the Jak/Stat signaling pathway induced by IFN- α .

Gene transcription specifically induced by IFN- α is strongly impaired in cells expressing the palmitoylation-deficient IFNAR1 mutant. We next analyzed whether the Jak/Stat signaling defects in the AC IFNAR1 mutant affect the transcriptional activity of IFN- α . The transcription of type I interferon stimulated genes depends on the binding of the ISGF3 complex to IFN-stimulated response element (ISRE). We analyzed the transcription of ISRE element-containing genes by transfecting cells expressing wild-type or palmitoylation-deficient IFNAR1 with an ISRE-luciferase reporter construct, and we measured the luciferase activity 8 hours after IFN- α stimulation as described in (7). The transcriptional activity induced by IFN- α in cells expressing the AC IFNAR1 mutant was more than 60% lower than that in the wild-type controls (Fig. 7). These findings are consistent with those for Stat1 activation and nuclear translocation, and confirm the major role of IFNAR1 palmitoylation in IFN- α signaling.

DISCUSSION

Our study demonstrates that the IFN- α receptor subunits IFNAR1 and IFNAR2 are palmitoylated. Cysteine 463, the more proximal of the two cysteines present in the cytoplasmic domain of IFNAR1, is palmitoylated consistent with previous studies showing a preferential linkage of palmitate to cysteines that are next to the cytoplasmic end of the transmembrane domain, which in the case of IFNAR1 encompasses the amino acids 437-457. Accordingly, a palmitoylation site prediction program computing several palmitoylation sites gave a higher probability for the palmitoylation of cysteine 463 than that of cysteine 502 (31).

IFNAR1 being essential in IFN- α signaling, we investigated the effects of IFNAR1 palmitoylation in the functions of the IFN- α receptor by examining the established consequences of this common posttranslational lipid modification of proteins. Protein palmitoylation has effects on a broad range of activities that include protein trafficking, membrane association, protein stability, protein aggregation into lipid microdomains, and regulation of signaling (32). IFNAR1 endocytosis was strongly inhibited by the treatment with 2-bromopalmitate (a general inhibitor of palmitoylation), but the palmitoylation-deficient IFNAR1 mutant did not

show any obvious abnormality of endocytosis or intracellular distribution. Presumably, palmitoylation of proteins other than the receptor itself is involved in IFNAR1 trafficking. It is interesting to consider the potential role of the second IFN- α receptor subunit, IFNAR2 that we also show to be palmitoylated. IFNAR2 is the subunit that presents the highest affinity for IFN- α , and the current model is that the primary interaction at the cell surface is between IFN- α and IFNAR2, with IFNAR2-bound IFN- α complex interacting with IFNAR1 being a subsequent event (33,34). However, another study suggests that IFNAR1 and IFNAR2 are preassociated at the plasma membrane prior to IFN binding (20), a model also described for the two IFN- γ receptor chains (35). In any case, it is possible that non-palmitoylated IFNAR1 displays normal trafficking properties as a result of its association with IFNAR2. Thus, IFNAR2, by associating with IFNAR1, may drive IFNAR1 uptake and control its intracellular distribution, explaining the differences observed between 2-bromopalmitate treatment and the palmitoylation-deficient IFNAR1 mutant. Most functions involving palmitoylation have been described for cytoplasmic proteins, and the role that it plays on transmembrane proteins is less clear. These proteins are already strongly embedded in the membrane through their transmembrane domains, and it seems unlikely that palmitoylation is required to anchor them. It is therefore plausible that palmitoylation is not required for IFNAR1 trafficking as has been recently shown for other transmembrane proteins: *snc1* and *syn8* are two examples of SNARE proteins that are palmitoylated in yeast, and non-palmitoylated mutants of these proteins are sorted normally (12). It is interesting that, like IFNAR1, *snc1* and *syn8* are palmitoylated on a single cysteine close to the transmembrane domain. MUC1 is another example of a transmembrane protein whose palmitoylation is not required for its endocytosis and its stability at the cell surface (19). Some studies failed to identify any clear role for protein palmitoylation. The LMP2A protein encoded by Epstein Bar virus is palmitoylated on multiple cysteines, but none of its known functions could be related to this modification (36).

In agreement with the effect of 2-bromopalmitate, we found that the absence of palmitate on IFNAR1 cysteine 463 had a major effect on the Jak/Stat signaling pathway activated

by IFN- α . Thus, Tyk2 activation, Stat1 activation and nuclear translocation, and transcriptional activity after IFN- α stimulation, in cells expressing the non-palmitoylated form of IFNAR1 were all substantially lower than the wild-type. Signaling events show an extraordinary degree of complexity at different levels including biochemical and gene transcription events, and involve cross talk and feedback mechanisms that are tightly coordinated in a spatio-temporal manner. Consequently, protein palmitoylation may be an important device for regulating signaling in a versatile manner because it is the only lipid modification of proteins that can be either transient or permanent. The established functions of protein palmitoylation can account for the control of IFN- α signaling by IFNAR1 palmitoylation. These functions include effects on dynamics of binding to membranes, association with specific intracellular compartments, trafficking, interaction with lipid microdomains, and protein-protein interactions (9). We already showed that upon IFN- α binding, IFNAR1 subunits do not cluster within lipid microdomains of the raft type, ruling out a role for IFNAR1 palmitoylation in this process. However, IFNAR1 endocytosis was essential for the activation of the Jak/Stat signaling cascade and the antiviral and antiproliferative effects of IFN- α (7). Our finding that IFNAR1 palmitoylation regulates IFN- α signaling independently from IFNAR1 trafficking reveals the complexity and the diversity of the mechanisms by which the Jak/Stat signaling pathways can be controlled (8).

Another means by which palmitoylation may control signaling, other than affecting membrane trafficking, is through the regulation of lipid-protein or protein-protein interactions, in the same way as other reversible posttranslational modifications such as tyrosine phosphorylation and GTP/GDP cycling. This aspect of signaling control by palmitoylation was described for the interaction between the kinase Fyn and the T cell receptor (37). Similarly, palmitoylation of one critical cysteine of the prostanoid thromboxane A2 receptor is specifically required for efficient coupling of the phospholipase C β to the Gq subunit (38). It is therefore possible that IFNAR1 palmitoylation contributes to the recruitment of signaling proteins to the IFNAR1 subunit and stabilization of the association. The presence of palmitate may affect the spatial

conformation of IFNAR1 in the vicinity of the transmembrane domain, thereby reversibly regulating, the association with downstream effectors. Our results identify Tyk2 as a likely candidate because its activation is rapidly impaired in cells expressing non-palmitoylated IFNAR1. Thus, the absence of palmitate on IFNAR1 may weaken the interaction between IFNAR1 and the Tyk2 kinase, resulting in impaired Jak/Stat signaling. In support of this model, cysteine 463 is only a few amino acids away from the IFNAR1 sequence involved in binding Tyk2, and it has been recently shown that the accessibility of Tyk2 to IFNAR1 depends on posttranslational modifications of IFNAR1 (39).

The molecular mechanism by which palmitate is transferred to proteins has been a matter of debate for many years. New mechanical insights have been provided with the identification, first in yeast and subsequently in human cells, of a new class of protein acyl transferases that catalyze the linkage of palmitate to protein substrates; these enzymes called palmitoyl transferases (PATs) have a characteristic Asp-His-His-Cys motif in a Cys-rich domain (DHHC) (40-42). A few palmitoyl thioesterases that remove palmitate from proteins have also been identified (9), and in particular APT1, a cytosolic palmitoyl thioesterase that may remove palmitate from signaling proteins such as H-Ras and G-protein α subunits (43). Although DHHC PATs are often redundant for their substrates (44), it would be interesting to identify which of the 23 described human PATs is or are responsible for the palmitoylation of IFNAR1, in relation with their known intracellular localization (45).

In this work, we have demonstrated that palmitoylation of a single cysteine (Cys463) adjacent to the transmembrane domain of the IFN- α receptor subunit IFNAR1 plays a critical role in the activation of the Jak/Stat signaling pathway by type I IFNs. This is consistent with the essential role of IFNAR1 in IFN- α -induced signaling. Ubiquitination of IFNAR1 is important for the regulation of IFNAR1 internalization and degradation (30,46), and thus palmitoylation is a new example of a posttranslational modification of IFNAR1 with a distinct function: it controls Jak/Stat signaling without affecting IFNAR1 trafficking. Several studies have documented a relationship between ubiquitination and palmitoylation of transmembrane proteins (32). In view of the critical role for IFNAR endocytosis in IFN

signaling (7), it appears that IFNAR1 palmitoylation and ubiquitination may contribute, through the control of downstream Jak/Stat signaling and IFNAR trafficking, respectively, to orchestrating the complexity and selectivity of the signaling and pleiotropic cellular effects of IFNs (8). This novel aspect of the regulation of the Jak/Stat signaling pathway

may have important therapeutic implications because dysfunctions of this pathway have been reported in several cancers (47). It would therefore be potentially valuable to test whether the recently developed inhibitors of human palmitoylacyl transferases and ubiquitin ligases (48,49) can modulate the antiviral, immune, and antitumoral activities of IFNs.

REFERENCES

1. Plataniias, L. C. (2005) *Nat Rev Immunol* **5**(5), 375-386.
2. Kalvakolanu, D. V. (2003) *Pharmacol Ther* **100**(1), 1-29
3. Parmar, S., and Plataniias, L. C. (2003) *Curr Opin Oncol* **15**(6), 431-439.
4. Stark, G., Kerr, I., Williams, B., Silverman, R., and Schreiber, R. (1998) *Annu Rev Biochem* **67**, 227-264.
5. de Weerd, N. A., Samarajiwa, S. A., and Hertzog, P. J. (2007) *J Biol Chem* **282**(28), 20053-20057
6. van Boxel-Dezaire, A. H., Rani, M. R., and Stark, G. R. (2006) *Immunity* **25**(3), 361-372
7. Marchetti, M., Monier, M. N., Fradagrada, A., Mitchell, K., Baychelier, F., Eid, P., Johannes, L., and Lamaze, C. (2006) *Mol Biol Cell* **17**(7), 2896-2909.
8. Claudinon, J., Monier, M. N., and Lamaze, C. (2007) *Biochimie* **89**, 735-743
9. Resh, M. D. (2006) *Sci STKE* **2006**(359), re14
10. Nadolski, M. J., and Linder, M. E. (2007) *FEBS J* **274**(20), 5202-5210
11. Percherancier, Y., Planchenault, T., Valenzuela-Fernandez, A., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Bachelier, F. (2001) *J Biol Chem* **276**(34), 31936-31944
12. Valdez-Taubas, J., and Pelham, H. (2005) *Embo J* **24**(14), 2524-2532
13. Abrami, L., Leppa, S. H., and van der Goot, F. G. (2006) *J Cell Biol* **172**(2), 309-320.
14. Tani, M., and Hannun, Y. A. (2007) *J Biol Chem* **282**(13), 10047-10056
15. Flaumenhaft, R., and Sim, D. S. (2005) *Hematology* **10**(6), 511-519
16. Blanpain, C., Wittamer, V., Vanderwinden, J. M., Boom, A., Renneboog, B., Lee, B., Le Poul, E., El Asmar, L., Govaerts, C., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. (2001) *J Biol Chem* **276**(26), 23795-23804.
17. Chakrabandhu, K., Herincs, Z., Huault, S., Dost, B., Peng, L., Conchonaud, F., Marguet, D., He, H. T., and Hueber, A. O. (2007) *Embo J* **26**(1), 209-220.
18. Hayashi, T., Rumbaugh, G., and Haganir, R. L. (2005) *Neuron* **47**(5), 709-723
19. Kinlough, C. L., McMahan, R. J., Poland, P. A., Bruns, J. B., Harkleroad, K. L., Stremple, R. J., Kashlan, O. B., Weixel, K. M., Weisz, O. A., and Hughey, R. P. (2006) *J Biol Chem* **281**(17), 12112-12122.
20. Cajean-Feroldi, C., Nosal, F., Nardeux, P. C., Gallet, X., Guymarho, J., Baychelier, F., Sempe, P., Tovey, M. G., Escary, J. L., and Eid, P. (2004) *Biochemistry* **43**(39), 12498-12512.
21. Alvarez, E., Girones, N., and Davis, R. J. (1990) *J Biol Chem* **265**(27), 16644-16655
22. Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M. D. (2000) *J Biol Chem* **275**(1), 261-270
23. Pestka, S., Krause, C. D., and Walter, M. R. (2004) *Immunol Rev* **202**, 8-32
24. Mouillac, B., Caron, M., Bonin, H., Dennis, M., and Bouvier, M. (1992) *J Biol Chem* **267**(30), 21733-21737
25. Mumby, S. M., Kleuss, C., and Gilman, A. G. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(7), 2800-2804
26. Cherukuri, A., Carter, R. H., Brooks, S., Bornmann, W., Finn, R., Dowd, C. S., and Pierce, S. K. (2004) *J Biol Chem* **279**(30), 31973-31982.
27. Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., and Marino, M. (2005) *Mol Biol Cell* **16**(1), 231-237
28. Bijlmakers, M. J., and Marsh, M. (2003) *Trends Cell Biol* **13**(1), 32-42.
29. Kumar, K. G., Tang, W., Ravindranath, A. K., Clark, W. A., Croze, E., and Fuchs, S. Y. (2003) *Embo J* **22**(20), 5480-5490.

30. Kumar, K. G., Barriere, H., Carbone, C. J., Liu, J., Swaminathan, G., Xu, P., Li, Y., Baker, D. P., Peng, J., Lukacs, G. L., and Fuchs, S. Y. (2007) *J Cell Biol.* **179**(5), 935-950.
31. Zhou, F., Xue, Y., Yao, X., and Xu, Y. (2006) *Bioinformatics.* **22**(7), 894-896.
32. Linder, M. E., and Deschenes, R. J. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**(1), 74-84.
33. Lamken, P., Gavutis, M., Peters, I., Van der Heyden, J., Uze, G., and Pehler, J. (2005) *J Mol Biol* **350**(3), 476-488
34. Kumaran, J., Wei, L., Kotra, L. P., and Fish, E. N. (2007) *Faseb J* **21**(12), 3288-3296
35. Krause, C. D., Mei, E., Xie, J., Jia, Y., Bopp, M. A., Hochstrasser, R. M., and Pestka, S. (2002) *Mol Cell Proteomics* **1**(10), 805-815
36. Katzman, R. B., and Longnecker, R. (2004) *J Virol* **78**(20), 10878-10887.
37. van't Hof, W., and Resh, M. D. (1999) *J Cell Biol* **145**(2), 377-389
38. Reid, H. M., and Kinsella, B. T. (2007) *Cell Signal* **19**(5), 1056-1070
39. Kumar, K. G., Varghese, B., Banerjee, A., Baker, D. P., Constantinescu, S. N., Pellegrini, S., and Fuchs, S. Y. (2008) *J Biol Chem* **283**(27), 18566-18572
40. Lobo, S., Greentree, W. K., Linder, M. E., and Deschenes, R. J. (2002) *J Biol Chem* **277**(43), 41268-41273
41. Roth, A. F., Feng, Y., Chen, L., and Davis, N. G. (2002) *J Cell Biol* **159**(1), 23-28
42. Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R. A., and Brecht, D. S. (2004) *Neuron.* **44**(6), 987-996.
43. Duncan, J. A., and Gilman, A. G. (1998) *J Biol Chem* **273**(25), 15830-15837
44. Roth, A. F., Wan, J., Bailey, A. O., Sun, B., Kuchar, J. A., Green, W. N., Phinney, B. S., Yates, J. R., 3rd, and Davis, N. G. (2006) *Cell* **125**(5), 1003-1013
45. Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T., and Igarashi, Y. (2006) *Biochim Biophys Acta.* **1761**(4), 474-483.
46. Kumar, K. G., Krolewski, J. J., and Fuchs, S. Y. (2004) *J Biol Chem* **279**(45), 46614-46620.
47. Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., and Russo, A. (2003) *J Cell Physiol* **197**(2), 157-168.
48. Ducker, C. E., Griffel, L. K., Smith, R. A., Keller, S. N., Zhuang, Y., Xia, Z., Diller, J. D., and Smith, C. D. (2006) *Mol Cancer Ther* **5**(7), 1647-1659
49. Bernassola, F., Karin, M., Ciechanover, A., and Melino, G. (2008) *Cancer Cell* **14**(1), 10-21

FOOTNOTES

We thank Florence Niedergang for helpful discussions, Pauline Gonnord for reading the manuscript, and Winfried Römer for his help with the confocal microscope and reading of the manuscript. The help and support of the members of the laboratory is acknowledged. This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (3143) and Agence Nationale de la Recherche (#BLAN0211). JC was supported by a predoctoral fellowship from Ligue contre le Cancer.

The abbreviations used are: IFN, interferon; ISGs, IFN-stimulated genes; ISGF3, IFN-stimulated gene factor 3; ISRE, IFN-stimulated response element.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. IFNAR1 endocytosis and IFN- α induced Jak/Stat signaling depend on palmitoylation events. **A.** Effect of the palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate on IFNAR1 endocytosis. L929R1R2 cells pretreated or not for 1h with 100 μ M 2-bromopalmitate were incubated with anti-IFNAR1 34F10 mAb as described in Material and methods. Cells were incubated at 37°C for 30 min and IFNAR1 endocytosis was detected by visualizing internalized IFNAR1/antibody complexes after an acid wash. Scale bar 20 μ m. Results are representative of at least four independent experiments. **B.** Effect of 2-bromopalmitate on IFN- α -induced Stat1 tyrosine phosphorylation. L929R1R2 cells were pretreated for 1h with the indicated concentrations of 2-bromopalmitate and stimulated with 1000 U/ml IFN- α for 10 min at 37°C. Total lysates were analyzed by Western blot/ECL to detect phosphorylated Stat1 (pStat1). Results are representative of at least four independent experiments. **C.** Effect of 2-bromopalmitate on IFN- α -induced pStat1 nuclear translocation. L929R1R2 cells were

pretreated or not for 1h with 100 μ M 2-bromopalmitate and stimulated with 1000 U/ml IFN- α for 30 min at 37°C. Cells were fixed and the nuclear localization of phosphorylated Stat1 was detected by immunofluorescence. Scale bar 20 μ m.

Fig. 2. The IFNAR1 and IFNAR2 subunits of the IFN- α receptor are palmitoylated. *A.* L929R1R2 cells were incubated for 4h with 3 H-palmitate before immunoprecipitation of either IFNAR1 or IFNAR2 as indicated. Immunoprecipitates were analyzed by autoradiography. *B.* L929R1R2 cells were pretreated or not with 1000 U/ml IFN- α or IFN- β for 1h before addition of 3 H-palmitate in the medium. After 4h of incubation, IFNAR1 was immunoprecipitated and samples were analyzed both by autoradiography (upper panel) and by Western-Blotting against IFNAR1 (lower panel).

Fig. 3. IFNAR1 is palmitoylated on cysteine 463. *A.* Amino acid sequence of the 458-507 part of the carboxy-terminal cytoplasmic tail of human IFNAR1. The two cytoplasmic cysteines in positions 463 and 502 are highlighted in bold. Cys-463 and Cys-502 were mutated into alanine individually or in combination, and the corresponding mutants named AC, CA and AA as indicated (mutations are underlined). *B.* L929R2 cells stably transfected with wild-type IFNAR1 (CC) or with the indicated mutants were incubated for 4h with 3 H-palmitate. IFNAR1 was immunoprecipitated from cell lysates and immune complexes were separated by SDS-PAGE. The IFNAR1 immunoprecipitate was split in two before being analyzed either by Western-blotting (lower panel) or by autoradiography (upper panel).

Fig. 4. Similar intracellular distribution of wild-type IFNAR1 and palmitoylation-deficient AC IFNAR1 mutant. L929R2 cells stably transfected with wild-type IFNAR1 or the AC mutant were fixed, permeabilized and co-labeled with anti-IFNAR1 34F10 mAb and antibodies directed either against the early endosome marker EEA1 (A), the Golgi apparatus marker Rab6 (B), the recycling endosome marker Rab11 (C) or the lysosomal marker lamp2 (D). Secondary antibodies coupled with alexa-488 (green) and with Cy3 (red) were used to reveal IFNAR1 and cellular markers, respectively. Cells were imaged with a confocal Leica microscope.

Fig. 5. IFNAR1 palmitoylation is not involved in IFNAR1 endocytosis and IFNAR1 half-life at the cell surface. *A.* Endocytic pattern of the wild-type and AC IFNAR1 subunits. L929R2 cells stably transfected with wild-type IFNAR1 or the AC IFNAR1 mutant were processed for endocytosis as described in Fig. 1. Scale bar 20 μ m. *B.* FACS analysis of IFNAR1 endocytosis at early time points. L929R2 cells expressing either wild-type IFNAR1 or the IFNAR1 AC mutant were labeled with AA3 anti-IFNAR1 mAb prior endocytosis at 37°C for the indicated times. Remaining cell surface IFNAR1/AA3 complexes were quantified by flow cytometry. Results are expressed as the disappearance of total cell bound antibody from the cell surface. Each value is the mean \pm SD of triplicate experiments. *C.* Cell surface down-modulation of wild-type and AC IFNAR1 subunits. The cell surface expression of IFNAR1 was measured by flow cytometry in L929R2 cells expressing either wild-type or AC IFNAR1 subunits in the presence of cycloheximide and 1000 U/ml IFN- α 2b for the indicated times.

Fig. 6. IFNAR1 palmitoylation is required for the activation of the Jak/Stat signaling pathway by IFN- α . *A.* IFN- α induced Tyk2 tyrosine phosphorylation in L929R2 cells expressing either the wild type or the AC IFNAR1 subunits. Cells were stimulated or not with 1000 U/ml IFN- α for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western-blotting against tyrosine phosphorylated Tyk2 (pTyk2) or Tyk2 as indicated. *B.* IFN- α induced Stat1 tyrosine phosphorylation in L929R2 cells expressing either the wild type or the AC IFNAR1 subunits. Cells were stimulated or not with 1000 U/ml IFN- α for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western-blotting against tyrosine phosphorylated Stat1 (pStat1) or Stat1 as indicated. *C.* IFN- α induced pStat1 nuclear translocation in L929R2 cells expressing either the wild type or the AC IFNAR1 subunits. Upper part: pStat1 nuclear translocation was analyzed by immunofluorescence as described in Material and methods (scale bar 20

µm). Lower part: the percentage of cells with pStat1 translocation was quantified by counting (N=200). Results are the mean ± SD of four independent experiments.

Fig. 7. IFN- α induced gene transcription is strongly reduced in the palmitoylation deficient IFNAR1 AC mutant. IFN- α -induced gene transcription was analyzed using the luciferase reporter gene. L929R2 cells stably expressing either the wild type or the AC IFNAR1 subunits were transfected by the ISG-54 luciferase construct, stimulated with 1000 U/ml IFN- α , and luciferase activity was quantified by measurement of luminescence reported to the quantity of proteins, as described in material and methods. Results are the mean ± SD of three independent experiments and were expressed as the ratio to the basal activity without IFN- α stimulation.

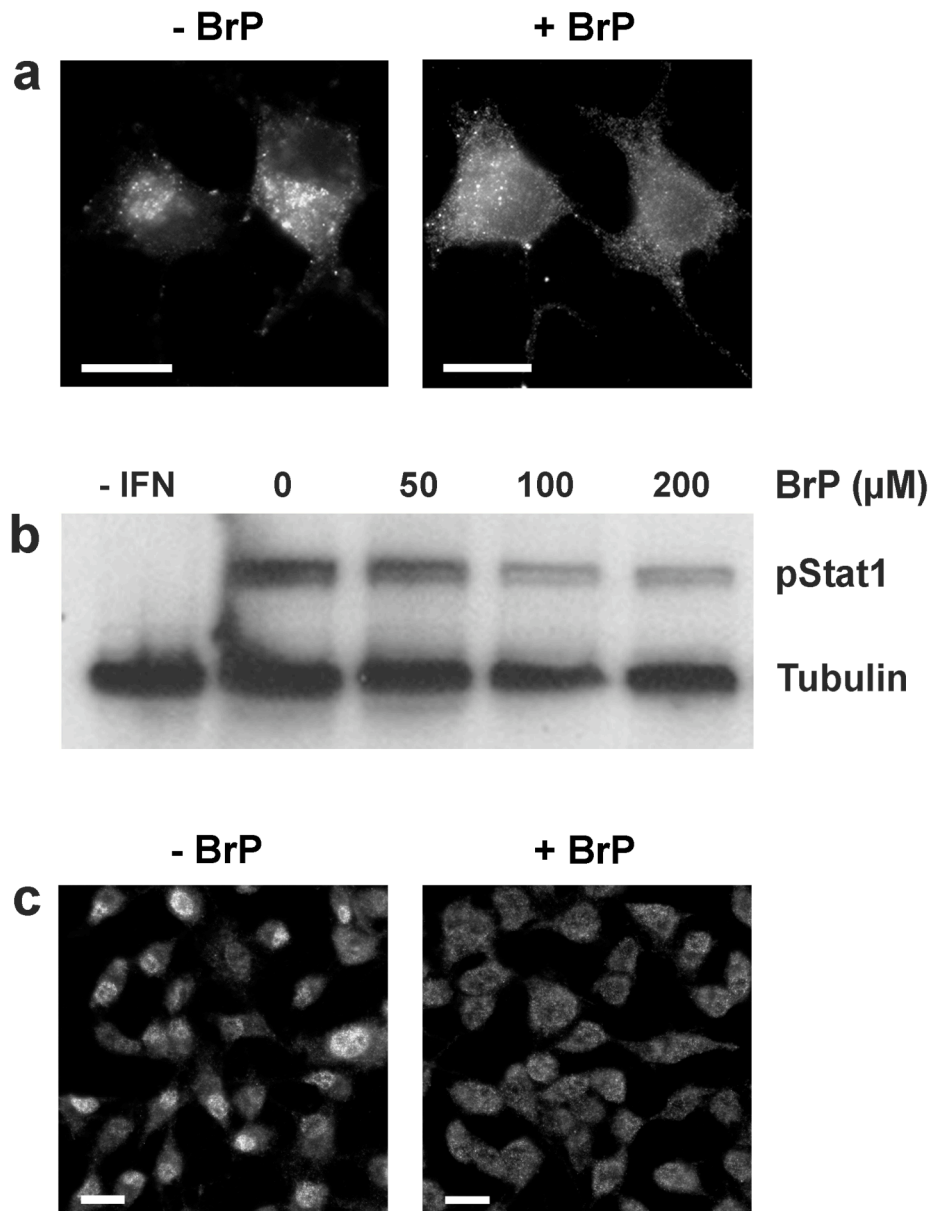


Figure 1. IFNAR1 endocytosis and IFN- α induced Jak/Stat signaling depend on palmitoylation events. (a) Effect of the palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate on IFNAR1 endocytosis. L929R1R2 cells pretreated or not for 1h with 100 μ M 2-bromopalmitate were incubated with anti-IFNAR1 34F10 mAb as described in Material and methods. Cells were incubated at 37°C for 30 min and IFNAR1 endocytosis was detected by visualizing internalized IFNAR1/antibody complexes after an acid wash. Scale bar 20 μ m. Results are representative of at least four independent experiments. (b) Effect of 2-bromopalmitate on IFN- α -induced Stat1 tyrosine phosphorylation. L929R1R2 cells were pretreated for 1h with the indicated concentrations of 2-bromopalmitate and stimulated with 1000 U/ml IFN- α for 10 min at 37°C. Total lysates were analyzed by Western blot/ECL to detect phosphorylated Stat1 (pStat1). Results are representative of at least four independent experiments. (c) Effect of 2-bromopalmitate on IFN- α -induced pStat1 nuclear translocation. L929R1R2 cells were pretreated or not for 1h with 100 μ M 2-bromopalmitate and stimulated with 1000 U/ml IFN- α for 30 min at 37°C. Cells were fixed and the nuclear localization of phosphorylated Stat1 was detected by immunofluorescence. Scale bar 20 μ m.

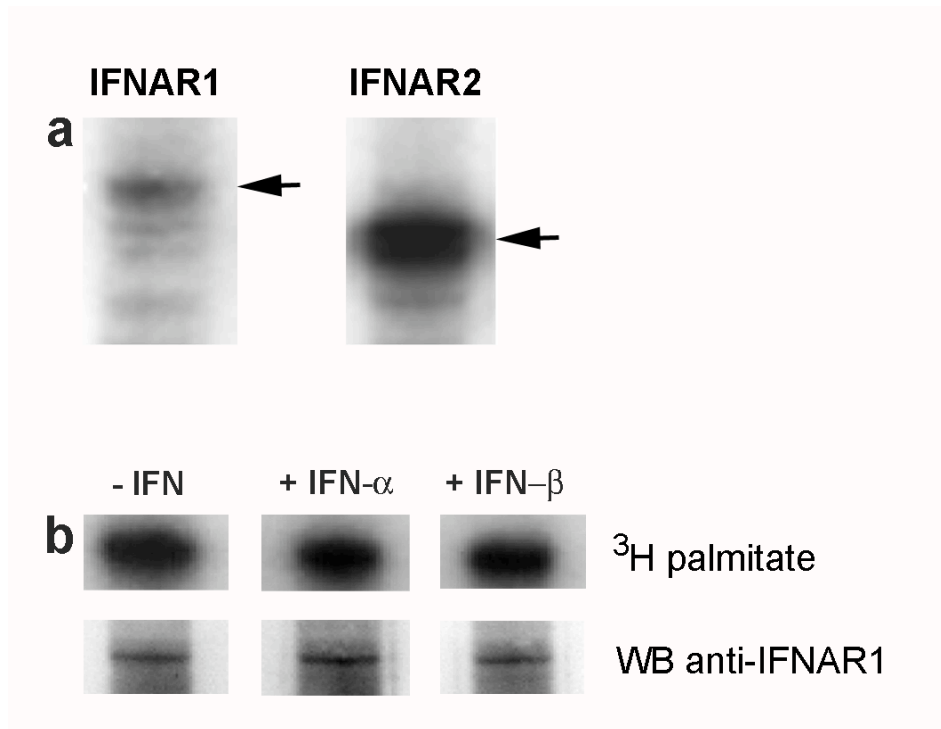


Figure 2. The IFNAR1 and IFNAR2 subunits of the IFN- α receptor are palmitoylated. (a) L929R1R2 cells were incubated for 4h with ^3H -palmitate before immunoprecipitation of either IFNAR1 or IFNAR2 as indicated. Immunoprecipitates were analyzed by autoradiography. (b) L929R1R2 cells were pretreated or not with 1000 U/ml IFN- α or IFN- β for 1h before addition of ^3H -palmitate in the medium. After 4h of incubation, IFNAR1 was immunoprecipitated and samples were analyzed both by autoradiography (upper panel) and by Western-Blotting against IFNAR1 (lower panel).

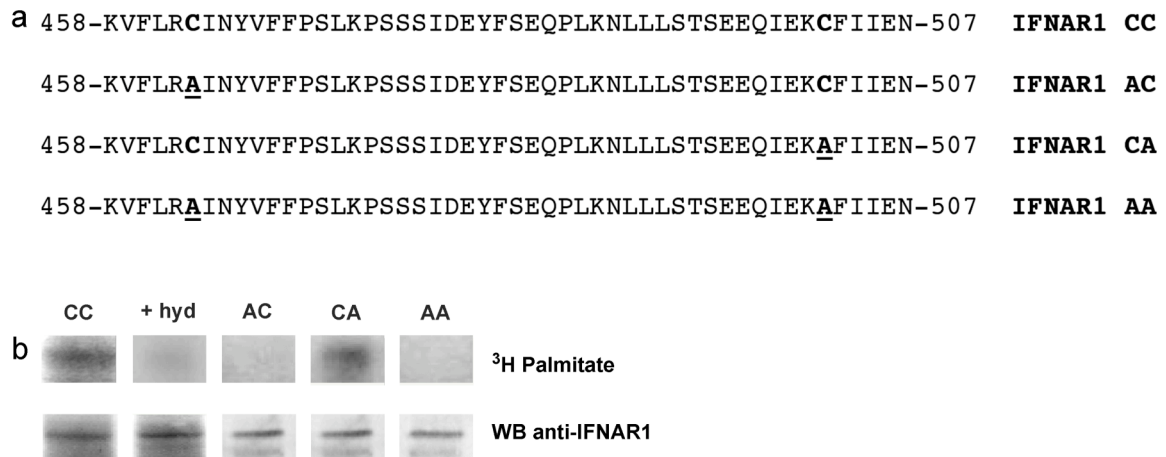


Figure 3. IFNAR1 is palmitoylated on cysteine 463. (a) Amino acid sequence of the 458-507 part of the carboxy-terminal cytoplasmic tail of human IFNAR1. The two cytoplasmic cysteines in positions 463 and 502 are highlighted in bold. Cys-463 and Cys-502 were mutated into alanine individually or in combination, and the corresponding mutants named AC, CA and AA as indicated (mutations are underlined). (b) L929R2 cells stably transfected with wild-type IFNAR1 (CC) or with the indicated mutants were incubated for 4h with ³H-palmitate. IFNAR1 was immunoprecipitated from cell lysates and immune complexes were separated by SDS-PAGE. The IFNAR1 immunoprecipitate was split in two before being analyzed either by Western-blotting (lower panel) or by autoradiography (upper panel).

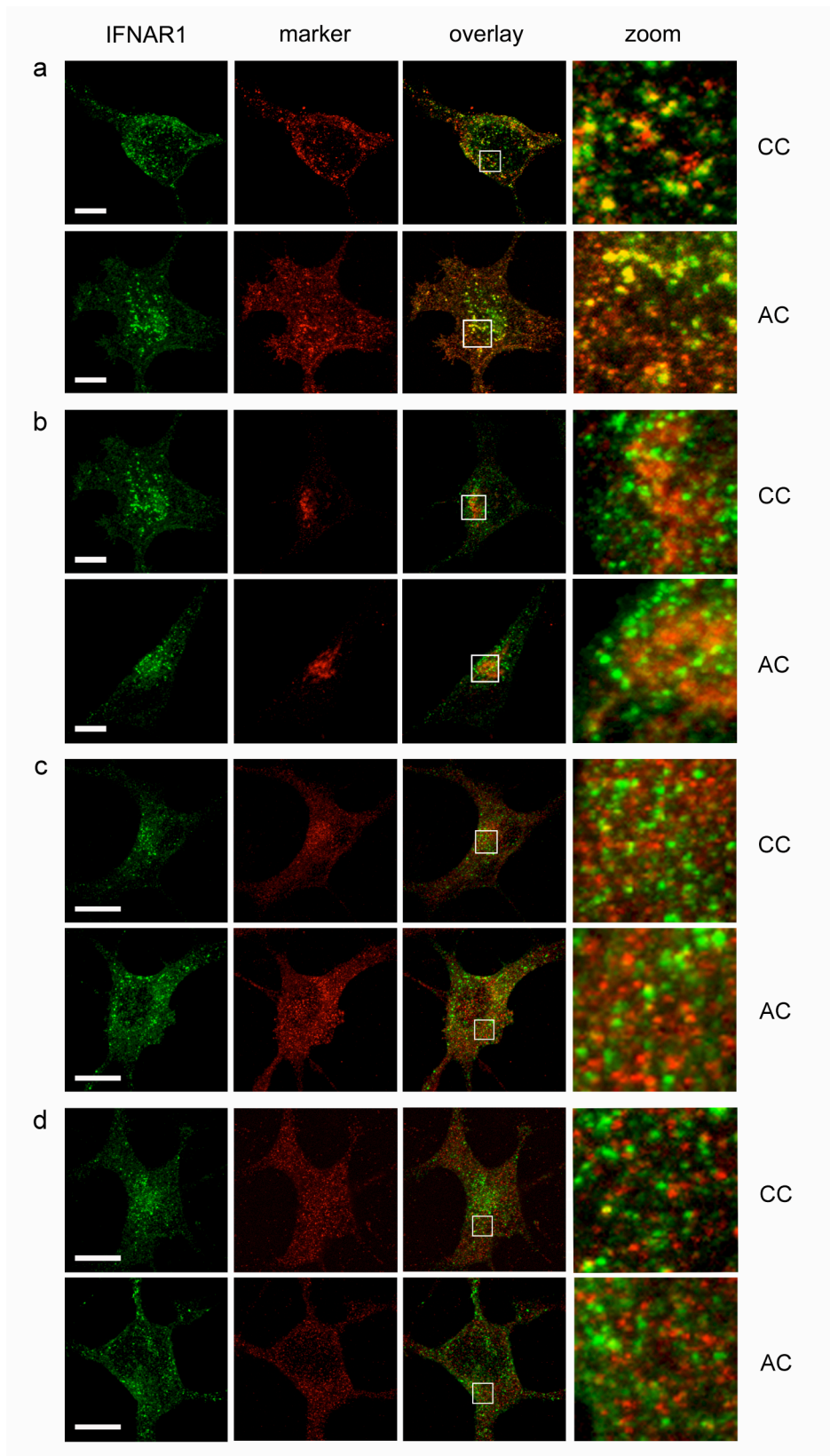


Figure 4. Similar intracellular distribution of wild-type IFNAR1 and palmitoylation-deficient AC IFNAR1 mutant. L929R2 cells stably transfected with wild-type IFNAR1 or the AC mutant were fixed, permeabilized and co-labeled with anti-IFNAR1 34F10 mAb and antibodies directed either against the early endosome marker EEA1 (A), the Golgi apparatus marker Rab6 (B), the recycling endosome marker Rab11 (C) or the lysosomal marker lamp2 (D). Secondary antibodies coupled with alexa-488 (green) and with Cy3 (red) were used to reveal IFNAR1 and cellular markers, respectively. Cells were imaged with a confocal Leica microscope.

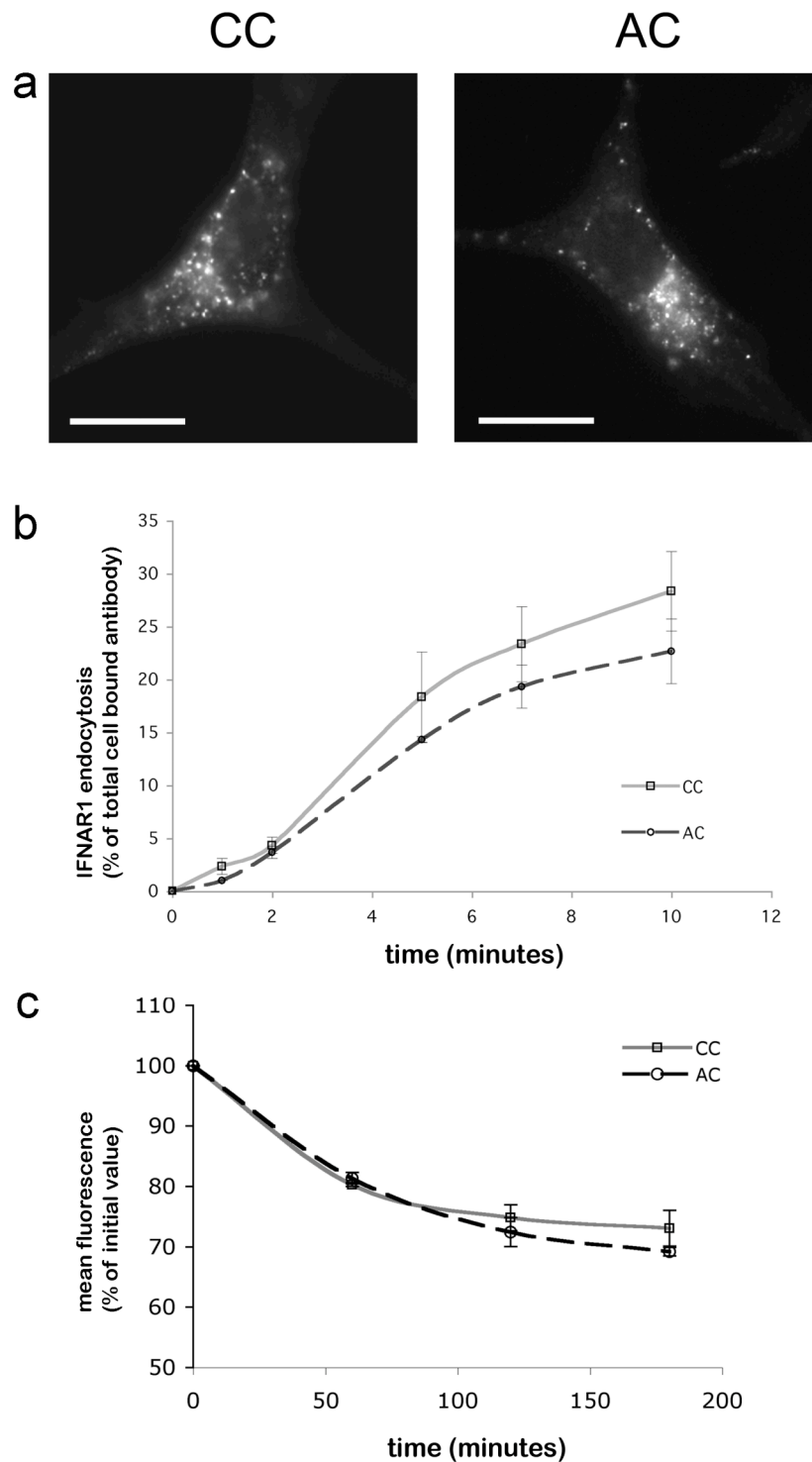


Figure 5. IFNAR1 palmitoylation is not involved in IFNAR1 endocytosis and IFNAR1 half-life at the cell surface. (a) Endocytic pattern of the wild-type and AC IFNAR1 subunits. L929R2 cells stably transfected with wild-type IFNAR1 or the AC IFNAR1 mutant were processed for endocytosis as described in Figure 1. Scale bar 20 μm . (b) FACS analysis of IFNAR1 endocytosis at early time points. L929R2 cells expressing either wild-type IFNAR1 or the IFNAR1 AC mutant were labeled with AA3 anti-IFNAR1 mAb prior endocytosis at 37°C for the indicated times. Remaining cell surface IFNAR1/AA3 complexes were quantified by flow cytometry. Results are expressed as the disappearance of total cell bound antibody from the cell surface. Each value is the mean \pm SD of triplicate experiments. (c) Cell surface down-modulation of wild-type and AC IFNAR1 subunits. The cell surface expression of IFNAR1 was measured by flow cytometry in L929R2 cells expressing either wild-type or AC IFNAR1 subunits in the presence of cycloheximide and 1000 U/ml IFN- α 2b for the indicated times.

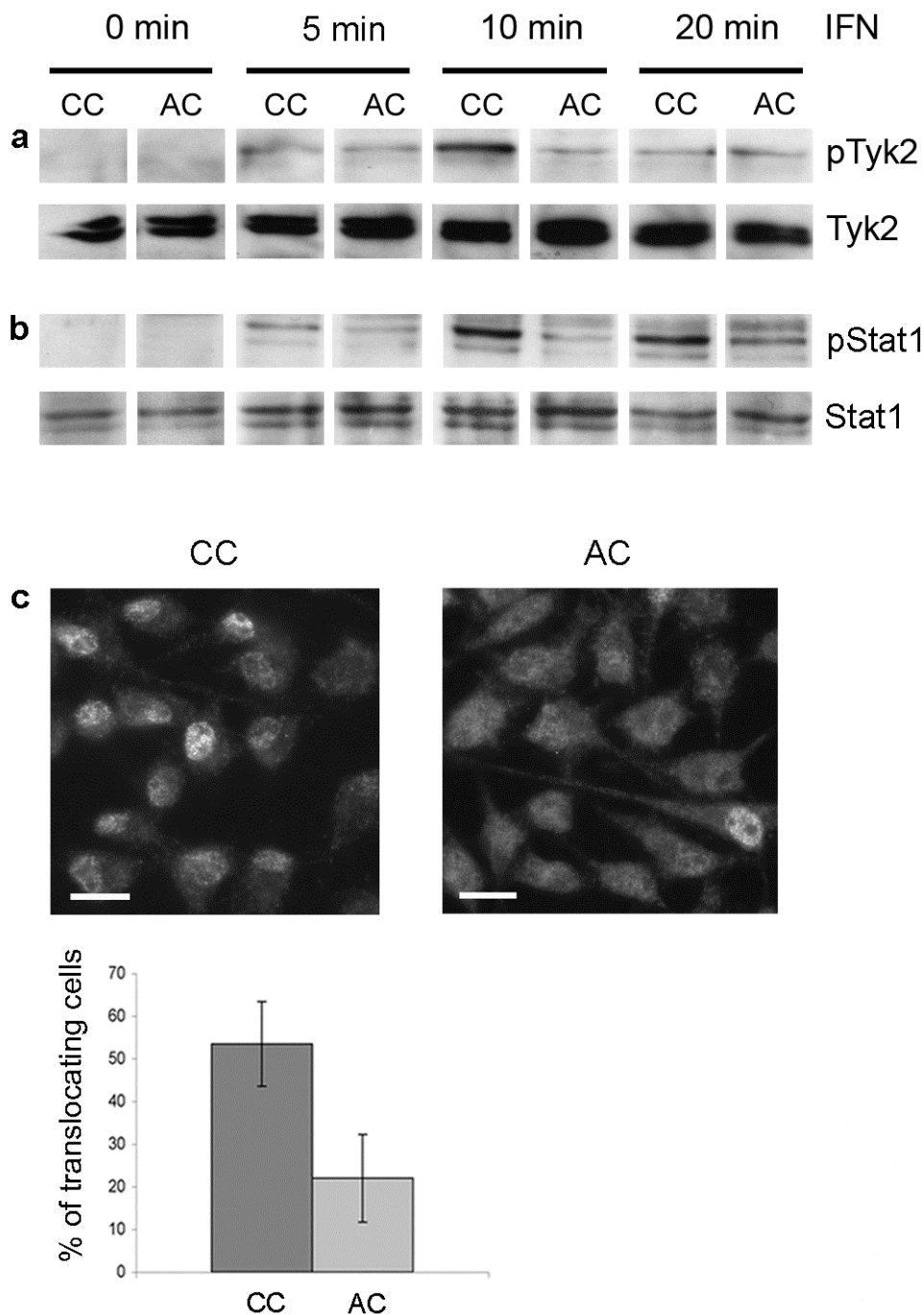


Figure 6. IFNAR1 palmitoylation is required for the activation of the Jak/Stat signaling pathway by IFN- α . (a) IFN- α induced Tyk2 tyrosine phosphorylation in L929R2 cells expressing either the wild type or the AC IFNAR1 subunits. Cells were stimulated or not with 1000 U/ml IFN- α for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western-blotting against tyrosine phosphorylated Tyk2 (pTyk2) or Tyk2 as indicated. (b) IFN- α induced Stat1 tyrosine phosphorylation in L929R2 cells expressing either the wild type or the AC IFNAR1 subunits. Cells were stimulated or not with 1000 U/ml IFN- α for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western-blotting against tyrosine phosphorylated Stat1 (pStat1) or Stat1 as indicated. (c) IFN- α induced pStat1 nuclear translocation in L929R2 cells expressing either the wild type or the AC IFNAR1 subunits. Upper part: pStat1 nuclear translocation was analyzed by immunofluorescence as described in Material and methods (scale bar 20 μ m). Lower part: the percentage of cells with pStat1 traslocation was quantified by counting (n=200). Results are the mean \pm SD of four independent experiments.

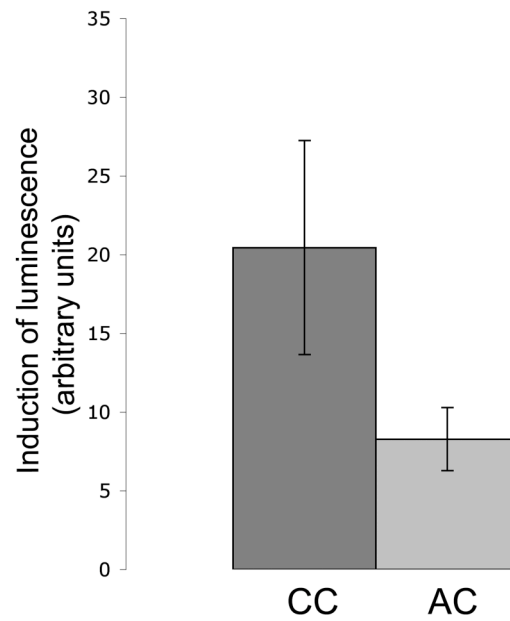


Figure 7. IFN- α induced gene transcription is strongly reduced in the palmitoylation deficient IFNAR1 AC mutant. IFN- α -induced gene transcription was analyzed using the luciferase reporter gene. L929R2 cells stably expressing either the wild type or the AC IFNAR1 subunits were transfected by the ISG-54 luciferase construct, stimulated with 1000 U/ml IFN- α , and luciferase activity was quantified by measurement of luminescence reported to the quantity of proteins, as described in material and methods. Results are the mean \pm SD of three independent experiments and were expressed as the ratio to the basal activity without IFN- α stimulation.

Résultats complémentaires

Endocytose de l'IFN- α couplé à des marqueurs fluorescents

Dans les expériences d'endocytose que nous avons réalisées en immunofluorescence, nous avons suivi l'internalisation d'IFNAR1 à 37°C à l'aide d'un anticorps non neutralisant dirigé contre la partie extracellulaire d'IFNAR1 (anticorps 34F10). Ceci nous a permis d'observer au bout de 30 minutes d'internalisation une accumulation d'IFNAR1 dans la région périnucléaire (voir figure 6 de l'article). En effectuant ces expériences avec ou sans stimulation par l'IFN- α , nous n'avons pas observé de différence dans la distribution intracellulaire d'IFNAR1, aussi bien pour la forme sauvage (CC) que pour la forme mutante (AC).

Néanmoins, afin d'être certains que la stimulation par l'IFN- α ne modifiait pas l'endocytose d'IFNAR1, nous avons suivi spécifiquement l'internalisation d'IFNAR1 lié à l'IFN- α en utilisant des IFNs couplés à des marqueurs fluorescents. En incubant les cellules à 37°C pendant 30 minutes en présence d'IFN- α couplé au Cy3 (IFN α -Cy3) ou d'IFN- α couplé à l'Oregon green (IFN α -OG ; dons de Jacob Piehler, Francfort, Allemagne), nous avons pu observer les complexes IFN-récepteur endocytés, tandis que nous regardions habituellement les complexes IFNAR1-anticorps.

Ceci nous a permis de constater que l'IFN- α se retrouvait après 30 minutes d'endocytose dans la région périnucléaire, ce que nous avons observé avec l'anticorps 34F10 (figure supplémentaire 1). De même, nous n'avons constaté aucune différence d'endocytose entre IFNAR1 CC et IFNAR1 AC, confirmant ainsi nos résultats montrant que la palmitoylation d'IFNAR1 ne joue aucun rôle dans son internalisation.

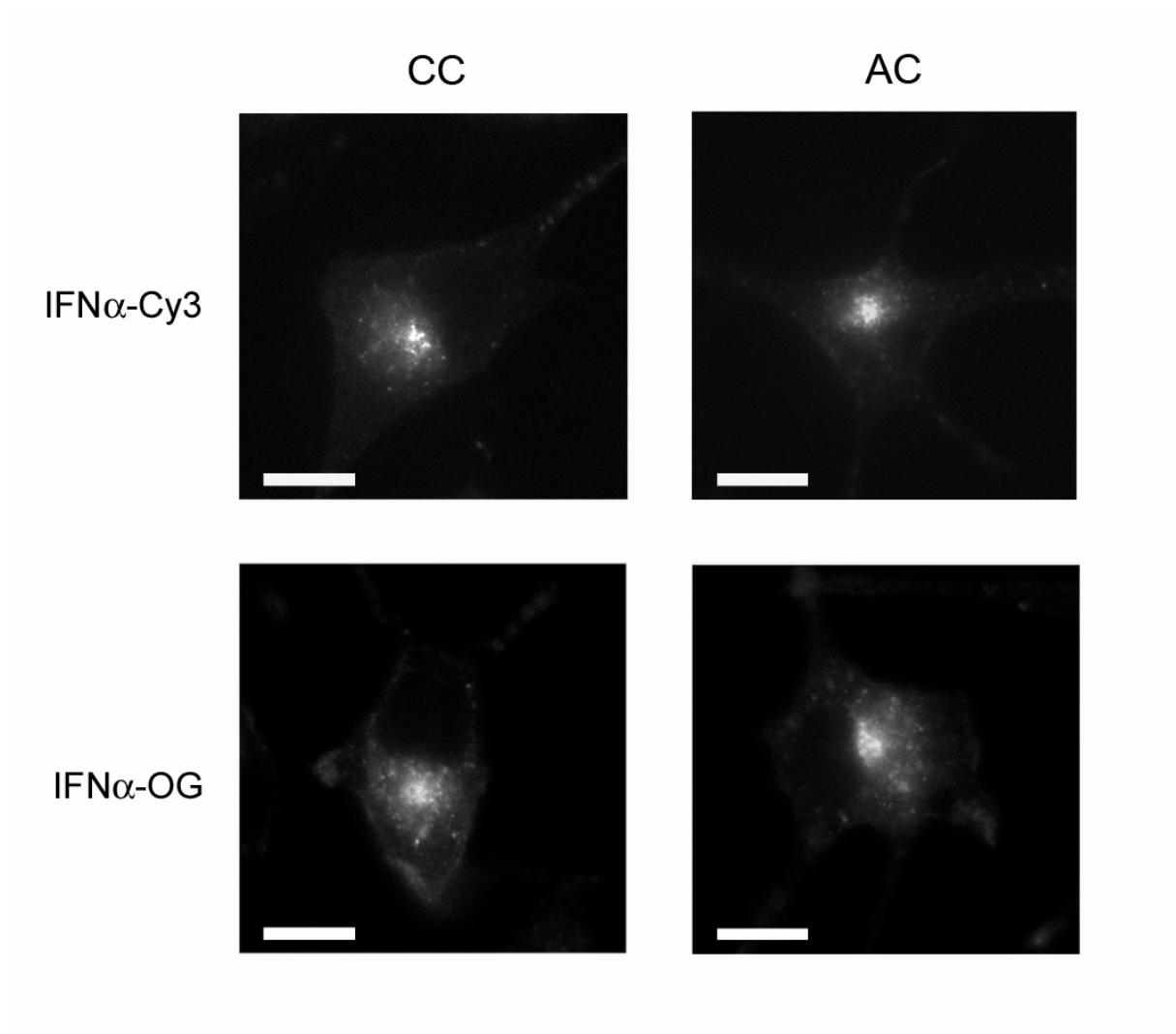


Figure supplémentaire 1. Endocytose de l'IFN- α couplé à des marqueurs fluorescents.

Endocytose de l'IFN- α couplé à des marqueurs fluorescents dans les cellules L929R2 exprimant IFNAR1 sauvage (CC) ou un mutant d'IFNAR1 déficient pour la palmitoylation (AC). Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C en présence d'IFN- α couplé au fluorophore cyanine 3 (IFN α -Cy3) ou au fluorophore oregon green (IFN α -OG). Elles ont ensuite été lavées, fixées et analysées par microscopie à épifluorescence. Barre d'échelle = 20 μ m.

Rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans l'action antiproliférative de l'IFN- α

Nous avons montré que la palmitoylation d'IFNAR1 était nécessaire à l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN- α , et, de façon concordante, était également requise pour l'activation transcriptionnelle des ISGs contenant un élément ISRE dans leur promoteur. Nous avons donc voulu savoir si l'inhibition de la signalisation et de la transcription observées chez le mutant d'IFNAR1 non palmitoylé se répercutait sur les effets biologiques de l'IFN- α .

L'IFN- α est capable d'induire des activités antivirales et antiprolifératives. Nous avons décidé d'analyser le rôle potentiel de la palmitoylation d'IFNAR1 dans l'activité antiproliférative de l'IFN- α . Pour cela, nous avons cultivé un nombre identique de cellules L929R2 exprimant IFNAR1 CC ou le mutant non palmitoylé IFNAR1 AC pendant 72 heures en présence ou non de 6000 U/ml d'IFN- α . Nous avons ensuite mesuré la prolifération par comptage (voir légende de la figure supplémentaire 2 pour le détail du protocole).

Nous avons ainsi pu observer que le traitement par l'IFN- α induisait une inhibition de la prolifération cellulaire de 50% en 72 heures, comme l'indique le rapport du nombre de cellules entre le lot traité et le lot non traité. Nous avons constaté que l'inhibition de la prolifération induite par l'IFN- α est identique chez les cellules exprimant IFNAR CC ou IFNAR1 AC (figure supplémentaire 2). Il semble donc que la palmitoylation d'IFNAR1, malgré son implication dans la signalisation, n'est pas importante pour l'induction de l'activité antiproliférative de l'IFN- α .

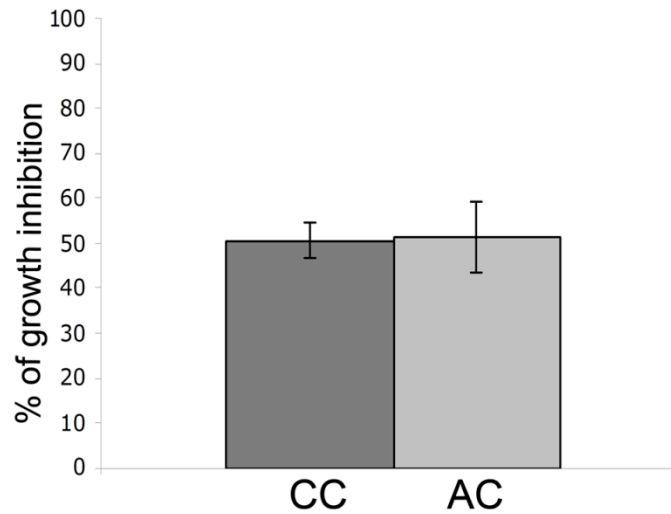


Figure supplémentaire 2. Rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans l'activité antiproliférative de l'IFN- α .

L'évaluation de l'activité antiproliférative a été réalisée comme suit : le jour 1, les cellules L929R2 exprimant IFNAR1 CC ou IFNAR1 AC ont étéensemencées dans une plaque 24 puits, à raison de 20 000 cellules par puits. Le jour 2, 6000 U/ml d'IFN- α 2b ont été ajoutés ou non aux cellules. Le jour 5, après 72 heures, les cellules ont été comptées. Chaque point a été réalisé en trois exemplaires et compté deux fois, puis les six comptages ont été moyennés. L'inhibition de la prolifération induite par l'IFN- α a été évaluée d'après le ratio entre le nombre de cellules ayant poussé en présence d'IFN- α et le nombre de cellules ayant poussé sans IFN- α , retiré à 100 et exprimé en pourcentage.

DISCUSSION

DISCUSSION

I. Système d'étude utilisé

Nous avons choisi pour ce travail d'utiliser une lignée cellulaire murine, la lignée fibroblastique L929, dans laquelle nous avons exprimé de façon stable les sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 humaines (cellules L929R1R2). En effet, pour pouvoir étudier spécifiquement les mutations réalisées sur IFNAR1, il convenait de s'affranchir des molécules IFNAR1 endogènes. L'expression du récepteur de l'IFN de type I étant ubiquitaire, il était impossible d'exprimer nos constructions dans des cellules dépourvues de récepteur. Or, l'interaction de l'IFN- α avec son récepteur étant spécifique de l'espèce, il est possible, en exprimant le récepteur humain dans des cellules d'une autre espèce, d'étudier spécifiquement les effets qu'il induit en l'activant par l'IFN- α humain. Ce système a été établi dans une étude antérieure (Cajean-Feroldi et al., 2004).

Néanmoins, il comporte quelques inconvénients. Nous avons validé sa fonctionnalité pour notre étude en nous assurant de la capacité de l'IFN- α humain à induire la voie JAK/STAT dans ces cellules, ce qui est le cas. Toutefois, en comparant à d'autres lignées cellulaires humaines (HeLa, RPE-1), l'efficacité de l'IFN- α sur les L929R1R2 était plutôt réduite comme le montre la moindre intensité de translocation nucléaire de pSTAT1. On peut en effet se demander si la spécificité d'espèce concerne également, à un degré plus faible, l'interaction entre les protéines de signalisation (TYK2, JAK1, STAT2 et STAT1) et les deux chaînes du récepteur.

Pour tenter d'évaluer ce problème, j'ai comparé les séquences protéiques des deux chaînes du récepteur, de chacune des JAKs et de chacune des STATs entre les deux espèces homme et souris. J'ai ainsi obtenu un pourcentage d'homologie, calculé d'après le nombre d'acides aminés identiques. Ces résultats sont présentés tableau 4. On peut constater que l'homologie entre la forme humaine et la forme murine des deux sous-unités du récepteur n'est que de 46%. Si les formes humaines et murines de TYK2 et de STAT1 sont assez proches (80% et 93% d'homologie, respectivement), celles de JAK1 et de STAT2 le sont moins (64% et 67% d'homologie). Ces différences entre les protéines des deux espèces expliquent sans doute l'activation moins forte de la voie JAK/STAT (traduite par une plus faible translocation nucléaire de pSTAT1) dans les cellules L929R1R2.

Des expériences de co-immunoprécipitation dans ces cellules pourraient permettre de confirmer l'association entre les sous-unités du récepteur humain et les JAKs et STATs murins. Ces expériences n'ont pas été réalisées, néanmoins, il faut noter qu'une co-immunoprécipitation entre IFNAR1 et TYK2 n'a jamais été réussie dans aucun type cellulaire (interaction démontrée *in vitro* uniquement).

S'il est possible d'étiqueter IFNAR1, avec un groupe Flag par exemple, pour étudier les constructions mutantes dans des cellules humaines, cette approche ne permet pas d'étudier spécifiquement la signalisation induite par les formes mutantes d'IFNAR1. Nous ne disposons par conséquent d'aucun autre système pour cette étude.

Protéine	Homologie
IFNAR1	46%
IFNAR2	46%
TYK2	80%
JAK1	64%
STAT2	67%
STAT1	93%

Tableau 4. Homologie entre les formes humaines et murines des protéines de la voie JAK/STAT. Les séquences protéiques ont été comparées par ClustalW, et l'homologie a été évaluée comme le pourcentage d'acides aminés identiques.

II. Palmitoylation

II.1 Probabilités de palmitoylation

IFNAR1 possède deux cystéines cytoplasmiques, Cys⁴⁶³ et Cys⁵⁰², et nous avons montré que seul le résidu Cys⁴⁶³ est palmitoylé. Un programme de prédiction des sites palmitoylés, CSS-Palm, a été mis au point par Zhou et al en 2006 en se basant sur les connaissances disponibles dans la littérature et les 263 sites de palmitoylation connus (Zhou et al., 2006). Une version plus récente (v2.0) a récemment été mise au point (Ren et al., 2008). Un calcul de la probabilité de palmitoylation réalisé sur IFNAR1 à l'aide de ce programme affiche un score plus élevé pour Cys⁴⁶³ (0,809) que pour Cys⁵⁰² (0,348), ce qui concorde avec nos résultats (tableau 5). La sous-unité IFNAR2, que nous avons aussi montré être palmitoylée, possède deux cystéines cytoplasmiques, Cys²⁷¹ et Cys³⁹⁵. Le calcul montre que seule la Cys²⁷¹ présente une forte probabilité d'être palmitoylée avec un score de 1,983. En accord avec cette observation, la forme murine d'IFNAR2 ne possède pas de résidu cystéine au voisinage de la position 395. Il reste à déterminer expérimentalement si Cys²⁷¹ est effectivement le résidu palmitoylé d'IFNAR2.

Le programme CSS-Palm nous a aussi permis d'observer que les JAKS ont de fortes chances d'être palmitoylés, sur des résidus multiples (5 résidus pour la forme humaine de TYK2, 4 résidus pour JAK1) avec des scores très élevés. On constate aussi que la forme murine de TYK2 possède un résidu supplémentaire, la Cys⁸, dont la probabilité de palmitoylation est extrêmement forte (score de 2,913). Les STATs ont également une probabilité de palmitoylation élevée, mais sur un seul résidu (Cys⁵⁷⁷ pour STAT1 et Cys²⁸⁴ pour STAT2).

Protéine	Position	Séquence	Score
IFNAR1 humain	463	FLR <u>C</u> IN Y	0,809
	502	IEK <u>C</u> FII	0,348
IFNAR1 murin	457	KYL <u>C</u> HVC	1,024
	590	ALL <u>C</u> ***	1,687
IFNAR2 humain	271	GYI <u>C</u> LRN	1,904
	395	SGP <u>C</u> ERR	0,417
IFNAR2 murin	270	GYI <u>C</u> LKD	1,252
TYK2 humain	550	LRR <u>C</u> CLP	1,375
	551	RRC <u>C</u> LPQ	1,359
	965	YKG <u>C</u> CED	1,188
	966	KGC <u>C</u> EDQ	1,453
	1187	FSV <u>C</u> ***	2,165
TYK2 murin	8	MPL <u>C</u> GRR	2,913
	550	LHH <u>C</u> CLP	1,094
	551	HH <u>C</u> CLPR	1,125
	962	YKG <u>C</u> CED	1,078
	963	KGC <u>C</u> EDQ	1,375
	1184	FSV <u>C</u> ***	2,000
JAK1 humain	10	KED <u>C</u> NAM	1,939
	16	MAF <u>C</u> AKM	1,678
	543	LKR <u>C</u> CQP	1,016
	544	KRC <u>C</u> QPK	0,859
JAK1 murin	10	KED <u>C</u> NAM	1,670
	16	MAF <u>C</u> AKM	1,487
	542	LKR <u>C</u> CQP	0,969
	543	KRC <u>C</u> QPK	0,859
STAT1 humain	577	NDG <u>C</u> IMG	1,026
STAT1 murin	577	NDG <u>C</u> IMG	0,843
STAT2 humain	284	GLS <u>C</u> LVS	0,861
STAT2 murin	245	QKS <u>C</u> IGA	0,878

Tableau 5. Prédiction des sites de palmitoylation à l'aide du programme CSS-Palm v2.0.

La protéine étudiée, les positions des cystéines potentiellement palmitoylées, la séquence entourant la cystéine ainsi que le score obtenu par le calcul sont représentés. A l'exception d'IFNAR1 et d'IFNAR2, seuls les scores supérieurs à 0,800 (probabilité moyenne à forte) sont indiqués.

On peut noter que, d'après ces données statistiques, les positions des sites de palmitoylation de toutes ces protéines sont relativement conservées entre l'homme et la souris. Il est donc tentant d'en déduire que la palmitoylation jouerait un rôle fonctionnel crucial pour toutes ces protéines impliquées dans la signalisation, notamment en facilitant les interactions de ces protéines entre elles, ainsi que leur localisation dans des microdomaines membranaires de type raft. Ceci permettrait d'expliquer, d'une part, que malgré l'homologie limitée entre les séquences protéiques humaines et murines, les JAKs et STATs murines parviennent à transduire le signal initié par le récepteur humain (voir chapitre précédent, *Système d'étude utilisé*) ; mais aussi, d'autre part, que le traitement des cellules par l'inhibiteur général de la palmitoylation 2-bromopalmitate aboutisse à une inhibition aussi drastique de la voie JAK/STAT induite par l'IFN- α (figure 1 de l'article).

Toutefois, la palmitoylation des JAKs et des STATs reste à confirmer expérimentalement.

II.2 Environnement peptidique

Les cystéines palmitoylées se retrouvent souvent dans des environnements peptidiques particuliers : environnements hydrophobes, suivis d'une série d'acides aminés chargés positivement (voir chapitre II.II.1 de l'introduction, *Motifs de palmitoylation*). L'environnement peptidique de la Cys⁴⁶³ est représenté figure 24. La Cys⁴⁶³ se trouve certes dans un environnement hydrophobe, mais n'est pas suivie d'une série d'acides aminés chargés positivement. Par contre, comme c'est le cas pour beaucoup de protéines transmembranaires palmitoylées, elle se trouve proche de la membrane plasmique (à seulement 5 acides aminés).

458-KVFLRCIN⁴⁶³YVFFPSLKPSSSID⁴⁶³EYFSEQPLKNLLSTSEEQIEKCFIIE⁴⁶³N-507 WT

Figure 24. Environnement peptidique des cystéines cytoplasmiques d'IFNAR1.

La séquence protéique des acides aminés 458 à 507 du domaine cytoplasmique d'IFNAR1 est représentée. Les cystéines sont représentées en rouge, la Cys⁴⁶³ palmitoylée est soulignée. Un surlignage de couleur est attribué aux acides aminés selon leurs caractéristiques biochimiques : rose, hydrophobe ; jaune, hydrophile neutre ; vert, hydrophile chargé négativement (acide) ; bleu, hydrophile chargé positivement (basique).

III. Trafic d'IFNAR1

III.1 Rôle de la palmitoylation dans le trafic d'IFNAR1

Nous avons montré que la palmitoylation d'IFNAR1 n'était pas impliquée dans son endocytose, bien qu'un lien entre endocytose et palmitoylation ait été démontré pour plusieurs protéines transmembranaires. Le récepteur de la bradykinine B est phosphorylé sur son résidu Tyr³⁵², qui est probablement impliqué dans un motif d'internalisation. Soskic et al ont montré que le récepteur de la bradykinine B est palmitoylé sur son résidu Cys³⁵⁶, et que la phosphorylation de la Tyr³⁵² et la palmitoylation de la Cys³⁵⁶ sont mutuellement exclusives (Soskic et al., 1999). On peut donc facilement supposer que la palmitoylation d'une cystéine située quatre acides aminés plus loin permettrait de prévenir et de réguler l'endocytose du récepteur. Il est intéressant de constater que dans le cas d'IFNAR1, la Tyr⁴⁶⁶, située trois acides aminés après la Cys⁴⁶³, fait également partie d'un motif d'internalisation Yxxφ. Bien que nos résultats ne mettent pas en évidence un rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans son endocytose, il serait tentant de proposer ici un mécanisme similaire dans lequel la palmitoylation de la Cys⁴⁶³ régulerait la phosphorylation de la Tyr⁴⁶⁶. Ceci se ferait sans doute plutôt de manière positive, étant donné que la Tyr⁴⁶⁶ phosphorylée est le site d'arrimage de la forme activée de STAT2 (voir plus bas chapitre IV de la discussion, *Signalisation de l'IFN-α*). Cette hypothèse reste à confirmer expérimentalement.

Nous avons également montré que, contrairement à d'autres protéines transmembranaires (Abrami et al., 2006; Percherancier et al., 2001; Schweizer et al., 1996; Tani and Hannun., 2007), un défaut de palmitoylation d'IFNAR1 n'aboutissait pas à un adressage accru vers les lysosomes. Néanmoins, pour pouvoir observer plus facilement une accumulation d'IFNAR1 non palmitoylé dans ces compartiments, il aurait fallu traiter les cellules par des inhibiteurs des enzymes de dégradation lysosomales, tels que la leupeptine. En effet, les protéines étant rapidement dégradées lors de leur arrivée dans les lysosomes, il est difficile de pouvoir les y observer par immunofluorescence. Toutefois, si la forme non palmitoylée d'IFNAR1 était sujette à une dégradation lysosomale accrue, nous aurions observé une réduction de sa demie-vie à la membrane plasmique, ce qui n'était pas le cas.

Une étude précédente de mon laboratoire d'accueil a indiqué qu'IFNAR1 n'est pas localisé dans les rafts, comme le montre son exclusion des DRMs (Marchetti et al., 2006). Par conséquent, s'il a été très largement décrit que la palmitoylation permet la localisation des protéines dans ces microdomaines lipidiques, il semble que ce ne soit pas le cas pour IFNAR1. Dans certains cas, la palmitoylation permet aussi aux protéines d'être exclues des rafts (Abrami et al., 2006). Une telle fonction de la palmitoylation d'IFNAR1 n'a pas été testée.

Certaines études ont suggéré tout de même une présence d'IFNAR1 dans les rafts (Takaoka et al., 2000), il convient donc de déterminer si ces divergences de résultats sont dus aux types cellulaires utilisés ou proviennent d'une différence de protocole dans l'isolation des DRMs. De plus, une localisation d'IFNAR1 dans les rafts serait consistante avec ses propriétés de signalisation (voir chapitre IV.1 de la discussion, *Rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans la signalisation de l'IFN- α*).

Les expériences initiales que nous avons réalisées avec le 2-bromopalmitate ont montré une forte inhibition de l'endocytose lorsque la palmitoylation était inhibée de manière générale, or, le mutant d'IFNAR1 non palmitoylé est endocyté normalement. Ceci suggère que d'autres protéines palmitoylées sont impliquées dans l'endocytose d'IFNAR1. Ce peut être directement des protéines de la machinerie d'endocytose, il conviendrait pour tester cette possibilité d'étudier la palmitoylation des acteurs de la voie dépendante de la clathrine.

On peut également s'interroger sur un rôle potentiel de la sous-unité IFNAR2, elle-même palmitoylée, dans l'endocytose d'IFNAR1. Si le modèle admis veut que IFNAR1 et IFNAR2 ne s'associent qu'après la liaison de l'IFN, une étude a suggéré qu'IFNAR1 et IFNAR2 existent sous forme d'un complexe préassocié à la membrane plasmique (Cajean-Feroldi et al., 2004). Dans ce cas, on pourrait supposer qu'IFNAR2, ayant conservé intacte sa capacité à être endocytée, permette au mutant d'IFNAR1 non palmitoylé d'être internalisé par l'intermédiaire de leur association. Toutefois, cette étude repose sur le fait qu'un anticorps dirigé contre le site de liaison de l'IFN sur IFNAR1, l'anticorps 64G12, empêche l'induction des activités biologiques de l'IFN de type I. Les auteurs ont donc conclu, étant donné que cet anticorps ne reconnaît pas le site de liaison de l'IFN sur IFNAR2, que les deux sous-unités devaient nécessairement être associées avant la liaison de l'IFN. Cependant, si l'on considère le modèle initial où les deux sous-unités ne s'associent qu'en présence d'IFN, on peut concevoir que l'anticorps 64G12, en empêchant la liaison de l'IFN à IFNAR1, empêche également la formation du complexe ternaire IFN-IFNAR1-IFNAR2, et donc l'induction des effets biologiques de l'IFN. La validation de ce modèle requiert donc des recherches plus poussées.

Chez les protéines cytoplasmiques, la palmitoylation a souvent un rôle d'ancrage important dans les membranes lipidiques (Resh, 1999). Les protéines transmembranaires étant déjà fortement ancrées dans les membranes par leur(s) domaine(s) transmembranaire(s), il est peu probable que leur palmitoylation joue un rôle additionnel direct dans leur stabilité membranaire. En revanche, la palmitoylation peut jouer un rôle indirect dans la stabilité membranaire par la régulation de certains mécanismes : régulation de la phosphorylation des tyrosines dans des motifs d'endocytose, régulation de l'ubiquitination, et cela se fait probablement, d'une manière générale, par la régulation des interactions du domaine cytoplasmique des protéines avec d'autres facteurs (kinases, ubiquitine ligases, ...). Toutefois, dans le cas d'IFNAR1, la palmitoylation ne semble pas être impliquée dans sa stabilité à la membrane plasmique.

Nos résultats montrent que la palmitoylation d'IFNAR1 semble ne pas être requise pour son trafic, contrairement à ce qui a été montré pour d'autres protéines transmembranaires. Le mutant non palmitoylé n'a pas de problème d'export de l'appareil de Golgi, est endocyté normalement, recyclé normalement, et sa stabilité à la membrane plasmique n'est pas altérée. Cependant, il existe d'autres cas de protéines palmitoylées où la palmitoylation ne joue aucun rôle apparent dans le trafic. On peut citer par exemple les protéines SNARE de levure *snc1* et *syn8* (Valdez-Taubas and Pelham, 2005), ou la protéine virale LMP2A du virus Epstein Bar (Katzman and Longnecker, 2004).

III.2 Autres considérations sur le trafic d'IFNAR1

Nous avons montré qu'il n'y a pas de différence dans la localisation intracellulaire d'IFNAR1 consécutive à son endocytose en présence ou non d'IFN- α . Il a été montré que l'endocytose constitutive d'IFNAR1 l'adresse dans l'endosome de recyclage, tandis que l'endocytose induite par l'IFN- α l'adresse dans les lysosomes (voir chapitre I.VI de l'introduction, *Trafic cellulaire des récepteurs aux IFNs*). Il est possible que le récepteur de l'IFN de type I transite toujours par l'endosome de recyclage, avant soit d'être recyclé, soit, s'il y a eu liaison de l'IFN et ubiquitination, d'être dirigé vers les lysosomes. Dans tous les cas, on devrait s'attendre à voir une différence d'adressage d'IFNAR1 lorsque l'endocytose se fait ou non en présence d'IFN- α , ce qui n'est pas le cas. Néanmoins, il faut considérer qu'IFNAR1 étant rapidement dégradé dans les lysosomes, il est difficile de pouvoir l'observer dans ces compartiments.

IV. Signalisation de l'IFN- α

IV.1 Rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 dans la signalisation de l'IFN- α

Nos résultats montrent que la palmitoylation d'IFNAR1 joue un rôle clef dans l'induction de la voie de signalisation JAK/STAT induite par l'IFN- α . Toutefois, l'inhibition des différentes étapes de cette voie lorsque la palmitoylation d'IFNAR1 est inhibée spécifiquement par mutation n'est que partielle. Au contraire, lorsque les cellules ont été traitées par le 2-bromopalmitate, qui inhibe la palmitoylation de manière générale, l'inhibition est beaucoup plus forte (totale pour la translocation nucléaire de pSTAT1). Ceci suggère que la palmitoylation d'autres protéines est impliquée. De bonnes candidates sont les protéines intervenant dans cette voie de signalisation, les JAKs et les STATs. Ces protéines présentent de fortes chances d'être palmitoylées, comme le montrent les résultats du programme CSS-Palm (voir chapitre II.1 de la discussion, *Probabilités de palmitoylation*). De plus, la palmitoylation jouerait un rôle important dans les interactions protéine-protéine, ce qui est particulièrement significatif dans le cadre des cascades de signalisation. Cette fonction a été

intensivement décrite dans la signalisation des cellules hématopoïétiques (Flaumenhaft and Sim, 2005). La palmitoylation des JAKs et des STATs reste un champ de recherche important à explorer.

La palmitoylation est unique parmi les modifications lipidiques des protéines par le fait que c'est la seule qui soit réversible. Cette propriété lui permet d'avoir des fonctions de régulation des fonctions protéiques, elle pourrait donc, tout comme la phosphorylation et l'échange du GTP, être un élément de régulation de la signalisation. Dans ce contexte, il convient de s'intéresser aux enzymes responsables de la régulation palmitoylation/dépalmitoylation. Une famille de palmitoyltransférases contenant un motif DHHC a été identifiée récemment (voir chapitre II.II.2.2.2 de l'introduction, *Famille DHHC*), 23 membres ont été actuellement caractérisés chez l'homme (Ohno et al., 2006). Fukata et al ont mis au point une méthode de criblage pour identifier les protéines DHHC impliquées dans la palmitoylation d'un substrat donné (Fukata et al., 2004). Elle consiste à surexprimer chacune de ces 23 PATs dans des cellules en culture, et de regarder ensuite si cela permet une augmentation de l'incorporation de palmitate tritié chez le substrat d'intérêt. Nous avons prévu d'appliquer cette méthode pour tenter d'identifier la ou les PAT(s) responsable(s) de la palmitoylation d'IFNAR1.

Une façon dont la palmitoylation d'IFNAR1 pourrait agir sur l'interaction avec TYK2 et STAT2 serait par la modulation de la conformation spatiale de sa partie cytoplasmique. La palmitoylation d'IFNAR1 sur sa Cys⁴⁶³ pourrait induire une conformation qui permette le recrutement de TYK2 et de STAT2. Inversement, lorsqu'IFNAR1 n'est plus palmitoylée, l'accès de ces protéines serait moins favorable, expliquant ainsi les effets que nous avons observé sur le signal avec le mutant IFNAR1 AC.

Dans le chapitre III.1 de la discussion (*Rôle de la palmitoylation dans le trafic d'IFNAR1*) j'ai soumis l'hypothèse d'un lien entre la palmitoylation de la Cys⁴⁶³ et la phosphorylation de la Tyr⁴⁶⁶. La Tyr⁴⁶⁶ phosphorylée est le site d'arrimage de la forme activée de STAT2. Etant donné le rôle important de la palmitoylation d'IFNAR1 dans l'induction du signal, il semble plus probable que la palmitoylation de la Cys⁴⁶³ facilite la phosphorylation de la Tyr⁴⁶⁶, plutôt que ces deux modifications ne soient mutuellement exclusives. Il serait intéressant d'étudier si la palmitoylation d'IFNAR1 est requise pour la phosphorylation de la Tyr⁴⁶⁶.

On peut également imaginer que la présence d'un palmitate à trois acides aminés de la Tyr⁴⁶⁶ prévienne le recrutement de tyrosine phosphatases, empêchant ainsi la déphosphorylation de la Tyr⁴⁶⁶, de STAT2 et de STAT1 et participant ainsi à la maintenance du signal.

Enfin, un rôle des microdomaines lipidiques ou rafts dans la signalisation de l'IFN de type I est à considérer, même si, pour l'instant, la présence d'IFNAR1 dans les rafts est débattue (Marchetti et al., 2006; Takaoka et al., 2000). La palmitoylation des protéines permet le plus souvent leur

localisation dans des microdomaines et facilite ainsi la signalisation par recrutement des protéines impliquées. On peut facilement imaginer que l'attachement d'un ou plusieurs acide(s) gras saturé(s) à une protéine membranaire modifie son environnement lipidique et induise ainsi la formation d'un microdomaine lipidique ou raft (voir chapitre II.III.1.2 de l'introduction, *Localisation dans les rafts*). Ceci aboutit au recrutement de toutes ces protéines dans un même raft de deux façons possibles (non mutuellement exclusives): 1, plusieurs palmitoylations (de plusieurs protéines avoisinantes) facilitent la formation d'un microdomaine ; 2, différents microdomaines avoisinants fusionnent ensemble. De cette manière, les différentes protéines palmitoylées impliquées dans la signalisation (ici, IFNAR1, IFNAR2, et probablement TYK2, JAK1, STAT1 et STAT2) se retrouvent confinées et stabilisées dans un même raft, ce qui facilite leurs interactions. Ces hypothèses forment un modèle cohérent, associant le caractère dynamique de la formation des rafts et les propriétés transitoires et réversibles de la palmitoylation avec le processus dynamique et finement régulé de la signalisation.

IV.2 Autres modifications post-traductionnelles impliquées dans la signalisation de l'IFN- α

Parmi les événements impliqués dans les cascades de signalisation, le rôle de la phosphorylation est largement reconnu. Dans le cas de la voie JAK/STAT, la phosphorylation des différents acteurs sur des résidus tyrosine a été montrée cruciale. Cependant, un certain nombre d'éléments amène à penser que d'autres modifications post-traductionnelles sont probablement impliquées dans cette cascade de signalisation. Par exemple, le recrutement de STAT2 à IFNAR2 peut être à la fois dépendant ou non de la phosphorylation d'IFNAR2, et STAT1 et STAT2 ont la capacité de former des hétérodimères indépendamment de leur état de phosphorylation.

Nous avons mis à jour un rôle de la palmitoylation dans la voie de signalisation JAK/STAT. Une autre étude récente a également montré un rôle important d'une autre modification post-traductionnelle, l'acétylation, dans la signalisation de l'IFN- α (Tang et al, 2007). L'acétylation est l'addition d'un groupement acétyl (CH₃-C=O) sur un résidu lysine (Lys). Cette modification est catalysée par des acétyltransférases et influence la conformation des protéines ainsi que leurs interactions avec des molécules cibles en neutralisant la charge positive et en modifiant la taille de la chaîne latérale des résidus lysine. Suite à la stimulation par l'IFN- α , la CBP (CREB-binding protein), une acétyltransférase, est recrutée sur IFNAR2 où elle induit l'acétylation de la Lys³⁹⁹. Une fois acétylée, la Lys³⁹⁹ sert de site de recrutement de l'IRF9, qui forme avec STAT1 et STAT2 le complexe de transcription ISGF3. IRF9, STAT1 et STAT2 sont également acétylés par la CBP. L'acétylation de STAT2 sur sa Lys³⁹⁰ régule l'interaction entre STAT1 et STAT2, et l'acétylation de IRF9 et de STAT2 dans leur domaine de liaison à l'ADN joue un rôle critique dans l'activation de la fonction transcriptionnelle du complexe ISGF3 et dans l'induction de l'activité antivirale.

V. Rôle de la palmitoylation sur les effets biologiques de l'IFN- α

De façon surprenante, en dépit de l'importance de la palmitoylation d'IFNAR1 sur la signalisation JAK/STAT et l'activité transcriptionnelle induites par l'IFN- α , nous n'avons pas observé d'inhibition de l'action antiproliférative de l'IFN- α chez le mutant non palmitoylé IFNAR1 AC. Ceci peut s'expliquer par plusieurs raisons.

Premièrement, l'inhibition de la voie JAK/STAT et de l'activité transcriptionnelle n'étaient que partielles (environ 60%). Il est donc possible que les 40% d'activité résiduelle soient suffisants pour l'induction des effets biologiques de l'IFN- α , notamment l'inhibition de la croissance cellulaire. De plus, il faut considérer que l'activation de la voie JAK/STAT s'observe sur des temps courts (20 à 30 minutes), tandis que l'inhibition de la prolifération cellulaire s'observe sur des temps plus longs (72 heures de stimulation par l'IFN- α).

Deuxièmement, la voie JAK/STAT n'est pas la seule voie de signalisation induite par l'IFN- α . Parmi les autres voies, on peut citer la voie des MAP kinases et la voie de la PI3 kinase (voir chapitre I.III.2 de l'introduction, *Les autres voies de signalisation des IFNs*). Si la palmitoylation est importante dans l'activation de la voie JAK/STAT, elle n'est peut-être pas impliquée dans l'activation des autres voies, qui peuvent également aboutir aux effets antiprolifératifs de l'IFN- α .

Troisièmement, concernant l'activation transcriptionnelle, nous avons seulement regardé l'activation d'un promoteur contenant un élément ISRE. Si ce type de promoteurs sont ceux qui sont majoritairement activés par l'IFN- α , il en existe d'autres, tels que ceux contenant des éléments GAS ou EIRE. Il est possible que l'activation de ces derniers, en particulier par une voie indépendante des JAKs et des STATs, conduise également aux effets antiprolifératifs de l'IFN- α et soit indépendante de la palmitoylation.

Quatrièmement, l'IFN- α est capable d'induire plusieurs effets biologiques, comprenant certes l'inhibition de la prolifération mais aussi, de façon importante, l'inhibition de la réplication virale. Il est donc possible que la palmitoylation d'IFNAR1 ne soit pas impliquée dans l'induction des effets antiprolifératifs de l'IFN- α , mais plutôt dans l'induction de l'activité antivirale.

S'il s'avérait que certaines de ces hypothèses se vérifient, et que la palmitoylation d'IFNAR1 soit spécifiquement impliquée dans certaines voies de signalisation et dans certains effets biologiques, mais pas dans d'autres, alors il serait intéressant de proposer un rôle de régulation spécifique de la palmitoylation dans l'induction des multiples voies de signalisation possibles. Ceci permettrait d'apporter un niveau d'explication supplémentaire à la complexité de la modulation de la signalisation de l'IFN de type I. Des travaux futurs sont requis pour déterminer le rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 sur la voie des MAP kinases, la voie de la PI3 kinase, l'induction des promoteurs GAS et l'activité antivirale de l'IFN- α .

VI. Relation entre le trafic d'IFNAR1 et l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN- α

Les travaux antérieurs de mon équipe d'accueil ont suggéré que l'endocytose d'IFNAR1 par la voie dépendante de la clathrine était requise pour l'induction de la voie JAK/STAT et les activités biologiques de l'IFN- α (Marchetti et al., 2006). Cependant, nous avons montré que la palmitoylation d'IFNAR1 était importante pour l'induction de la voie JAK/STAT mais pas pour l'endocytose d'IFNAR1.

Dans l'étude de Marchetti et al, l'endocytose dépendante de la clathrine a été inhibée de manière générale dans la cellule par l'intermédiaire de siRNAs dirigés contre la chaîne lourde de la clathrine et d'un mutant dominant négatif de la dynamine, une GTPase impliquée dans la scission des invaginations. Dans ces conditions, IFNAR1 n'était plus endocyté et la voie JAK/STAT ainsi que les effets biologiques de l'IFN- α n'étaient plus activés. Il a donc été supposé que l'endocytose d'IFNAR1 était une étape requise pour la signalisation de l'IFN- α par la voie JAK/STAT.

Toutefois, l'endocytose dépendante de la clathrine ayant été inhibée de manière générale, il est possible que l'endocytose d'autres facteurs, et non d'IFNAR1, soit nécessaire à l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN- α . Alternativement, si l'endocytose d'IFNAR1 est effectivement requise, nous pouvons supposer que le rôle de la palmitoylation dans la signalisation se situerait à une étape ultérieure. Ceci serait consistant avec le concept d'endosome de signalisation : ainsi, après liaison de l'IFN- α à son récepteur, ce dernier serait endocyté pour se retrouver dans l'endosome de signalisation (qui pourrait correspondre, par exemple, à l'endosome précoce), où aurait alors lieu l'induction de la voie JAK/STAT. C'est à cet endroit précis qu'interviendrait le rôle de la palmitoylation.

Afin de trancher entre ces deux possibilités, il convient d'inhiber spécifiquement l'endocytose d'IFNAR1 et d'en analyser les effets sur l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN- α . IFNAR1 contient dans son domaine cytoplasmique trois motifs potentiels d'endocytose : un motif de type Yxx ϕ (YVFF), un motif di-leucine, et un motif di-isoleucine. En collaboration avec Pierre Eid (Institut Gustave Roussy, Villejuif), nous avons généré des mutants d'IFNAR1 sur ces différents motifs (figure 25). Il reste maintenant à déterminer les propriétés endocytiques de ces mutants ainsi que leur capacité à activer la voie JAK/STAT en réponse à l'IFN- α .

IFNAR1 WT

458-KVFLRCINYVFFPSLKPSSSIDEYFSEQPLKNLLLSTSEEQIEKCFIIENISTTIATVEETNOTD
EDHKKYSSQTSQDSGNYSNEDESESKTSEELQQDFV-557

I504A

458-KVFLRCINYVFFPSLKPSSSIDEYFSEQPLKNLLLSTSEEQIEKCFAIENISTTIATVEETNOTD
EDHKKYSSQTSQDSGNYSNEDESESKTSEELQQDFV-557

L489,491A -I504A

458-KVFLRCINYVFFPSLKPSSSIDEYFSEQPLKNALASTSEEQIEKCFAIENISTTIATVEETNOTD
EDHKKYSSQTSQDSGNYSNEDESESKTSEELQQDFV-557

Y466A-F469A-L489,491A-I504A

458-KVFLRCINAVFAPSLKPSSSIDEYFSEQPLKNALASTSEEQIEKCFAIENISTTIATVEETNOTD
EDHKKYSSQTSQDSGNYSNEDESESKTSEELQQDFV-557

Figure 25. Mutants des motifs potentiels d'endocytose d'IFNAR1.

La séquence protéique du domaine intracellulaire d'IFNAR1 est représentée, les trois motifs potentiels d'endocytose YVFF, LL et II sont soulignés et surlignés en cyan. Les différents mutants sont nommés selon les acides aminés remplacés, qui sont surlignés en jaune sur la séquence.

VII. Impact thérapeutique

Le rôle régulateur de la palmitoylation dans la signalisation pourrait représenter dans le futur une cible thérapeutique prometteuse. Des drogues inhibant la palmitoylation ont déjà été testées dans le traitement de certaines pathologies. Ainsi, des acides gras à longue chaîne polyinsaturés ont été administrés chez des patients souffrant de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn (Belluzzi et al., 1996; Cleland et al., 1988; Kremer et al., 1987). Leur rôle inhibiteur de la palmitoylation permet alors la suppression de la signalisation du TCR, et par conséquent la suppression de la fonction des cellules T. Récemment, d'autres drogues inhibant la palmitoylation ont été explorées dans le traitement du cancer et des maladies cardiovasculaires, en raison de leur capacité à réguler l'activation de Ras ou les fonctions du récepteur aux oestrogènes (Blum et al., 2008; Galluzzo et al., 2008).

Cependant, dans le cas de l'IFN de type I, il convient plutôt de potentialiser la signalisation pour permettre d'optimiser les actions antivirales et antitumorales de l'IFN. La palmitoylation étant requise pour un déroulement optimal du signal, il faut alors chercher à la favoriser, et non à l'inhiber. Dans ce contexte particulier, il serait intéressant de développer des drogues visant à promouvoir la palmitoylation, telles que des activateurs des palmitoyltransférases, ou des compléments alimentaires en palmitoyl-CoA.

Il existe toutefois certaines pathologies, telles que le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérodermie, dans lesquelles une hyper-activation de la signalisation de l'IFN est en cause (Lande et al., 2004; Theofilopoulos et al., 2005). Les drogues inhibant la palmitoylation pourraient par conséquent se révéler intéressantes dans le traitement de ces maladies, tout comme, d'une manière générale, dans certaines maladies auto-immunes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nous avons montré que les deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 du récepteur de l'IFN de type I sont palmitoylées ; à l'aide de mutants sur les cystéines cytoplasmiques d'IFNAR1, nous avons montré que cette sous-unité est palmitoylée uniquement sur sa Cys⁴⁶³, la plus proche de la membrane plasmique. Bien que cette modification ne joue aucun rôle dans le trafic intracellulaire d'IFNAR1 ni dans sa stabilité, elle est importante pour l'induction de la voie de signalisation JAK/STAT comme le montrent l'inhibition de la phosphorylation de TYK2, de STAT1 et de la translocation nucléaire de la forme phosphorylée de STAT1 chez le mutant IFNAR1 AC non palmitoylé. La palmitoylation d'IFNAR1 est également requise pour l'activation transcriptionnelle induite par l'IFN- α , en revanche, elle n'est pas impliquée dans l'activité antiproliférative de l'IFN- α .

La palmitoylation est unique parmi les modifications lipidiques des protéines par le fait que c'est la seule qui soit transitoire et réversible. Cette propriété lui permet d'être un élément régulateur des fonctions des protéines, et de jouer un rôle important dans la signalisation.

La figure 26 récapitule les différents résultats et éléments discutés dans un modèle intégrant le rôle potentiel de l'endocytose d'IFNAR1 et le rôle de la palmitoylation dans l'induction de la voie JAK/STAT par l'IFN de type I. Suite à la liaison de l'IFN de type I à IFNAR1 et IFNAR2, le complexe IFN-récepteur est endocyté et se retrouve dans l'endosome de signalisation, où a lieu la transduction du signal. La palmitoylation d'IFNAR1, d'IFNAR2, et la palmitoylation probable des JAKs et des STATs permet à tous ces éléments d'interagir ensemble pour l'induction de la voie de signalisation. Il est possible que la palmitoylation des sous-unités du récepteur, des JAKs et des STATs induise la formation de microdomaines lipidiques au site membranaire du récepteur, et stabilise ainsi les interactions entre toutes ces protéines. Cette zone de la membrane, endocytée avec le récepteur, se retrouverait également dans l'endosome de signalisation. Les hypothèses proposées dans ce modèle restent à vérifier : il convient de s'assurer du rôle de l'endocytose d'IFNAR1 dans l'induction de la voie JAK/STAT à l'aide des mutants d'IFNAR1 sur les trois motifs potentiels d'endocytose, de démontrer expérimentalement la palmitoylation des JAKs et des STATs et d'étudier la localisation potentielle dans les rafts de toutes ces protéines.

Il serait intéressant d'explorer le rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 sur les autres voies de signalisation inductibles par l'IFN- α , notamment afin d'expliquer l'absence d'influence de la palmitoylation sur l'action antiproliférative de l'IFN- α en dépit de l'inhibition de la voie JAK/STAT. Il reste de plus à regarder le rôle de la palmitoylation d'IFNAR1 sur l'activité antivirale de l'IFN- α . Enfin, la contribution de la palmitoylation d'IFNAR2 dans l'endocytose du récepteur et dans l'induction de la voie JAK/STAT pourrait également être étudiée à l'aide de mutations sur ses cystéines cytoplasmiques.

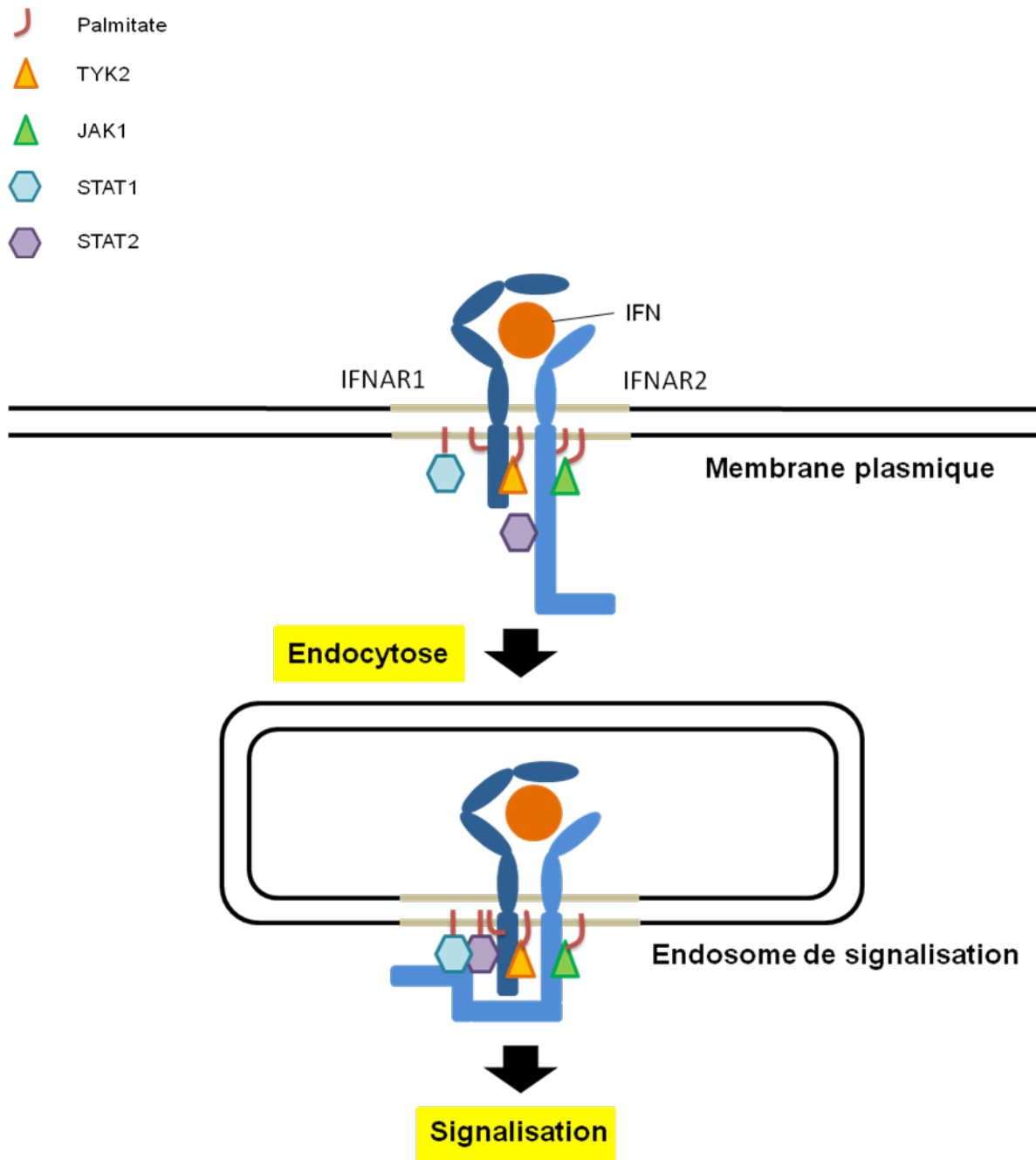


Figure 26. Proposition de modèle des événements gouvernant la signalisation de l'IFN de type I, intégrant le rôle de la palmitoylation et le rôle de l'endocytose.

IFNAR1 et IFNAR2 sont associés constitutivement avec leur JAKs respectives, TYK2 et JAK1. STAT2 est associé à IFNAR2. IFNAR1 et IFNAR2 sont palmitoylés, TYK2, JAK1, STAT1 et STAT2 sont également probablement palmitoylés. La liaison de l'IFN à IFNAR1 et IFNAR2 est suivie de l'endocytose du complexe IFN-récepteur, qui se retrouve alors dans l'endosome de signalisation. STAT2 activé par phosphorylation se lie à la Tyr⁴⁶⁶ phosphorylée d'IFNAR1, et recrute alors STAT1. Il est possible que STAT2 ne soit palmitoylé qu'après activation, ce qui permet son ancrage à la membrane et participe ainsi à la stabilisation d'un changement conformationnel d'IFNAR2 permettant à STAT2 d'interagir avec IFNAR1. La palmitoylation des différents éléments de la voie JAK/STAT leur permet d'interagir ensemble, notamment dans un microdomaine lipique (représenté en beige), afin de transduire le signal.

REFERENCES

REFERENCES

- Abrami, L., S.H. Leppla, and F.G. van der Goot.** 2006. Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *J Cell Biol.* **172**:309-20.
- Abrami, L., B. Kunz, I. Iacovache, and F.G. van der Goot.** 2008. Palmitoylation and ubiquitination regulate exit of the Wnt signaling protein LRP6 from the endoplasmic reticulum. *Proc Nat Acad Sci USA.* **105**:5384-5389.
- Acconcia, F., P. Ascenzi, A. Bocedi, E. Spisni, V. Tomasi, A. Trentalance, P. Visca, and M. Marino.** 2005. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell.* **16**:231-7.
- Aguet, M., Z. Dembic, and G. Merlin.** 1988. Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell.* **55**:273-80.
- Ahmad, S., Y.M. Alsayed, B.J. Druker, and L.C. Platanias.** 1997. The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of the CrkL adaptor protein. *J Biol Chem.* **272**:29991-4.
- Alvarez, E., N. Girones, and R.J. Davis.** 1990. Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid. *J Biol Chem.* **265**:16644-55.
- Apolloni, A., I.A. Prior, M. Lindsay, R.G. Parton, and J.F. Hancock.** 2000. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol.* **20**:2475-87.
- Arcaro, A., C. Gregoire, N. Boucheron, S. Stotz, E. Palmer, B. Malissen, and I.F. Luescher.** 2000. Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J Immunol.* **165**:2068-76.
- Barnes, N.C., M.S. Powell, H.M. Trist, A.L. Gavin, B.D. Wines, and P.M. Hogarth.** 2006. Raft localisation of FcgammaRIIa and efficient signaling are dependent on palmitoylation of cysteine 208. *Immunol Lett.* **104**:118-23.
- Barnhart, B.C., P. Legembre, E. Pietras, C. Bubici, G. Franzoso, and M.E. Peter.** 2004. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J.* **23**:3175-85.
- Bartels, D.J., D.A. Mitchell, X. Dong, and R.J. Deschenes.** 1999. Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**:6775-87.
- Belluzzi, A., C. Brignola, M. Campieri, A. Pera, S. Boschi, and M. Miglioli.** 1996. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med.* **334**:1557-60.
- Berthiaume, L., and M.D. Resh.** 1995. Biochemical characterization of a palmitoyl acyltransferase activity that palmitoylates myristoylated proteins. *J Biol Chem.* **270**:22399-405.
- Bharadwaj, M., and O.A. Bizzozero.** 1995. Myelin P0 glycoprotein and a synthetic peptide containing the palmitoylation site are both autoacylated. *J Neurochem.* **65**:1805-15.
- Bijlmakers, M.J., and M. Marsh.** 2003. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* **13**:32-42.

- Bivona, T.G., I. Perez de Castro, I.M. Ahearn, T.M. Grana, V.K. Chiu, P.J. Lockyer, P.J. Cullen, A. Pellicer, A.D. Cox and M.R. Philips.** 2003. Phospholipase $C\gamma$ activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature*. **424**:694-698.
- Blanpain, C., V. Wittamer, J.M. Vanderwinden, A. Boom, B. Renneboog, B. Lee, E. Le Poul, L. El Asmar, C. Govaerts, G. Vassart, R.W. Doms, and M. Parmentier.** 2001. Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways. *J Biol Chem*. **276**:23795-804.
- Blum, R., A.D. Cox, and Y. Kloog.** 2008. Inhibitors of chronically active ras: potential for treatment of human malignancies. *Recent Patents Anticancer Drug Discov*. **3**:31-47.
- Borden, E.C., D. Lindner, R. Dreicer, M. Hussein, and D. Peereboom.** 2000. Second-generation interferons for cancer: clinical targets. *Semin Cancer Biol*. **10**:125-44.
- Borden, E.C., G.C. Sen, G. Uze, R.H. Silverman, R.M. Ransohoff, G.R. Foster, and G.R. Stark.** 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*. **6**:975-90.
- Brierley, M.M., and E.N. Fish.** 2005. Stats: multifaceted regulators of transcription. *J. Interferon. Cytokine. Res*. **25**: 733-744.
- Cajean-Feroldi, C., F. Nosal, P.C. Nardeux, X. Gallet, J. Guymarho, F. Baychelier, P. Sempe, M.G. Tovey, J.L. Escary, and P. Eid.** 2004. Identification of residues of the IFNAR1 chain of the type I human interferon receptor critical for ligand binding and biological activity. *Biochemistry*. **43**:12498-512.
- Cantley, L.C.** 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. **296**:1655-7.
- Castelli, J.C., B.A. Hassel, A. Maran, J. Paranjape, J.A. Hewitt, X.L. Li, Y.T. Hsu, R.H. Silverman, and R.J. Youle.** 1998. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ*. **5**:313-20.
- Chakrabandhu, K., Z. Herincs, S. Huault, B. Dost, L. Peng, F. Conchonaud, D. Marguet, H.T. He, and A.O. Hueber.** 2007. Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J*. **26**:209-20.
- Chang, L., and M. Karin.** 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. **410**:37-40.
- Chatterjee-Kishore, M., K.L. Wright, J.P. Ting, and G.R. Stark.** 2000. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J*. **19**:4111-22.
- Cherukuri, A., R.H. Carter, S. Brooks, W. Bornmann, R. Finn, C.S. Dowd, and S.K. Pierce.** 2004. B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *J Biol Chem*. **279**:31973-82.
- Chill, J.H., S.R. Quadt, R. Levy, G. Schreiber, and J. Anglister.** 2003. The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding. *Structure*. **11**:791-802.
- Chiu, V.K., T. Bivona, A. Hach, J.B. Sjous, J. Silletti, H. Wiener, R.L. Johnson, A.D. Cox and M.R. Philips.** 2002. Ras signaling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol*. **4**:343-350.

- Choy, E., V.K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I.E. Ivanov, and M.R. Philips.** 1999. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*. **98**:69-80.
- Claudinon, J., M.N. Monier, and C. Lamaze.** 2007. Interfering with interferon receptor sorting and trafficking : impact on signaling. *Biochimie*. **89**: 735-743.
- Cleland, L.G., J.K. French, W.H. Betts, G.A. Murphy, and M.J. Elliott.** 1988. Clinical and biochemical effects of dietary fish oil supplements in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. **15**:1471-5.
- Coccia, E.M., G. Uze, and S. Pellegrini.** 2006. Negative regulation of type I interferon signaling: facts and mechanisms. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. **52**:77-87.
- Craven, S.E., A.E. El-Husseini, and D.S. Bredt.** 1999. Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron*. **22**:497-509.
- Das, A.K., B. Dasgupta, R. Bhattacharya, and J. Basu.** 1997. Purification and biochemical characterization of a protein-palmitoyl acyltransferase from human erythrocytes. *J Biol Chem*. **272**:11021-5.
- David, M., E. Petricoin, 3rd, C. Benjamin, R. Pine, M.J. Weber, and A.C. Lerner.** 1995. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science*. **269**:1721-3.
- Di Fiore, P.P., and P. De Camilli.** 2001. Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell*. **106**:1-4.
- Di Guglielmo, G.M., C. Le Roy, A.F. Goodfellow, and J.L. Wrana.** 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*. **5**:410-21.
- Dietrich, L.E., R. Gurezka, M. Veit, and C. Ungermann.** 2004. The SNARE Ykt6 mediates protein palmitoylation during an early stage of homotypic vacuole fusion. *EMBO J*. **23**:45-53.
- Dietrich, L.E., and C. Ungermann.** 2004. On the mechanism of protein palmitoylation. *EMBO Rep*. **5**:1053-7.
- Dietzen, D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin.** 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem*. **270**:6838-42.
- Domanski, P., M. Witte, M. Kellum, M. Rubinstein, R. Hackett, P. Pitha, and O.R. Colamonici.** 1995. Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J Biol Chem*. **270**:21606-11.
- Domanski, P., E.Fish, O.W. Nadeau, M. Witte, L.C. Plataniias, H. Yan, J. Krowleski, P. Pitha, and O.R. Colamonici.** 1997. A region of the beta subunit of the interferon alpha receptor box 1 interacts with jak1 and is sufficient to activate the Jak-Stat pathway and induce an antiviral state. *J Biol Chem*. **272**: 26338-93.
- Duncan, J.A., and A.G. Gilman.** 1996. Autoacylation of G protein alpha subunits. *J Biol Chem*. **271**:23594-600.
- Duncan, J.A., and A.G. Gilman.** 1998. A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J Biol Chem*. **273**:15830-7.

- Duncan, J.A., and A.G. Gilman.** 2002. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-protein thioesterase 1, the enzyme responsible for G protein alpha subunit deacylation in vivo. *J Biol Chem.* **277**:31740-52.
- Dunphy, J.T., W.K. Greentree, C.L. Manahan, and M.E. Linder.** 1996. G-protein palmitoyltransferase activity is enriched in plasma membranes. *J Biol Chem.* **271**:7154-9.
- Dunphy, J.T., H. Schroeder, R. Leventis, W.K. Greentree, J.K. Knudsen, J.R. Silvius, and M.E. Linder.** 2000. Differential effects of acyl-CoA binding protein on enzymatic and non-enzymatic thioacylation of protein and peptide substrates. *Biochim Biophys Acta.* **1485**:185-98.
- Faergeman, N.J., and J. Knudsen.** 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J.* **323** (Pt 1):1-12.
- Feig, C., V. Tchikov, S. Schutze, and M.E. Peter.** 2007. Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J.* **26**:221-31.
- Feller, S.M.** 2001. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene.* **20**:6348-71.
- Flaumenhaft, R., and D.S. Sim.** 2005. Protein palmitoylation in signal transduction of hematopoietic cells. *Hematology.* **10**:511-9.
- Fragoso, R., D. Ren, X. Zhang, M.W. Su, S.J. Burakoff, and Y.J. Jin.** 2003. Lipid raft distribution of CD4 depends on its palmitoylation and association with Lck, and evidence for CD4-induced lipid raft aggregation as an additional mechanism to enhance CD3 signaling. *J Immunol.* **170**:913-21.
- Frahm, T., H. Hauser, and M. Koster.** 2006. IFN-type-I-mediated signaling is regulated by modulation of STAT2 nuclear export. *J Cell Sci.* **119**:1092-104.
- Fu, X.Y., C. Schindler, T. Improta, R. Aebersold, and J.E. Darnell, Jr.** 1992. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:7840-3.
- Fukata, M., Y. Fukata, H. Adesnik, R.A. Nicoll, and D.S. Breddt.** 2004. Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron.* **44**:987-96.
- Fukushima, Y., T. Saitoh, M. Anai, T. Ogihara, K. Inukai, M. Funaki, H. Sakoda, Y. Onishi, H. Ono, M. Fujishiro, T. Ishikawa, K. Takata, R. Nagai, M. Omata, and T. Asano.** 2001. Palmitoylation of the canine histamine H2 receptor occurs at Cys(305) and is important for cell surface targeting. *Biochim Biophys Acta.* **1539**:181-91.
- Galluzzo, P., P. Ascenzi, P. Bulzomi, and M. Marino.** 2008. The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor alpha-palmitoylation. *Endocrinology.* **149**:2567-75.
- Gao, Z., Y. Ni, G. Szabo, and J. Linden.** 1999. Palmitoylation of the recombinant human A1 adenosine receptor: enhanced proteolysis of palmitoylation-deficient mutant receptors. *Biochem J.* **342** (Pt 2):387-95.
- Gavutis, M., E. Jaks, P. Lamken, and J. Piehler.** 2006. Determination of the two-dimensional interaction rate constants of a cytokine receptor complex. *Biophys J.* **90**:3345-55.

- Gavutis, M., S. Lata, P. Lamken, P. Muller, and J. Piehler.** 2005. Lateral ligand-receptor interactions on membranes probed by simultaneous fluorescence-interference detection. *Biophys J.* **88**:4289-302.
- Goh, K.C., S.J. Haque, and B.R. Williams.** 1999. p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *EMBO J.* **18**:5601-8.
- Goodwin, J.S., K.R. Drake, C. Rogers, L. Wright, J. Lippincott-Schwartz, M.R. Philips, and A.K. Kenworthy.** 2005. Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol.* **170**:261-72.
- Gupta, P., A.A. Soyombo, A. Atashband, K.E. Wisniewski, J.M. Shelton, J.A. Richardson, R.E. Hammer, and S.L. Hofmann.** 2001. Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:13566-71.
- Hancock, J.F.** 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**:456-62.
- Hancock, J.F., H. Paterson, and C.J. Marshall.** 1990. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell.* **63**:133-9.
- Hawtin, S.R., A.B. Tobin, S. Patel, and M. Wheatley.** 2001. Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem.* **276**:38139-46.
- Hayashi, M.K., and T. Haga.** 1997. Palmitoylation of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes: reduction in their ability to activate G proteins by mutation of a putative palmitoylation site, cysteine 457, in the carboxyl-terminal tail. *Arch Biochem Biophys.* **340**:376-82.
- Hayashi, T., G. Rumbaugh, and R.L. Huganir.** 2005. Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron.* **47**:709-23.
- Heathcote, J., and J. Main.** 2005. Treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat.* **12**:223-35.
- Hicke, L., and R. Dunn.** 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **19**:141-72.
- Hoeller, D., S. Volarevic, and I. Dikic.** 2005. Compartmentalization of growth factor receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol.* **17**:107-11.
- Honda, Z., T. Suzuki, H. Kono, M. Okada, T. Yamamoto, C. Ra, Y. Morita, and K. Yamamoto.** 2000. Sequential requirements of the N-terminal palmitoylation site and SH2 domain of Src family kinases in the initiation and progression of FcepsilonRI signaling. *Mol Cell Biol.* **20**:1759-71.
- Hu, J., S.K. Roy, P.S. Shapiro, S.R. Rodig, S.P. Reddy, L.C. Platanius, R.D. Schreiber, and D.V. Kalvakolanu.** 2001. ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. *J Biol Chem.* **276**:287-97.
- Hundt, M., H. Tabata, M.S. Jeon, K. Hayashi, Y. Tanaka, R. Krishna, L. De Giorgio, Y.C. Liu, M. Fukata, and A. Altman.** 2006. Impaired activation and localization of LAT in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect. *Immunity.* **24**:513-22.
- Isaacs, A., and J. Lindenmann.** 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **147**:258-67.

- Jaks, E., M. Gavutis, G. Uze, J. Martal, and J. Piehler.** 2007. Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol.* **366**:525-39.
- Jung, V., L. Chen, S.L. Hofmann, M. Wigler, and S. Powers.** 1995. Mutations in the SHR5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* suppress Ras function and block membrane attachment and palmitoylation of Ras proteins. *Mol Cell Biol.* **15**:1333-42.
- Kabouridis, P.S., A.I. Magee, and S.C. Ley.** 1997. S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J.* **16**:4983-98.
- Kalvakolanu, D.V.** 2003. Alternate interferon signaling pathways. *Pharmacol Ther.* **100**:1-29.
- Katzman, R.B., and R. Longnecker.** 2004. LMP2A does not require palmitoylation to localize to buoyant complexes or for function. *J Virol.* **78**:10878-87.
- Kennedy, M.E., and L.E. Limbird.** 1994. Palmitoylation of the alpha 2A-adrenergic receptor. Analysis of the sequence requirements for and the dynamic properties of alpha 2A-adrenergic receptor palmitoylation. *J Biol Chem.* **269**:31915-22.
- Kihara, A., F. Kurotsu, T. Sano, S. Iwaki, and Y. Igarashi.** 2005. Long-chain base kinase Lcb4 is anchored to the membrane through its palmitoylation by Akr1. *Mol Cell Biol.* **25**:9189-97.
- Kinlough, C.L., R.J. McMahan, P.A. Poland, J.B. Bruns, K.L. Harkleroad, R.J. Stremple, O.B. Kashlan, K.M. Weixel, O.A. Weisz, and R.P. Hughey.** 2006. Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation. *J Biol Chem.* **281**:12112-22.
- Kleuss, C., and E. Krause.** 2003. Galpha(s) is palmitoylated at the N-terminal glycine. *EMBO J.* **22**:826-32.
- Kotenko, S.V., G. Gallagher, V.V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N.K. Shah, J.A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, and R.P. Donnelly.** 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol.* **4**:69-77.
- Krebs, D.L., and D.J. Hilton.** 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells.* **19**:378-87.
- Kremer, J.M., W. Jubiz, A. Michalek, R.I. Rynes, L.E. Bartholomew, J. Bigaouette, M. Timchalk, D. Beeler, and L. Lininger.** 1987. Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blinded, controlled, crossover study. *Ann Intern Med.* **106**:497-503.
- Krishna, M., and H. Narang.** 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* In press.
- Kumar, K.G., J.J. Krolewski, and S.Y. Fuchs.** 2004. Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *J Biol Chem.* **279**:46614-20.
- Lackmann, M., A.G. Harpur, A.C. Oates, R.J. Mann, A. Gabriel, W. Meutermans, P.F. Alewood, I.M. Kerr, G.R. Stark, and A.F. Wilks.** 1998. Biomolecular interaction analysis of IFN gamma-induced signaling events in whole-cell lysates: prevalence of latent STAT1 in high-molecular weight complexes. *Growth Factors.* **16**:39-51.
- Lam, K.K., M. Davey, B. Sun, A.F. Roth, N.G. Davis, and E. Conibear.** 2006. Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J Cell Biol.* **174**:19-25.

- Lam, S., S. Wang, and M. Gottesman.** 2008. Interferon-beta(1b) for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **4**:1111-1117.
- Lamken, P., M. Gavutis, I. Peters, J. Van der Heyden, G. Uze, and J. Piehler.** 2005. Functional cartography of the ectodomain of the type I interferon receptor subunit ifnar1. *J Mol Biol.* **350**:476-88.
- Lamken, P., S. Lata, M. Gavutis, and J. Piehler.** 2004. Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers. *J Mol Biol.* **341**:303-18.
- Lande, R., E. Giacomini, B. Serafini, B. Rosicarelli, G.D. Sebastiani, G. Minisola, U. Tarantino, V. Riccieri, G. Valesini, and E.M. Coccia.** 2004. Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J Immunol.* **173**:2815-24.
- Lane, H.C., V. Davey, J.A. Kovacs, J. Feinberg, J.A. Metcalf, B. Herpin, R. Walker, L. Deyton, R.T. Davey, Jr., J. Falloon, et al.** 1990. Interferon-alpha in patients with asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) infection. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* **112**:805-11.
- Larkin, J., 3rd, H.M. Johnson, and P.S. Subramaniam.** 2000. Differential nuclear localization of the IFNGR-1 and IFNGR-2 subunits of the IFN-gamma receptor complex following activation by IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res.* **20**:565-76.
- Lee, H., S.E. Woodman, J.A. Engelman, D. Volonte, F. Galbiati, H.L. Kaufman, D.M. Lublin, and M.P. Lisanti.** 2001. Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J Biol Chem.* **276**:35150-8.
- Legembre, P., B.C. Barnhart, L. Zheng, S. Vijayan, S.E. Straus, J. Puck, J.K. Dale, M. Lenardo, and M.E. Peter.** 2004. Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep.* **5**:1084-9.
- Leventis, R., G. Juel, J.K. Knudsen, and J.R. Silvius.** 1997. Acyl-CoA binding proteins inhibit the nonenzymic S-acylation of cysteinyl-containing peptide sequences by long-chain acyl-CoAs. *Biochemistry.* **36**:5546-53.
- Li, Y., A. Sassano, B. Majchrzak, D.K. Deb, D.E. Levy, M. Gaestel, A.R. Nebreda, E.N. Fish, and L.C. Platanias.** 2004. Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling. *J Biol Chem.* **279**:970-9.
- Liang, X., A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, W. Bornmann, P. Tempst, and M.D. Resh.** 2001. Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J Biol Chem.* **276**:30987-94.
- Linder, M.E., and R.J. Deschenes.** 2006. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**:74-84.
- Lobo, S., W.K. Greentree, M.E. Linder, and R.J. Deschenes.** 2002. Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **277**:41268-73.
- Lodige, I., A. Marg, B. Wiesner, B. Malecova, T. Oelgeschlager, and U. Vinkemeier.** 2005. Nuclear export determines the cytokine sensitivity of STAT transcription factors. *J Biol Chem.* **280**:43087-99.

- Loisel, T.P., L. Adam, T.E. Hebert, and M. Bouvier.** 1996. Agonist stimulation increases the turnover rate of beta 2AR-bound palmitate and promotes receptor depalmitoylation. *Biochemistry*. **35**:15923-32.
- Lok, A.S., and B.J. McMahon.** 2007. Chronic hepatitis B. *Hematology*. **45**:507-539.
- Loutfy, M.R., L.M. Blatt, K.A. Siminovitch, S. Ward, B. Wolff, H. Lho, D.H. Pham, H. Deif, E.A. LaMere, M. Chang, K.C. Kain, G.A. Farcas, P. Ferguson, M. Latchford, G. Levy, J.W. Dennis, E.K. Lai, and E.N. Fish.** 2003. Interferon alfacon-1 plus corticosteroids in severe acute respiratory syndrome: a preliminary study. *Jama*. **290**:3222-8.
- Magee, A.I., and S.A. Courtneidge.** 1985. Two classes of fatty acid acylated proteins exist in eukaryotic cells. *EMBO J.* **4**:1137-1144.
- Marchetti, M., M.N. Monier, A. Fradagrada, K. Mitchell, F. Baychelier, P. Eid, L. Johannes, and C. Lamaze.** 2006. Stat-mediated signaling induced by type I and type II interferons (IFNs) is differentially controlled through lipid microdomain association and clathrin-dependent endocytosis of IFN receptors. *Mol Biol Cell*. **17**:2896-909.
- Mauro, M.J., and B.J. Druker.** 2001. Chronic myelogenous leukemia. *Curr Opin Oncol*. **13**:3-7.
- Meyer, T., and U. Vinkemeier.** 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem*. **271**:4606-12.
- Miaczynska, M., L. Pelkmans, and M. Zerial.** 2004. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. **16**:400-6.
- Mitchell, D.A., A. Vasudevan, M.E. Linder, and R.J. Deschenes.** 2006. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J Lipid Res*. **47**:1118-27.
- Miura, G.I., J. Buglino, D. Alvarado, M.A. Lemmon, M.D. Resh, and J.E. Treisman.** 2006. Palmitoylation of the EGFR ligand Spitz by Rasp increases Spitz activity by restricting its diffusion. *Dev Cell*. **10**:167-76.
- Moffett, S., B. Mouillac, H. Bonin, and M. Bouvier.** 1993. Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J.* **12**:349-56.
- Mogensen, K.E., M. Lewerenz, J. Reboul, G. Lutfalla, and G. Uze.** 1999. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res*. **19**:1069-98.
- Mouillac, B., M. Caron, H. Bonin, M. Dennis, and M. Bouvier.** 1992. Agonist-modulated palmitoylation of beta 2-adrenergic receptor in Sf9 cells. *J Biol Chem*. **267**:21733-7.
- Mumby, S.M.** 1997. Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr Opin Cell Biol*. **9**:148-54.
- Nadeau, O.W., P. Domanski, A. Usacheva, S. Uddin, L.C. Platanias, P. Pitha, R. Raz, D. Levy, B. Majchrzak, E. Fish, and O.R. Colamonici.** 1999. The proximal tyrosines of the cytoplasmic domain of the beta chain of the type I interferon receptor are essential for signal transducer and activator of transcription (Stat) 2 activation. Evidence that two Stat2 sites are required to reach a threshold of interferon alpha-induced Stat2 tyrosine phosphorylation that allows normal formation of interferon-stimulated gene factor 3. *J Biol Chem*. **274**:4045-52.
- Nadolski, M.J., and M.E. Linder.** 2007. Protein lipidation. *Febs J*. **274**:5202-10.

- Ndubuisi, M.I., G.G. Guo, V.A. Fried, J.D. Etlinger, and P.B. Sehgal.** 1999. Cellular physiology of STAT3: Where's the cytoplasmic monomer? *J Biol Chem.* **274**:25499-509.
- Nguyen, H., C.V. Ramana, J. Bayes, and G.R. Stark.** 2001. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem.* **276**:33361-8.
- Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein.** 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell.* **77**:391-400.
- Ohno, Y., A. Kihara, T. Sano, and Y. Igarashi.** 2006. Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1761**:474-83.
- Parat, M.O., and P.L. Fox.** 2001. Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible. *J Biol Chem.* **276**:15776-82.
- Parmar, S., and L.C. Platanias.** 2003. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol.* **15**:431-9.
- Peleg-Shulman, T., L.C. Roisman, G. Zupkovitz, and G. Schreiber.** 2004. Optimizing the binding affinity of a carrier protein: a case study on the interaction between soluble ifnar2 and interferon beta. *J Biol Chem.* **279**:18046-53.
- Pepinsky, R.B., C. Zeng, D. Wen, P. Rayhorn, D.P. Baker, K.P. Williams, S.A. Bixler, C.M. Ambrose, E.A. Garber, K. Miatkowski, F.R. Taylor, E.A. Wang, and A. Galdes.** 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem.* **273**:14037-45.
- Percherancier, Y., T. Planchenault, A. Valenzuela-Fernandez, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and F. Bachelierie.** 2001. Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *J Biol Chem.* **276**:31936-44.
- Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter.** 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* **202**:8-32.
- Petaja-Repo, U.E., M. Hogue, T.T. Leskela, P.M. Markkanen, J.T. Tuusa, and M. Bouvier.** 2006. Distinct subcellular localization for constitutive and agonist-modulated palmitoylation of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem.* **281**:15780-9.
- Platanias, L.C.** 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* **5**:375-86.
- Plowman, S.J., and J.F. Hancock.** 2005. Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochim Biophys Acta.* **1746**:274-83.
- Plowman, S.J., C. Muncke, R.G. Parton, and J.F. Hancock.** 2005. H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:15500-5.
- Ponimaskin, E.G., M.F. Schmidt, M. Heine, U. Bickmeyer, and D.W. Richter.** 2001. 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor expressed in Sf9 cells is palmitoylated in an agonist-dependent manner. *Biochem J.* **353**:627-34.

- Pranada, A.L., S. Metz, A. Herrmann, P.C. Heinrich, and G. Muller-Newen.** 2004. Real time analysis of STAT3 nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem.* **279**:15114-23.
- Qanbar, R., and M. Bouvier.** 2003. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther.* **97**:1-33.
- Radaeva, S., B. Jaruga, W.H. Kim, T. Heller, T.J. Liang, and B. Gao.** 2004. Interferon-gamma inhibits interferon-alpha signalling in hepatic cells: evidence for the involvement of STAT1 induction and hyperexpression of STAT1 in chronic hepatitis C. *Biochem J.* **379**:199-208.
- Ren, J., L. Wen, X. Gao, C. Jin, Y. Xue, and X. Yao.** 2008. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel.* In press.
- Resh, M.D.** 1996. Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal.* **8**:403-12.
- Resh, M.D.** 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1451**:1-16.
- Resh, M.D.** 2006. Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci STKE.* 2006:re14.
- Resh, M.D.** 2006. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol.* **2**: 584-590.
- Robinson, L.J., L. Busconi, and T. Michel.** 1995. Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* **270**:995-8.
- Roth, A.F., Y. Feng, L. Chen, and N.G. Davis.** 2002. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J Cell Biol.* **159**:23-8.
- Sadler, A.J., and B.R. Williams.** 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* **8**:559-68.
- Saleh, A.Z., A.T. Fang, A.E. Arch, D. Neupane, A. El Fiky, and J.J. Krolewski.** 2004. Regulated proteolysis of the IFN α 2 subunit of the interferon-alpha receptor. *Oncogene.* **23**:7076-86.
- Schweizer, A., S. Kornfeld, and J. Rohrer.** 1996. Cysteine34 of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting. *J Cell Biol.* **132**:577-84.
- Sehgal, P.B.** 2003. Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling. *Acta Biochim Pol.* **50**:583-94.
- Sehgal, P.B.** 2008. Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin Cell Dev Biol.*
- Shahinian, S., and J.R. Silvius. 1995. Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry.* **34**:3813-22.
- Sheppard, P., W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T.E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, J. Roraback, C. Ostrander, D. Dong, J. Shin, S. Presnell, B. Fox, B. Haldeman, E. Cooper, D. Taft, T. Gilbert, F.J. Grant, M. Tackett, W. Krivan, G. McKnight, C. Clegg, D. Foster, and K.M. Klucher.** 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol.* **4**:63-8.

- Shuai, K., and B. Liu.** 2005. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol.* **5**:593-605.
- Shuai, K., C. Schindler, V.R. Prezioso, and J.E. Darnell, Jr.** 1992. Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science.* **258**:1808-12.
- Smotrys, J.E., M.J. Schoenfish, M.A. Stutz, and M.E. Linder.** 2005. The vacuolar DHHC-CRD protein Pfa3p is a protein acyltransferase for Vac8p. *J Cell Biol.* **170**:1091-9.
- Soh, J., R.J. Donnelly, S. Kotenko, T.M. Mariano, J.R. Cook, N. Wang, S. Emanuel, B. Schwartz, T. Miki, and S. Pestka.** 1994. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. *Cell.* **76**:793-802.
- Soskic, V., E. Nyakatura, M. Roos, W. Muller-Esterl, and J. Godovac-Zimmermann.** 1999. Correlations in palmitoylation and multiple phosphorylation of rat bradykinin B2 receptor in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **274**:8539-45.
- Soyombo, A.A., and S.L. Hofmann.** 1997. Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase 2 (PPT2), a homolog of lysosomal palmitoyl-protein thioesterase with a distinct substrate specificity. *J Biol Chem.* **272**:27456-63.
- Stark, G.R.** 2007. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**:419-23.
- Stark, G.R., I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman, and R.D. Schreiber.** 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* **67**:227-64.
- Subramaniam, P.S., and H.M. Johnson.** 2002. Lipid microdomains are required sites for the selective endocytosis and nuclear translocation of IFN-gamma, its receptor chain IFN-gamma receptor-1, and the phosphorylation and nuclear translocation of STAT1alpha. *J Immunol.* **169**:1959-69.
- Subramaniam, P.S., and H.M. Johnson.** 2004. The IFNAR1 subunit of the type I IFN receptor complex contains a functional nuclear localization sequence. *FEBS Lett.* **578**:207-10.
- Sugimoto, H., H. Hayashi, and S. Yamashita.** 1996. Purification, cDNA cloning, and regulation of lysophospholipase from rat liver. *J Biol Chem.* **271**:7705-11.
- Swarthout, J.T., S. Lobo, L. Farh, M.R. Croke, W.K. Greentree, R.J. Deschenes, and M.E. Linder.** 2005. DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras. *J Biol Chem.* **280**:31141-8.
- Tahara, E., Jr., H. Tahara, M. Kanno, K. Naka, Y. Takeda, T. Matsuzaki, R. Yamazaki, H. Ishihara, W. Yasui, J.C. Barrett, T. Ide, and E. Tahara.** 2005. G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell. *Cancer Immunol Immunother.* **54**:729-40.
- Takaoka, A., Y. Mitani, H. Suemori, M. Sato, T. Yokochi, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi.** 2000. Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains. *Science.* **288**:2357-60.
- Tang, X., J.S. Gao, Y.J. Guan, K.E. McLane, Z.L Yuan, B. Ramratnam, and Y.E. Chin.** 2007. Acetylation-dependent signal transduction of the type I interferon receptor. *Cell.* **131**: 93-105.

- Tani, M., and Y.A. Hannun.** 2007. Neutral sphingomyelinase 2 is palmitoylated on multiple cysteine residues. Role of palmitoylation in subcellular localization. *J Biol Chem.* **282**:10047-56.
- Thankamony, S.P., and W. Knudson.** 2006. Acylation of CD44 and its association with lipid rafts are required for receptor and hyaluronan endocytosis. *J Biol Chem.* **281**:34601-9.
- Theofilopoulos, A.N., R. Baccala, B. Beutler, and D.H. Kono.** 2005. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* **23**:307-36.
- Tian, Z., X. Shen, H. Feng, and B. Gao.** 2000. IL-1 beta attenuates IFN-alpha beta-induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J Immunol.* **165**:3959-65.
- Truchet, S., J. Wietzerbin, and P. Debey.** 2001. Mouse oocytes and preimplantation embryos bear the two sub-units of interferon-gamma receptor. *Mol Reprod Dev.* **60**:319-30.
- Uddin, S., F. Lekmine, N. Sharma, B. Majchrzak, I. Mayer, P.R. Young, G.M. Bokoch, E.N. Fish, and L.C. Platanius.** 2000. The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem.* **275**:27634-40.
- Uddin, S., B. Majchrzak, J. Woodson, P. Arunkumar, Y. Alsayed, R. Pine, P.R. Young, E.N. Fish, and L.C. Platanius.** 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem.* **274**:30127-31.
- Uddin, S., L. Yenush, X.J. Sun, M.E. Sweet, M.F. White, and L.C. Platanius.** 1995. Interferon-alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Biol Chem.* **270**:15938-41.
- Uddin, S.e.a.** 2000. Interferon-dependent activation of the serine kinase PI 3'-kinase requires engagement of the IRS pathway but not the Stat pathway. *Biophys Res Commun*:158-162.
- Ueno, K., and Y. Suzuki.** 1997. p260/270 expressed in embryonic abdominal leg cells of *Bombyx mori* can transfer palmitate to peptides. *J Biol Chem.* **272**:13519-26.
- Uze, G., G. Lutfalla, and I. Gresser.** 1990. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell.* **60**:225-34.
- Uze, G., and D. Monneron.** 2007. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie.* **89**:729-34.
- Uze, G., G. Schreiber, J. Piehler, and S. Pellegrini.** 2007. The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol.* **316**:71-95.
- Valdez-Taubas, J., and H. Pelham.** 2005. Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J.* **24**:2524-32.
- van't Hof, W., and M.D. Resh.** 1999. Dual fatty acylation of p59(Fyn) is required for association with the T cell receptor zeta chain through phosphotyrosine-Src homology domain-2 interactions. *J Cell Biol.* **145**:377-89.
- van Boxel-Dezaire, A.H., M.R. Rani, and G.R. Stark.** 2006. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity.* **25**:361-72.

- Veit, M.** 2000. Palmitoylation of the 25-kDa synaptosomal protein (SNAP-25) in vitro occurs in the absence of an enzyme, but is stimulated by binding to syntaxin. *Biochem J.* **345** Pt 1:145-51.
- Velazquez, L., M. Fellous, G.R. Stark, and S. Pellegrini.** 1992. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell.* **70**:313-22.
- Verkruyse, L.A., and S.L. Hofmann.** 1996. Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase. *J Biol Chem.* **271**:15831-6.
- Vesa, J., E. Hellsten, L.A. Verkruyse, L.A. Camp, J. Rapola, P. Santavuori, S.L. Hofmann, and L. Peltonen.** 1995. Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature.* **376**:584-7.
- Wirth, M.P.** 1993. Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am.* **20**:283-95.
- Wong, L.H., I. Hatzinisiriou, R.J. Devenish, and S.J. Ralph.** 1998. IFN-gamma priming up-regulates IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) components, augmenting responsiveness of IFN-resistant melanoma cells to type I IFNs. *J Immunol.* **160**:5475-84.
- Yan, H., K. Krishnan, A.C. Greenlund, S. Gupta, J.T. Lim, R.D. Schreiber, C.W. Schindler, and J.J. Krolewski.** 1996. Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFN α R1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J.* **15**:1064-74.
- Yan, H., K. Krishnan, J.T. Lim, L.G. Contillo, and J.J. Krolewski.** 1996. Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFN α R1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Mol Cell Biol.* **16**:2074-82.
- Yang, J., M. Chatterjee-Kishore, S.M. Staugaitis, H. Nguyen, K. Schlessinger, D.E. Levy, and G.R. Stark.** 2005. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res.* **65**:939-47.
- Yeh, D.C., J.A. Duncan, S. Yamashita, and T. Michel.** 1999. Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca(2+)-calmodulin. *J Biol Chem.* **274**:33148-54.
- Zhang, F.L., and P.J. Casey.** 1996. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem.* **65**:241-69.
- Zhang, W., R.P. Tribble, and L.E. Samelson.** 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity.* **9**:239-46.
- Zhou, F., Y. Xue, X. Yao, and Y. Xu.** 2006. CSS-Palm: palmitoylation site prediction with a clustering and scoring strategy (CSS). *Bioinformatics.* **22**:894-6.
- Zhu, M., S. Shen, Y. Liu, O. Granillo, and W. Zhang.** 2005. Cutting Edge: Localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development. *J Immunol.* **174**:31-5.