

Université de Montréal

L'EFFICACITÉ *IN VITRO* D'UN INHIBITEUR DE VCP DE PREMIÈRE GÉNÉRATION
(CB-5083) CONTRE LE LYMPHOME CANIN

par

ALEXANDRA GAREAU

Département des sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *maître ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Décembre 2017

© Alexandra Gareau, 2017

Résumé

La «protéine contenant de la valosine» (VCP) est essentielle au maintien de l'homéostasie des protéines intracellulaires par son rôle dans la dégradation des protéines, un processus dont dépendent les cellules cancéreuses. Le but de cette étude était de déterminer l'efficacité et d'élucider le mécanisme d'action moléculaire de CB-5083, un inhibiteur de première classe de VCP conçu pour une utilisation *in vivo*, dans un modèle de lymphome canin. En utilisant des lignées cellulaires de lymphome (CLBL-1, CL-1 et 17-71) et des cellules mononucléées de sang périphérique fraîchement isolées (PBMC) comme contrôle, nous avons d'abord déterminé les effets du CB-5083 sur la viabilité cellulaire et l'apoptose à l'aide de l'exclusion au bleu de trypan et de la détection de l'activité des caspases. Nous avons ensuite évalué son effet sur le stress du réticulum endoplasmique, la voie de l'agrésome-autophagie, et la réponse de la protéine dépliée (UPR) par immunobuvardage et des analyses RT-PCR. Les résultats ont démontré une mort cellulaire préférentielle (lignées de lymphome vs PBMC) à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (IC50: 120-360 nM). La mort cellulaire a été attribuée à une augmentation de l'apoptose, confirmée par une augmentation de l'activité de la caspase 3/7 dès 6 heures post traitement (1 μ M, $p < 0,0001$). Bien que le traitement au CB-5083 n'ait pas eu d'effets délétères sur la voie de l'agrésome-autophagie, le stress du RE et le UPR ont été rapidement induits, comme en témoigne l'augmentation de l'expression de DDIT3 et de ATF-4 suivant l'augmentation de la phosphorylation de eIF2 α . Ces résultats valident le CB-5083 en tant qu'agent thérapeutique potentiel pour le traitement du lymphome canin, et identifient DDIT3 comme un biomarqueur de l'inhibition de la cible d'intérêt qui peut être transposé aux études *in vivo*.

Mots-clés: VCP, lymphome canin, CB-5083, stress protéotoxique, DDIT3

Abstract

Valosin-containing protein (VCP) is central to the maintenance of cellular protein homeostasis through its role in protein degradation, a process crucial for cancer cell survival. The goal of this study was to determine the efficacy and elucidate the molecular mechanism of action of CB-5083, a first-in-class small molecule inhibitor of VCP designed for *in vivo* use, in a canine lymphoma model system. Using lymphoma cell lines (CLBL-1, CL-1 and 17-71) and freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as controls, we first determined the effects of CB-5083 on cell viability and apoptosis by trypan blue exclusion and Caspase Glo assays. We then evaluated its effect on ER stress, the aggresome-autophagy pathway, and the unfolded protein response (UPR) by immunoblot and RT-PCR analyses. Results showed a preferential cell kill (lymphoma lines vs PBMCs) at concentrations in the nanomolar range (IC₅₀:120-360 nM). Cell death was attributed to increased apoptosis, as confirmed by increased caspase 3/7 activity as early as 6 hours post treatment (1μM, $P<0.0001$). Although the aggresome-autophagy path was not affected by CB-5083 treatment, ER stress and the UPR were rapidly induced, as evidenced by increased expression of DDIT3 and ATF4 following increased phosphorylation of eIF2 α . These results validate CB-5083 as a potential therapeutic agent for canine lymphoma treatment, and identify DDIT3 as a biomarker for target inhibition that can be translated to *in vivo* studies.

Keywords: VCP, canine lymphoma, CB-5083, proteotoxic stress, DDIT3

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des sigles et abréviations	vii
Remerciements	ix
Introduction	1
Revue de la littérature	3
CHAPITRE 1. Le lymphome canin et ses défis thérapeutiques	3
1.1. Le lymphome canin	3
1.1.1. La biopathologie du lymphome canin.....	3
1.1.2. Signes cliniques.....	4
1.1.3. Diagnostic.....	5
1.1.4. Traitements et réponse clinique	6
1.1.5. Facteurs pronostiques	7
1.2. Les défis thérapeutiques du lymphome canin.....	8
1.2.1. La chimiorésistance	8
1.2.2. Les thérapies ciblées	9
1.2.2.1. Identification de la cible thérapeutique.....	10
1.2.2.2. Les anticorps monoclonaux	12
1.2.2.3. Les petites molécules inhibitrices.....	14
CHAPITRE 2. L'homéostasie protéique et le stress protéotoxique	15
2.1. Le système ubiquitine / protéasome (UPS).....	15
2.2. Le stress protéotoxique	16
2.2.1. Le stress protéotoxique au sein des cellules tumorales.....	17
2.3. Le stress protéotoxique associé au réticulum endoplasmique	18
2.3.1. La dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique.....	18
2.3.2. La réponse de la protéine dépliée.....	19
2.3.2.1. La voie de IRE1	25

2.3.2.2. La voie de ATF6.....	26
2.3.2.3. La voie PERK.....	27
CHAPITRE 3. VCP comme cible thérapeutique.....	28
3.1. La protéine contenant de la valosine (VCP) et ses fonctions cellulaires.....	28
3.1.1. Les fonctions de VCP au sein de la voie de l'agrésome-autophagie	30
3.1.2. Les fonctions de VCP au sein de la dégradation protéique associée à la chromatine	31
3.1.3. Les fonctions de VCP au sein de la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique.....	32
3.2. VCP au sein des cellules cancéreuses	33
CHAPITRE 4. Molécules ciblant la dégradation protéique.....	34
4.1. Le UPR comme cible thérapeutique	35
4.2. Les inhibiteurs du protéasome	36
4.2.1. Le bortezomib.....	37
4.3. Les inhibiteurs pharmacologiques de VCP	39
4.3.1. N2, N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine (DBeQ).....	39
4.3.2. Eeyarestatin 1.....	40
4.3.3. Le CB-5083.....	40
Hypothèse et objectifs.....	43
Publication.....	44
Discussion générale.....	66
Conclusion.....	73
Bibliographie.....	74

Liste des tableaux

Tableau I. Stades cliniques du lymphome canin (39).....	5
---	---

Liste des figures

Figure 1. L'activité ERAD dépend des fonctions du UPR.....	21
Figure 2. Le stress du RE induit le UPR.	23
Figure 3. Le domaine cytosolique activé de PERK du UPR.....	25
Figure 4. Les fonctions cellulaires de VCP	30
Figure 5. CHOP est un marqueur bien établi du UPR et est régulé sous la voie PERK-eIF2α-ATF4	68
Figure 6. Le stress protéotoxique irréversible.	70

Liste des sigles et abréviations

AAA: ATPase associated with diverse cellular activities (ATPase associée à diverses activités cellulaires)

ABC : ATP-Binding Cassette (protéine de cassette de liaison à l'ATP)

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNi : Acide ribonucléique interférant

ATF4 : Activating transcription factor 4

BCL-2 : B-cell lymphoma-2

Ca²⁺ : Calcium

CD20 : Cluster of differentiation 20 (Cluster de différenciation)

CHOP : CCAAt/enhancer-binding protein homologous protein

DBeQ : N2,N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine

DSB : Cassure de l'ADN double brin

Eey1 : Eeyarestatin 1

eIF2a : Eukaryotic initiation factor 2 alpha (Facteur-2 d'initiation eukaryote)

ERAD : Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (Dégradation des protéines associée au réticulum endoplasmique)

Fc: Fragment crystallisable (région d'un anticorps)

GADD34 : Growth arrest DNA-damage-inducible 34

GRP78/BiP : Glucose-regulated protein 78/ Binding immunoglobulin protein

HDAC : Histone désacétylase

IRE1a : Inositol-requiring enzyme 1 alpha

KIT : Tyrosine-protein kinase (protéine tyrosine kinase)

LC3 : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LDGCB : Lymphome diffus à grandes cellules B

LNH : Lymphome non-hodgkinien

mAB : Anticorps monoclonaux

MM : Myélome multiple

NF-B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFC : Domaine contenant du nitrofurane

NK: Natural killer cells (Cellule (s) tueuse (s) naturelle (s))

PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor

PERK : Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase

Pgp : Glycoprotéine P

RAG: Recombination-activating gene (Gène (s) activant la recombinaison)

RE : Réticulum endoplasmique

SQSTM1 : Sequestosome-1 protein (Protéine séquestosome-1)

TNF : Tumor necrosis factor (Facteur de nécrose tumorale)

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand (Ligand inducteur d'apoptose lié au TNF)

UPR : Unfolded protein response (Réponse de la protéine dépliée)

VCP : Valosin-containing protein (Protéine contenant de la valosine)

VEGF : Vascular endothelial growth factor (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

WHO : World Health Organization (Organisation mondiale de la Santé)

γ H2aX : Forme phosphorylée de l'histone H2aX

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier ma directrice de thèse, Dr. Marie-Ève Nadeau. Ce projet de recherche a fait grandir en moi un fort intérêt pour l'oncologie vétérinaire, confirmant ainsi mon choix de carrière. J'aimerais également remercier le Dr. Derek Boerboom pour sa disponibilité, son écoute et ses précieux conseils. J'aimerais également remercier mes collègues de laboratoire pour leur aide inestimable et moments de fous rires! Enfin, j'aimerais exprimer ma profonde gratitude à ma famille et à mes amis pour m'avoir fourni un soutien sans faille et des encouragements continus tout au long de mes années d'études. Cette réalisation n'aurait pas été possible sans vous. Je vous remercie du fond du cœur !

Introduction

Le cancer survient à travers un processus mutagène comprenant plusieurs étapes pendant lesquelles les cellules cancéreuses acquièrent un ensemble commun de propriétés, y compris le potentiel de prolifération, l'autosuffisance en signaux de croissance et la résistance aux signaux antiprolifératifs et apoptotiques (1). L'acquisition de ces caractéristiques dépend majoritairement d'une succession d'altérations dans le génome qui impliquent une mutation par gain de fonction, par amplification et/ou par surexpression d'oncogènes clés conjointement avec la mutation par perte de fonction de suppresseurs tumoraux par la délétion et/ou le silence épigénétique (1). En conséquence, la progression tumorale peut être décrite comme une succession d'expansions clonales, chacune d'elles étant déclenchée par l'acquisition fortuite d'une mutation génétique favorable. Ces sous-clones forment la base de l'hétérogénéité tumorale (2).

Les lymphomes, ou lymphosarcomes, sont une maladie hétérogène englobant des sous-types de tumeurs malignes qui résultent de la transformation néoplasique des lymphocytes B et T à différents stades de développement. Ils sont parmi les tumeurs les plus diagnostiquées chez le chien, toutes races confondues. Ils représentent environ 90% des cancers hématopoïétiques canins et près de 7-14% de tous les cancers diagnostiqués chez cette espèce (3). Des études plus récentes ont estimé l'incidence du lymphome canin à 20-107 cas pour 100 000, ce qui représente une incidence plus élevée chez les chiens comparativement aux humains (4-7).

Les lymphomes canins spontanés démontrent de grandes similarités avec les lymphomes de hauts grades non-Hodgkiniens chez les humains en terme d'histopathologie, de génétique tumorale, et de progression de la maladie (8, 9). Chez ces deux espèces, le lymphome est très hétérogène sur le plan morphologique, immunophénotypique, moléculaire, y compris la réponse aux modalités thérapeutiques (10, 11). À ce jour, les protocoles multi-drogues CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, corticostéroïdes) et CHOP modifiés sont le traitement de première ligne contre le lymphome humain et canin. Chez l'humain, pour les lymphomes plus agressifs, les schémas thérapeutiques modernes entraînent des taux de survie à long terme de > 80% pour le lymphome Hodgkinien, de ~ 60% pour le lymphome diffus à

grandes cellules B et de <30% pour le lymphome T à cellules périphériques (12-14). Chez le chien, ces protocoles résultent en une réponse complète d'une durée de 6-11 mois pour plus de 80% des patients. Toutefois, ils sont considérés palliatifs ; la durée de survie totale demeure basse et la survie moyenne est de 12 mois avec seulement 10% des patients canins qui survivent deux ans (11). Similairement au lymphome non-hodgkinien en médecine humaine, ces statistiques sont attribuables au phénomène de chimiorésistance (15, 16).

En raison de la chimiorésistance, il y a un besoin criant de nouvelles modalités thérapeutiques ciblées contre le lymphome. Parmi les thérapies ciblées actuellement à l'étude en médecine humaine et vétérinaire, les voies de dégradation protéique sont prometteuses. Effectivement, il est maintenant établi que les cellules tumorales sont dépendantes des mécanismes de repliement protéique afin de maintenir la protéostasie et d'assurer leur survie (17, 18). Cibler les voies de dégradation protéique génère ultimement l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (19-21).

Parmi les protéines contribuant significativement à la protéostasie, la protéine contenant de la valosine, ou VCP, est au cœur de nombreuses études tant en oncologie humaine que vétérinaire. Dans les années passées, notre laboratoire a démontré l'expression accrue de VCP au sein des cellules de lymphomes canins (22). Cette étude supporte l'affirmation que les cellules tumorales sont plus dépendantes de cette protéine que les cellules non tumorales pour leur fonctionnement et leur survie (22). Notre étude met en lumière le CB-5083, un inhibiteur puissant et sélectif de VCP, conçu pour une utilisation *in vivo*. À ce jour, aucune donnée recensée dans la littérature n'évalue l'activité et l'efficacité de ce composé chez le chien.

Ce mémoire présente le ciblage des mécanismes de maintien de la protéostasie, plus particulièrement le ciblage thérapeutique de VCP contre le lymphome canin. D'abord, une revue de littérature comprenant un survol du lymphome canin et de ses défis thérapeutiques, suivie par l'importance de l'homéostasie protéique, le stress du RE comme cible thérapeutique et les molécules ciblant la dégradation protéique, seront présentés. Cette section sera suivie de l'article publié dans le cadre de ce projet de maîtrise, et pour terminer, la discussion des résultats et une conclusion.

Revue de la littérature

CHAPITRE 1. Le lymphome canin et ses défis thérapeutiques

1.1. Le lymphome canin

1.1.1. La biopathologie du lymphome canin

Les lymphomes sont un groupe diversifié de tumeurs spontanées caractérisées par leur immunophénotype (B, T ou les deux). L'identification des lymphocytes est possible par la technique d'immunoperoxidase pour l'identification de marqueurs de surface spécifiques à l'immunophénotype (23, 24). La classification du lymphome est basée sur sa caractéristique immunophénotypique, sa localisation, et son apparence histologique.

Les lymphomes prennent origine majoritairement des nœuds lymphatiques puis, dépendamment du stade, se distribuent au foie, à la rate et à la moelle osseuse. Ils peuvent cependant provenir de presque tous les tissus de l'organisme (25). Le type de lymphome le plus commun chez le chien est le lymphome multicentrique qui apparaît en premier lieu dans les nœuds lymphatiques. Cette forme représente près de 80-85% des lymphomes diagnostiqués chez le chien (25). Il existe plusieurs autres formes de lymphomes, classées en ordre de prévalence soit le lymphome multicentrique, médiastinal, gastro-intestinal et cutané (11).

L'aspect histopathologique du lymphome peut être utilisé pour prédire le comportement clinique et celui-ci prend en compte, entre autres, le type cellulaire, le degré de différenciation cellulaire et la localisation des cellules d'origine au sein de la lymphopoïèse (26). Les tumeurs de bas grade sont caractérisées par de petites cellules, un faible index mitotique ainsi qu'une progression clinique lente. Les tumeurs de haut grade ou de grade intermédiaire sont caractérisées par de grandes cellules, un index mitotique élevé et une progression clinique rapide (27).

La classification histopathologique des lymphomes non-Hodgkiniens humains est basée sur la morphologie, l'immunophénotype et l'évolution clinique (28). La classification des lymphomes canins a suivi les systèmes de classification développés pour les humains et ces derniers ont récemment été adaptés pour inclure les tumeurs chez les animaux domestiques

(29). Ainsi, la distribution des sous-types de lymphomes chez les humains comparativement aux chiens soutient que le lymphome diffus à grandes cellules B est le sous-type le plus commun entre ces deux espèces. Certains sous-types survenant couramment chez le chien tels que lymphome de la zone marginale et le lymphome T lymphoblastique, entre autres, sont plutôt rares chez l'humain (29-31). L'évolution rapide des méthodes diagnostiques incluant l'immunophénotypage sous entend que les publications actuelles sous-estiment l'incidence des sous-types de lymphomes canins (32).

Les lymphomes canins possèdent une étiologie multifactorielle, incluant la génétique et l'environnement (25). Les races avec une plus grande incidence de lymphome incluent entre autres le boxer et le golden rétriever (33). Il existe une prédilection de race et une susceptibilité augmentée de développer un lymphome B ou à lymphocytes T. Par exemple, les lymphomes T, bien qu'ils ne représentent que 25-30% de tous les lymphomes canins, représentent près de 85% des lymphomes retrouvés chez le boxer (34). De plus, le risque que le boxer développe un lymphome est 4 fois plus élevé que le risque moyen de tous les autres chiens (27). Les races de type spitz, le Shih Tzu et le Lhasa Apso, entres autres, développent presque exclusivement des lymphomes T et le golden rétriever les deux immunophénotypes en parts égales (35). De plus, le ratio des lymphomes B et T chez les races mixtes est 70:30, respectivement (27). Enfin, les chiens femelles intactes, moins fréquemment affectées par le lymphome, bénéficieraient d'un effet protecteur de leurs hormones sexuelles (36).

1.1.2. Signes cliniques

Le lymphome canin est plus rare chez le jeune chien et affecte majoritairement les chiens d'âge moyen à avancé (25). Les signes cliniques varient en fonction de l'étendue de la maladie ainsi que du type de lymphome présent. Les chiens atteints d'un lymphome présentent généralement des signes cliniques peu spécifiques tels qu'une tolérance à l'exercice diminuée, une fatigabilité augmentée et une anorexie. La majorité des patients présentés ont une lymphadénopathie périphérique, généralisée ou localisée. Le lymphome canin peut être associé à des syndromes paranéoplasiques pour la plupart détectables avec un bilan sanguin : anémie, hypercalcémie, thrombocytopénie, neutrophilie et lymphocytose (11).

1.1.3. Diagnostic

Ces dernières années, plusieurs progrès scientifiques ont permis de mieux comprendre les processus biomoléculaires régulant les tumeurs malignes hématopoïétiques et d'utiliser ces cibles dans la détection, le traitement ainsi que l'établissement du pronostic. Malgré les nombreuses avancées importantes dans la compréhension de la biologie des tumeurs et l'utilisation de biomarqueurs tumoraux, il existe peu de publications à leur sujet (34). Certaines études rapportent l'usage de biomarqueurs tumoraux pour dépister de façon hâtive le lymphome, toutefois ils sont peu fiables en raison de leur faible sensibilité et spécificité (34). Le défi consiste principalement à comprendre l'hétérogénéité du cancer et la plasticité du génome du cancer (37).

Le diagnostic du lymphome en tant qu'entité générale peut être relativement simple grâce à la cytologie standard, toutefois décrire les différents sous-types et anticiper leur comportement biologique demeure difficile (38). Néanmoins, la biopsie et l'examen histopathologique d'un nœud lymphatique réséqué permettent d'orienter le pronostic, car ils constituent la seule façon d'obtenir le grade de la tumeur et de choisir le traitement approprié (11).

Étant donné la nature systémique du lymphome, il est crucial de déterminer l'étendue de l'atteinte des différents tissus et organes et d'identifier les maladies concomitantes devant être traitées avant d'entreprendre un traitement chimiothérapeutique. Le stade clinique d'un chien atteint d'un lymphome, est déterminé via l'examen physique et le bilan d'extension.

Tableau I. Stades cliniques du lymphome canin (39)

Stade I	Un seul nœud lymphatique ou le tissu lymphoïde d'un seul organe est atteint (excluant la moelle osseuse)
Stade II	Implication régionale de plusieurs nœuds lymphatiques
Stade III	Lymphadénopathie généralisée
Stade IV	Implication du foie, de la rate avec présence ou absence de lymphadénopathie généralisée

Stade V	Implication du sang, de la moelle osseuse et/ou d'autres organes non lymphoïdes
Sous-stade A	Absence de signes cliniques de la maladie
Sous-stade B	Présence de signes cliniques de la maladie

1.1.4. Traitements et réponse clinique

Un chien atteint d'un lymphome multicentrique a une survie moyenne, sans traitement, de quatre à huit semaines. À l'exception des lymphomes de bas grade ou indolents, les lymphomes progressent très rapidement, jusqu'à la phase terminale, s'ils ne sont pas traités. Lorsque traités par chimiothérapie, ces patients ont une amélioration marquée de leur qualité de vie et de leur durée de vie. Les chiens ayant un lymphome de stade IV, stade V ou sous-stade B sont moins susceptibles de répondre à la chimiothérapie et sont plus susceptibles d'avoir une réponse plus courte que les chiens atteints d'un lymphome avec stade inférieur (stade I, II, III ou sous-stade A).

Étant donné la nature systémique de cette maladie, la chimiothérapie est la modalité thérapeutique principalement utilisée (11). Le but ultime du traitement chimiothérapeutique d'un lymphome multicentrique est d'induire une rémission complète et durable. Plusieurs facteurs peuvent influencer la réponse d'un patient aux cocktails chimiothérapeutiques tels que les maladies concomitantes et la pharmacogénétique (l'influence du génotype sur les réponses d'individus aux médicaments). Cependant, le facteur le plus important est la présence de chimiorésistance qui encourage l'utilisation de protocoles multi-drogues et le taux de réponse approche 90% chez les chiens traités avec ces protocoles. Ces derniers ont l'avantage de surmonter le phénomène de chimiorésistance, car ils affectent différentes voies métaboliques de la cellule et permettent également d'augmenter les chances d'atteindre la cible (40). À l'inverse, lorsqu'un seul agent est utilisé, le taux de réponse est faible et la durée de la réponse est plus courte (11).

À ce jour, les protocoles chimiothérapeutiques multiagents de type CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, corticostéroïdes) sont le traitement de première

ligne contre le lymphome canin (11). Chacune des drogues utilisées dans ce protocole possède son propre mécanisme d'action : doxorubine (anthracycline qui conduit à l'inhibition des enzymes topoisomérases et de la synthèse de protéines), cyclophosphamide (agent alkylant), vincristine (vinca-alcaloïde qui se lie aux tubulines) et corticostéroïdes (anti-inflammatoire et effets cytotoxiques via les récepteurs des glucocorticoïdes) (41).

Le protocole CHOP résulte en une réponse complète pour une durée de 6-11 mois dans plus de 80% des cas. Toutefois, ce protocole chimiothérapeutique est considéré palliatif avec un taux de survie moyen de 12 mois et avec approximativement 10% des patients qui survivent deux ans (11). Les réponses cliniques obtenues des patients sous traitement chimiothérapeutique sont uniques à chaque individu. L'évaluation normalisée de la réponse clinique aux traitements chimiothérapeutiques des tumeurs solides, incluant le lymphome, suivent l'évaluation standardisée des lymphomes et « Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST). Ce consensus est une tentative pour décrire des mesures cliniques applicables, simples et reproductibles contraintes à la pratique oncologique vétérinaire. Ce consensus s'appuie fortement sur les lignes directrices de la littérature humaine (42-44).

1.1.5. Facteurs pronostiques

Le lymphome est l'une des tumeurs canines les mieux caractérisées permettant ainsi d'établir un pronostic prenant en considération la globalité du patient. L'identification appropriée de l'immunophénotype, de la localisation anatomique, du stade clinique et du grade, ainsi que l'efficacité chimiothérapeutique sont tous essentiels à l'établissement du pronostic. Les lymphomes de haut grade d'immunophénotype T ont un pronostic moins favorable que ceux d'immunophénotype B. En effet, les chiens atteints d'un lymphome B sont plus enclins à une rémission complète d'une durée beaucoup plus longue que les chiens atteints d'un lymphome T (11). Plusieurs études démontrent que les lymphomes T sécrètent des cytokines, et cela expliquerait la raison pourquoi ces patients ont un pronostic plus pauvre et une survie moins longue comparativement aux patients avec un lymphome B (45-48).

1.2. Les défis thérapeutiques du lymphome canin

1.2.1. La chimiorésistance

Le lymphome canin est à bien des égards comparable au lymphome non hodgkinien chez les humains et chez ces deux espèces, cette tumeur est très hétérogène sur le plan morphologique, immunophénotypique, moléculaire, y compris la réponse aux modalités chimiothérapeutiques (10, 11). En médecine humaine, près de 50% des patients atteints du lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) présenteront une progression de la maladie et/ou une rechute en raison de chimiorésistance (13, 49, 50). L'acquisition de mécanismes de résistance dans les lymphomes est en partie motivée par l'hétérogénéité génétique inhérente et l'instabilité des cellules tumorales (51).

La présence de multirésistance aux agents chimiothérapeutiques, avec absence de réponse optimale, est associée à une rémission plus courte et à une survie moins longue. La cause principale de l'échec au traitement est une résistance aux agents chimiothérapeutiques qui peut être présente au début de la chimiothérapie (résistance intrinsèque) ou se développer pendant ou après une chimiothérapie initiale (résistance acquise). Les différents mécanismes adaptés par les cellules cancéreuses pour résister à une drogue chimiothérapeutique comprennent entre autres l'altération du transport et du métabolisme des médicaments incluant l'efflux actif de drogues cytotoxiques par des protéines transporteuses à ATP-Binding Cassette (ABC) (34, 52, 53). L'expression élevée des transporteurs ABC a été associée à la fois à une sensibilité réduite aux agents cytotoxiques, ainsi qu'à un mauvais pronostic pour plusieurs types de cancer chez les humains et les chiens (53, 54). Entre autres, le gène ABCB1 δ , initialement connu sous le nom de MDR1, code pour une protéine transmembranaire, la glycoprotéine P (Pgp). Celle-ci conduit à la résistance de plusieurs médicaments (antimicrotubules, anthracyclines, prednisone), dont les agents couramment utilisés pour traiter le lymphome (55).

Il existe plusieurs options thérapeutiques pour les tumeurs réfractaires au traitement, mais le pronostic demeure médiocre. En médecine humaine, plusieurs thérapies contre le LNH ont été mises de l'avant afin de contrer cette résistance : anticorps monoclonaux anti-CD20 de

troisième génération permettant d'augmenter la puissance et l'avidité de la liaison au CD20, conjugués anticorps-drogue, radio-immunothérapie, et petites molécules inhibitrices. Un grand nombre de ces thérapies ont montré des taux de réponse significatifs mais non optimaux (56).

Bien que la résistance représente un obstacle majeur au succès de la chimiothérapie chez les humains et les chiens, les mesures thérapeutiques pour contourner la résistance sont encore limitées. Par conséquent, la conception de médicaments anticancéreux efficaces nécessite une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses éludent le traitement.

1.2.2. Les thérapies ciblées

La classification histologique du lymphome est de plus en plus précise et permet l'identification de plus de 30 sous-types de lymphomes canins (29). Ces sous-types hétérogènes ont une pathogénèse moléculaire complexe et proviendraient de mécanismes oncogéniques distincts (28). Néanmoins, les progrès de la recherche sur la biologie tumorale ont conduit à l'identification d'une variété de voies intracellulaires oncogéniques comme cibles thérapeutiques potentielles (57).

La dérégulation des voies de signalisation dans les tumeurs peut entraîner une augmentation de la prolifération, de la survie, de l'invasion locale et du potentiel métastatique des cellules cancéreuses, et une apoptose réduite (58). Afin d'assurer leur survie, les cellules tumorales dépendent de manière critique sur l'activation continue de la signalisation oncogénique (59). Les cellules tumorales ayant une signalisation oncogénique surexprimée sont plus affectées par les thérapies ciblées que les cellules non tumorales. Dès lors, plutôt que de baser les décisions de traitement sur les caractéristiques histologiques, les décisions thérapeutiques futures peuvent être prises en fonction de l'identité des voies de signalisation dérégulées (57, 60).

Ces voies peuvent être ciblées par l'inhibition sélective de molécules connues pour être activées dans le lymphome, dont beaucoup contribuent à la survie cellulaire (57). Parmi les voies oncogéniques les plus étudiées dans le lymphome figurent PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT, la signalisation des récepteurs des cellules B (BCR) et le NF- κ B. Ces voies

peuvent être activées via la surexpression de certaines protéines, telle que la protéine régulatrice de l'apoptose Bcl-2, et par une perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs et des protéines qu'ils codent (60).

Plusieurs thérapies ciblées font maintenant partie intégrante des traitements de première ligne pour plusieurs tumeurs solides humaines. Néanmoins, le développement d'inhibiteurs ciblant certains oncogènes dans certaines tumeurs solides a démontré un succès limité en raison de la chimiorésistance et du fait que la plupart des mutations trouvées dans les tumeurs ne peuvent être directement ciblées (40, 61). La variabilité de réponse clinique résulte de l'hétérogénéité moléculaire et il a été proposé que le traitement anticancéreux puisse exploiter directement la dépendance qu'ont les cellules cancéreuses sur des gènes non mutés et associer correctement une thérapie ciblée à la composition génétique et moléculaire unique aux sous-types de lymphome (57, 59). Cette approche a eu un impact minimal sur la progression thérapeutique étant donné la présence d'oncogènes additionnels inconnus (57). Bien que la théorie et les concepts fondamentaux derrière la thérapie ciblée soient établis, certains défis sont difficilement surmontables.

1.2.2.1. L'identification de la cible thérapeutique

Différentes approches peuvent être envisagées pour l'identification d'une cible. Une première approche consiste à comparer les quantités de protéines individuelles dans les cellules cancéreuses avec celles exprimées dans les cellules normales. Les protéines qui sont surexprimées dans les cellules cancéreuses, qui fournissent un avantage sélectif aux cellules tumorales (croissance ou survie), et qui ne sont pas exprimées (ou exprimées à des niveaux beaucoup plus bas) par des cellules non cancéreuses représentent des cibles idéales (62). Une autre approche consiste à déterminer si les cellules néoplasiques produisent des protéines mutées qui participent à la génération et à la progression du cancer. Par ailleurs, des anomalies chromosomiques peuvent également être présentes dans les cellules néoplasiques, ce qui entraîne des gènes de fusion dont les produits peuvent stimuler le développement du cancer (62). De telles protéines de fusion peuvent devenir des cibles potentielles pour le traitement anticancéreux.

L'identification de mutations qui favorisent chacune des étapes de la progression tumorale est essentielle au développement de nouvelles drogues chimiothérapeutiques spécifiques. La spécificité et l'efficacité de ces nouvelles approches entraînent toutefois un certain nombre de défis :

- a. Il est essentiel d'identifier et de quantifier spécifiquement les cibles protéiques dans les cellules tumorales pour l'utilisation de telles thérapies ciblées (63).
- b. La présence d'une protéine mutée n'est pas toujours suffisante pour prédire l'issue de thérapies ciblées. La dérégulation des molécules de signalisation en aval pourrait également jouer un rôle important dans le succès de ces approches thérapeutiques (63).
- c. L'hétérogénéité intra-tumorale, caractérisée par le développement de sous-clones et au degré de différenciation de cellules hématopoïétiques, varie considérablement avec la progression de la tumeur (64). En ce qui a trait plus spécifiquement au degré de différenciation de cellules hématopoïétiques, l'identification de sous-types histologiques distincts a peu d'impact sur le développement de drogues chimiothérapeutiques ou sur l'amélioration du taux de guérison (60). L'une des raisons expliquant ce manque de progrès est l'hétérogénéité des sous-types histopathologiques qui possèdent différentes caractéristiques moléculaires sous-jacentes. En effet, les cellules malignes hématopoïétiques ont la capacité de découler de différents stades de différenciation hématopoïétique donnant naissance à des tumeurs hétérogènes. L'hétérogénéité tumorale représente donc une limite potentielle rendant ainsi le développement de la thérapie moléculaire ciblée pour le lymphome plus difficile que pour tout autre type de cancer (57).
- d. Les voies de signalisation physiologiques peuvent être activées de façon aberrante par une variété de cytokines inflammatoires et de facteurs de croissance qui sont produits dans le microenvironnement tumoral (60).

À mesure que de nouvelles cibles moléculaires sont identifiées, le nombre de nouveaux agents anticancéreux ciblés continue d'augmenter. Cependant, en raison de l'interaction complexe entre plusieurs voies oncogéniques du lymphome, les médicaments ciblés à ce jour

sont peu efficaces contre ce cancer (57).

1.2.2.2. Les anticorps monoclonaux

Les caractéristiques des anticorps monoclonaux visent non seulement à cibler et à interférer avec la signalisation cellulaire, mais aussi à induire une cytotoxicité dépendante des anticorps et du complément (65-67). Ceci dit, bien que des réponses cliniques aient été observées avec une variété d'anticorps monoclonaux qui ciblent des antigènes associés aux tumeurs et des antigènes spécifiques aux tumeurs, il semble plus fructueux de cibler le processus oncogénique sous-jacent. Néanmoins, plusieurs anticorps ont depuis été développés mais avec un succès limité (60). Les hypothèses pouvant expliquer pourquoi ces anticorps peuvent être sous-optimaux comprennent une faible expression des récepteurs, l'internalisation des antigènes/récepteurs, et/ou un manque de spécificité des anticorps permettant un blocage complet (57).

En médecine humaine, le développement et l'utilisation de l'anticorps monoclonal rituximab a considérablement amélioré le pronostic du LNH, cependant les réponses sont variables selon le sous-type de lymphome (68). La co-administration du rituximab et de la chimiothérapie CHOP, comparativement à la chimiothérapie seule, a significativement amélioré les taux de réponse, de rémission et de survie des patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB), avec un taux de guérison de 60 à 70% (13, 49, 69).

Le rituximab est un anticorps chimérique murin/humain ciblant CD20. Il s'agit d'une immunoglobuline glycosylée associant d'une part les régions constantes d'une IgG1 humaine et d'autre part les régions variables des chaînes légères et lourdes d'origine murine (70). Cet anticorps est spécifique pour le marqueur de surface cellulaire CD20 humain présent sur les cellules de lignée B, et par conséquent exprimé sur de nombreuses cellules de lymphome B (71). En se liant au CD20 sur les cellules de lymphome B, le rituximab permet l'inhibition de cinq voies principales : NF- κ B, PI3K/AKT/mTORC1, STAT3, MEK/ERK et p38-MAPK. Ceci résulte en la régulation négative de l'expression des membres de la famille des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et en l'activation directe de l'apoptose FAS (72-81).

Alors que le rituximab a considérablement amélioré le pronostic du LNH, un nombre de patients demeure réfractaire au rituximab, tels que ceux atteints d'un LNH récidivant (71). Plusieurs mécanismes de résistance au rituximab ont été postulés : les polymorphismes du récepteur Fc à la surface des cellules tumorales, la régulation négative ou la perte d'expression du CD20, et la pharmacocinétique altérée des anticorps, etc (71). Une étude démontre que la régulation à la baisse de l'expression de la protéine CD20 est fortement corrélée à la résistance au rituximab *in vitro* (82) cependant, la pertinence clinique n'est pas totalement élucidée (83-86). De plus, la résistance à la chimiothérapie a été principalement associée à une régulation négative des voies intrinsèques de l'apoptose et à l'activation des voies de survie dans le DLBCL (73, 74, 77-79, 87, 88). Par exemple, une exposition répétée au rituximab peut générer un phénotype résistant à la thérapie par la régulation à la hausse des protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques (77) ou par la régulation à la baisse des protéines pro-apoptotiques BAK et BAX (89).

En médecine vétérinaire, le rituximab n'a malheureusement pas démontré une efficacité optimale dans le lymphome canin à cellules B en raison du manque d'homologie de l'épitope CD20 reconnu par le rituximab (62). Le manque d'homologie des épitopes entre les protéines humaines et canines, et par conséquent la faible réactivité croisée des anticorps monoclonaux (mAb) pour la protéine canine, limite leur utilisation chez les chiens. Plusieurs obstacles demeurent dans le développement des anticorps canins tels que la faible immunogénicité des mAbs humains et murins chez les chiens, le coût de production des mAbs, la pénétration difficile des tumeurs et les faibles résultats *in vivo* (62).

Bien qu'il existe maintenant de nombreux mAbs approuvés pour la thérapie du cancer chez les êtres humains, en médecine vétérinaire, peu d'anticorps thérapeutiques atteignent le marché. Un anticorps anti-CD20 similaire au rituximab contre les lymphomes B et un anticorps anti-CD52 contre les lymphomes T, ont été considérés prometteurs en oncologie vétérinaire. Malgré une augmentation notable de la survie médiane chez les chiens atteints de lymphome B, les derniers essais cliniques n'ont pas démontré des résultats encourageants. En effet, les essais cliniques randomisés combinant l'anticorps anti-CD52 avec deux protocoles de chimiothérapie différents n'ont pas montré des résultats significatifs comparativement au

placebo. De plus, ces deux anticorps ont démontré une spécificité médiocre pour leurs cibles respectives (62).

1.2.2.3. Les petites molécules inhibitrices

Les progrès de la compréhension de la biologie moléculaire du lymphome ont permis d'identifier plusieurs cibles thérapeutiques potentielles. Néanmoins, le processus d'approbation de nouveaux médicaments contre le lymphome demeure lent et inefficace. Les sous-types histologiques distincts et l'hétérogénéité moléculaire du lymphome font en sorte que le développement de la thérapie moléculaire ciblée est plus difficile que pour tout autre type de cancer (90). Bien que des progrès significatifs aient été réalisés en médecine humaine dans le domaine de l'immunothérapie, les progrès les plus rapides ont été réalisés dans le développement de petites molécules inhibitrices qui modulent les voies de signalisation clés importantes dans la pathogenèse du LNH. Au cours de la dernière décennie, l'identification de voies moléculaires clés dans la pathogénèse du lymphome a permis le développement de nouvelles thérapies ciblées. En outre, en médecine humaine, l'ibrutinib, l'idelalisib et le venetoclax représentent des thérapies pour les patients atteints de lymphome B. Malgré des preuves d'innocuité à long terme de ces molécules, la toxicité demeure un obstacle important et la résistance fait surface (91).

Le développement de petites molécules inhibitrices en médecine vétérinaire est récent. Que deux petites molécules inhibitrices sont approuvées pour usage chez les patients vétérinaires : le toceranib phosphate (Palladia) et le masitinib (Kinavet) (92). Le toceranib phosphate est un inhibiteur de la tyrosine kinase qui cible PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) et KIT (tyrosine-protein kinase). Il est approuvé pour le traitement des tumeurs mastocytaires canines, et certains groupes ont rapporté son efficacité chez les chiens atteints de plusieurs types de carcinomes (93-95). Le masitinib, un autre inhibiteur de la tyrosine kinase qui cible PDGFR, VEGFR et KIT, inhibe la croissance des cellules de lymphome canin *in vitro* (96, 97). De plus, ces mêmes groupes ont rapporté que le KIT est exprimé à des niveaux élevés chez les chiens atteints de lymphomes T de haut grade, et que le masitinib présente des effets antitumoraux

chez ces chiens (96, 98). Cependant, il est non documenté dans la littérature si le toceranib phosphate peut être utilisé pour traiter le lymphome canin à ce jour.

CHAPITRE 2. L'homéostasie protéique et le stress protéotoxique

2.1. Le système ubiquitine / protéasome (UPS)

L'homéostasie protéique au sein d'une cellule réfère à l'équilibre entre la synthèse, le pliage, le contrôle de qualité ainsi que la dégradation des protéines et est nécessaire pour la survie cellulaire et la prévention du cancer (99). Le système ubiquitine / protéasome (UPS) assure une protéolyse ciblée et appropriée qui est essentielle à la fonction cellulaire et à l'homéostasie cellulaire. Dans les cellules eucaryotes, la voie ubiquitine-protéasome est la voie centrale non lysosomale pour la dégradation des protéines. Dans des conditions normales, la voie lysosomale dégrade les protéines extracellulaires importées dans la cellule par endocytose ou pinocytose, alors que le protéasome contrôle la dégradation des protéines intracellulaires (100, 101).

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) assure la dégradation des protéines marquées par l'ubiquitine par le complexe protéasome 26S. Cette voie protéolytique coordonnée dépend de l'activité synergique du système de conjugaison de l'ubiquitine et du protéasome 26S (102). Le protéasome 26S est un complexe présent dans le noyau et le cytoplasme des cellules eucaryotes. Il est composé d'un noyau catalytique ainsi que de sous-unités qui ont la capacité de reconnaître et de lier les substrats polyubiquitinés. Ces sous-unités accessoires déploient des substrats et les alimentent au complexe catalytique, tout en éliminant les molécules d'ubiquitine attachées. L'assemblage du protéasome 26S et la dégradation des substrats protéiques dépendent de l'ATP (103, 104).

Les protéines destinées à la dégradation protéasomale sont modifiées par la conjugaison d'ubiquitine aux résidus lysine par l'action concertée de certaines enzymes (E1-E3) (105, 106). L'ubiquitine consiste en une protéine de 76 acides aminés pouvant être fixée de manière

covalente à la lysine des protéines cibles. Des cycles répétés de conjugaison conduisent à la formation d'une chaîne de polyubiquitine attachée à la protéine cible sur un seul résidu de lysine, ce qui en fait un substrat ciblé pour le protéasome 26S (107). L'addition d'ubiquitine à la protéine cible signale sa dégradation protéasomale, altère sa localisation cellulaire, affecte ses activités, favorise et/ou empêche l'interaction de la protéine avec d'autres substrats au sein de la cellule (100, 108, 109).

En contrôlant les niveaux de nombreuses protéines cellulaires clés, le protéasome agit comme régulateur de la croissance cellulaire et de l'apoptose. La perturbation de son activité peut avoir des effets profonds à la fois sur l'étiologie et le traitement du cancer. De nombreux facteurs de transcription régulés par le système ubiquitine-protéasome sont impliqués dans l'oncogenèse tel que le NF- κ B. NF- κ B est un régulateur de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, des réponses immunitaires et inflammatoires et contrôle l'expression des gènes codant pour les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance, les molécules d'adhésion cellulaire et les récepteurs de surface cellulaire (110, 111). Les facteurs inductibles par NF- κ B peuvent contribuer à la résistance aux médicaments, à l'angiogenèse et au potentiel métastatique (112).

2.2. Le stress protéotoxique

Les protéines doivent se plier dans des structures tridimensionnelles uniques pour assurer une fonction optimale et la survie de la cellule (113). Une multitude de stress protéotoxiques, y compris des mutations génétiques, des erreurs de biosynthèse et des agressions physiologiques et environnementales, remettent constamment en question le repliement adéquat des protéines et la fonction optimale du protéasome. Pour contrecarrer cela, les cellules ont des voies de signalisation élaborées pour les protéger contre le mauvais repliement et l'agrégation des protéines pour maintenir l'homéostasie des protéines (protéostasie). La cellule détient des mécanismes qui maintiennent les conformations protéiques fonctionnelles grâce à des mécanismes de repliement, d'assemblage et de désagrégation ainsi que des voies de clairance qui reconnaissent et éliminent les protéines mal repliées (114). Ces mécanismes de contrôle de la qualité des protéines sont contrôlés par des

réponses adaptatives au stress, qui ajustent la capacité de repliement et de dégradation des protéines selon le degré de stress protéotoxique (115).

2.2.1. Le stress protéotoxique au sein des cellules tumorales

Lorsque survient la tumorigenèse, celle-ci induit l'altération de nombreux procédés et conduit à des niveaux de stress augmentés, tels que l'augmentation du stress de la réplication, le stress métabolique, le stress protéotoxique et le stress oxydatif (1). Les cellules réagissent au stress de diverses façons, allant de l'activation des voies qui favorisent leur survie, ou l'activation des voies qui favorisent plutôt la mort cellulaire programmée. Le type de réponse entreprise dépend en grande partie de la nature et de la durée du stress ainsi que du type cellulaire. On y retrouve bien souvent une interaction entre les différentes voies de signalisation déterminant ainsi le sort final de la cellule. Le mécanisme par lequel une cellule meurt dépend de divers facteurs exogènes ainsi que de sa capacité à maîtriser le stress auquel elle est exposée (116). La réponse initiale d'une cellule au stress permet de l'aider à se défendre et de se remettre de l'insulte. Cependant, si le stimulus nocif est non résolu, celle-ci active les voies de signalisation de la mort cellulaire (116).

L'identification de gènes essentiels à la survie des cellules cancéreuses a mis en lumière les gènes impliqués dans la dégradation protéasomale et le repliement des protéines. Ces gènes déploient leur importance lorsque les aberrations génétiques, comprenant des altérations transcriptionnelles, conduisent à des protéines indument pliées qui contribuent à un stress protéotoxique accru. Les aberrations génétiques, telle que l'aneuploïdie des cellules tumorales, peuvent altérer l'équilibre relatif des signaux de croissance et de survie, favorisant ainsi la tumorigenèse (1). L'aneuploïdie entraîne également l'augmentation et la diminution des niveaux de protéines transcrites ce qui provoque des déséquilibres dans la stœchiométrie de complexes protéiques (1, 117-119). Ces déséquilibres augmentent la quantité d'agrégats de protéines toxiques déployés dans la cellule et placent des charges supplémentaires sur les mécanismes de repliement et de dégradation des protéines afin de maintenir l'homéostasie cellulaire.

Afin d'assurer la survie cellulaire, cette contrainte protéotoxique doit être réduite par une régulation positive de la capacité de pliage des protéines et de la dégradation protéasomale. Elle est neutralisée, en partie, par les réponses protectrices telles que la réponse au choc thermique ou la réponse de la protéine dépliée (UPR) (1). Ces réponses régulent l'augmentation de l'activité des protéines chaperons ce qui améliore la capacité de pliage des protéines, contrecarrant ainsi le stress et favorisant la survie cellulaire. La régulation positive de ces protéines chaperons et l'augmentation de la dégradation protéasomale surviennent communément dans les cancers humains (120).

Étant donné que certaines tumeurs dépendent de la réduction des niveaux de stress pour leur survie, certaines approches ont été proposées permettant de mieux cibler les cellules tumorales comparativement aux cellules non tumorales. D'une part, l'inhibition des voies qui parviennent à réduire la capacité de la cellule à répondre au stress intracellulaire devrait théoriquement augmenter de façon marquée les niveaux de stress au sein des cellules tumorales. D'autre part, l'application d'une surcharge protéique peut spécifiquement tuer les cellules cancéreuses, car elles possèdent moins de capacité tampon que les cellules normales (59).

2.3. Le stress protéotoxique associé au réticulum endoplasmique

2.3.1. La dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un réseau de tubules et de sacs aplatis comprenant des régions rugueuses et lisses qui diffèrent selon leur structure et leur fonction. La fonction du RE est essentielle à la régulation de nombreux aspects de la physiologie cellulaire, tels que le trafic de vésicules, la biogenèse des lipides et des membranes ainsi que le ciblage et la sécrétion de protéines (121-124). Le RE joue un rôle crucial dans le fonctionnement cellulaire normal, par le traitement de la modification post-traductionnelle et le pliage des protéines sécrétoires et membranaires. Ces protéines sont synthétisées le long de la membrane du RE

rugueux et sont ensuite passées à l'appareil de Golgi, où elles subissent d'autres modifications post-traductionnelles. La capacité du RE à replier correctement ces protéines dépend des protéines chaperons qui, dans des conditions physiologiques normales, sont en excès dans la lumière du RE (122).

La majorité des protéines sécrétées ou associées à la membrane cellulaire pénètre le réticulum endoplasmique pour être repliées correctement et s'assembler. Tel un système de contrôle de qualité, le réticulum endoplasmique peut percevoir l'accumulation de protéines mal repliées et y répondre par l'atténuation de la traduction, la régulation positive de gènes pour les protéines chaperons et autres protéines apparentées, et la hausse de la dégradation des protéines mal repliées (125). La dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique (ERAD) est le processus par lequel les protéines aberrantes et/ou mal repliées localisées dans la lumière ou dans la membrane du réticulum endoplasmique sont éliminées (21, 126). Au cours de ERAD, les chaperons moléculaires et les facteurs associés reconnaissent et ciblent les substrats pour leur rétrotranslocation au cytoplasme, où ils sont polyubiquitinés et dégradés par le protéasome 26S. ERAD est essentiel au maintien de l'homéostasie du RE, et la perturbation de ce processus est étroitement associée à l'apoptose. Dans certaines conditions cellulaires, la quantité de protéines de conformation anormale dans le RE s'accumulent ce qui génère le « stress du RE » et ultimement l'apoptose (127).

2.3.2. La réponse de la protéine dépliée

Le stress associé au RE est une caractéristique commune de plusieurs cellules tumorales causé par l'accumulation de protéines mal repliées au sein du RE due entre autres aux stress environnementaux tels que l'hypoxie, le manque de nutriments, l'acidose, la déplétion calcique du RE, le stress oxydatif, le dommage à l'ADN et les perturbations énergétiques (21). Plusieurs types de cancers reposent sur les mécanismes de repliement et de clairance protéiques du RE pour replier correctement les protéines de voies de signalisation clés. Ces cancers requièrent une activité augmentée de la machinerie du RE en raison de leur synthèse élevée de protéines (128-133). Ceci dit, un stress protéique trop sévère ou se

prolongeant surpasse les mécanismes compensatoires résultant en un stress protéotoxique irréversible induisant la mort cellulaire (134, 135).

Les cellules cancéreuses sont dépendantes des mécanismes de repliement protéique pour leur survie, et les mécanismes de neutralisation du stress étant élevés dans les cellules tumorales contribuent au processus de tumorigenèse. Conséquemment, les cellules cancéreuses sont constamment sur la limite d'un stress protéotoxique irréversible, comparativement aux cellules non tumorales qui parviennent à maintenir un équilibre (136, 137). Afin d'assurer la survie cellulaire, les cellules normales et tumorales réagissent rapidement au stress du RE par des mécanismes initiés par un ensemble de signaux de transduction intracellulaires, regroupés sous le terme de « la réponse de la protéine dépliée » (UPR). L'UPR est un mécanisme de protection et de compensation majeur qui favorise le repliement des protéines et la dégradation des protéines mal repliées.

L'accumulation de preuves a démontré que l'UPR est un mécanisme important requis pour les cellules cancéreuses dans le cadre d'un stress du RE. La signalisation du UPR favorise généralement la survie cellulaire en améliorant la capacité de pliage des protéines dans le RE (115, 116, 138). Les gènes ciblés par l'UPR comprennent les chaperons moléculaires dans le RE, les catalyseurs permettant le repliement optimal des protéines, et les sous-unités de la machinerie de translocation (134, 135). L'activité ERAD dépend des fonctions du UPR; notamment, plusieurs composants du système ERAD sont sous contrôle transcriptionnel du UPR (figure 1) (139). Si la charge de protéines dans le RE dépasse sa capacité de pliage, ou que le UPR comporte certaines déficiences, les cellules ont tendance à mourir avec des caractéristiques apoptotiques via la voie intrinsèque (127, 134, 140). Ceci dit, le stress du RE et le UPR ont un double impact sur les tumeurs : ils promeuvent à la fois la croissance tumorale et l'apoptose (141).

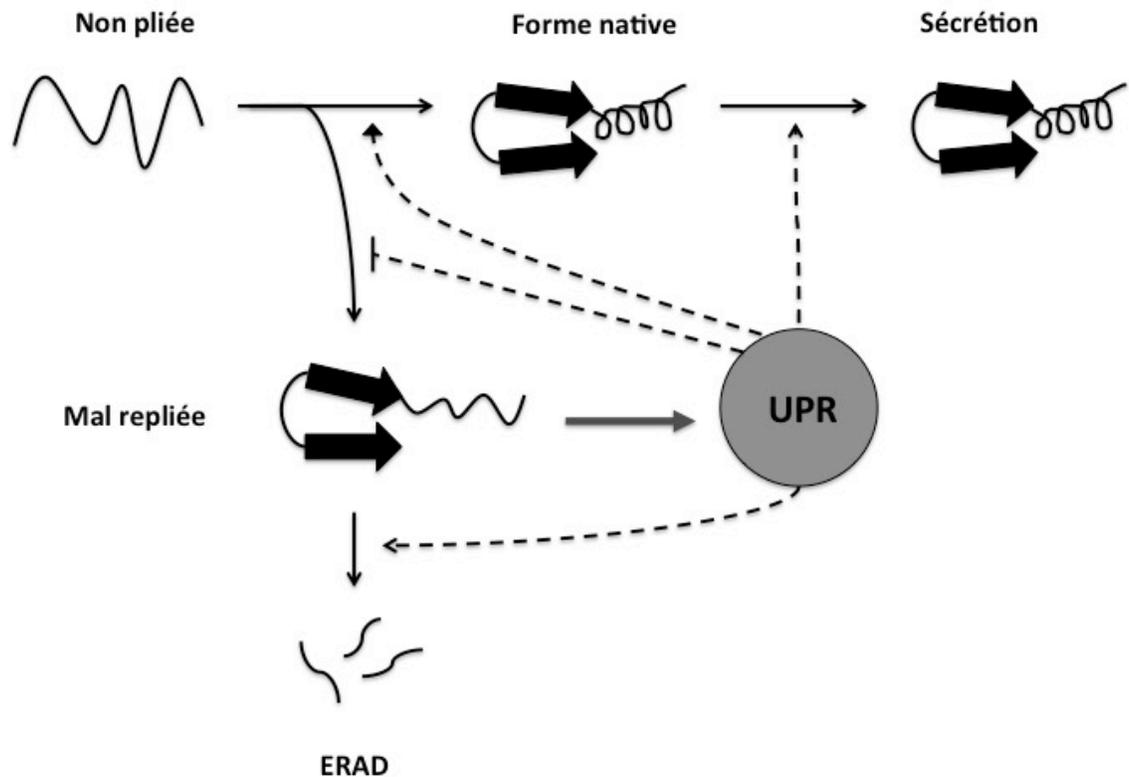


Figure 1. L'activité ERAD dépend des fonctions du UPR. Les protéines pénètrent dans le RE sous forme non pliée, après quoi elles se replient, forment des oligomères et passent à la voie sécrétoire tardive ou deviennent irrévérablement mal repliées et sont éliminées par la machinerie ERAD. Le stress cellulaire ou la perte de ERAD entraîne l'accumulation de protéines mal repliées et, par conséquent, l'activation du UPR (flèche pleine). L'UPR agit pour réduire les niveaux de protéines mal pliées en améliorant le repliement à l'état natif, en favorisant le transit vers la voie sécrétoire et en augmentant le taux d'ERAD, tout en réduisant simultanément la formation de protéines mal repliées. Figure adaptée de *Travers et al. Cell 101 (3) 2000.*

Le UPR comporte trois voies conservées régulant l'expression de nombreux gènes qui maintiennent l'homéostasie au sein du RE ou favorisent l'apoptose cellulaire lors d'un stress persistant (figure 2). L'activation d'au moins une branche du UPR et l'expression accrue de

nombreux chaperons du RE et de gènes cibles du UPR ont été démontrés dans un certain nombre de tumeurs humaines mais leurs rôles ne sont pas encore complètement caractérisés (116). Les trois voies du UPR opèrent en parallèle et chacune possède ses propres effecteurs de signalisation (142). Un régulateur essentiel du UPR est le GRP78 (connu sous le nom de protéine de liaison à la chaîne lourde d'immunoglobuline ou BiP). Celui-ci est l'un des chaperons les plus abondants dans la lumière du RE et est lié aux protéines transmembranaires du RE : la « protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase » (PERK), l'activation du facteur de transcription 6 (ATF6) et « l'inositol requiring enzyme 1 (IRE1) (134). En réponse au stress du RE, la dissociation de GRP78 des protéines transmembranaires permet leur activation ultérieure (127, 134).

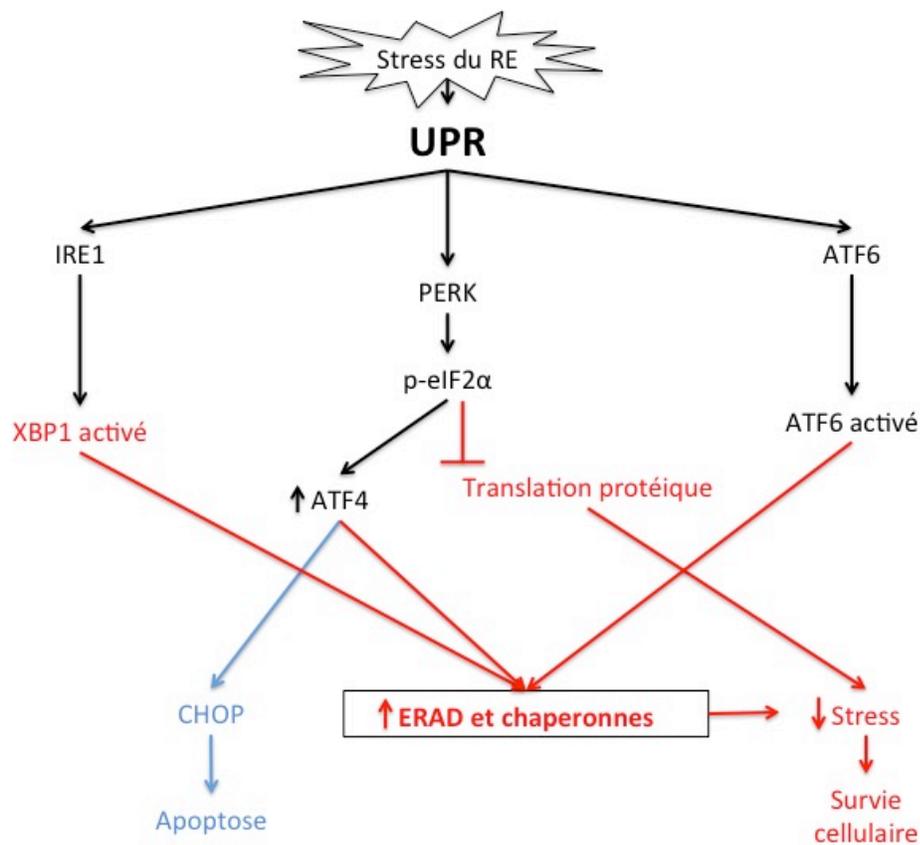


Figure 2. Le stress du RE induit le UPR. Dans le RE des mammifères, le stress du RE est détecté par trois protéines associées à la membrane, ATF6, PERK et IRE1. L'ATF6 est un facteur de transcription dont l'activation nécessite la translocation d'ATF6 à l'appareil de Golgi et le traitement subséquent de l'ATF6 par deux protéases membranaires. PERK est une protéine kinase qui est autophosphorylée et activée lorsque GRP78 se dissocie du domaine luminal du RE en réponse au stress du RE. PERK phosphoryle eIF2 α , conduisant à une atténuation globale de la synthèse protéique que seules quelques protéines dont le facteur de transcription ATF4 peuvent échapper. L'ATF4 active les gènes en aval qui peuvent avoir un rôle pro-survie ou pro-apoptotique (les événements pro-morts sont marqués en bleu alors que les événements pro-survie sont marqués en rouge). IRE1 est également une protéine kinase liée à la membrane qui est activée lorsque GRP78 se dissocie de celle-ci et promeut l'épissage de l'ARNm qui code pour la protéine XBP1. Figure adaptée de *Liu et Ye, Cell Research 21(6) : 867-83, 2011.*

Certaines études citent qu'en situation de stress, les trois voies du UPR sont activées séquentiellement, la voie PERK étant activée la plus rapidement, suivi par ATF6 puis IRE1. Cela suggère que PERK et ATF6 peuvent résoudre le stress de façon temps-dépendante, et bien que IRE1 contribue également à la survie cellulaire, cette voie finirait par induire les voies apoptotiques (143). Cependant, il a été récemment démontré que l'atténuation d'IRE1 induit les voies apoptotiques et que l'activation persistante d'IRE1 augmente la viabilité cellulaire en situation de stress. Ces données suggèrent que la durée de signalisation de IRE1 agit comme commutateur (144, 145).

Le moment relatif auquel survient le stress déplace l'équilibre entre la cytoprotection et l'apoptose au fur et à mesure que le stress du RE non résolu persiste (143). Citons par exemple la voie PERK comme étant central avec GADD34 comme un des joueurs principaux dans le déclenchement de la cascade apoptotique avec CHOP (figure 3). La signalisation PERK induit sa propre désactivation via l'expression de GADD34. GADD34 code pour une sous-unité d'une protéine phosphatase qui contrecarre PERK en déphosphorylant eIF2 α . Une phosphorylation soutenue d'eIF2 α permet à la fois une diminution transitoire de la traduction globale et l'expression d'ARNm spécifiques induits par le stress (127, 134). L'activation excessive de cette voie peut cependant être nocive pour la cellule lorsque la réduction de la quantité de protéines qui entre dans le RE doit être balancée avec la nécessité de maintenir une synthèse protéique suffisante pour assurer le mécanisme de repliement des protéines incluant toutes les autres protéines essentielles qui sont pliées dans le RE (146). Le blocage de cette voie de protection peut être un élément central du passage de la phase adaptatrice à l'apoptose.

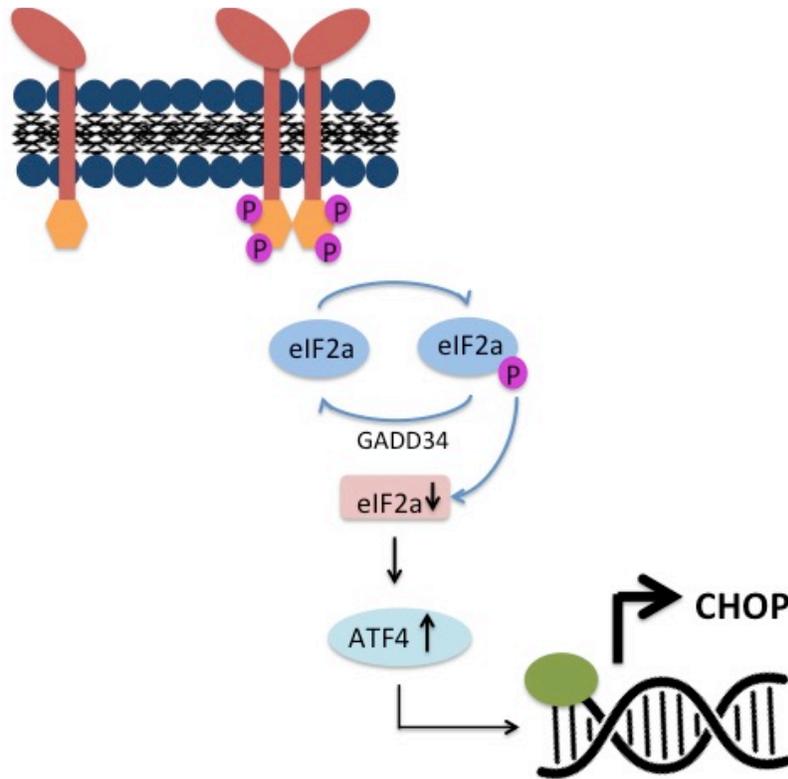


Figure 3. Le domaine cytosolique activé de PERK du UPR. GADD34 code pour une sous-unité qui déphosphoryle eIF2 α permettant la transcription de CHOP en aval. Schéma adapté de *Walter et al., Science (2011)* .

2.3.2.1. La voie de IRE1

La protéine IRE1 α est une protéine transmembranaire qui contient à la fois un domaine serine/thréonine kinase et un domaine endoribonucléase. Son domaine endoribonucléase promeut l'épissage de l'ARNm qui code pour la protéine XBP1. Cette dernière sert de régulateur transcriptionnel des gènes cibles du UPR tels que le contrôle de la transcription des chaperons, des co-chaperons ainsi que des gènes impliqués dans la dégradation des protéines

(127). XBP1 contribue à la réponse adaptative au stress du RE grâce à une régulation positive du GRP78.

L'étude auprès de modèles animaux a démontré que XBP1 était nécessaire pour la croissance tumorale *in vivo*. Cette étude a été effectuée chez des souris SCID dans lesquelles ont été injectées des fibroblastes embryonnaires de souris spontanément transformés. Les cellules *Xbp1*^{-/-} et *Xbp1*⁻ n'ont pu développer de tumeurs chez la souris, même en présence de VEGF. Des mutations de XBP1 ont été décrites dans des cellules tumorales de patients atteints de myélome multiple (147-149). La surexpression de XBP1 dans les cellules de myélome a été démontrée et elle semble être critique pour l'induction du myélome multiple (131). Fait intéressant, il a été démontré que l'inhibition de l'épissage de XBP1 réduit la croissance des cellules de myélome multiple (150). En conséquence, l'inhibition de l'IRE1 α a montré qu'il sensibilisait les cellules de myélome multiple au stress du RE et réduisait leur survie (151). Ces résultats supportent que la voie IRE1 du UPR est nécessaire à la tumorigenèse.

2.3.2.2. La voie de ATF6

ATF6 est activé par une protéolyse intramembranaire régulée après sa translocation du RE vers l'appareil de Golgi. L'ATF6 actif est un facteur de transcription qui régule l'expression des chaperons du RE et de la protéine XBP1 pour faciliter le pliage, la sécrétion et la dégradation des protéines dans le RE. Il a été démontré que les deux processus d'activation, ATF6 et l'épissage initié par IRE1 α de l'ARNm de XBP1, sont nécessaires pour l'induction complète du UPR (127, 134).

L'ATF6 est surexprimé dans de nombreuses tumeurs humaines solides et participe à la promotion de leur prolifération et de leur survie dans des conditions de stress (152). L'expression de l'ATF6 contribue à la formation du cancer en régulant négativement les gènes impliqués dans la sénescence cellulaire (153).

2.3.2.3. La voie PERK

L'activation de PERK implique son oligomérisation et son autophosphorylation. Tel que discuté ci-dessus, la phosphorylation du facteur d'initiation eucaryote 2 α (eIF2 α) par PERK inactive indirectement eIF2 et la traduction globale de l'ARNm. La réduction de la traduction globale entraîne une réduction des protéines régulatrices clés qui sont sujettes à un renouvellement rapide, facilitant l'activation de facteurs de transcription, tel que NF- κ B, pendant le stress cellulaire (134). La répression translationnelle entreprise par PERK est transitoire et permet la traduction sélective de certaines protéines activées, y compris la traduction du facteur de transcription ATF4. ATF4 se transloque au noyau et induit la transcription des gènes requis pour rétablir l'homéostasie du RE incluant CHOP et GADD34 (134, 142).

En culture cellulaire, les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) PERK - / - ne parviennent pas à phosphoryler eIF2 α en réponse à l'hypoxie. Lorsque des MEF PERK - / - sont injectés par voie sous-cutanée chez la souris, ils croissent plus lentement et présentent des niveaux plus faibles de p-eIF2 α que les cellules PERK + / + (154). La perte de PERK dans les cellules cancéreuses supprime l'apparition et l'expansion de la tumeur, alors qu'elle augmente l'instabilité génomique dans les cellules normales et peut entraîner le développement de la tumeur (155). En ce qui a trait à l'expression de PERK *in vivo*, il a été démontré que les lymphomes humains ont des niveaux significativement plus élevés de l'activation du UPR par rapport aux tissus normaux dans le but de favoriser la survie cellulaire par l'induction d'une autophagie cytoprotectrice (156). En somme, l'inhibition de PERK a démontré réduire la croissance tumorale à la fois *in vitro* et *in vivo* (157).

L'une des composantes transcrite en aval de la voie PERK et ATF6 du UPR est la protéine homologue C/EBP (CHOP), également connue sous le nom du gène GADD153. CHOP est un facteur de transcription important du passage de la signalisation pro-adaptative à pro-apoptotique par le contrôle de gènes responsables d'initier l'apoptose (142, 146). Celui-ci régule l'expression de plusieurs gènes codant pour des facteurs pro-apoptotiques comprenant DR5 (récepteur de mort 5). Des preuves récentes suggèrent que sous un stress du RE, les

protéines Bcl-2 pro-apoptotiques, Bak et Bax, subissent une altération conformationnelle dans la membrane du RE permettant l'activation de la procaspase-12 qui réside dans le RE. La caspase-12 activée clive et active la procaspase-9 et par conséquent permet l'activation de la cascade des caspases (158). Il a été rapporté que les cellules déficientes en CHOP démontrent une résistance à l'apoptose suite à un stress du RE (159).

CHAPITRE 3. VCP comme cible thérapeutique

3.1. La protéine contenant de la valosine (VCP) et ses fonctions cellulaires

VCP est une ATPase cytoplasmique qui permet l'extraction des protéines marquées par l'ubiquitine destinées à être détruites par l'UPS, grâce à l'interaction avec un certain nombre de cofacteurs distincts (160-165). Cette protéine est un homohexamère membre de la famille des ATPases associées à diverses activités cellulaires (AAA) possédant un domaine ATPase hautement conservé. VCP est également connue sous les noms de chaperon moléculaire p97 chez les vertébrés, Cdc48 chez *S. cerevisiae*, Cdc-48 chez *C. elegans*, TER94 chez *Drosophila melanogaster* et VAT chez les archaebactéries (162, 166-170). Elle est l'une des protéines les plus abondantes dans le cytoplasme et le nucléoplasme comptant pour près de 1% de toutes les protéines cytoplasmiques (161, 171).

La protéine VCP comprend un domaine N et un domaine C-terminal et deux ATPases, D1 et D2. L'ATPase D2 contribuerait à la majorité de l'activité ATPase de VCP (161, 172, 173). VCP possède des protéines effectrices contenant des motifs d'interaction protéiques qui se lient à ses extrémités N- ou C-terminales (162, 164, 174-176). Chacun de ces complexes protéiques permet le recrutement de VCP aux substrats cibles intégrés au niveau de différentes structures cellulaires telles que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (177-179). Ils sont également spécifiques à un processus cellulaire tels que ERAD (180-182), le UPS (183-185), la réparation de l'ADN (186), la maturation des autophagosomes (187, 188), et la régulation du cycle cellulaire (179, 189, 190).

L'hydrolyse de l'ATP dans le domaine D2 de VCP permet un changement conformationnel des protéines permettant leur extraction mécanique de complexes protéiques,

de membranes lipidiques ou de la chromatine, afin de les remodeler ou de les déplier et de les présenter pour dégradation protéasomale ou lysosomale (167, 168, 174, 191-195). La simple présence de VCP n'est pas suffisante pour que la dégradation se produise; l'ATPase de VCP est nécessaire pour effectuer un réarrangement structurel essentiel (172, 196). L'initiation du dépliage protéique est un processus complexe où les étapes et les mécanismes peuvent varier en fonction de la nature structurelle de la protéine ubiquitinée. Ce faisant, il a été proposé que les divers rôles de VCP soient médiés par une activité "ségrégame" qui désintègre des structures en déployant un substrat endogène, ce qui expliquerait son implication dans des processus aussi divers que ERAD, par exemple (160). En plus de son activité "ségrégame", elle possède une activité enzymatique « unfoldase » pour les substrats du protéasome permettant d'améliorer le processus de dégradation (160, 161). Toutes les protéines extraites, remodelées ou dépliées par l'activité unfoldase ou "ségrégame" de VCP sont dégradées par le protéasome (173).

Les fonctions de VCP sont essentielles à l'UPS, ce dernier étant responsable de la dégradation ciblée de la plupart des protéines intracellulaires. Les fonctions moléculaires de VCP sont associées à une grande variété de processus cellulaires comprenant la dégradation protéique ubiquitine-dépendante telles que la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique (ERAD), la dégradation protéique associée à la chromatine (CAD), et la voie de l'agrésome-autophagie, pour en nommer que quelques-uns (figure 4) (187, 188, 197-199).

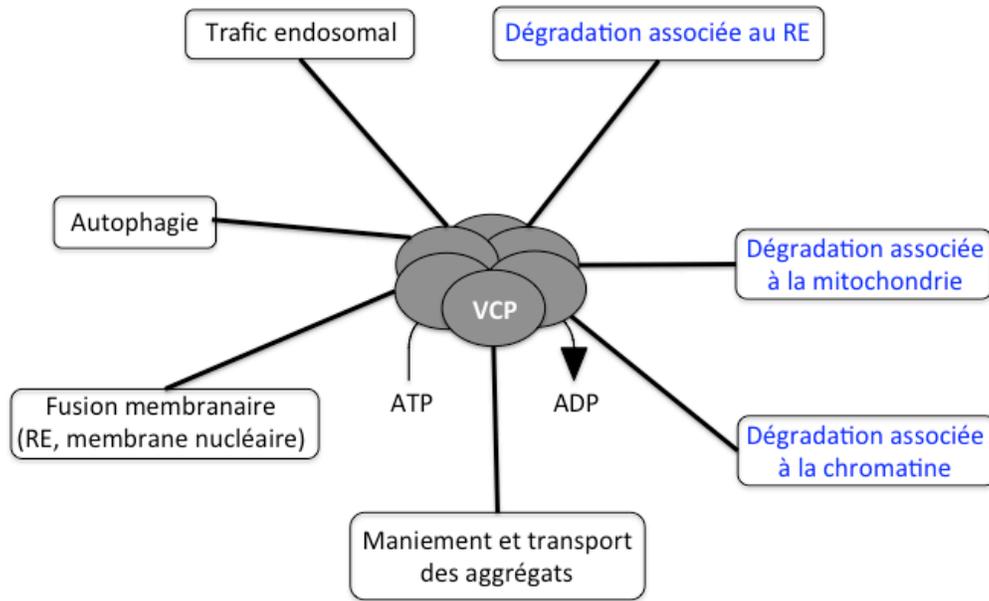


Figure 4. Les fonctions cellulaires de VCP. VCP est associée à une grande variété de processus cellulaires comprenant la dégradation protéique ubiquitine-dépendante tels que la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique (ERAD), la dégradation protéique associée à la chromatine (CAD), la voie de l'agrésome-autophagie, la dégradation protéique associée à la mitochondrie (MAD), l'endocytose, et le trafic des protéines. Les protéines effectrices spécifiques à ces fonctions ne sont pas démontrées dans ce schéma. Les fonctions en bleu représentent celles associées au UPS. Schéma adapté de *Meyer et al., Nature Cell Biology (2012)*.

3.1.1. Les fonctions de VCP au sein de la voie de l'agrésome-autophagie

Les cellules eucaryotes possèdent deux moyens pour dégrader les protéines : le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie. Le protéasome est utilisé lorsque les protéines sont marquées avec des chaînes de polyubiquitine lys-48. Pour sa part, l'autophagie dégrade les protéines mal repliées qui forment des agrégats dans le cytosol (200). Les protéines polyubiquitinées sont transportées en région péri-nucléaire pour former des agrésomes et s'assemblent avec des membranes autophagiques pour former des autophagosomes (201-203). Dans ce processus, les constituants à être dégradés sont séquestrés dans les vésicules à double

membrane connues sous le nom de vacuoles autophagiques. Celles-ci se fusionnent avec le lysosome, un organite majeur pour la dégradation qui contient des hydrolases pouvant dégrader tout constituant subcellulaire (protéines, lipides, acides nucléiques, et glucides). Ce processus peut être décomposé en étapes distinctes: l'induction, la formation de l'autophagosome et sa fusion avec le lysosome pour former un autolysosome, et la dégradation autophagique.

VCP prend part à la fusion des autophagosomes, qui contiennent des protéines mal repliées, aux lysosomes pour la formation des autolysosomes (187, 188, 204, 205). Cette action se fait en partenariat avec HDAC6, un complexe moteur dynéine rétrograde qui permet le recrutement de p62-NBR1-ALFY (194, 206, 207). La dysfonction de VCP ou de HDAC6 cause une déficience de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (187, 188, 205, 208). Cela provoque une augmentation du nombre d'autophagosomes qui sont dans l'incapacité de mûrir en autophagolysosomes et de dégrader les agrégats de protéines (188). Ce phénomène mène ultimement la cellule vers l'apoptose.

3.1.2. Les fonctions de VCP au sein de la dégradation protéique associée à la chromatine

L'intégrité du génome est préservée par les mécanismes de signalisation et de réparation des dommages à l'ADN, qui contrecarrent les conséquences néfastes des lésions à l'ADN. La chromatine permet l'intégration et l'association structurelle et dynamique de protéines impliquées dans divers processus, tels que la transcription, la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN et la division cellulaire (173). La majorité des protéines recrutées à la chromatine au cours de ces processus est essentielle pour l'entretien du génome et nécessite d'être retirée ou désassemblée dans un temps donné. Divers composants du UPS sont étroitement associés à la chromatine, en particulier lorsque le taux de renouvellement protéique devient plus important, comme dans le cas de lésions à l'ADN (173).

La dégradation protéique associée à la chromatine (CAD) est le processus par lequel les molécules régulatrices associées à la chromatine qui sont impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN, la division cellulaire et la transcription de gènes, sont dégradées. VCP induit le retrait des substrats polyubiquitinés conjugués au résidu lysine-48 liés à la chromatine

pour permettre l'assemblage adéquat des facteurs de signalisation en aval (209). Lorsque qu'un dommage à l'ADN double-brin survient, le complexe VCP^{Ufd1-Npl4} est recruté aux sites de cassures de l'ADN double brin (DSB) peu de temps après les dommages (209, 210) permettant la réparation de l'ADN et ultimement la survie cellulaire (190, 211-213). Il a été démontré que l'inhibition de VCP ou l'expression mutante de la fonction "ségrégase" de VCP ont provoqués des niveaux accrus et la persistance de chaînes lys48-ubiquitine sur les sites de DSB (214). Il est donc possible d'affirmer que VCP est recruté aux sites DSB par les chaînes lys48-ubiquitine et que sa fonction immédiate auprès des substrats lys48-ubiquitinés aux DSB est importante pour le recrutement de molécules de signalisation et de réparation, telles que 53BP1, BRCA1 et Rad51 (214-216).

Interférer avec VCP résulte en une accumulation de protéines polyubiquitinées sur la chromatine et le PICHROS « protein-induced chromatin stress ». Conséquemment, il y a une réponse inadéquate au dommage à l'ADN, ce qui résulte en une instabilité génomique et ultimement l'apoptose. PICHROS affecte négativement les événements en aval impliquant des substrats accumulés, tels que la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, la mitose et la transcription (209, 211-213, 217).

3.1.3. Les fonctions de VCP au sein de la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique

La dégradation protéique associée au RE s'agit de l'une des voies les plus étudiées dans la littérature qui contribue à maintenir l'homéostasie cellulaire (218-220). Dans ce contexte, VCP joue un rôle clé dans ERAD des protéines sécrétoires et membranaires mal repliées ainsi qu'auprès du turnover protéique dépendant de l'ubiquitine du UPS (173). VCP favorise la rétrotranslocation des substrats du protéasome à travers la membrane du RE pour leur dégradation protéasomale. Suite à l'ubiquitination des protéines cibles, VCP les extrait d'une manière ATP-dépendante du RE et elles maintiennent leur état mal replié jusqu'à ce qu'elles soient dégradées par le protéasome dans le cytosol (180-182, 195, 221, 222). La perte de l'activité ATPase de VCP par mutation ou modification oxydative entraîne un dysfonctionnement ERAD, un stress du RE et une mort cellulaire apoptotique (223-225). Dans

les cellules avec une activité VCP-ATPase diminuée, l'ARNi de VCP a entraîné une prolifération cellulaire réduite et une mort cellulaire apoptotique avec l'émergence de la caspase-3 et -7 (226). Par conséquent, la déplétion de VCP, comme l'expression diminuée de VCP, entraîne des effets similaires: le dysfonctionnement de ERAD et le stress du RE menant à la mort cellulaire apoptotique (227).

3.2. VCP au sein des cellules cancéreuses

Dans les cellules non tumorales, la charge des substrats de dégradation (c'est-à-dire les protéines marquées par l'ubiquitine) s'équilibre avec la capacité de dégradation du UPS avec l'aide supplémentaire de VCP. Pour leur part, les cellules cancéreuses sont caractérisées par l'expression accrue de protéines mutantes et/ou l'expression de protéines en excès résultant en une charge protéique qui dépasse la capacité de dégradation du UPS (228, 229). Cela s'illustre ultimement comme un déséquilibre entre la synthèse et l'assemblage des protéines. Pour contrer ce déséquilibre, les cellules cancéreuses se fient alors à l'efficacité de VCP pour maintenir l'homéostasie de la cellule, sans quoi la cellule entreprendra l'apoptose (230).

VCP détient la capacité de réguler les niveaux d'oncogènes et suppresseurs de tumeurs critiques via le contrôle du cycle cellulaire, l'autophagie, la protéostasie, les processus endocytiques et/ou les mécanismes de dommages à l'ADN. VCP et ses protéines effectrices sont impliquées directement dans la régulation (dégradation protéasomale) de protéines associées au cancer telles que I κ B α , un inhibiteur de NF- κ B (231, 232). VCP a également été impliquée dans la dégradation ou la régulation négative de HIF1 α (promoteur de l'angiogenèse tumorale et du potentiel métastatique), Aurora B kinase (impliqué dans l'instabilité génomique), et NF1 (suppresseur de tumeur et inhibiteur de la signalisation Ras) (233-235).

Étant donné la nature essentielle de VCP, l'expression altérée ou une mutation de VCP peuvent avoir des conséquences pathologiques tels que l'inhibition de ERAD, une élévation du stress du RE et ultimement l'apoptose (223-225). Il a également été démontré que l'inhibition de VCP, via l'utilisation d'ARN interférants qui la compose ou l'expression déficiente de son ATPase, provoque une instabilité génomique. L'instabilité génomique résulte par l'induction du PICHROS qui affecte directement et négativement de multiples

processus métaboliques de l'ADN, y compris la réplication, les réponses aux dommages de l'ADN, la mitose et la transcription, conduisant à un stress génotoxique et à l'instabilité du génome (173). Cette instabilité génomique provoque ultimement la mort cellulaire dans les lignées cellulaires tumorales (224, 226).

VCP est présent à un niveau significativement plus élevé dans le sérum d'humains atteints d'un carcinome ovarien et du lymphome non-Hodgkinien, entres autres (236). Les niveaux d'expression tumoraux de VCP sont en corrélation avec la récurrence et le pronostic de plusieurs carcinomes humains, tels que les carcinomes gastrique, épidermoïde gingival, oesophagien, etc. (237-247). Au sein des lymphomes cellules B canins, les niveaux d'expression de VCP se sont révélés augmentés avec le grade corrélant l'expression de VCP avec la malignité pour ce sous-type de lymphome (22). Sur la base de ces données, il est possible que des niveaux d'expression élevés de VCP contribuent au processus de malignité par sa capacité à réguler les protéines inhibant la croissance tumorale et à départir les cellules malignes de protéines abondantes, mal repliées / agrégées et potentiellement toxiques (233).

CHAPITRE 4. Molécules ciblant la dégradation protéique

Au sein des cellules tumorales, les protéines sont renouvelées sans cesse, la dégradation se produisant rapidement, spécifiquement, et de manière dépendante de l'ATP (248). Il devient donc intéressant d'investiguer l'efficacité des molécules chimiothérapeutiques sur les processus de dégradation protéique, comme le système ubiquitine-protéasome (UPS), qui est responsable de la plupart de la protéolyse cellulaire (248, 249). Tel que déjà mentionné, la voie de signalisation du UPS est une composante fondamentale de la prolifération et de la survie cellulaire en assurant le rôle de médiateur pour la dégradation des protéines impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire (15).

Les cellules cancéreuses, incluant celles de lymphomes, peuvent être particulièrement sensibles à la mort cellulaire par la suppression des mécanismes de dégradation protéique, car elles présentent une dépendance accrue vis-à-vis ces mécanismes de contrôle de qualité pour éliminer une charge élevée de substrats (250) et des niveaux déséquilibrés de sous-unités de complexes protéiques (117, 118) en raison de mutations ou un environnement métabolique

altéré (251). Les lymphomes B et T de haut grade ou à grandes cellules possèdent une régulation à la hausse de HSP90, une protéine de choc thermique, et les inhibiteurs du protéasome permettent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en provoquant une dérégulation d'un certain nombre de protéines pro-apoptotiques dans ces cellules (252).

4.1. Le UPR comme cible thérapeutique

Les cellules tumorales se développent sous un stress cellulaire causé par l'hypoxie, la privation de nutriments, les dommages à l'ADN, le stress métabolique et le stress oxydatif (253-255). Dans des conditions de stress cellulaire, la régulation des chaperons est à la hausse afin d'assurer l'adaptation des cellules cancéreuses au stress associé à l'oncogenèse soit en réparant les protéines endommagées (repliement des protéines) soit en les dégradant. Les cellules tumorales dépendent donc d'un UPR activé pour survivre au microenvironnement hostile, contrairement aux cellules non tumorales dans lesquelles les voies du UPR demeurent faiblement exprimées ou inactives parce qu'elles sont peu ou pas soumises à ces stress (127). Cet écart entre les cellules tumorales et les cellules normales offre un avantage pour les agents chimiothérapeutiques qui visent spécifiquement l'UPR. Ce potentiel thérapeutique impliquerait principalement deux approches auprès des cellules tumorales: induire l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE pour induire un stress au RE et inhiber les réponses adaptatives et antiapoptotiques du UPR.

L'étude des cellules de myélome a démontré que certains inhibiteurs de HSP90 similaires à la tunicamycine et à la thapsigargine (activateurs du UPR connus), sont capables d'activer les trois branches du UPR et d'inhiber la prolifération et les niveaux d'expression accrus de certains chaperons moléculaires tels que BiP et GRP94 générant ultimement l'apoptose par accumulation de protéines polyubiquitinées (127).

L'un des chaperons du RE les mieux caractérisés est la protéine régulée par le glucose (GRP78), également appelée BiP. GRP78 est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, y compris la translocation des polypeptides nouvellement synthétisés à travers la membrane du RE, facilitant le repliement et l'assemblage des protéines, ciblant les protéines

mal repliées pour la dégradation protéique associée au RE, régulant l'homéostasie calcique et servant de capteur de stress. Elle maintient dans un état inactif les signalisations associées à la capacité de repliement des protéines du RE, à la sensibilité des capteurs de stress du RE et les machineries pro-apoptotiques associées au RE. GRP78 régule l'équilibre entre la viabilité des cellules cancéreuses et l'apoptose (256).

Les niveaux de Grp78/BiP sont habituellement élevés dans les tumeurs solides et les lignées cellulaires cancéreuses (257, 258). Trois principaux mécanismes ont été proposés pour la survie tumorale associée au GRP78: la promotion de la prolifération des cellules tumorales, la protection contre l'apoptose et la promotion de l'angiogenèse tumorale. Le GRP78 régulé à la hausse permet la surexpression de XBP1, l'activation d'ATF6, la phosphorylation de eIF2- α , et l'induction d'ATF4 et de CHOP (159, 259).

Une étude évaluant la croissance de lignées cellulaires de cancer mammaires murins *in vivo* chez des souris hétérozygotes Grp78 $^{+/-}$ a soutenu l'effet cytotoxique de la perte de fonction de GRP78, qui entrave de manière significative la croissance des tumeurs. Cette étude a également obtenu des résultats similaires lorsqu'elle a été effectuée *in vitro* (260). Entre autres, il a été démontré que l'inhibition du chaperon GRP78 et du facteur de transcription XBP-1 dans de nombreuses cellules tumorales *in vitro* entraîne une augmentation importante de la mort par apoptose des cellules tumorales via une augmentation du stress du RE (159, 256, 261). Dans un modèle *in vivo* de souris nues injectées de fibroblastes embryonnaires de souris PERK +/+ et PERK -/-, il a été démontré que la croissance tumorale des cellules PERK +/- croissent plus rapidement que les tumeurs PERK négatives (154). Ainsi, le ciblage par chimiothérapie des mécanismes du UPR offre une stratégie potentielle pour traiter diverses formes de cancer.

4.2. Inhibiteurs du protéasome

Le système ubiquitine-protéasome est un régulateur important de la croissance cellulaire et de l'apoptose. La dégradation de substrats individuels peut être régulée à la hausse, sans affecter la protéolyse d'autres substrats, permettant ainsi au protéasome de fonctionner comme régulateur des voies métaboliques (262). Différentes classes d'inhibiteurs du protéasome

peuvent affecter de manière différentielle la dégradation de divers substrats du protéasome. Cela permet de contrôler les niveaux cellulaires de certaines protéines impliquées dans la cancérogénicité et la progression de la tumeur, sans nécessairement avoir un effet systémique généralisé (262). Les inhibiteurs du protéasome présentent un certain niveau de cytotoxicité sélectif dans les cellules cancéreuses en induisant préférentiellement l'apoptose des cellules prolifératives ou en favorisant la présence de molécules inhibitrices de la croissance ou pro-apoptotiques (262). La voie d'induction de l'apoptose par les inhibiteurs du protéasome se produit souvent via la voie apoptotique intrinsèque. Il en résulte une activation de la caspase-9, suivie de l'activation des caspases effectrices-3 et -7, qui sont responsables des changements biochimiques et morphologiques associés à l'apoptose (262).

Un exemple de cancer grandement affecté par les inhibiteurs du protéasome est le myélome multiple (MM) humain. Celui-ci exprime de manière constitutive des facteurs de survie associés au stress du RE qui sont essentiels pour leur propagation et leur maintenance. Ainsi, les inhibiteurs du protéasome induisent l'apoptose des MM parce que le UPR est incapable d'assurer la dégradation des protéines mal repliées. En fait, comparativement aux autres lignées cellulaires, les cellules de MM sont les plus sensibles à l'apoptose induite par des inhibiteurs de protéasome via l'activation des voies associées à l'UPR, y compris PERK et les facteurs de transcription en aval, ATF4 et la cible pro-apoptotique CHOP (122).

4.2.1. Le bortezomib

Le bortezomib est un inhibiteur puissant, hautement sélectif et réversible du protéasome 26S approuvé pour le traitement du lymphome du manteau récidivant et du myélome multiple (15). Seules des études *in vitro* ont confirmé les effets cytotoxiques du bortezomib sur une variété de cellules cancéreuses, y compris des cellules cancéreuses de la prostate, du poumon, du sein, du côlon et le LNH (263). De plus, il peut induire des activités cytotoxiques additifs ou synergiques contre les cellules cancéreuses lorsque combiné avec d'autres agents antinéoplasiques. Par exemple, il a été rapporté que le bortezomib sensibilise les cellules de cancer du pancréas *in vitro* à l'apoptose induite par le stress du RE et augmente ainsi fortement l'activité anticancéreuse de la cisplatine (264).

Le bortezomib peut jouer un rôle dans l'amélioration de l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle en modulant les facteurs de résistance intracellulaire, tels que NF- κ B. En effet, les effets antinéoplasiques du bortezomib ont été attribués, en partie, à l'inhibition de la dégradation de I κ B, empêchant ainsi l'activation des facteurs de transcription Rel / NF- κ B, reconnus pour favoriser l'expression de gènes antiapoptotiques, tel que Bcl-2 (265). Cependant, des résultats récents ont démontré que l'inhibition de l'activité Rel / NF- κ B ne représente qu'une petite fraction de l'activité anticancéreuse du bortezomib. En outre, il a été démontré que le bortezomib tue les cellules à travers un processus indépendant du gène suppresseur de tumeur p53, qui implique l'activation d'une réponse pro-apoptotique au stress du RE (265). Cette hypothèse est actuellement testée dans des essais cliniques prospectifs combinant le bortezomib avec une variété de protocoles chimiothérapeutiques (57). Certains inhibiteurs de protéasome de deuxième génération visant à améliorer l'activité clinique et à réduire les effets toxiques ont été développés, permettant de combiner ces agents avec la chimiothérapie (57, 266).

Bien que le bortezomib ait probablement de multiples mécanismes d'action, l'inhibition protéasomale entraîne une accumulation de protéines dépliées dans le RE. Il a été démontré que le bortezomib supprime la voie IRE1 α /XBP1 du UPR en inhibant l'activité endoribonucléase/kinase IRE1 α et en stabilisant la forme non épissée de XBP1 (265). Ceci explique l'efficacité élevée du bortezomib auprès de cellules cancéreuses dans lesquelles le RE est déjà prédisposé à une charge protéique élevée (267). Dans les lignées cellulaires de myélome multiple, l'apoptose induite par le bortezomib a été attribuée à l'activation du UPR, caractérisée par la stimulation de PERK et sa cible pro-apoptotique, CHOP tel que déjà mentionné (127, 265).

Les inhibiteurs protéasomaux représentent une classe de médicaments qui se sont révélés efficaces dans le traitement de certains cancers, principalement par leur capacité à induire l'apoptose des cellules tumorales via l'activation du stress du RE (265). Néanmoins, bien que le bortezomib ait démontré une activité antiproliférative *in vitro*, les lignées cellulaires dérivées de tumeurs solides peuvent survivre à de longues expositions aux inhibiteurs du protéasome et cela illustre pourquoi le bortezomib a montré peu d'activité clinique envers les tumeurs solides (44) et il n'a pas démontré d'activité clinique significative contre le lymphome Hodgkinien récidivant ou réfractaire (15).

4.3. Inhibiteurs pharmacologiques de VCP

La protéine VCP possède un large éventail de rôles au sein de la cellule. Dès lors, l'inhibition pharmacologique de VCP peut résulter en une grande variation d'effets au sein de la cellule dépendamment du type et du lieu d'interaction entre la drogue et VCP. Il existe à ce jour plusieurs inhibiteurs pharmacologiques (liants compétitifs de l'ATP et inhibiteurs allostériques) de VCP ayant tous une activité résultante distincte (119, 268-276). Cependant, ces derniers possèdent une efficacité modeste, leur spécificité n'est pas bien caractérisée et ils n'ont pas les propriétés pharmacologiques requises pour leur utilisation *in vivo* (277).

4.3.1. N2, N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine (DBeQ)

Le N2, N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine (DBeQ) est un inhibiteur sélectif, puissant, et réversible de VCP. Il a été identifié comme un composé induisant plus efficacement l'apoptose dans les cellules cancéreuses humaines par rapport aux cellules non cancéreuses (278). Il a été démontré que DBeQ induit rapidement l'activation des caspases -3 et -7, inhibe l'autophagie par évidence d'une accumulation de LC3-II et induit la mort cellulaire dans les cellules HeLa (271). Le mécanisme par lequel DBeQ provoque une induction rapide des caspases est méconnu. Une possibilité est la suppression du mécanisme de contrôle de qualité protéique. Une autre possibilité est que VCP peut réguler l'activité de facteurs dans les cascades de signalisation extrinsèques ou intrinsèques qui aboutissent à l'activation des caspases. Enfin, il est possible que l'activation des caspases et l'apoptose soient un effet «hors cible». Toutefois, une étude *in vitro* auprès de lignées cellulaires de lymphome du manteau démontre que la perte de fonction de VCP dans ces lignées induit également la cascade des caspases et la mort cellulaire, suggérant un effet plutôt « ciblé » (279).

Le DBeQ détient la capacité d'induire une activation rapide des caspases et la mort cellulaire auprès de lignées cellulaires dérivées de tumeurs solides contrairement aux inhibiteurs du protéasome qui démontrent une forte activité monothérapeutique uniquement dans les cancers de la lignée hématopoïétique (44). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de

VCP peut être plus efficace que l'inhibition du protéasome comme stratégie chimiothérapeutique.

4.3.2. Eeyarestatin 1

Eeyarestatin1 (Eey1) est un inhibiteur pharmacologique de VCP de première génération conçu pour une utilisation *in vitro* (135, 280). Eey1 comprend deux domaines fonctionnellement indépendants, un domaine contenant du nitrofurane (NFC) et un domaine aromatique. Le domaine NFC de EeyI est requis pour l'interaction avec le domaine D1 de VCP et pour ses activités inhibitrices et cytotoxiques auprès de ERAD. Le domaine aromatique d'EeyI est non-toxique par lui-même, mais il peut recruter EeyI à la membrane du RE permettant au NFC de se lier directement à VCP et d'interférer avec ses fonctions associées au RE (135).

Eey1 peut induire la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses hématologiques par un mécanisme similaire à celui du bortezomib. Il induit l'accumulation de protéines polyubiquitinées dans les cellules, générant un stress du RE et activant l'expression de CHOP en plus de causer une perte compensatoire de l'histone H2A mono-ubiquitinée, signe de répression de la transcription protéique (279, 280).

Une étude a démontré que cette drogue induit l'apoptose dans des lignées cellulaires dérivées de lymphomes canins par un mécanisme de dommage à l'ADN (22). Ces lignées cellulaires ont une sensibilité augmentée aux effets létaux de Eey1 ayant un LC50 5-6 fois plus faible comparativement aux PBMCs. Eey1 n'a ni induit le stress du RE, ni perturbé la voie de l'agrésome-autophagie dans ces cellules (22).

4.3.3. Le CB-5083

Le développement d'inhibiteurs pharmacologiques de VCP pour utilisation *in vivo*, a permis de mettre au point le CB-5083, un inhibiteur pharmacologique puissant et sélectif du domaine D2 de l'ATPase de VCP possédant une activité contre un large éventail de types de tumeurs. Les études *in vitro* démontrent que l'inhibition spécifique de VCP par le CB-5083,

dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines, conduit à la perturbation des mécanismes cellulaires responsables de la dégradation protéique ubiquitine-dépendante. L'accumulation de protéines polyubiquitinées dans le RE active les trois voies de l'UPR et permet la surexpression du facteur de transcription CHOP, un mécanisme important de la cytotoxicité de CB-5083. L'induction de CHOP est requise pour l'induction de l'activité des caspases et de la cytotoxicité (277).

Le CB-5083 a démontré des propriétés pharmaceutiques compatibles pour une utilisation *in vivo*. Par le passé, l'activité anti-tumorale de CB-5083 a été caractérisée *in vivo* pour plusieurs cancers hématologiques chez des souris porteuses de tumeurs solides. Une inhibition puissante de la croissance tumorale dans plusieurs modèles de xénogreffes de tumeurs solides a été constatée. Dans ces modèles, le CB-5083 provoque l'accumulation rapide et soutenue de polyubiquitine dans des xénogreffes tumorales. Parallèlement à l'augmentation des niveaux de polyubiquitine, l'activation des voies du UPR et l'induction de marqueurs de l'apoptose sont également observées (277). Cette drogue agit sur les voies de signalisation UPS, UPR et l'autophagie dans des modèles *in vivo* avec une amplitude et un temps similaire à ceux observés en culture cellulaire, suggérant que l'inhibition de VCP conduit aux mêmes phénotypes *in vivo* que *in vitro*. De plus, CB-5083 a une forte activité antitumorale dans les modèles de tumeurs hématologiques et solides. Une augmentation de l'induction du UPR avec inhibition de VCP *in vivo* combinée à l'administration *per os* permettant un niveau sérique prolongé de la drogue peut également contribuer à son activité anti-tumorale par rapport aux inhibiteurs du protéasome.

Le CB-5083 est un candidat en tête de liste des thérapies ciblées notamment contre le myélome multiple chez l'humain (277). Il possède une activité puissante contre plusieurs lignées cellulaires de myélome et un certain nombre de modèles de myélome multiple *in vivo* en induisant l'accumulation de protéines polyubiquitinées, l'induction du UPR et ultimement l'apoptose. De plus, il diminue la viabilité de lignées cellulaires de myélome multiple et de cellules de myélome multiple dérivées de patients, y compris celles résistantes aux inhibiteurs du protéasome (281). Le CB-5083 est en développement préclinique et est évalué dans deux essais cliniques de phase 1 chez des patients atteints de myélome multiple récidivant et réfractaire et chez des patients présentant des tumeurs solides avancées.

Les différences pharmacodynamiques et l'efficacité de CB-5083 dans les tumeurs solides comparativement aux inhibiteurs du protéasome ont été étudiées et contribuent à ses nombreuses qualités comme thérapie ciblée. Un inhibiteur de VCP, par opposition aux inhibiteurs du protéasome, permet une suppression plus puissante et durable des voies de contrôle de la qualité protéique dans les cellules tumorales (282). L'activité antitumorale de CB-5083 a été comparée au bortezomib, à la fois dans un modèle *in vivo* de myélome multiple (AMO-1) et de tumeur solide (carcinome pulmonaire A549). Le bortezomib a été administré à sa dose prouvée efficace tout en respectant la voie d'administration (IV) et la posologie. Le CB-5083 a été efficace dans le modèle de myélome multiple AMO-1 et dans le modèle de carcinome pulmonaire A549 comparativement au bortezomib. Il a été démontré qu'après une administration unique de CB-5083, l'induction du UPR avec le CB-5083 se produit à une plus grande amplitude et plus rapidement comparativement au bortezomib. Ceci suggère le potentiel d'efficacité accrue de CB-5083 auprès des cancers sensibles à la mort cellulaire induite par l'UPR (277). Il s'agit d'une indication préclinique que les inhibiteurs de VCP sont potentiellement efficaces contre les tumeurs hématologiques et solides et une preuve que CB-5083 est non seulement efficace mais potentiellement supérieur au bortezomib (283).

Hypothèse et objectifs

L'expression élevée de VCP documentée au sein des cellules de lymphomes canins et les résultats obtenus auparavant avec Eey-1 nous permettent d'émettre l'hypothèse initiale que le CB-5083 démontrera une cytotoxicité sélective envers les cellules dérivées de lymphomes canins *in vitro* en induisant l'apoptose via un mécanisme de dommage à l'ADN double-brin.

L'objectif principal du projet est de valider le CB-5083 comme une thérapie ciblée efficace dans le traitement du lymphome canin *in vitro*, plus particulièrement en identifiant les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires du CB-5083 sur trois lignées cellulaires dérivées de lymphomes canins (CLBL-1, CL-1 et 17-71). Spécifiquement, nous déterminerons les effets du CB-5083 sur la viabilité cellulaire et l'apoptose sur ces lignées cellulaires en utilisant des cellules mononucléées de sang périphérique fraîchement isolées (PBMC) comme contrôle. Nous évaluerons ensuite son effet sur le dommage à l'ADN double brin, le stress du RE, la voie de l'agrésome-autophagie, et la réponse de la protéine dépliée (UPR).

Publication comme premier auteur

In vitro efficacy of a first-generation valosin-containing protein inhibitor (CB-5083) against canine lymphoma

A. Gareau¹, C. Rico², D. Boerboom², M.-E. Nadeau¹

Affiliations des auteurs :

1. Département des Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada.
2. Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St- Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada.

Référence de l'article:

Gareau A, Rico C, Boerboom D, Nadeau M-E. In vitro efficacy of a first-generation valosin-containing protein inhibitor (CB-5083) against canine lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2018;1–7. <https://doi.org/10.1111/vco.12380>.

ABSTRACT

Valosin-containing protein (VCP), through its critical role in the maintenance of protein homeostasis, is a promising target for the treatment of several malignancies, including canine lymphoma. CB-5083, a first-in-class VCP inhibitor, exerts cytotoxicity through the induction of irreversible proteotoxic stress and possesses a broad spectrum of anticancer activity. Here, we determined the cytotoxicity of CB-5083 in canine lymphoma cells and its mechanism of action in vitro. Canine lymphoma cell lines were treated with varying concentrations of CB-5083 and assessed for viability by trypan blue exclusion and apoptosis by caspase activity assays. The mechanism of CB-5083 action was determined by immunoblotting and RT-qPCR analyses of Lys48 ubiquitination and markers of ER stress (DDIT3), autophagy (SQSTM1, MAP1LC3A) and DNA damage (γ H2AX). Unfolded protein response markers were also evaluated by immunoblotting (eIF2 α , P-eIF2 α) and RT-qPCR (ATF4). CB-5083 treatment resulted in preferential cytotoxicity in canine lymphoma cell lines over control peripheral blood mononuclear cells. CB-5083 rapidly disrupted the ubiquitin-dependent protein degradation system, inducing sustained ER stress as indicated by a dramatic increase in DDIT3. Activation of the unfolded protein response occurred through the increase in eIF2 α phosphorylation and increased transcription of ATF4, but did not re-establish protein homeostasis. Cells rapidly underwent apoptosis through activation of the caspase cascade. These results further validate VCP as an attractive target for the treatment of canine lymphoma and identify CB-5083 as a novel therapy with clinical potential for this malignancy.

KEYWORDS

canine lymphoma, ER stress, p97, targeted therapy, valosin-containing protein, VCP

Abbreviations: RT-qPCR, reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; ER, endoplasmic reticulum; DMSO, dimethyl sulfoxide; PBS, phosphate buffered saline

INTRODUCTION

The survival of dogs with lymphoma has remained largely unchanged in the last 15 years. Although it is now clear that certain lymphoma subtypes require different therapeutic approaches, optimal treatment has not yet been elucidated, and palliation remains the goal for most patients.¹ Chemoresistance either at onset or at recurrence is often the reason for treatment failure.¹ Novel therapeutic approaches are currently being investigated to circumvent this problem, and one that seems to hold particular promise is the development of molecular-targeted therapies.² Historically, the search for molecular targets has largely focused on oncogenes, in line with the concept of “oncogene addiction.”³ This theory posits that the inhibition of driving oncogenes results in dramatic consequences for cancer cells while sparing normal, non-addicted cells. Although driving oncogenes have been successfully defined in certain cancer types, they appear more difficult to identify in lymphoma.⁴ Recently, a “non-oncogene addiction” concept has emerged, which posits that the cancer phenotype requires the activity of genes and pathways that cannot be considered as oncogenic themselves.⁵ This concept is based in part on the notion that cancer cells are exposed to more stressful cellular conditions.⁶ Indeed, in order to survive such conditions, cancer cells must adapt and therefore become more reliant on compensatory pathways.

The protein degradation pathway is an example of a compensatory pathway that is gaining momentum as an anticancer target. Cancer cells have long been known to carry numerous mutations and supernumerary chromosomes, making them likely to produce abnormal or excess proteins that must be eliminated.^{7,8} It has therefore been suggested that cancer cells are more dependent on components of the protein degradation machinery to maintain homeostasis and survive.⁹ Several components of the degradation machinery have been reported to be overexpressed in cancer cells.¹⁰⁻¹² Of particular interest to this study is valosin-containing protein (VCP, also known as p97). It is a ubiquitously expressed hexameric protein member of the AAA family of ATPases that is composed of 2 ATPase domains (D1 and D2), a N-terminal domain and a C-terminal tail. Through complex interactions with

cofactors, it is involved in endocytosis, autophagy and protein trafficking but more importantly, in ubiquitin-dependent protein degradation processes such as ER-associated degradation (ERAD), mitochondrial-associated degradation and chromatin-associated degradation (CAD).¹³ VCP overexpression has been documented in several malignancies including canine lymphoma, and often in a manner relating to malignancy and outcome.¹⁴⁻¹⁹ Due to its critical role in protein homeostasis, VCP has proven to be a promising target for the treatment of several malignancies,²⁰⁻²² including canine lymphoma.¹⁹

Indeed, a previous study documented VCP as a valid target for canine lymphoma. Canine lymphoma cells exposed to the VCP inhibitor Eeyarestin 1 exhibited marked accumulation of cytoplasmic and (more importantly) nuclear polyubiquitinated protein. Ultimately, induction of apoptosis was proposed to be related to increased DNA damage, due to the requirement of VCP activity for CAD.¹⁹

A recent study reported the development of CB-5083, a first-in-class small molecule inhibitor of VCP with a promising pharmacological profile for clinical use.²³ Studies report a mechanism of CB-5083 action based on binding and inhibition of the D2 ATPase domain of VCP, which results in the disruption of ubiquitin proteasome system (UPS), the accumulation of cellular polyubiquitinated proteins, and consequent ER stress and activation of the unfolded protein response (UPR).^{23,24} Cells exposed to CB-5083 ultimately undergo apoptosis by failing to restore protein homeostasis. This drug exhibited a broad range of cytotoxicity and antitumor activity in vitro and in vivo when tested on a panel of human cell lines and mouse xenograft models.^{23,24} The aim of the present study was to evaluate the in vitro effects and mechanism of action of CB-5083 in canine lymphoma, in order to develop therapeutic strategies for this disease and further validate canine lymphoma as a research model for the study of VCP inhibitory molecules.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture (canine lymphoid cell lines and PBMCs)

The canine lymphoma cell lines CLBL-1, CL-1 and 17-71 were maintained in culture according to previously published conditions.^{25,26} Briefly, cells were grown in RPMI medium (Invitrogen, Carlsbad, California) containing 20% (CLBL-1) or 10% (CL-1 and 17-71) heat-inactivated foetal bovine serum (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin/fungizone (Invitrogen) at 37 C in humidified 5% CO₂/95% air.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donor dogs using Histopaque 1077 (10771; MilliporeSigma, Oakville, Ontario, Canada) according to manufacturer's recommendations. Briefly, whole blood was collected in heparinized tubes and layered on an equal volume of Histopaque-1077. Samples were centrifuged at 400g for 30 minutes allowing the retrieval of the mononuclear cell layer. PBMCs were cultured under the same conditions as the CL-1 and 17-71 cells (see above). All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université de Montréal and were in agreement with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) policy on humane care and use of laboratory animals.

Dose-response experiment

Using 24-well plates, 5×10^4 CLBL-1, 17-71 and CL-1 cells (or 2.5×10^5 PBMCs) were seeded and treated with vehicle (DMSO) or increasing concentrations of CB-5083 for 48 hours (n = 3 wells/ treatment). The number of viable cells per well was counted 3 times using the trypan blue exclusion assay and a haemocytometer.²⁷ The number of viable cells in the treated groups was normalized to the number of viable cells in the control group (vehicle), and the data plotted as percentage reduction in viable cell numbers. The generation of dose-response curves and IC₅₀ values were carried out using the Compusyn Software 1.0 (2005, Combosyn Inc, Paramus, New Jersey).

Time-course analyses

Using a 6-well plate, 2×10^6 CLBL-1 cells were seeded per well and treated for 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours with vehicle (DMSO) or 1 μ M CB-5083 (n = 3 per time point). Cells were then either collected for protein, mRNA extraction or apoptosis analyses (see below).

Apoptosis assays

The Caspase-Glo 3/7 assay and Caspase-Glo 8 assay kits (# G8090 and #G8200; Promega, Madison, Wisconsin) were used following manufacturer's instructions for cells in suspension. Briefly, in a 96-well plate, a 1:1 ratio of Caspase-Glo -3/7 or -8 reagent was added to each cell sample ($\approx 2 \times 10^4$ cells) and incubated at room temperature for 1 hour prior to quantification using a plate-reading luminometer (SpectraMax i3, Molecular Devices, Sunnyvale, California).

Immunoblot analyses

Treated cells were collected, centrifuged at 1200g for 10 minutes and washed twice with PBS. Protein extraction was performed following the incubation of cells in M-PER mammalian protein extraction reagent (#78501; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) mixed with Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (#78430; Thermo Scientific). Proteins were quantified using the Bradford method (#500-0006; Bio-Rad Protein Assay, Bio-rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) and stored at -80 C. Protein samples (15 μ g per well) were resolved on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-PSQ PVDF transfer membranes. The blots were probed at 4 C overnight with antibodies against γ H2AX (# ab26350; Abcam, Toronto, Ontario, Canada, 1/1000), Lys48 ubiquitin (# 05-1307, Millipore, Etobicoke, Ontario, Canada, 1/2000) SQSTM1 (# ab56416; Abcam, 1/1000), DDIT3 (# ab11419; Abcam, 1/100) MAP1LC3A (# 4599, Cell signaling, Denver, Massachusetts, 1/1000), eIF2A (# ab55924, Abcam, 1/1000), EIF2S1 (phospho S51) (# ab32157, Abcam, 1/1000), or ACTB (# sc-8432, Santa Cruz, Mississauga, Ontario, Canada, 1/50000). ACTB was used as the loading control. Following incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit or anti-mouse antibody, the protein bands were

visualized by chemiluminescence using the Immobilon Western HRP substrate (# WBKLS0500, Millipore). Signal was visualized with the Bio-Rad ChemiDoc MP imaging system and quantified using Image Lab 5.0 software (Bio-Rad Laboratories).

Real-time PCR

Treated cells were collected, centrifuged 10 minutes at 8000g, washed with PBS and frozen at -80°C in 350 μL RLT buffer (manufacturer provided buffer) and 3.5 μL β -mercaptoethanol as per manufacturer recommendation. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (# 74106, Qiagen, Venlo, Netherlands). RNA quantification was performed using a ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Scientific). RNA was reverse-transcribed using the SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit (# 11754, Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

Real-time PCR reactions were run using a C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad Laboratories) and Universal SsoAdvanced SYBR Green Supermix (# 172-5274, Bio-Rad Laboratories). Primer efficiency curves were generated using serial dilutions of cDNA, and amplification efficiency (E) values were obtained using the slope of the log-linear phase derived from the formula $E = e^{(1/\text{slope})}$. Only primers with efficiency values between 1.8 and 2.2 were used. The thermal cycling program to amplify transcripts typically consisted of 3 minutes at 95°C , followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C , 30 seconds at 60°C and 30 seconds at 72°C . To quantify relative gene expression, the cycle threshold (Ct) values for each transcript were compared with that of RPL19, according to the ratio ($R = [E^{\text{Ct RPL19}} / E^{\text{Ct target}}]$). RPL19 was determined to be a good internal control and Ct values showed minimal variation across conditions consistent with previous publications.^{19,28,29} MIQE guidelines were followed throughout. Primer sequences were: RPL19 sense 5^{\prime} -AAACGGGTGTCGCCTCCTGTGACCT- 3^{\prime} ; antisense 5^{\prime} -TTTTTGTGAGACCGGGCGGCCTT- 3^{\prime} ; DDIT3 sense 5^{\prime} -TCACGGGGCTTCCTTTTCC- 3^{\prime} ; antisense 5^{\prime} -GACCTTG TTCCTCCTTCTTAGTTT- 3^{\prime} ; ATF4 sense 5^{\prime} -GAACAGCGACCTCTTG GGTA- 3^{\prime} ; antisense 5^{\prime} -TGTTGCCTTTCCTCCTACGG- 3^{\prime} .

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Prism, GraphPad software inc, La Jolla, CA). Caspase 3/7 activation was analysed using 2-way analysis of variance (ANOVA) with Sidak's post-hoc adjustment for multiple comparisons. Lys48 ubiquitin, SQSTM1 and γ H2AX expression were analysed by 1-way ANOVA with Tukey's post-hoc adjustment for multiple comparisons. All other data were analysed using a 1-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test. Differences were considered significant when $P < .05$.

RESULTS

The VCP inhibitor CB-5083 has anticancer activity against canine lymphoma

To determine the sensitivity of canine lymphoma and normal canine cells to the VCP inhibitor CB-5083, CLBL-1, CL-1 and 17-71 cell lines and freshly isolated PBMCs were cultured in presence of graded concentrations of CB-5083, and viable cells were counted after 48 hours (Table S1, Supporting Information). All canine lymphoma cell lines were highly sensitive to CB-5083, with IC50 values in the nanomolar range (Figure 1). PBMCs were more resistant, with an IC50 value \approx 8 times greater than the most sensitive cell lines (CLBL-1 and 17-71).

To assess if cell death was due to apoptosis, CLBL-1, CL-1 and 17-71 cell lines were treated with CB-5083 (1 μ M) for up to 24 hours and the activation of the caspase cascade measured using the Caspase Glo 3/7 assay. Apoptosis was significantly induced as early as 6 hours post-treatment in CL-1 and CLBL-1 cells, and by 12 hours in 17-71 cells (Figure 2).

CB-5083 results in activation of the UPR and unresolvable ER stress

To determine the molecular mechanism through which CB-5083 exerted cytotoxicity in canine lymphoma cells, CLBL-1 cells were treated with CB-5083 over a time course. Immunoblotting was then done to assess levels of Lys48 polyubiquitinated proteins, as well as markers of autophagy (SQSTM1, MAP1LC3A) and DNA damage (γ H2AX, a marker of double-stranded DNA breaks). Results were consistent with a disruption of the UPS,

characterized by a pronounced and sustained increase in Lys-K48 polyubiquitinated proteins early following drug exposure. Furthermore, a decrease in SQTM1 in the absence of accumulation of MAP1LC3B was also noted early following CB-5083 exposure, suggesting possible activation of autophagy (Figure 3). Although an induction of γ H2AX was observed, suggesting the occurrence of DNA damage, it occurred late relative to the induction of apoptosis.

To determine if the observed accumulation of polyubiquitinated proteins resulted in ER stress, the activation of UPR, and ultimately cell death, CLB1-1 cells were treated with CB-5083 over time. The UPR can be activated via 3 pathways: IRE1, ATF6 and PERK. Of the 3, the PERK pathway is essential to DDIT3 upregulation, which leads to apoptosis in the presence of chronic ER stress (Figure 4).^{30,31} To assess activation of the PERK pathway, eIF2 α and phospho-eIF2 α levels were measured by immunoblotting, and the expression of the phospho-eIF2 α downstream effectors ATF4 and DDIT3 was evaluated by RT-qPCR. Finally, caspase-8 activation was assessed using the Caspase Glo-8 assay (Figure 5). Consistent with activation of the PERK pathway, a rapid induction of phosphorylation of eIF2 α and a significant increase in both ATF4 and DDIT3 mRNA levels occurred by 4 hours post-exposure to CB-5083. Caspase-8 activation was also significantly increased compared with controls by 4 hours post-treatment.

DISCUSSION

Targeting of protein homeostasis has become a clinically proven anti-cancer strategy since the introduction of proteasome inhibitors as a treatment for multiple myeloma.³² Although their development provided the rationale for targeting of the UPS, the clinical use of proteasome inhibitors resulted in the development of high rates of resistance³³ and they were found to be ineffective in solid tumours,³² illustrating the need for novel targets in the regulatory components of the UPS pathway. Since the clinical introduction of proteasome inhibitors, several in vitro studies have documented the efficacy of targeting VCP in order to induce cancer cell death in various haematologic and solid cancers including canine lymphoma,^{19,24,34} providing important proof-of-principle for VCP targeting. However, until the development of CB-5083, few^{22,35} if any VCP inhibitors had the right pharmacological properties to be used in vivo.²⁴ In this study, CB-5083 was used to treat 2 B-cell (17-71, CL-BL-1) and 1 T-cell (CL-1) canine lymphoma cell lines. Our results suggest a potent and differential cytotoxic effect of CB-5083 attributable to irreversible cellular stress caused by protein accumulation. We propose that CB-5083 therefore represents a novel anticancer approach for canine lymphoma.

Consistent with a previous publication on targeting VCP,¹⁹ treatment of canine lymphoma cells with CB-5083 resulted in preferential cytotoxicity vs PBMCs, with an IC₅₀ in the nanomolar range. Cells subjected to CB-5083 rapidly accumulated polyubiquitinated proteins as a response to the inhibition of the UPS. This is also in accordance with previous reports on VCP targeting in canine lymphoma and in various human malignancies in vitro.^{19,24} As previously stated, VCP also plays a role in autophagy, and inhibitors of VCP functions are expected to result in the inhibition of autophagy. However, in the present study, an activation of the autophagy pathway was obtained when canine lymphoma cells were subjected to CB-5083. This does not seem to be a cell-type-dependent effect, as it has been observed in other cell types. Recent work using CB-5083 also showed a clearance of SQSTM1 that was abrogated by the concomitant use of bafilomycin A1, an autophagy inhibitor.²⁴ One

possibility is that the strong ER stress response that is induced by CB-5083 is indirectly responsible for the activation of autophagy, as a similar effect has been observed in normal cells exposed to ER stress.³⁶

Previous *in vitro* work in canine lymphoma using Eeyarestatin 1 to inhibit VCP suggested a mechanism of action involving the accumulation of DNA damage caused by a disruption of chromatin-associated protein degradation, leading to the accumulation of nuclear polyubiquitinated proteins.¹⁹ Using CB-5083 in the present study and under similar conditions, an increase in γ H2AX was also observed. However, the increase occurred after the induction of apoptosis, and could therefore be easily explained by apoptosis itself. Indeed, previous publications have documented an increase in γ H2AX concurrent with the early DNA changes following the onset of apoptosis.³⁷ It therefore seems unlikely that DNA damage played an early, direct causal role in the induction of canine lymphoma cell death by CB-5083.

Whereas previous work in canine lymphoma cells failed to detect ER stress at cytotoxic concentrations of Eeyarestatin 1,¹⁹ CB-5083 caused a rapid and sustained induction of ER stress marker DDIT3. Our data therefore suggest that canine lymphoma cells exposed to CB-5083 rapidly activate the UPR. The role of the UPR is to restore cellular protein homeostasis and promote cell survival. However, when ER stress is prolonged or unresolvable, apoptosis is activated.³⁸ In this study, canine lymphoma cells exposed to CB-5083 did not recover following UPR activation, and underwent apoptosis initiated by caspase-8 activation. Caspase-8 is known to be an important mediator of ER stress-mediated apoptosis.^{31,39} Our findings are consistent with previous studies that used CB-5083 in many human cancer cell lines and xenograft models, which also reported a mechanism of CB-5083 action involving the induction of unresolvable proteotoxic stress.^{24,40} Why the mechanisms of action of Eeyarestatin 1 and CB-5083 differ is likely multifactorial. One likely explanation is that these compounds have different specificities for the D1 and D2 ATPase domains of VCP.^{24,41}

The results of this study further validate VCP as a target for therapeutic intervention in

canine lymphoma. CB-5083 represents an attractive new drug for the treatment of this malignancy. Its novel mechanism of action offers interesting opportunities, such as combination therapy and treatment in the context of resistance to conventional chemotherapeutic agents. Furthermore, the similarities between the elucidated mechanism of action of CB-5083 in canine lymphoma and human malignancies validate the use of canine lymphoma as a model for continued work on VCP-targeted therapies. Further studies are needed to test the in vivo efficacy of CB-5083 and to determine markers of target inhibition and tumour response.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author thanks Dr Steven Sutter (North Carolina State University) for generously providing the 17-71 and CL-1 cell lines and Dr Barbara Rütgen (Central Laboratory, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna) for the CLBL-1 cell line. Cleave Bio-sciences (Burlingame, California) also generously provided CB-5083. Meggie Girard for her technical assistance.

REFERENCES

1. Vail DMPM, Young KM. Canine lymphoma and leukemias. In:Withrow SJ, Vail DM, Page RL, eds. Withrow and MacEwan's Small Animal Clinical Oncology. 5th ed. St. Louis, MI: Elsevier-Sauders; 2012:608-638.
2. Johnston PB, Yuan R, Cavalli F, Witzig TE. Targeted therapy in lymphoma. *J Hematol Oncol.* 2010;3:45.
3. Sharma SV, Settleman J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.* 2007;21:3214-3231.
4. Younes A. Beyond chemotherapy: new agents for targeted treatment of lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8:85-96.
5. Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell.* 2007;130:986-988.
6. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 2009;136:823-837.
7. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339: 1546-1558.
8. Williams BR, Amon A. Aneuploidy: cancer's fatal flaw? *Cancer Res.* 2009;69:5289-5291.
9. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science.* 2008;319:916-919.
10. Kharabi Masouleh B, Geng H, Hurtz C, et al. Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:E2219-E2228.
11. Mozos A, Roué G, López-Guillermo A, et al. The expression of the endoplasmic reticulum stress sensor BiP/GRP78 predicts response to chemotherapy and determines the efficacy of proteasome inhibitors in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2011;179:2601-2610.
12. Zhu H, Xia L, Zhang Y, et al. Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancer cells through transactivation of SIRT1 expression. *PLoS One.* 2012;7:e31431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031431>.

13. Fessart D, Marza E, Taouji S, Delom F, Chevet E. P97/CDC-48: proteostasis control in tumor cell biology. *Cancer Lett.* 2013;337:26-34.
14. Zhu WW, Kang L, Gao YP, et al. Expression level of valosin containing protein is associated with prognosis of primary orbital MALT lymphoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:6439-6443.
15. Tsujimoto Y, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3007-3012.
16. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2004;11: 697-704.
17. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2004;11:165-172.
18. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Expression level of valosin-containing protein (VCP) as a prognostic marker for gingival squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2004;15:1432-1438.
19. Nadeau ME, Rico C, Tsoi M, et al. Pharmacological targeting of valosin containing protein (VCP) induces DNA damage and selectively kills canine lymphoma cells. *BMC Cancer.* 2015;15:479. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1489-1>.
20. Wang Q, Mora-Jensen H, Weniger MA, et al. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106: 2200-2205.
21. Long XH, Zhang ZH, Liu ZL, Huang SH, Luo QF. Inhibiting valosin-containing protein suppresses osteosarcoma cell metastasis via AKT/nuclear factor of kappa B signaling pathway in vitro. *Indian J Pathol Microbiol.* 2013;56:190-195.
22. Magnaghi P, D'Alessio R, Valsasina B, et al. Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat Chem Biol.* 2013;9:548-556.
23. Zhou HJ, Wang J, Yao B, et al. Discovery of a first-in-class, potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083). *J Med Chem.* 2015;58:9480-9497.

24. Anderson DJ, Le Moigne R, Djakovic S, et al. Targeting the AAA ATPase p97 as an approach to treat cancer through disruption of protein homeostasis. *Cancer Cell*. 2015;28:653-665.
25. Seiser EL, Thomas R, Richards KL, et al. Reading between the lines: molecular characterization of five widely used canine lymphoid tumour cell lines. *Vet Comp Oncol*. 2013;11:30-50.
26. Rutgen BC, Hammer SE, Gerner W, et al. Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leuk Res*. 2010;34:932-938.
27. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001; 21: A.3B.1-A.3B.2. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>.
28. Pessina P, Castillo V, Araujo M, Carriquiry M, Meikel A. Expression of thyroid-specific transcription factors in thyroid carcinoma, contralateral thyroid lobe and healthy thyroid gland in dogs. *Res Vet Sci*. 2012; 93:108-113.
29. Guillemette S, Rico C, Godin P, Boerboom D, Paquet M. In vitro validation of the hippo pathway as a pharmacological target for canine mammary gland tumors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2017; 22: 203-214. <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9384-9>.
30. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011;13:184-190.
31. Lu M, Lawrence DA, Marsters S, et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*. 2014;345:98-101.
32. Manasanch EE, Orłowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:417-433. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.206>.
33. Ruschak AM, Slassi M, Kay LE, Schimmer AD. Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:1007-1017.
34. Valle CW, Min T, Bodas M, et al. Critical role of VCP/p97 in the pathogenesis and progression of non-small cell lung carcinoma. *PLoS One*. 2011;6:e29073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029073>.
35. Chou TF, Brown SJ, Minond D, et al. Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:4834-4839.

36. Rashid H-O, Yadav RK, Kim H-R, Chae H-J. ER stress: autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*. 2015;11:1956-1977.
37. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*. 2000;275:9390-9395.
38. Tsai YC. The unfolded protein response, degradation from endoplasmic reticulum and cancer. *Genes Cancer*. 2010;1:764-778.
39. Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y, et al. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res*. 2003;283:156-166.
40. Le Moigne R, Wong S, Soriano S, et al. CB-5083 is a novel first in class p97 inhibitor that disrupts cellular protein homeostasis and demonstrates anti-tumor activity in solid and hematological models. *Proceedings of 105th American Association for Cancer Research Annual Meeting*. AACR, Philadelphia, PA 2014;951.
41. Wang Q, Shinkre BA, Lee JG, et al. The ERAD inhibitor Eeyarestatin I is a bifunctional compound with a membrane-binding domain and a p97/VCP inhibitory group. *PLoS One*. 2010;5:e15479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015479>.

FIGURE CAPTION

FIGURE 1. CB-5083 is cytotoxic to canine lymphoma cells. Peripheral blood mononuclear cell's (PBMC's), CLBL-1, 17-71 and CL- 1 were treated for 48 hours with doubling drug concentrations. Cell viability was assessed using trypan blue exclusion (n = 3 wells/ concentration), and the data plotted as percentage reduction in viable cell numbers relative to (untreated) control. IC50 values were calculated using Compusyn 1.0 (2005, Combosyn Inc.). Fa = Fraction of affected cells. The experiment was repeated 3 times and representative results are shown.

FIGURE 2. CB-5083 induces apoptosis in canine lymphoma. Caspase 3/7 activity measured by fluorescence. Data are presented as means (columns) ` SEM (error bars). Asterisks indicate statistically significant (*P < .05, ****P < .0001) difference from vehicle (n = 3 replicates/ treatment). The experiment was repeated 3 times and representative results are shown

FIGURE 3. CB-5083 induces accumulation of Lys48 polyubiquitinated proteins. CLBL-1 cells were treated with 1 μ M CB-5083 for the indicated times. A, Immunoblotting analysis was done for Lys48 ubiquitin, MAP1LC3A, SQSTM1 and γ H2AX. Single bands were observed at the predicted molecular weight for MAP1LC3A (16 KDa), SQSTM1 (75 KDa) and γ H2AX (16 KDa) and a high molecular weight (>75 KDa) smear was observed for Lys48 ubiquitin. Representative blots are shown; each lane represents a single sample. B, Positive control for autophagy disruption. CLBL-1 cells were treated with 50 μ M chloroquine. Immunoblotting analysis was done for MAP1LC3A. Single bands were detected at predicted molecular weights for MAP1LC3A (16 KDa) and MAP1LC3B (14 KDa). C, Quantitative analyses using n = 3 replicates/condition and normalized to ACTB as loading control. Data are presented as means (columns) ` SEM (error bars). Asterisks indicate statistically significant (*P < .05, **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001) difference from vehicle (n = 3 replicates/treatment). All experiments were repeated 3 times and representative results are shown.

FIGURE 4. PERK pathway. Upon homodimerization of PERK, eIF2 α is phosphorylated, which result in increased transcription factor ATF4 mRNA levels. The increase in ATF4

results in increased expression of its target gene DDIT3. While the ultimate goal of the unfolded protein response is to restore protein homeostasis, when ER stress cannot be resolved apoptosis will be triggered through the activation of caspase-8³⁰

FIGURE 5. CB-5084 induces ER stress in canine lymphoma cells and activates the unfolded protein response. CLBL-1 cells were treated with 1 μ M CB-5083 for the indicated times. A, Immunoblotting analysis was done for total eIF2 α and phospho-eIF2 α . Bands were observed at predicted molecular weights for eIF2 α (65 KDa) and phospho-eIF2 α (36 KDa). For the quantitative analyses, n = 4 replicates/condition normalized to ACTB were used to generate the phospho-eIF2 α :total eIF2 α ratio. B, DDIT3 and C, ATF4 mRNA levels were analysed by RT-qPCR, n = 3 replicates/time point. D, Caspase-8 activity was measured by fluorescence, n = 3 replicates/time point. Data are presented as means (columns) \pm SEM (error bars). Asterisks indicate statistically significant (*P < .05, **P < .01, ***P < .001, ****P < .0001) difference from vehicle. All experiments were repeated 3 times and representative results are shown.

FIGURE 1. CB-5083 is cytotoxic to canine lymphoma cells.

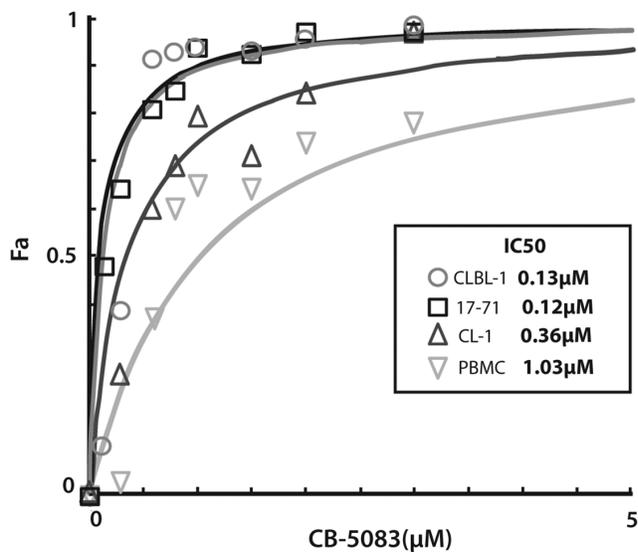


FIGURE 2. CB-5083 induces apoptosis in canine lymphoma.

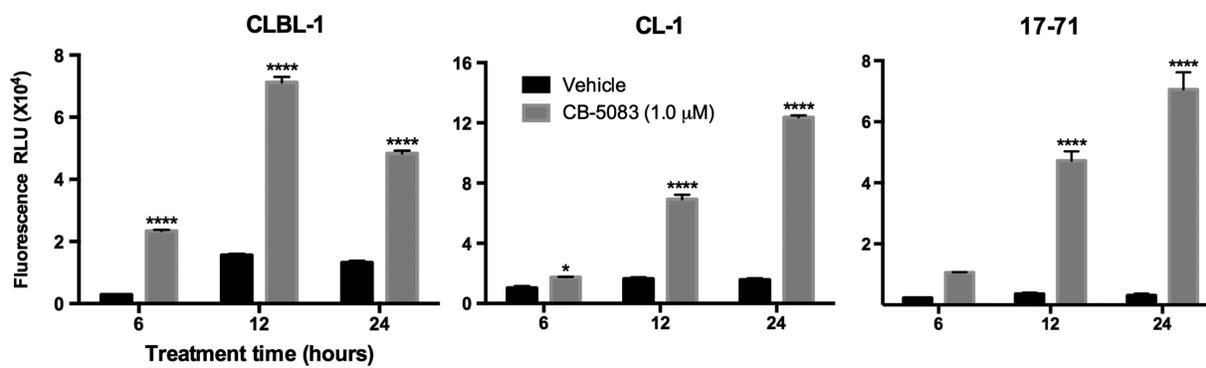


FIGURE 3. CB-5083 induces accumulation of Lys48 polyubiquitinated proteins.

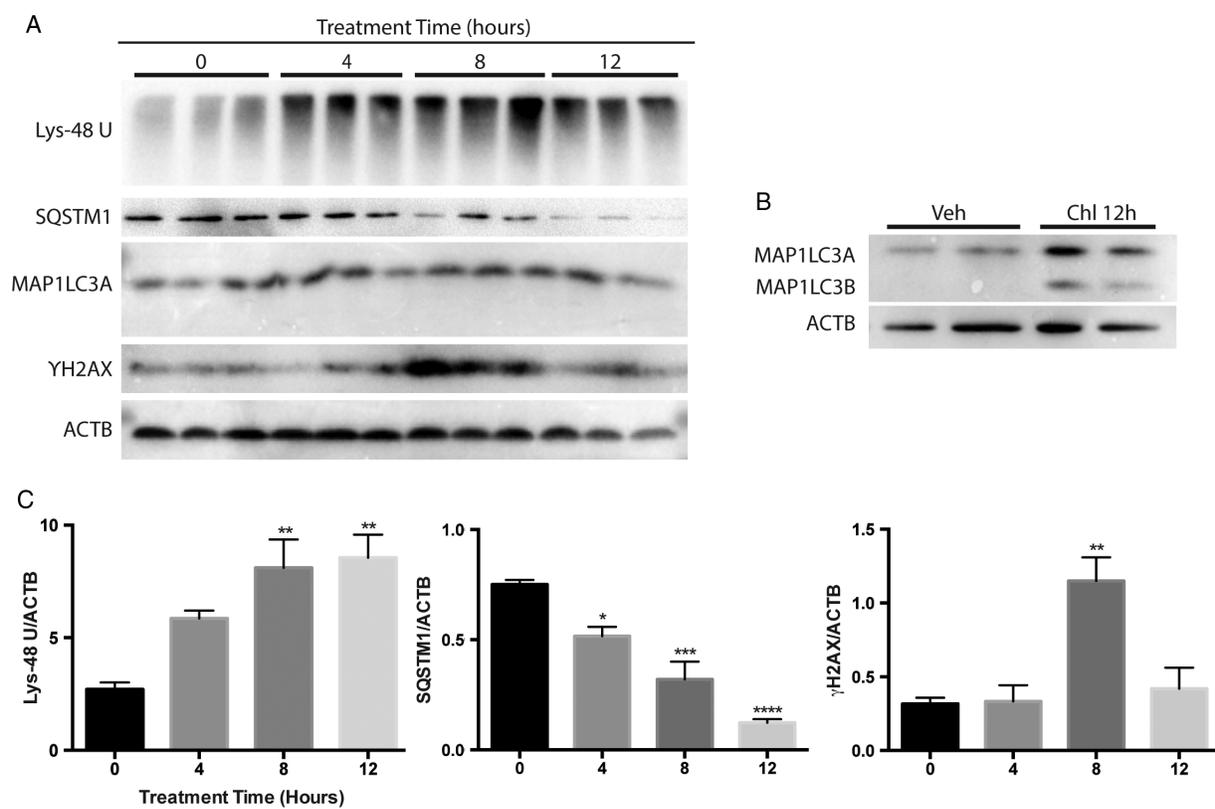


FIGURE 4. PERK pathway.

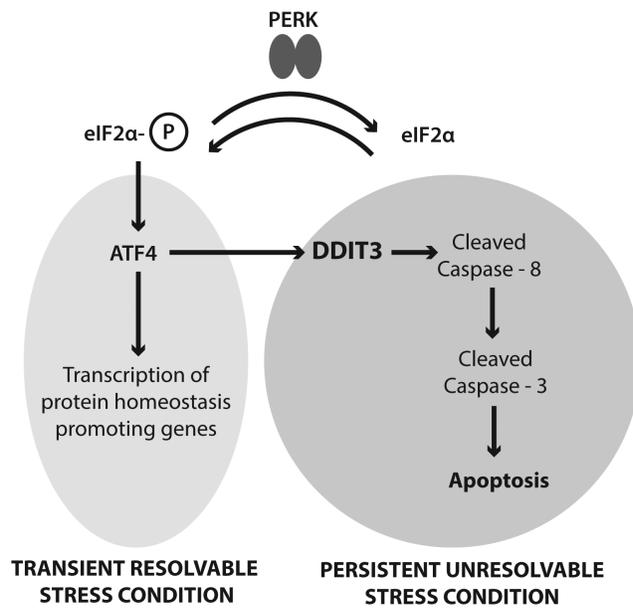
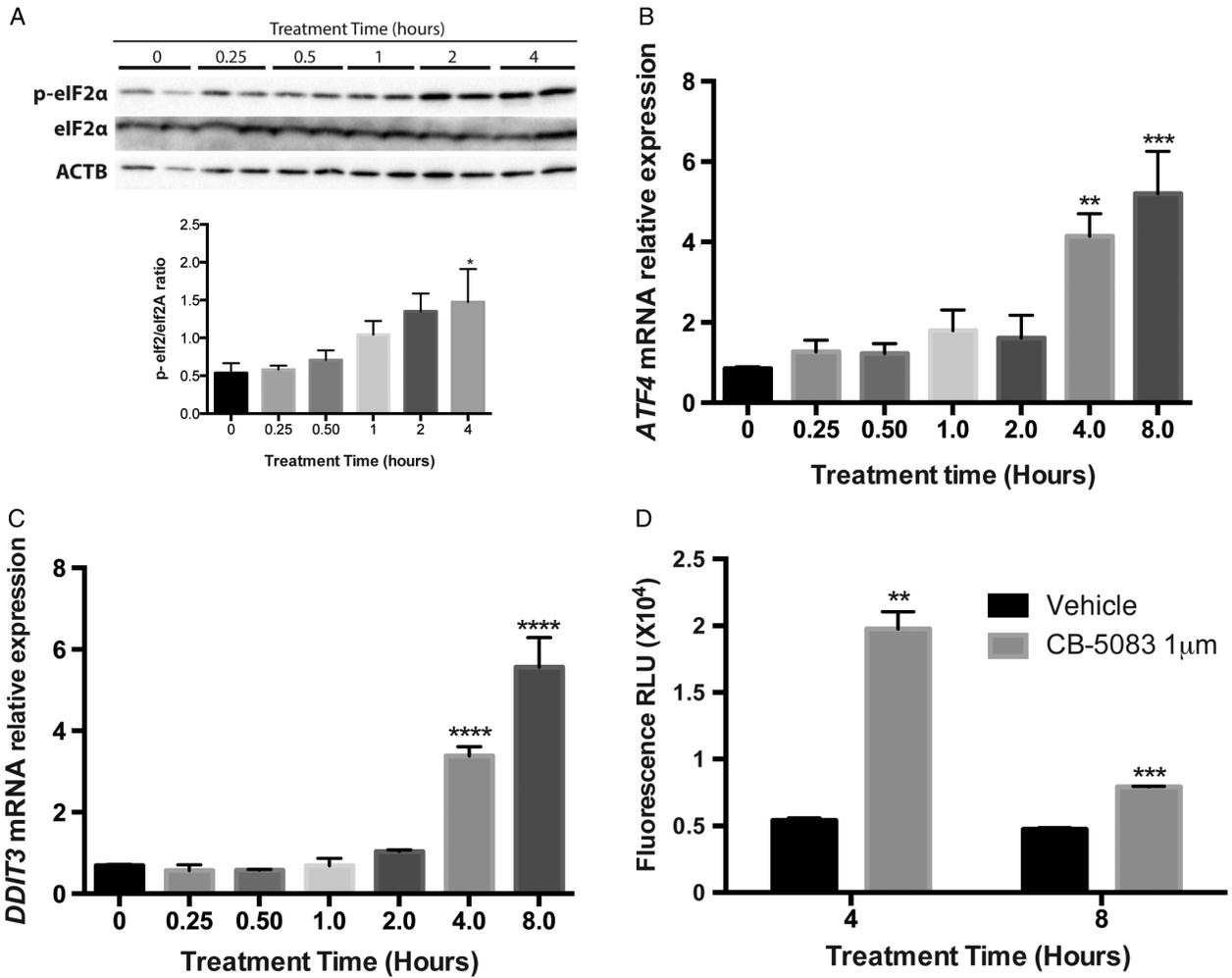


FIGURE 5. CB-5084 induces ER stress in canine lymphoma cells and activates the unfolded protein response.



Discussion générale

La protéine contenant de la valosine (VCP) est un médiateur critique de l'homéostasie des protéines. La surexpression de VCP se produit dans de nombreux cancers, et souvent d'une manière corrélant avec la malignité (238-242, 244, 245, 284). Il a été démontré que les lymphocytes B tumoraux de haut grade canins contiennent une surexpression de l'ATPase VCP en comparaison aux nœuds lymphatiques canins normaux (22). L'expression amplifiée de VCP dans ces cellules tumorales en fait une protéine clé essentielle pour compenser pour les activités métaboliques et prolifératives plus élevées de ces cellules (246-251, 253).

Notre étude met en lumière le CB-5083, un inhibiteur puissant et sélectif de VCP, comme cible thérapeutique pour le lymphome canin. Le CB-5083 induit une mort préférentielle des cellules de lymphomes canins exposées à des doses de l'ordre du nanomolaire comparativement aux cellules normales (PMBCs) (22). Ces résultats illustrent la sensibilité accrue des lignées de cellules tumorales à un inhibiteur de VCP par rapport à leurs homologues normaux. Ainsi, les cellules tumorales possèderaient une dépendance accrue aux fonctions cellulaires de VCP pour leur survie. Des résultats similaires furent aussi observés lors du traitement des mêmes lignées cellulaires avec Eey-1, un inhibiteur de VCP possédant toutefois un mécanisme d'action différent (22). Ceci est de plus supporté par Magnaghi *et al.* qui démontrent aussi la mort de cellules cancéreuses par différents inhibiteurs de VCP avec des mécanismes d'action variables (274).

Notre étude démontre que les lignées cellulaires de lymphome canin traitées au CB-5083 meurent par apoptose, tel qu'illustré par une augmentation convaincante des caspases 3,7 et 8. L'augmentation des caspases a également été observée auprès de diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines traitées avec le CB-5083 et des inhibiteurs de VCP structurellement différents (119, 271, 274, 277, 285, 286). Puisque VCP régule l'activité des facteurs intrinsèques et extrinsèques dans la cascade signalétique, son inhibition induit rapidement l'activation des caspases culminant ainsi à l'activation de caspases exécutrices et ultimement l'apoptose (271).

Afin d'investiguer les mécanismes cellulaires qui régissent la mort des cellules de lymphomes canins traitées au CB-5083, les fonctions cellulaires de VCP au sein de la

dégradation protéique associée à la chromatine et au RE ont été étudiés. D'abord, l'expression croissante de γ H2AX, un marqueur pour les cassures d'ADN double brin (287), reflète une perturbation de la dégradation protéique associée à la chromatine dans les lymphocytes tumoraux 8 heures suivant le traitement au CB-5083. Ce mécanisme de mort cellulaire corrèle avec l'étude de Nadeau *et al.* qui démontre des résultats similaires lorsque ces mêmes cellules sont traitées avec Eey-1 (22). Cependant, en raison de l'apoptose des cellules de lymphomes canins survenant plus tôt tel qu'illustré par l'augmentation des caspases 6 heures suivant le traitement au CB-5083, un mécanisme de mort cellulaire différent a été investigué. Pour cette raison, l'expression du marqueur CHOP a été utilisé pour valider l'effet de l'inhibition de VCP sur la dégradation protéique associée au RE puisqu'il est établi qu'une surexpression de CHOP survient lors de l'apoptose induite par le stress du RE (288, 289). Étant donné que les anticorps commerciaux manquent de spécificité vis-à-vis CHOP (290), l'expression relative de l'ARNm de CHOP a été étudiée. Nos résultats démontrent que parallèlement à une accumulation de protéines polyubiquitinées, il y a une surexpression de l'ARNm de CHOP à 4 heures suivant le traitement au CB-5083, ce qui est plus hâtif que l'expression de γ H2AX. Ces résultats suggèrent qu'il y a une induction rapide d'un stress protéotoxique et que celui-ci survient plus tôt que les dommages à l'ADN double brin. La présence d'un stress prolongé du RE ou d'un stress non résolu du RE peut augmenter ou prolonger l'expression de CHOP et contribuer à l'apoptose initiée par les caspases (291, 292). Dès lors, dans le cadre d'un stress protéotoxique induit par l'inhibition de VCP, il y a une augmentation de la traduction et de la transcription de l'ARNm de CHOP, permettant d'initier la cascade apoptotique.

Le stress du RE active une série de mécanismes adaptatifs connus sous le nom du UPR. Le facteur de transcription CHOP est un marqueur bien établi du UPR et est régulé sous la voie PERK-eIF2 α -ATF4 de celui-ci (293, 294). Nos résultats démontrent qu'il y a une augmentation de la phosphorylation de eIF2a suivi par une augmentation de l'expression d'ATF4 et subséquemment une augmentation de l'expression de CHOP. Il y a donc une accumulation de protéines polyubiquitinées et la phosphorylation subséquente de PERK suivant le traitement des lymphocytes tumoraux au CB-5083. Ces résultats concordent avec ce qui a déjà été rapporté dans la littérature dans d'autres lignées cellulaires tumorales traitées au CB-5083 (277). Les mécanismes d'adaptation au stress du RE initient la phosphorylation de

PERK lors d'un stress du RE résultant en une phosphorylation de eIF2 α et une diminution de la traduction protéique pour favoriser la survie cellulaire (295). L'inhibition de VCP génère un stress prolongé ce qui active les gènes pro-apoptotiques qui contribuent à la mort cellulaire. Dès lors, bien que la phosphorylation transitoire de eIF2 α soit une réponse d'adaptation critique au stress du RE, une phosphorylation soutenue d'eIF2 α induit l'expression de CHOP par le biais de la voie PERK et ultimement l'apoptose (295).

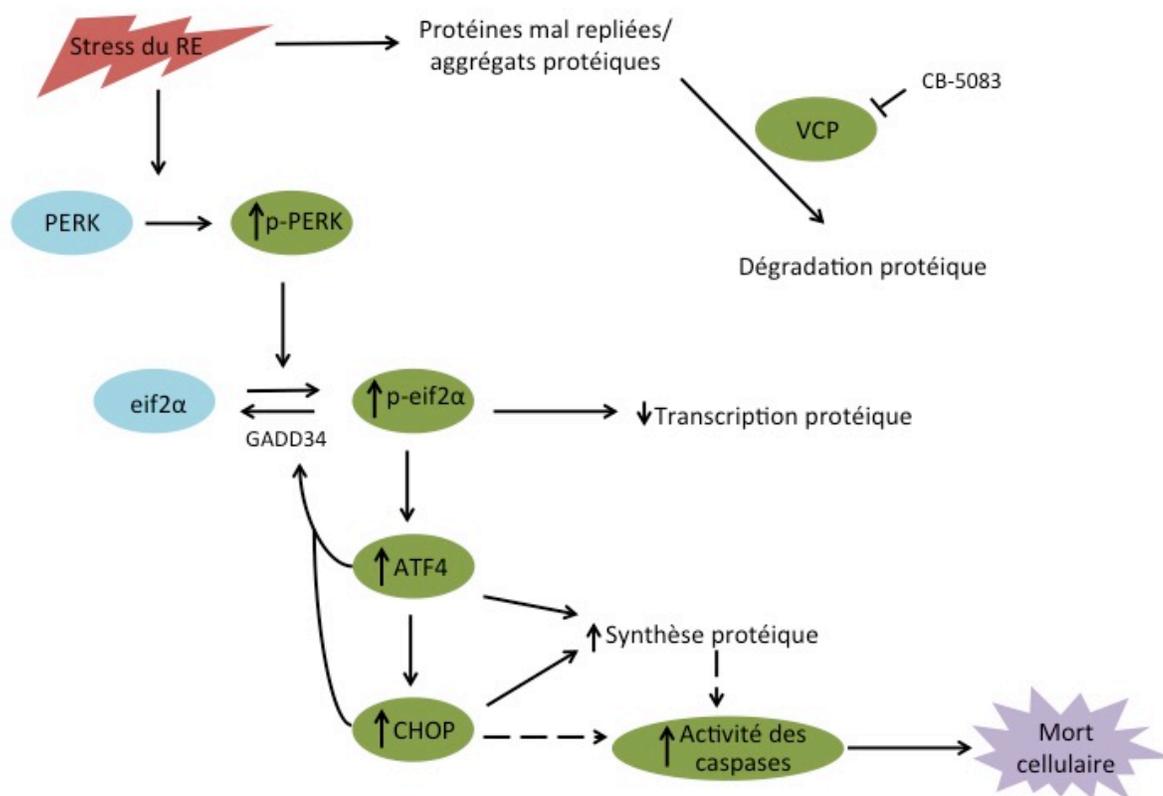


Figure 5. CHOP est un marqueur bien établi du UPR et est régulé sous la voie PERK-eIF2 α -ATF4. VCP facilite l'élimination des protéines dépliées. Lorsque VCP est inhibée par le CB-5083, une accumulation accrue de protéines dépliées induit un stress du RE et active la voie PERK. PERK phosphoryle eIF2 α et atténue la traduction protéique, réduisant ainsi la charge protéique pour restaurer l'homéostasie protéique. Le stress du RE active également l'induction séquentielle des facteurs de transcription ATF4 et CHOP. La présence d'un stress du RE prolongé ou d'un stress du RE non résolu peut augmenter ou prolonger l'expression de CHOP et contribuer à l'apoptose initiée par les caspases. Schéma adapté de Bastola *et al.*, Molecular Oncology, 2016.

Nos résultats supportent que l'inhibition de VCP génère un stress protéotoxique irréversible et induit la mort des lymphocytes tumoraux. Cette trouvaille est contraire à ce qui était attendu puisque la mort de lymphocytes tumoraux canins traitées avec l'inhibiteur de VCP, Eey-1, induit la mort cellulaire par un mécanisme de dommages à l'ADN double brin (22). Nos résultats seraient donc concordants avec Anderson *et al.* qui démontrent que le CB-5083 induit la mort de cellules tumorales via les voies apoptotiques CHOP-dépendantes (277). Ce même groupe a également rapporté que la perte de fonction de CHOP était suffisante pour diminuer la mort cellulaire induite par le CB-5083 dans d'autres lignées cellulaires tumorales humaines (277). Une possibilité pouvant expliquer les différents mécanismes de mort cellulaire entre le CB-5083 et Eey-1 est qu'il est connu que les inhibiteurs de VCP inhibent VCP via différents mécanismes par leurs liaisons covalentes et allostériques des domaines D1 et D2. Le site de liaison détermine de quel ordre l'activité enzymatique de VCP sera modifiée (274).

Il a été récemment confirmé que l'apoptose induite par le stress du RE dans les cellules cancéreuses fait suite à l'activation de la caspase-8 qui survient suite à une surexpression de DR5 par CHOP au sein de l'appareil de Golgi (134, 296-300). Nos résultats démontrent qu'il y a une augmentation significative de la caspase-8 au sein des lymphocytes tumoraux canins traités au CB-5083. Malgré que nous n'ayons pu valider la mort cellulaire via l'expression de DR5 dans notre étude, cette dernière est cohérente avec l'étude d'Anderson *et al.* qui démontre que le CB-5083 induit la mort cellulaire par l'expression de CHOP et l'activation du DR5 (213).

Dans les espèces animales non humaines et non rongeurs, le récepteur DR5 de TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) n'est pas bien caractérisé. Il semble y avoir une variation considérable des membres de la famille TNFRSF10 (tumor necrosis factor receptor superfamily) entre les différentes espèces. Bien qu'un orthologue TRAIL ait été identifié dans l'assemblage du génome du chien, il n'a pas été possible de trouver des orthologues pour les membres de la famille TNFRSF10 humains. L'assemblage du génome du chien est basé sur un chien Boxer; il est possible qu'il y ait des orthologues canins de TNFRSF10A-D, mais que cette région ait été supprimée soit dans le Boxer individuel sur

lequel l'assemblage du génome du chien était basé, ou dans la race Boxer ou chez le chien dans son ensemble (250).

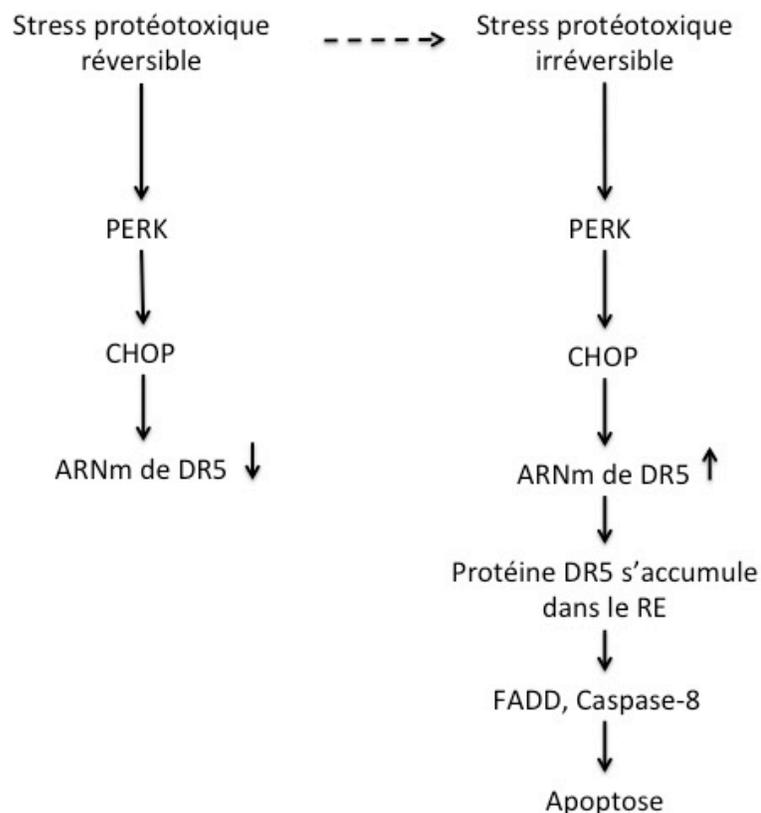


Figure 6. Le stress protéotoxique irréversible. L'accumulation de substrats ERAD dans le RE mène au stress du RE et à l'activation du UPR afin d'assurer la survie cellulaire. Cependant, si le stress est trop sévère ou perdure dans le temps, un stress protéotoxique irréversible et ultimement la mort cellulaire sont induits via l'expression de CHOP et de DR5. Schéma adapté de Lurlaro *et al.*, The Febs Journal, 2015.

Dans un autre ordre d'idées, étant donné que VCP détient un rôle crucial pour l'autophagie, l'étude de la voie de l'autophagie a également été entreprise par la détection de MAP1LC3A et de SQSTM1 par immunoblotting, une méthode fiable pour détecter

l'autophagie (301). Notre étude démontre que l'inhibition de VCP au CB-5083 n'a pas eu d'effet délétère sur les voies de l'autophagie tel que démontre la clairance de SQSTM1. Nos résultats semblent témoigner que l'impact de l'inhibition de la dégradation protéique dépendante de l'ubiquitine a été atténué par une régulation positive de l'autophagie (302, 303). Des travaux récents utilisant CB-5083 ont également montré une clairance de SQSTM1 avec l'utilisation concomitante de la bafilomycine A1, un inhibiteur connu de l'autophagie (277). Une possibilité expliquant l'activation de l'autophagie est que la forte réponse au stress du RE induite par le CB-5083 est indirectement responsable de l'activation de l'autophagie. Un effet similaire a été observé dans les cellules normales exposées au stress du RE (304).

L'effet sélectif de CB-5083 sur certaines fonctions de VCP peut être expliqué en parti par sa spécificité pour le domaine D2 ATPase de VCP ou par le fait que CB-5083 se lie préférentiellement à des cofacteurs spécifiques de VCP. Des études approfondies à l'échelle moléculaire permettraient de mieux définir les affinités et les fonctions précises de CB-5083 sur VCP au sein de cellules de lymphomes canins. Néanmoins, nos résultats indiquent que l'inhibition de la D2-ATPase est suffisante pour provoquer un effet cytotoxique auprès des cellules de lymphome canin. Ensemble, ils appuient un concept émergent selon lequel les voies de stress du réticulum endoplasmique (ER) peuvent être ciblées dans les lymphomes canins.

Notre étude *in vitro* comportent des limitations tels que les modèles *in vitro* ne représentent pas toujours les caractéristiques biopathologiques réelles retrouvées *in vivo* au niveau des tumeurs des êtres vivants. Les lignées cellulaires d'études *in vitro* subissent des changements morphologiques après de nombreux passages qui altèrent l'expression génique des cellules (305-310). Comme elles ont subies des modifications phénotypiques, elles s'éloignent de la réalité physiologique ce qui induit un biais supplémentaire dans les résultats obtenus *in vitro* (249). Toutefois, de tous les inhibiteurs de VCP décrits dans la littérature, CB-5083 est le seul composé qui démontre des propriétés pharmacologiques pour utilisation *in vivo* et module les voies du UPS et du UPR dans des modèles animaux de façon très similaire à ce qui est observé dans les cultures cellulaires (213). Ceci suggère que l'inhibition de VCP

mène aux mêmes phénotypes *in vivo* que *in vitro* et que ces concentrations effectrices de l'ordre du nanomolaire prédit son efficacité clinique (311).

Les directions futures de ce projet incluent l'étude du CB-5083 sur un modèle de xénogreffe de lymphome canin *in vivo* afin de valider ses effets à un niveau macroscopique, cellulaire et moléculaire. Nos résultats *in vitro* permettent de prédire CHOP comme biomarqueur de réponse et comme un déterminant d'efficacité pour recherches futures *in vivo*. Il est important d'établir les déterminants moléculaires de la sensibilité des cellules tumorales au CB-5083 afin de mieux identifier les patients qui pourraient avoir une réponse clinique à des doses bien tolérées.

Conclusion

Étant donné le rôle fondamental de VCP au sein des cellules tumorales, les inhibiteurs de VCP fournissent une avenue intéressante pour le développement de molécules chimiothérapeutiques ciblées au sein de cellules tumorales exprimant davantage les voies du UPR. Nous avons démontré que le stress du RE cause la mort des lymphocytes tumoraux canins et représente donc une nouvelle avenue thérapeutique d'intérêt. La corrélation de l'expression augmentée de gènes associés au UPR parallèlement à une évidence qui soutient une sensibilité des CLBL-1 au CB-5083, supporte un stress protéotoxique irréversible comme mécanisme primaire de cytotoxicité des lymphocytes tumoraux canins traités au CB-5083. Nos résultats appuient donc que les voies de stress du RE et du UPR sont vulnérables et peuvent être ciblées dans les cellules tumorales de lymphomes canins.

Bibliographie

1. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 2009;136(5):823-37.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. Dorn CR, Taylor DO, Hibbard HH. Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am J Vet Res*. 1967;28(125):993-1001.
4. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract*. 2002;43(6):240-6.
5. Edwards DS, Henley WE, Harding EF, Dobson JM, Wood JL. Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet Comp Oncol*. 2003;1(4):200-6.
6. Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med*. 2008;22(4):976-84.
7. Teske E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q*. 1994;16(4):209-19.
8. Hansen K, Khanna C. Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. *Eur J Cancer*. 2004;40(6):858-80.
9. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med*. 2011;17(7):380-8.
10. Hunt KE, Reichard KK. Diffuse large B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(1):118-24.

11. Vail DM PM YK. Canine lymphoma and leukemias. 5 ed. St-Louis, MI: Elsevier-Saunders; 2012.
12. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, International TCLP. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol.* 2008;26(25):4124-30.
13. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(1):12-23.
14. Borchmann P, Eichenauer DA, Engert A. State of the art in the treatment of Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(8):450-9.
15. Johnston PB, Yuan R, Cavalli F, Witzig TE. Targeted therapy in lymphoma. *J Hematol Oncol.* 2010;3:45.
16. Chao MP. Treatment challenges in the management of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma - novel and emerging therapies. *Cancer Manag Res.* 2013;5:251-69.
17. Zhang W, Sidhu SS. Development of inhibitors in the ubiquitination cascade. *FEBS Lett.* 2014;588(2):356-67.
18. Chen D, Dou QP. The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Curr Protein Pept Sci.* 2010;11(6):459-70.
19. Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(17):9946-51.
20. Suh DH, Kim MK, Kim HS, Chung HH, Song YS. Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1271:20-32.
21. Tsai YC, Weissman AM. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer.* 2010;1(7):764-78.

22. Nadeau ME, Rico C, Tsoi M, Vivancos M, Filimon S, Paquet M, et al. Pharmacological targeting of valosin containing protein (VCP) induces DNA damage and selectively kills canine lymphoma cells. *BMC Cancer*. 2015;15:479.
23. Whiteside TL, Rowlands DT, Jr. T-cell and B-cell identification in the diagnosis of lymphoproliferative disease. A review. *Am J Pathol*. 1977;88(3):754-92.
24. Aiuti F, Lacava V, Fiorilli M, Ciarla MV. Lymphocyte surface markers in lymphoproliferative disorders. *Acta Haematol*. 1973;50(5):275-83.
25. Zandvliet M. Canine lymphoma: a review. *Vet Q*. 2016;36(2):76-104.
26. Valli VE, Kass PH, San Myint M, Scott F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol*. 2013;50(5):738-48.
27. Richards KL, Suter SE. Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma? *Immunol Rev*. 2015;263(1):173-91.
28. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
29. Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol*. 2011;48(1):198-211.
30. Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C, et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol*. 2010;47(3):414-33.

31. Frantz AM, Sarver AL, Ito D, Phang TL, Karimpour-Fard A, Scott MC, et al. Molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. *Vet Pathol.* 2013;50(4):693-703.
32. Seelig DM, Avery AC, Ehrhart EJ, Linden MA. The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma. *Vet Sci.* 2016;3(2).
33. Shearin AL, Ostrander EA. Leading the way: canine models of genomics and disease. *Dis Model Mech.* 2010;3(1-2):27-34.
34. Ito D, Frantz AM, Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;159(3-4):192-201.
35. Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, et al. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res.* 2005;65(13):5654-61.
36. Villamil JA, Henry CJ, Hahn AW, Bryan JN, Tyler JW, Caldwell CW. Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *J Cancer Epidemiol.* 2009;2009:591753.
37. Bienzle D, Vernau W. The diagnostic assessment of canine lymphoma: implications for treatment. *Clin Lab Med.* 2011;31(1):21-39.
38. Aresu L. Canine Lymphoma, More Than a Morphological Diagnosis: What We Have Learned about Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Vet Sci.* 2016;3:77.
39. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology.* 2000;36(1):69-86.
40. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1769-92.

41. Chun R GLaVD. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4 ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2007.
42. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(5):579-86.
43. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol.* 1999;17(4):1244.
44. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
45. Cortes JE, Talpaz M, Cabanillas F, Seymour JF, Kurzrock R. Serum levels of interleukin-10 in patients with diffuse large cell lymphoma: lack of correlation with prognosis. *Blood.* 1995;85(9):2516-20.
46. Coiffier B, Brousse N, Peuchmaur M, Berger F, Gisselbrecht C, Bryon PA, et al. Peripheral T-cell lymphomas have a worse prognosis than B-cell lymphomas: a prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with the LNH-84 regimen. The GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes Agressives). *Ann Oncol.* 1990;1(1):45-50.
47. Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, Dumontet C, Renard N, et al. Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J Clin Oncol.* 1997;15(2):499-508.
48. Gisselbrecht C, Gaulard P, Lepage E, Coiffier B, Briere J, Haioun C, et al. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood.* 1998;92(1):76-82.
49. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing

rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010;116(12):2040-5.

50. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3121-7.

51. Maxwell SA, Mousavi-Fard S. Non-Hodgkin's B-cell lymphoma: advances in molecular strategies targeting drug resistance. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238(9):971-90.

52. Zahreddine H.; Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol* 2013;4(28).

53. Zandvliet M, Teske E, Schrickx JA. Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug-resistant canine lymphoma. *Toxicol In Vitro*. 2014;28(8):1498-506.

54. Zandvliet MTE. Mechanisms of Drug Resistance in Veterinary Oncology— A Review with an Emphasis on Canine Lymphoma . *Veterinary Sciences*. 2015;2:150-84.

55. Flory AB, Rassnick KM, Al-Sarraf R, Bailey DB, Balkman CE, Kiselow MA, et al. Combination of CCNU and DTIC chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs. *J Vet Intern Med*. 2008;22(1):164-71.

56. Singh V, Gupta D, Almasan A. Development of Novel Anti-Cd20 Monoclonal Antibodies and Modulation in Cd20 Levels on Cell Surface: Looking to Improve Immunotherapy Response. *J Cancer Sci Ther*. 2015;7(11):347-58.

57. Intlekofer AM, Younes A. Precision therapy for lymphoma--current state and future directions. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(10):585-96.

58. Giacotti FG. Deregulation of cell signaling in cancer. *FEBS Lett.* 2014;588(16):2558-70.
59. Nagel R, Semenova EA, Berns A. Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy. *EMBO Rep.* 2016;17(11):1516-31.
60. Younes A, Berry DA. From drug discovery to biomarker-driven clinical trials in lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(11):643-53.
61. Friedman R. Drug resistance in cancer: molecular evolution and compensatory proliferation. *Oncotarget.* 2016;7(11):11746-55.
62. Beirãoa BR, T.; Jainc, S.; Huppc, T.; Argylea, D.J. Challenges and opportunities for monoclonal antibody therapy in veterinary oncology. *The Veterinary Journal.* 2016;218:40-50.
63. Malinowsky K, Wolff C, Gundisch S, Berg D, Becker K. Targeted therapies in cancer - challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues. *J Cancer.* 2010;2:26-35.
64. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* 2013;501(7467):338-45.
65. Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, et al. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol.* 2010;184(1):512-20.
66. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(5):317-27.
67. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* 2007;357(1):39-51.
68. Flowers CR, Armitage JO. A decade of progress in lymphoma: advances and continuing challenges. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2010;10(6):414-23.

69. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;87(2):146-71.
70. Lapeyre H, Joly P. [Rituximab: mabthera]. *Ann Dermatol Venereol*. 2007;134(12):968-71.
71. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(2):203-16.
72. Alas S, Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res*. 2001;61(13):5137-44.
73. Jazirehi AR, Bonavida B. Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene*. 2005;24(13):2121-43.
74. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2005;65(1):264-76.
75. Vega MI, Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF- κ B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J Immunol*. 2005;175(4):2174-83.
76. Koivula S, Valo E, Raunio A, Hautaniemi S, Leppa S. Rituximab regulates signaling pathways and alters gene expression associated with cell death and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Rep*. 2011;25(4):1183-90.

77. Jazirehi AR, Vega MI, Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* 2007;67(3):1270-81.
78. Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, Goodglick L, Bonavida B. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res.* 2004;64(19):7117-26.
79. Alas S, Bonavida B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):316-26.
80. Stel AJ, Ten Cate B, Jacobs S, Kok JW, Spierings DC, Dondorff M, et al. Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *J Immunol.* 2007;178(4):2287-95.
81. Suzuki E, Umezawa K, Bonavida B. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene.* 2007;26(42):6184-93.
82. Small GW, McLeod HL, Richards KL. Analysis of innate and acquired resistance to anti-CD20 antibodies in malignant and nonmalignant B cells. *PeerJ.* 2013;1:e31.
83. Johnson NA, Leach S, Woolcock B, deLeeuw RJ, Bashashati A, Sehn LH, et al. CD20 mutations involving the rituximab epitope are rare in diffuse large B-cell lymphomas and are not a significant cause of R-CHOP failure. *Haematologica.* 2009;94(3):423-7.
84. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, Nakamura S, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood.* 2009;113(20):4885-93.

85. Sar A, Perizzolo M, Stewart D, Mansoor A, Difrancesco LM, Demetrick DJ. Mutation or polymorphism of the CD20 gene is not associated with the response to R-CHOP in diffuse large B cell lymphoma patients. *Leuk Res.* 2009;33(6):792-7.
86. Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sakurai T, Mishima Y, et al. Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(7):2523-30.
87. Wilson WH. Drug resistance in diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol.* 2006;43(4):230-9.
88. Muris JJ, Meijer CJ, Ossenkoppele GJ, Vos W, Oudejans JJ. Apoptosis resistance and response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol.* 2006;24(3):97-104.
89. Olejniczak SH, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Clements JL, Czuczman MS. Acquired resistance to rituximab is associated with chemotherapy resistance resulting from decreased Bax and Bak expression. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1550-60.
90. Younes A. Beyond chemotherapy: new agents for targeted treatment of lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(2):85-96.
91. Rosenthal A. Small Molecule Inhibitors in Chronic Lymphocytic Lymphoma and B Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017;12(3):207-16.
92. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med.* 2008;22(6):1301-9.
93. Bernabe LF, Portela R, Nguyen S, Kisseberth WC, Pennell M, Yancey MF, et al. Evaluation of the adverse event profile and pharmacodynamics of toceranib phosphate administered to dogs with solid tumors at doses below the maximum tolerated dose. *BMC Vet Res.* 2013;9:190.

94. Pan X, Tsimbas K, Kurzman ID, Vail DM. Safety evaluation of combination CCNU and continuous toceranib phosphate (Palladia((R))) in tumour-bearing dogs: a phase I dose-finding study. *Vet Comp Oncol.* 2016;14(2):202-9.
95. London C, Mathie T, Stingle N, Clifford C, Haney S, Klein MK, et al. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia((R))) in solid tumours. *Vet Comp Oncol.* 2012;10(3):194-205.
96. Holtermann N, Kiupel M, Kessler M, Teske E, Betz D, Hirschberger J. Masitinib monotherapy in canine epitheliotropic lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2016;14 Suppl 1:127-35.
97. Zandvliet M, Teske E, Chapuis T, Fink-Gremmels J, Schrickx JA. Masitinib reverses doxorubicin resistance in canine lymphoid cells by inhibiting the function of P-glycoprotein. *J Vet Pharmacol Ther.* 2013;36(6):583-7.
98. Giantin M, Aresu L, Arico A, Gelain ME, Riondato F, Comazzi S, et al. Evaluation of tyrosine-kinase receptor c-kit mutations, mRNA and protein expression in canine lymphoma: might c-kit represent a therapeutic target? *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;154(3-4):153-9.
99. Papamichos-Chronakis M, Peterson CL. Chromatin and the genome integrity network. *Nat Rev Genet.* 2013;14(1):62-75.
100. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):1807-19.
101. Myung J, Kim KB, Crews CM. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev.* 2001;21(4):245-73.
102. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503-33.
103. Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol.* 2010;20(7):391-401.

104. Bar-Nun S, Glickman MH. Proteasomal AAA-ATPases: structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(1):67-82.
105. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002;82(2):373-428.
106. Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*. 2003;21(8):921-6.
107. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:477-513.
108. Li W, Ye Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(15):2397-406.
109. Schrader EK, Harstad KG, Matouschek A. Targeting proteins for degradation. *Nat Chem Biol*. 2009;5(11):815-22.
110. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2625-32.
111. Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol*. 2004;1(5):343-50.
112. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(1):17-26.
113. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475(7356):324-32.
114. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:959-91.

115. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-29.
116. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol.* 2010;2010:214074.
117. Torres EM, Sokolsky T, Tucker CM, Chan LY, Boselli M, Dunham MJ, et al. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science.* 2007;317(5840):916-24.
118. Torres EM, Dephoure N, Panneerselvam A, Tucker CM, Whittaker CA, Gygi SP, et al. Identification of aneuploidy-tolerating mutations. *Cell.* 2010;143(1):71-83.
119. Chou T-F, Deshaies RJ. Development of p97 AAA ATPase inhibitors. *Autophagy.* 2014;7(9):1091-2.
120. Esser C, Alberti S, Hohfeld J. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1695(1-3):171-88.
121. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2656-64.
122. Hassan M, Selimovic D, Hannig M, Haikel Y, Brodell RT, Megahed M. Endoplasmic reticulum stress-mediated pathways to both apoptosis and autophagy: Significance for melanoma treatment. *World J Exp Med.* 2015;5(4):206-17.
123. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79-94.
124. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2002;3(10):944-50.
125. Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:399-425.

126. Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*. 2011;334(6059):1086-90.
127. Li X, Zhang K, Li Z. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J Hematol Oncol*. 2011;4:8.
128. Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, et al. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol*. 2006;8(10):1053-63.
129. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):874-85.
130. Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, Petrilli V, Malek M, Chilloux J, et al. p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol Cell*. 2013;49(6):1049-59.
131. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell*. 2007;11(4):349-60.
132. Senovilla L, Vitale I, Martins I, Tailler M, Pailleret C, Michaud M, et al. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science*. 2012;337(6102):1678-84.
133. De Raedt T, Walton Z, Yecies JL, Li D, Chen Y, Malone CF, et al. Exploiting cancer cell vulnerabilities to develop a combination therapy for ras-driven tumors. *Cancer Cell*. 2011;20(3):400-13.
134. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol*. 2011;490:71-92.

135. Wang Q, Shinkre BA, Lee JG, Weniger MA, Liu Y, Chen W, et al. The ERAD inhibitor Eeyarestatin I is a bifunctional compound with a membrane-binding domain and a p97/VCP inhibitory group. *PLoS One*. 2010;5(11):e15479.
136. Guerriero CJ, Brodsky JL. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol Rev*. 2012;92(2):537-76.
137. Dejeans N, Manie S, Hetz C, Bard F, Hupp T, Agostinis P, et al. Addicted to secrete - novel concepts and targets in cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(5):242-50.
138. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:739-89.
139. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;301:215-90.
140. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 2008;319(5865):916-9.
141. Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):581-97.
142. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-6.
143. Tameire F, Verginadis, II, Koumenis C. Cell intrinsic and extrinsic activators of the unfolded protein response in cancer: Mechanisms and targets for therapy. *Semin Cancer Biol*. 2015;33:3-15.
144. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*. 2007;318(5852):944-9.

145. Lin JH, Li H, Zhang Y, Ron D, Walter P. Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One*. 2009;4(1):e4170.
146. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 2004;18(24):3066-77.
147. Fujimoto T, Onda M, Nagai H, Nagahata T, Ogawa K, Emi M. Upregulation and overexpression of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) gene in primary breast cancers. *Breast Cancer*. 2003;10(4):301-6.
148. Hong SY, Hagen T. Multiple myeloma Leu167Ile (c.499C>A) mutation prevents XBP1 mRNA splicing. *Br J Haematol*. 2013;161(6):898-901.
149. Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*. 2003;38(5):605-14.
150. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai YT, Cirstea D, Santo L, et al. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*. 2012;119(24):5772-81.
151. Papandreou I, Denko NC, Olson M, Van Melckebeke H, Lust S, Tam A, et al. Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*. 2011;117(4):1311-4.
152. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J*. 2010;29(12):2082-96.
153. Horiguchi M, Koyanagi S, Okamoto A, Suzuki SO, Matsunaga N, Ohdo S. Stress-regulated transcription factor ATF4 promotes neoplastic transformation by suppressing expression of the INK4a/ARF cell senescence factors. *Cancer Res*. 2012;72(2):395-401.

154. Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, Fels D, Blais J, Hu N, et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*. 2005;24(19):3470-81.
155. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, Zhang F, Ye J, Koumenis C, et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*. 2010;29(27):3881-95.
156. Hart LS, Cunningham JT, Datta T, Dey S, Tameire F, Lehman SL, et al. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4621-34.
157. Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, et al. Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem*. 2012;55(16):7193-207.
158. Fribley A, Zhang K, Kaufman RJ. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol*. 2009;559:191-204.
159. Yadav RK, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev*. 2014;19(2):75-88.
160. Beskow A, Grimberg KB, Bott LC, Salomons FA, Dantuma NP, Young P. A conserved unfoldase activity for the p97 AAA-ATPase in proteasomal degradation. *J Mol Biol*. 2009;394(4):732-46.
161. Fessart D, Marza E, Taouji S, Delom F, Chevet E. P97/CDC-48: proteostasis control in tumor cell biology. *Cancer Lett*. 2013;337(1):26-34.
162. Meyer H, Bug M, Bremer S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol*. 2012;14(2):117-23.

163. Elsasser S, Finley D. Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol.* 2005;7(8):742-9.
164. Schuberth C, Buchberger A. UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(15):2360-71.
165. Yeung HO, Kloppsteck P, Niwa H, Isaacson RL, Matthews S, Zhang X, et al. Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 1):62-7.
166. Woodman PG. p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 21):4283-90.
167. Halawani D, Latterich M. p97: The cell's molecular purgatory? *Mol Cell.* 2006;22(6):713-7.
168. Jentsch S, Rumpf S. Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem Sci.* 2007;32(1):6-11.
169. Stolz A, Hilt W, Buchberger A, Wolf DH. Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(10):515-23.
170. Verma R, Oania RS, Kolawa NJ, Deshaies RJ. Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *Elife.* 2013;2:e00308.
171. Peters JM, Walsh MJ, Franke WW. An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *EMBO J.* 1990;9(6):1757-67.
172. Song C, Wang Q, Li CC. ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. *J Biol Chem.* 2003;278(6):3648-55.
173. Vaz B, Halder S, Ramadan K. Role of p97/VCP (Cdc48) in genome stability. *Front Genet.* 2013;4:60.

174. DeLaBarre B, Brunger AT. Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. *Nat Struct Biol.* 2003;10(10):856-63.
175. Huyton T, Pye VE, Briggs LC, Flynn TC, Beuron F, Kondo H, et al. The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å. *J Struct Biol.* 2003;144(3):337-48.
176. Ye Y. Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *J Struct Biol.* 2006;156(1):29-40.
177. Latterich M, Frohlich KU, Schekman R. Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell.* 1995;82(6):885-93.
178. Hetzer M, Meyer HH, Walther TC, Bilbao-Cortes D, Warren G, Mattaj IW. Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol.* 2001;3(12):1086-91.
179. Ramadan K, Bruderer R, Spiga FM, Popp O, Baur T, Gotta M, et al. Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature.* 2007;450(7173):1258-62.
180. Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature.* 2001;414(6864):652-6.
181. Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, et al. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol.* 2002;4(2):134-9.
182. Rabinovich E, Kerem A, Frohlich KU, Diamant N, Bar-Nun S. AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol.* 2002;22(2):626-34.
183. Hoppe T, Matuschewski K, Rape M, Schlenker S, Ulrich HD, Jentsch S. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell.* 2000;102(5):577-86.

184. Dai RM, Li CC. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol.* 2001;3(8):740-4.
185. Janiesch PC, Kim J, Mouysset J, Barikbin R, Lochmuller H, Cassata G, et al. The ubiquitin-selective chaperone CDC-48/p97 links myosin assembly to human myopathy. *Nat Cell Biol.* 2007;9(4):379-90.
186. Partridge JJ, Lopreiato JO, Jr., Latterich M, Indig FE. DNA damage modulates nucleolar interaction of the Werner protein with the AAA ATPase p97/VCP. *Mol Biol Cell.* 2003;14(10):4221-9.
187. Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnica-Worms D, Baloh RH, et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol.* 2009;187(6):875-88.
188. Tresse E, Salomons FA, Vesa J, Bott LC, Kimonis V, Yao TP, et al. VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy.* 2010;6(2):217-27.
189. Cao K, Nakajima R, Meyer HH, Zheng Y. The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell.* 2003;115(3):355-67.
190. Mouysset J, Deichsel A, Moser S, Hoege C, Hyman AA, Gartner A, et al. Cell cycle progression requires the CDC-48/UBD-1/NPL-4 complex for efficient DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):12879-84.
191. Wendler P, Ciniawsky S, Kock M, Kube S. Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(1):2-14.
192. Patel S, Latterich M. The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* 1998;8(2):65-71.
193. Joly N, Zhang N, Buck M, Zhang X. Coupling AAA protein function to regulated gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(1):108-16.

194. Yamanaka K, Sasagawa Y, Ogura T. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(1):130-7.
195. Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S. Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4)chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J*. 2002;21(4):615-21.
196. DeLaBarre B, Christianson JC, Kopito RR, Brunger AT. Central pore residues mediate the p97/VCP activity required for ERAD. *Mol Cell*. 2006;22(4):451-62.
197. Deshaies RJ. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biol*. 2014;12:94.
198. Meyer HH, Wang Y, Warren G. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J*. 2002;21(21):5645-52.
199. Seguin SJ, Morelli FF, Vinet J, Amore D, De Biasi S, Poletti A, et al. Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly. *Cell Death Differ*. 2014;21(12):1838-51.
200. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013;4(1):1-26.
201. Wojcik C. On the spatial organization of ubiquitin-dependent proteolysis in HeLa cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 1997;35(2):117-8.
202. Wojcik C, Schroeter D, Wilk S, Lamprecht J, Paweletz N. Ubiquitin-mediated proteolysis centers in HeLa cells: indication from studies of an inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Eur J Cell Biol*. 1996;71(3):311-8.
203. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 1998;143(7):1883-98.

204. Boyault C, Zhang Y, Fritah S, Caron C, Gilquin B, Kwon SH, et al. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev.* 2007;21(17):2172-81.
205. Ju JS, Miller SE, Hanson PI, Weihl CC. Impaired protein aggregate handling and clearance underlie the pathogenesis of p97/VCP-associated disease. *J Biol Chem.* 2008;283(44):30289-99.
206. Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M, et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol.* 2010;191(7):1367-80.
207. Boyault C, Gilquin B, Zhang Y, Rybin V, Garman E, Meyer-Klaucke W, et al. HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *EMBO J.* 2006;25(14):3357-66.
208. Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* 2010;29(5):969-80.
209. Ramadan K. p97/VCP- and Lys48-linked polyubiquitination form a new signaling pathway in DNA damage response. *Cell Cycle.* 2012;11(6):1062-9.
210. Bruderer RM, Brasseur C, Meyer HH. The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *J Biol Chem.* 2004;279(48):49609-16.
211. Meerang M, Ritz D, Paliwal S, Garajova Z, Bosshard M, Mailand N, et al. The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2011;13(11):1376-82.
212. Franz A, Orth M, Pirson PA, Sonnevile R, Blow JJ, Gartner A, et al. CDC-48/p97 coordinates CDT-1 degradation with GINS chromatin dissociation to ensure faithful DNA replication. *Mol Cell.* 2011;44(1):85-96.

213. Raman M, Havens CG, Walter JC, Harper JW. A genome-wide screen identifies p97 as an essential regulator of DNA damage-dependent CDT1 destruction. *Mol Cell*. 2011;44(1):72-84.
214. Al-Hakim A, Escribano-Diaz C, Landry MC, O'Donnell L, Panier S, Szilard RK, et al. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9(12):1229-40.
215. van Attikum H, Gasser SM. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol*. 2009;19(5):207-17.
216. Bunting SF, Callen E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, et al. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*. 2010;141(2):243-54.
217. Verma R, Oania R, Fang R, Smith GT, Deshaies RJ. Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II. *Mol Cell*. 2011;41(1):82-92.
218. Raasi S, Wolf DH. Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(6):780-91.
219. Hampton RY. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(4):476-82.
220. Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature*. 2009;458(7237):453-60.
221. Wolf DH, Stolz A. The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(1):117-24.
222. Bays NW, Wilhovsky SK, Goradia A, Hodgkiss-Harlow K, Hampton RY. HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell*. 2001;12(12):4114-28.

223. Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, Nakadate K, Ohsawa Y, Kamei Y, et al. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 2001;8(10):977-84.
224. Kobayashi T, Tanaka K, Inoue K, Kakizuka A. Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J Biol Chem.* 2002;277(49):47358-65.
225. Noguchi M, Takata T, Kimura Y, Manno A, Murakami K, Koike M, et al. ATPase activity of p97/valosin-containing protein is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved cysteine 522 residue in Walker A motif. *J Biol Chem.* 2005;280(50):41332-41.
226. Wojcik C, Yano M, DeMartino GN. RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 2):281-92.
227. Braun RJ, Zischka H. Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death: from yeast apoptosis to human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(7):1418-35.
228. Oromendia AB, Amon A. Aneuploidy: implications for protein homeostasis and disease. *Dis Model Mech.* 2014;7(1):15-20.
229. Donnelly N, Storchova Z. Dynamic karyotype, dynamic proteome: buffering the effects of aneuploidy. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(2):473-81.
230. Vekaria PH, Home T, Weir S, Schoenen FJ, Rao R. Targeting p97 to Disrupt Protein Homeostasis in Cancer. *Front Oncol.* 2016;6:181.
231. Dai RM, Chen E, Longo DL, Gorbea CM, Li CC. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. *J Biol Chem.* 1998;273(6):3562-73.

232. Asai T, Tomita Y, Nakatsuka S, Hoshida Y, Myoui A, Yoshikawa H, et al. VCP (p97) regulates NFkappaB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line. *Jpn J Cancer Res.* 2002;93(3):296-304.
233. Haines DS. p97-containing complexes in proliferation control and cancer: emerging culprits or guilt by association? *Genes Cancer.* 2010;1(7):753-63.
234. Lucas GJ, Mehta SG, Hocking LJ, Stewart TL, Cundy T, Nicholson GC, et al. Evaluation of the role of Valosin-containing protein in the pathogenesis of familial and sporadic Paget's disease of bone. *Bone.* 2006;38(2):280-5.
235. Alexandru G, Graumann J, Smith GT, Kolawa NJ, Fang R, Deshaies RJ. UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. *Cell.* 2008;134(5):804-16.
236. Lague MN, Romieu-Mourez R, Bonneil E, Boyer A, Pouletty N, Mes-Masson AM, et al. Proteomic profiling of a mouse model for ovarian granulosa cell tumor identifies VCP as a highly sensitive serum tumor marker in several human cancers. *PLoS One.* 2012;7(8):e42470.
237. Tsujimoto Y, Tomita Y, Hoshida Y, Kono T, Oka T, Yamamoto S, et al. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(9):3007-12.
238. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, et al. Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 2003;21(13):2537-44.
239. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Kidogami S, Miyata H, et al. Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5558-65.
240. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Monden M, Yamamoto S, et al. Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2004;11(7):697-704.

241. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, et al. Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2004;11(2):165-72.
242. Yamamoto S, Tomita Y, Uruno T, Hoshida Y, Qiu Y, Iizuka N, et al. Increased expression of valosin-containing protein (p97) is correlated with disease recurrence in follicular thyroid cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005;12(11):925-34.
243. Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, et al. Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35798-802.
244. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Toyosawa S, Inohara H, Kishino M, et al. Expression level of valosin-containing protein (VCP) as a prognostic marker for gingival squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*. 2004;15(9):1432-8.
245. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Sakon M, Kameyama M, Imaoka S, et al. Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004;10(2):651-7.
246. Yamamoto S, Tomita Y, Nakamori S, Hoshida Y, Iizuka N, Okami J, et al. Valosin-containing protein (p97) and Ki-67 expression is a useful marker in detecting malignant behavior of pancreatic endocrine neoplasms. *Oncology*. 2004;66(6):468-75.
247. Yamamoto S, Tomita Y, Nakamori S, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, et al. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence. *J Clin Oncol*. 2003;21(3):447-52.
248. Van Drie JH. Protein folding, protein homeostasis, and cancer. *Chin J Cancer*. 2011;30(2):124-37.
249. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994;79(1):13-21.

250. Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell*. 2007;130(6):986-8.
251. Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N. Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1113:202-16.
252. Suh KS, Tanaka T, Sarojini S, Nightingale G, Gharbaran R, Pecora A, et al. The role of the ubiquitin proteasome system in lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;87(3):306-22.
253. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:762825.
254. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49(11):1603-16.
255. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev*. 2012;26(9):877-90.
256. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2307-16.
257. Kosakowska-Cholody T, Lin J, Srideshikan SM, Scheffer L, Tarasova NI, Acharya JK. HKH40A downregulates GRP78/BiP expression in cancer cells. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1240.
258. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. 2005;35(4):373-81.
259. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(10):2143-9.
260. Dong D, Ni M, Li J, Xiong S, Ye W, Virrey JJ, et al. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Res*. 2008;68(2):498-505.

261. Virrey JJ, Dong D, Stiles C, Patterson JB, Pen L, Ni M, et al. Stress chaperone GRP78/BiP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6(8):1268-75.
262. Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 2002;16(4):433-43.
263. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999;59(11):2615-22.
264. Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Dunner K, Jr., Huang P, et al. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 2005;65(24):11658-66.
265. Strasser A, Puthalakath H. Fold up or perish: unfolded protein response and chemotherapy. *Cell Death Differ.* 2008;15(2):223-5.
266. Boccadoro. Second-generation Proteasome Inhibition: What a Difference a Generation Makes. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia.* 2015;15(3):e13-e4.
267. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Jr., Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood.* 2006;107(12):4907-16.
268. Alvarez C, Arkin MR, Bulfer SL, Colombo R, Kovaliov M, LaPorte MG, et al. Structure-Activity Study of Bioisosteric Trifluoromethyl and Pentafluorosulfanyl Indole Inhibitors of the AAA ATPase p97. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6(12):1225-30.
269. Bursavich MG, Parker DP, Willardsen JA, Gao ZH, Davis T, Ostanin K, et al. 2-Anilino-4-aryl-1,3-thiazole inhibitors of valosin-containing protein (VCP or p97). *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(5):1677-9.

270. Chou TF, Li K, Nordin BE, Porubsky P, Frankowski K, Patricelli MP, et al. Selective, reversible inhibitors of the AAA ATPase p97. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda (MD)2010.
271. Chou TF, Brown SJ, Minond D, Nordin BE, Li K, Jones AC, et al. Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(12):4834-9.
272. Fang CJ, Gui L, Zhang X, Moen DR, Li K, Frankowski KJ, et al. Evaluating p97 inhibitor analogues for their domain selectivity and potency against the p97-p47 complex. ChemMedChem. 2015;10(1):52-6.
273. Gui L, Zhang X, Li K, Frankowski KJ, Li S, Wong DE, et al. Evaluating p97 Inhibitor Analogues for Potency against p97-p37 and p97-Npl4-Ufd1 Complexes. ChemMedChem. 2016;11(9):953-7.
274. Magnaghi P, D'Alessio R, Valsasina B, Avanzi N, Rizzi S, Asa D, et al. Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. Nat Chem Biol. 2013;9(9):548-56.
275. Polucci P, Magnaghi P, Angiolini M, Asa D, Avanzi N, Badari A, et al. Alkylsulfanyl-1,2,4-triazoles, a new class of allosteric valosine containing protein inhibitors. Synthesis and structure-activity relationships. J Med Chem. 2013;56(2):437-50.
276. Wijeratne EM, Gunaherath GM, Chapla VM, Tillotson J, de la Cruz F, Kang M, et al. Oxaspirol B with p97 Inhibitory Activity and Other Oxaspirols from Lecythophora sp. FL1375 and FL1031, Endolichenic Fungi Inhabiting Parmotrema tinctorum and Cladonia evansii. J Nat Prod. 2016;79(2):340-52.
277. Anderson DJ, Le Moigne R, Djakovic S, Kumar B, Rice J, Wong S, et al. Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. Cancer Cell. 2015;28(5):653-65.

278. Cubedo E, Cordeu L, Bandres E, Rebollo A, Malumbres R, Sanmartin C, et al. New symmetrical quinazoline derivatives selectively induce apoptosis in human cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(7):850-9.
279. Wang Q, Mora-Jensen H, Weniger MA, Perez-Galan P, Wolford C, Hai T, et al. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(7):2200-5.
280. Wang Q, Li L, Ye Y. Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I. *J Biol Chem.* 2008;283(12):7445-54.
281. Le Moigne R, Aftab BT, Djakovic S, Dhimolea E, Valle E, Murnane M, et al. The p97 Inhibitor CB-5083 Is a Unique Disrupter of Protein Homeostasis in Models of Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(11):2375-86.
282. Chapman E, Maksim N, de la Cruz F, La Clair JJ. Inhibitors of the AAA+ chaperone p97. *Molecules.* 2015;20(2):3027-49.
283. Wright JJ. Combination therapy of bortezomib with novel targeted agents: an emerging treatment strategy. *Clin Cancer Res.* 2010;16(16):4094-104.
284. Zhu WW, Kang L, Gao YP, Hei Y, Dong J, Liu Y, et al. Expression level of valosin containing protein is associated with prognosis of primary orbital MALT lymphoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(11):6439-43.
285. Bastola P, Neums L, Schoenen FJ, Chien J. VCP inhibitors induce endoplasmic reticulum stress, cause cell cycle arrest, trigger caspase-mediated cell death and synergistically kill ovarian cancer cells in combination with Salubrinal. *Mol Oncol.* 2016;10(10):1559-74.
286. Parzych K, Chinn TM, Chen Z, Loaiza S, Porsch F, Valbuena GN, et al. Inadequate fine-tuning of protein synthesis and failure of amino acid homeostasis following inhibition of the ATPase VCP/p97. *Cell Death Dis.* 2015;6:e2031.

287. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008;22(3):305-9.
288. Lu TH, Tseng TJ, Su CC, Tang FC, Yen CC, Liu YY, et al. Arsenic induces reactive oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK-mediated mitochondria-dependent and GRP 78/CHOP-regulated pathways. *Toxicol Lett*. 2014;224(1):130-40.
289. Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*. 1992;6(3):439-53.
290. Haataja L, Gurlo T, Huang CJ, Butler PC. Many commercially available antibodies for detection of CHOP expression as a marker of endoplasmic reticulum stress fail specificity evaluation. *Cell Biochem Biophys*. 2008;51(2-3):105-7.
291. Teng Y, Gao M, Wang J, Kong Q, Hua H, Luo T, et al. Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation enhances TRAIL-induced apoptosis in hepatoma cells. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1060.
292. Koizumi M, Tanjung NG, Chen A, Dynlacht JR, Garrett J, Yoshioka Y, et al. Administration of salubrinal enhances radiation-induced cell death of SW1353 chondrosarcoma cells. *Anticancer Res*. 2012;32(9):3667-73.
293. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 1998;12(7):982-95.
294. Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46(8):629-40.
295. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000;6(5):1099-108.

296. Cazanave SC, Elmi NA, Akazawa Y, Bronk SF, Mott JL, Gores GJ. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipopapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(1):G236-43.
297. Lu M, Lawrence DA, Marsters S, Acosta-Alvear D, Kimmig P, Mendez AS, et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*. 2014;345(6192):98-101.
298. Ghosh AP, Klocke BJ, Ballestas ME, Roth KA. CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress. *PLoS One*. 2012;7(6):e39586.
299. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001;21(4):1249-59.
300. Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279(44):45495-502.
301. Tanida I, Waguri S. Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods Mol Biol*. 2010;648:193-214.
302. Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*. 2007;171(2):513-24.
303. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*. 2007;447(7146):859-63.
304. Rashid HO, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*. 2015;11(11):1956-77.

305. Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G. LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997;62(5-6):391-9.
306. Yu H, Cook TJ, Sinko PJ. Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res.* 1997;14(6):757-62.
307. Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;214(3):248-57.
308. Chang-Liu CM, Woloschak GE. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett.* 1997;113(1-2):77-86.
309. Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep.* 2004;24(6):631-9.
310. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005;21(1):1-26.
311. Wong CC, Cheng KW, Rigas B. Preclinical predictors of anticancer drug efficacy: critical assessment with emphasis on whether nanomolar potency should be required of candidate agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;341(3):572-8.