

Université de Montréal

Investigation du système ubiquitine protéasome et découverte de nouvelles cibles thérapeutiques anti-cancer surpassant la résistance acquise au bortézomib

par

Saad Menggad

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.SC.)

en Biologie Moléculaire

27 Août 2018

© Saad Menggad, 2018

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

Investigation du système ubiquitine protéasome et découverte de nouvelles cibles thérapeutiques anti-cancer surpassant la résistance acquise au botézomib

Présenté par:

Saad Menggad

a été évalué par le jury composé par les professeurs suivants:

, Président-rapporteur

, Directeur de recherche

, Examineur

RÉSUMÉ

Le myélome multiple (MM) est le deuxième cancer humain du sang le plus courant. Le protéasome, un complexe multi-protéique responsable de la dégradation des protéines ubiquitinées, a été établi comme une cible majeure pour le traitement des patients atteints de MM. Bien que les taux de survie des patients se sont significativement améliorés depuis l'introduction des inhibiteurs du protéasome (bortézomib), les patients développent une résistance et ultimement rechutent. Par conséquent, cette maladie demeure un problème de santé publique majeur et elle oblige un besoin absolu de développer de nouvelles thérapies.

Dans notre étude, nous avons généré des lignées de cellules cancéreuses résistantes au bortézomib et réalisé des criblages ARNi de déubiquitinasés (DUB: 100 gènes) et d'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2: 40 gènes). Cela dans le but d'identifier les gènes de ces familles qui affectent la prolifération des cellules cancéreuses sensibles et/ou résistantes suite à l'abrogation de leur fonction.

Nous avons identifié plusieurs cibles dont la déubiquitinase associée au protéasome PSMD14, qui est nécessaire pour la déubiquitination des protéines antérieures à leur entrée et dégradation par le protéasome. Par la suite, PSMD14 a été soumise à une analyse plus détaillée en utilisant des approches ARNi, CRISPR/Cas9 et de mutagenèse sur des cellules cancéreuses sensibles ou résistantes. Nous avons trouvé que la déplétion de PSMD14 entraîne une diminution dramatique de la prolifération cellulaire et de la mort cellulaire comparé à la cible du bortézomib PSMB5. D'autre part, nous avons observé que l'étendue de l'ubiquitination de l'histone H2A et les niveaux d'expression de HSP70 sont corrélés avec la sensibilité cellulaire à l'inhibition du protéasome. Ainsi, ces facteurs pourraient être des biomarqueurs potentiels pour le pronostic de survie chez les patients atteints de MM.

PMSD14 ainsi que d'autres cibles révélées par nos criblages représentent des cibles thérapeutiques potentielles dont l'inhibition pourrait surmonter la résistance acquise aux inhibiteurs de protéasome actuellement utilisés pour le traitement des patients atteints de cancer.

Mots clés: Cancer, Protéasome, Inhibiteur du protéasome, Résistance acquise, Nouvelle thérapie, Criblage, Déubiquitinase, Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, PMSD14

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) is the second most common human blood cancer. The proteasome, a multi-protein complex responsible for the degradation of ubiquitinated proteins, has been established as a major target for the treatment of MM cancer patients. Although patient survival rates have significantly improved since the introduction of proteasome inhibitors (bortezomib), patients develop resistance and ultimately relapse. Therefore, this disease remains a major public health issue and there is an absolute need to develop novel therapies.

In our study, we generated bortezomib-resistant cancer cell lines and conducted deubiquitinases (DUB: 100 genes) and ubiquitin-conjugating enzymes (E2: 40 genes) RNAi screens to identify which genes of these families affect cell proliferation of sensitive and/or resistant cancer cells following abrogation of their function.

Among several hits, we identified the proteasome-associated DUB PSMD14, which is required for protein deubiquitination prior to their entry and degradation by the proteasome. These hits have been validated by other RNAi sequences. Further, PSMD14 was submitted to more detailed analysis using RNAi, CRISPR/Cas9 and mutagenesis approaches in sensitive or resistant cancer cells. We found that PSMD14 depletion result in a dramatic decrease of cell proliferation and cell death compared to bortezomib target PSMB5. On the other hand, we observed that the extent of histone H2A ubiquitination and HSP70 expression levels are correlated with the cellular sensitivity to proteasome inhibition. Thus, these factors could be potential biomarkers for MM patient survival prognosis.

PSMD14 as well as other candidates revealed from our screens represent potential therapeutic targets whose inhibition is predicted to overcome the acquired resistance to proteasome inhibitors currently used to treat cancer patients.

Key words: Cancer, Proteasome, Proteasome inhibitor, Acquired resistance, New therapy, Screening, Deubiquitinase, Ubiquitin conjugation enzyme, PSMD14

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
DÉDICACES.....	xvii
REMERCIEMENTS.....	xviii
AVANT-PROPOS.....	1
1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
1.1 Ubiquitination.....	3
1.2 Déubiquitination.....	9
1.3 Protéasome.....	11
1.4 Protéasome et son implication dans le cancer.....	17
1.5 Immunoprotéasome.....	18
1.6 Thérapie innovante contre le cancer: inhibition du protéasome.....	21

1.7	Avantages et inconvénients de la chimiothérapie à base de bortézomib.....	25
1.8	Seconde génération d'inhibiteurs du protéasome.....	27
1.9	Hypothèse et objectifs.....	29
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
2.1.	Culture cellulaire.....	31
2.2	Construction et Purification de plasmides.....	31
2.2.1	ARNg.....	32
2.2.2	Digestion et purification.....	32
2.2.3	Hybridation des séquences d'ADN codant pour un ARNg.....	33
2.2.4	Ligation.....	33
2.2.5	Transformation.....	34
2.2.6	Crible des plasmides: méthode d'extraction au phénol chloroforme.....	34
2.2.7	Purification des plasmides.....	35
2.3	Préparation des gels.....	35
2.3.1	Gel d'agarose 0, 7 et 2 %.....	35
2.3.2	Gel d'acrylamide 6, 8, 10 et 15 %.....	36
2.3.3	Migration.....	37
2.4	Immunobuvardage.....	37

2.4.1	Procédure de l'immunobuvardage.....	37
2.4.2	Les anticorps utilisés.....	39
2.5	Transfection.....	39
2.6	Production virale et infection.....	40
2.7	Test de prolifération MTT.....	41
2.8	Immunofluorescence.....	41
2.9	Analyse bio-informatique.....	42
2.10	Cytométrie en flux.....	43
2.11	RT-qPCR.....	43
2.12	Essai de formation de colonies (CFA).....	44
3.	RÉSULTATS.....	45
3.1	Criblage par ARNi des DUBs et E2s du génome humain.....	46
3.2	Analyse bio-informatique des meilleures cibles issues des criblages des DUBs et E2s.....	50
3.3	Déplétion de la déubiquitinase PSMD14 et résistance acquise au borézomib.....	53
3.4	Inhibition chimique de l'activité catalytique de PSMD14.....	57
3.5	Effet de la déplétion des composantes importantes du protéasome 26S.....	60
3.6	Fraction d'ubiquitine suite à la déplétion de PSMD14 ou PSMB5.....	63
3.7	Biomarqueurs potentiels et prédiction de la résistance au bortézomib: H2Aub et HSP70...66	66

4.	DISCUSSION.....	69
4.1	Cribles des DUBs et E2s et étude détaillée de la déplétion de la déubiquitinase PSMD14..	70
4.2	Biomarqueurs potentiels et prédiction de la résistance aux inhibiteurs du protéasome.....	75
5.	CONCLUSIONS.....	76
6.	DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES.....	78
7.	BIBLIOGRAPHIE.....	108

LISTE DES TABLEAUX

1. Revue Bibliographique

Tableau I. Protéines substrats du protéasome 20S.....	12
Tableau II. Les sous unités du protéasome 26S.....	16

6. Données Supplémentaires

Tableau III. Liste des anticorps.....	99
Tableau IV. Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR.....	102
Tableau V. Liste des gARN utilisés pour la technique CRISPR/Cas9.....	104
Tableau VI. Liste des plasmides utilisés.....	105

LISTE DES FIGURES

1. Revue Bibliographique

Figure 1.1 Structure de l'ubiquitine avec ses 7 résidus lysines.....	4
Figure 1.2 Illustration de la réaction d'ubiquitination suivie d'une dégradation protéasomale.....	5
Figure 1.3 Illustration de plusieurs familles de E3 ligases.....	7
Figure 1.4 Le code de l'ubiquitine.....	9
Figure 1.5 Les différentes familles de déubiquitinases.....	11
Figure 1.6 Le protéasome 26S.....	13
Figure 1.7 Les différents types de protéasomes.....	19
Figure 1.8 Les différentes combinaisons de protéasomes possibles.....	20
Figure 1.9 Mécanismes d'action du bortézomib.....	24

3. Résultats

Figure 3.1 Criblage ARNi des DUBs et E2s dans des cellules sensibles ou résistantes au bortézomib.....	48
Figure 3.2 Pronostic de survie des patients atteints de cancers en fonction de l'expression des ARNm des meilleures cibles.....	51
Figure 3.3 Analyse phénotypique et moléculaire suite à la déplétion de PSMD14.....	55
Figure 3.4 Activité catalytique de PSMD14 et viabilité cellulaire.....	58
Figure 3.5 Comparaison des effets des déplétions des composantes importantes du complexe régulateur ou catalytique du protéasome 26S dans des cellules résistantes au bortézomib.....	61

Figure 3.6 Effet de la déplétion de PSMD14 sur la fraction d'ubiquitine comparé à celui de PSMB5.....	64
Figure 3.7 Détection des biomarqueurs potentiel H2Aub et HSP70 et prédiction de la résistance au bortézomib.....	67

6. Données Supplémentaires

Figure S6.1 Procédure de génération des cellules résistantes au bortézomib.....	79
Figure S6.2 Profil de cytométrie en flux des cellules sensibles ou résistantes après traitement au bortézomib.....	81
Figure S6.3 Valeur note Z issues des criblages de DUBs et E2s effectués.....	83
Figure S6.4 Comparaison des effets des déplétions des 3 DUBs associées au protéasome.....	85
Figure S6.5 Validation et comparaison des effets des déplétions des meilleures cibles DUBs et E2s du criblage.....	87
Figure S6.6 Comparaison des effets de PSMD14 et PSMB5 sur la prolifération.....	89
Figure S6.7 Effet de la déplétion combinée de plus d'une sous unité du protéasome sur la prolifération cellulaire.....	91
Figure S6.8 La déplétion de PSMD14 et apoptose.....	93
Figure S6.9 Variation des niveaux d'H2Aub et HSP70 dans des cellules du myélome multiple et lymphome suite à une inhibition du protéasome.....	95
Figure S6.10 Effets des déplétions des meilleures cibles DUBs et E2s du criblage dans des cellules du mésothéliome résistantes au bortézomib.....	97

LISTE D'ABRÉVIATION ET TERMINOLOGIES

ADN: Acide Désoxyribonucléique

Akt: Protéine kinase B (aussi nommée PKB)

ARNi: ARN interférent (siARN)

Bcl-2: *B-Cell lymphoma 2*

BTZ: Bortézomib

cIAP1: *Baculoviral IAP repeat-containing protein 1*

cIAP2: *Baculoviral IAP repeat-containing protein 2*

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPZ: Capzimin

DKK1: Dickkopf-1

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Milieu minimum essentiel de Eagle)

DMSO: Le diméthylsulfoxyde

DUB: Déubiquitinase

E1: Enzyme activatrice de l'ubiquitine

E2: Enzyme conjugatrice de l'ubiquitine

E3: Enzyme ligase de l'ubiquitine

EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétique (acide)

eIF2: *Eukaryotic Initiation Factor 2* (Facteur d'initiation 2 de la traduction chez les eucaryotes)

FBS: *Fetal Bovine Serum* (sérum de fœtus de bovin)

FDA: *Food and Drug Administration* (l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux)

HDAC: Histone Déacétylase

HECT: *Homology to E6AP C Terminus* (Une famille de E3)

IC50: Concentration inhibitrice médiane

IGF-1: *Insulin-Like Growth Factor-1* (facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline)

IκB: *Inhibitor of Kappa B* (inhibiteur de NF-κB)

Il-6: Interleukine 6

K: Lysine

kDa: Kilodalton

MKP-1: *Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1*

NF-κB: *Nuclear Factor-Kappa B* (facteur de transcription nucléaire kappa-B)

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Tampon phosphate salin)

PM: Poids moléculaires

R: Résistante

RANK: *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B* (Le récepteur qui active le facteur nucléaire kappa-B)

RANKL: *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand* (Ligand qui active RANK qui est le récepteur qui active le facteur nucléaire kappa-B)

RING: *Really Interesting New Gene* (Une famille de E3)

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium* (Milieu de l' institute Roswell Park Memorial)

S: Coefficient de sédimentation Svedbergs

S: Sensible

SUP: Système ubiquitine-protéasome

TAE: Le tampon contenant du Tris, Acétate et l'EDTA

Tris: Trishydroxyméthylaminométhane

U-box E3: Une famille de E3

UV: Ultraviolet

min: Minute

ml: Millilitre

mg: Milligramme

U: Unité

C: Degré Celsius

µg: Microgramme

μ l: Microlitre

BrdU: bromodésoxyuridine

Je dédie ce modeste mémoire de fin d'étude de maîtrise

À mes très chers parents

Dont le sacrifice m'a permis de vivre ce jour

À qui je dois tout

J'espère que vous trouverez en moi toujours votre fierté

À toute ma famille

À tous ceux qui me sont chers

À mes amis, mes collègues d'études

À tous ceux qui ont contribué à ce travail de proche ou de loin

À toutes les bonnes personnes existant dans ce monde

À qui je souhaite un avenir joyeux, remplie de réussite et de satisfaction

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes. Je souhaite par la présente section les remercier du fond du cœur qu'il soit cité ou non, je vous suis entièrement reconnaissant. Encore une fois merci infiniment à toutes et à tous !

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr El Bachir Affar, professeur associée au département de médecine de l'Université de Montréal, pour son accueil au sein de son laboratoire, pour son temps, pour avoir contribué à ma formation ainsi que le partage de son immense savoir. Sans lui la réalisation de ce projet n'aurait pas eu lieu, ce travail découle de son expertise et ses compétences reconnus mondialement notamment sur le complexe BAP1. J'exprime mes plus profonds respects et remerciements envers Dr. El Bachir Affar pour tous les précieux outils mis à ma disposition pour réaliser ce magnifique projet. Je le remercie pour l'accord de sa confiance, pour son aide quotidien et ses précieux conseils, ses explications et surtout sa patience. J'espère que par les présents mots il a pu ressentir toute la gratitude et reconnaissance que j'ai envers lui.

Je remercie les membres de mon jury d'évaluation de mon mémoire de maîtrise pour leur acceptation d'évaluer ce travail, pour leur précieux temps, pour leurs commentaires, pour leurs corrections, pour leurs suggestions et pour leurs efforts inestimables. Je remercie aussi l'ensemble des membres du département de biologie moléculaire pour leur appui et présence.

Je voudrais également remercier tous les membres de notre laboratoire sans exception. Je remercie Nadine Sen et Haithem Barbour pour leur encadrement durant ma formation et qui m'ont appris différentes techniques. Aussi pour leurs commentaires, suggestions, éclaircissements et discussions, je vous en suis redevable. Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu tout au long de mes deux stages et ma maîtrise de proche ou de loin.

Je n'oublie pas de remercier tous ceux qui, au Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont comme à l'Université de Montréal, ont été gentil et serviable avec moi.

Bien évidemment, je remercie ma famille, mes proches pour leur soutien inépuisable. Je remercie et j'honore infiniment mes très chers parents, sont eux je ne serai pas où je suis. Votre présence à mes côtés et vos sacrifices n'ont pas de prix, que dieu vous protège à jamais, qu'il puisse vous apporter santé, paix, joie et réalise vos souhaits !

AVANT-PROPOS

Le cancer est le résultat de l'influence de plusieurs facteurs génétiques et l'environnement. Parmi les facteurs génétiques on peut citer l'expression des oncogènes, des génomes viraux intégrés ou l'apparition de mutations (germinales ou somatiques). Même si la majorité des mutations somatiques acquises avec le temps n'ont généralement pas d'effets certains mutations et particulièrement celles touchant des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire sont néfastes. Elles entraînent la perte des voies de régulation, ce qui engage la cellule dans une prolifération non contrôlée et la transforme donc en cellule cancéreuse. Les mutations se produisent soient par des erreurs au cours de la réplication, soient suite à des expositions à des agents génotoxiques endogènes (des radicaux libres, des aldéhydes, etc.) ou exogènes (des produits chimiques, des rayons UV, des rayons ionisants etc.). Il arrive, au fil du temps, qu'un nombre de ces mutations acquises confèrent à la cellule des avantages de survie ou une dérégulation menant à une prolifération anarchique. Ce processus pourra mener au développement de cancers (1). Les traitements contre le cancer ciblent des enzymes impliquées dans des processus cellulaires déterminants comme la production de l'ATP, la réplication (ADN polymérase, topoisomérase), la transcription, la traduction, la signalisation en réponse aux récepteurs des facteurs de croissance, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et la dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome. Ce dernier système sera développé dans cette étude (2).

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Ubiquitination

La découverte de l'ubiquitine en 1980 est relativement récente. En effet, entre les années 1980 et 1990 s'est effectué la caractérisation de la cascade enzymatique de l'ubiquitine avec l'identification des enzymes E1, E2 et E3 qui seront détaillées par la suite. Les études scientifiques au cours de ces années ont permis également la compréhension des mécanismes d'activation et de transfert de l'ubiquitine. Cela s'est poursuivi avec la purification du protéasome 26S et 20S par plusieurs laboratoires. C'est surtout la découverte de l'ubiquitine comme une protéine d'adressage ou de signalisation qui a révolutionné le domaine scientifique. Cela a poussé au début des 1990 vers une émergence d'un intérêt biologique pour le système ubiquitine protéasome essentiellement avec des études génétiques particulièrement dans la levure démontrant que l'ubiquitination et le protéasome sont essentiels. Ces avancés ont permis d'apporter de la lumière sur ce système et ont permis notamment de mieux comprendre sa fonction de dégradation des protéines. Ce savoir accumulé est entre autres dû aux travaux chevronnés des chercheurs Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose. Ces derniers ont par ailleurs remporté le prix Nobel de chimie en 2004 (3, 4).

L'ubiquitination d'une protéine est une modification biochimique post-traductionnelle, au cours de laquelle une autre protéine appelé ubiquitine se fixe de manière covalente à la protéine substrat. L'ubiquitine est constituée de 76 acides aminés (8,5 kDa) dont 7 lysines qui peuvent servir de point de polymérisation pour d'autres ubiquitines (Figure 1.1) (5).

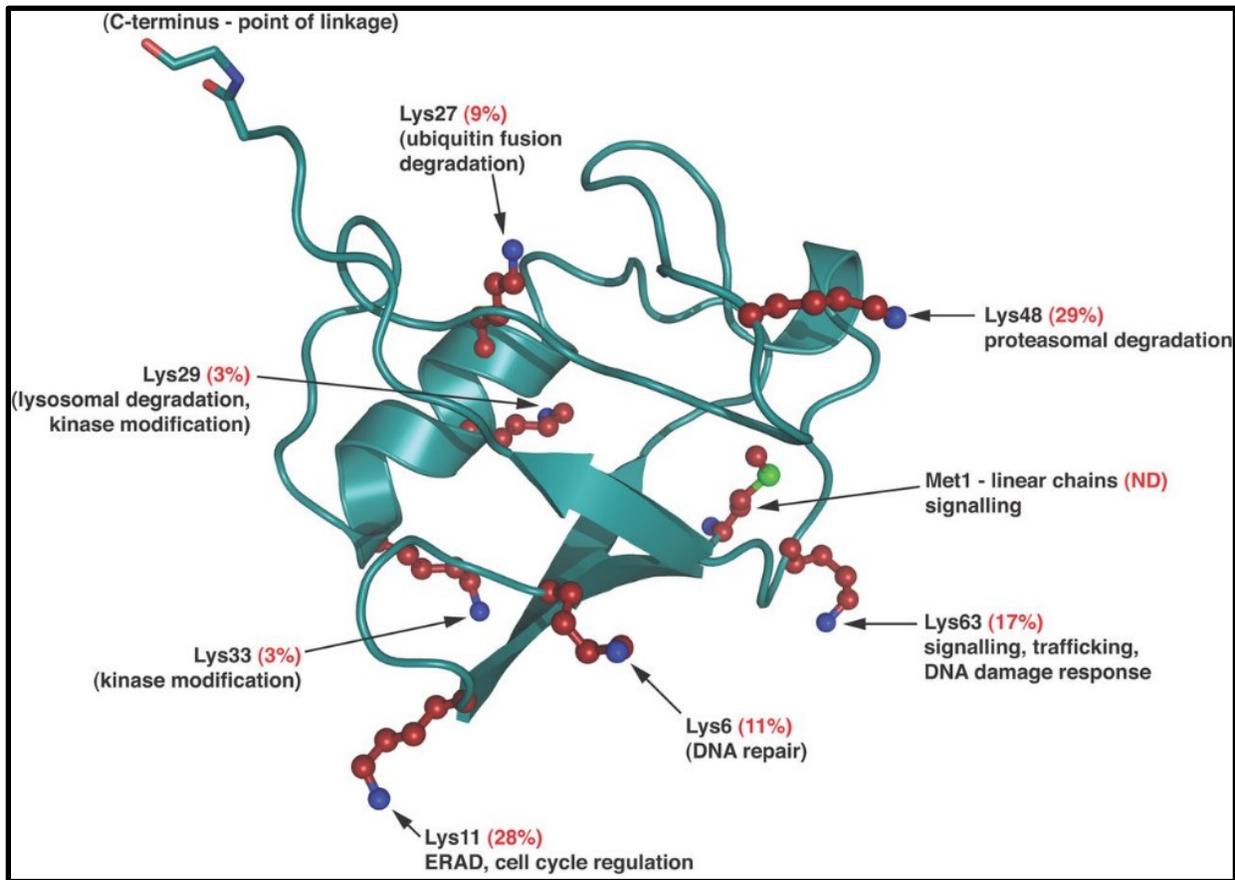


Figure 1.1 Structure de l'ubiquitine avec ses 7 résidus lysines. La structure de l'ubiquitine est en vert et ses 7 résidus lysines présents en surface de la molécule sont en rouge. En bleu apparaissent les atomes nitrogène des lysines. De plus la méthionine 1 (Met¹) de l'ubiquitine possède un atome de sulfure qui apparaît en vert clair et qui par ailleurs se trouve très proche de la Lys⁶³ de l'ubiquitine. À l'extrémité C terminal on retrouve les résidus Gly⁷⁵ – Gly⁷⁶ avec leur atome d'oxygène en rouge clair et les atomes nitrogène en bleu. Il est à noter qu'à côté de chaque lysine se trouve un pourcentage en rouge indiquant l'abondance de chaîne impliquant cette lysine chez la levure *S. cerevisiae*. Aussi entre parenthèses sont indiquées les fonctions présumées pour chaque type de chaîne d'ubiquitine (Modifiée de *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 5):937-53) (6).

L'ubiquitine se fait via une cascade de trois réactions enzymatiques faisant intervenir trois enzymes différentes. L'ubiquitination débute par l'activation de l'ubiquitine par l'enzyme activatrice E1 à travers une carboxylation de manière ATP dépendante. Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée de la E1 vers un groupe sulfure de l'enzyme de conjugaison E2. Finalement, la E2 se lie à la E3 qui elle lie la protéine substrat. Ainsi, la molécule d'ubiquitine est transférée par l'intermédiaire de l'ubiquitine-ligase E3 à un groupe amyle d'un résidu lysine (K) de la protéine cible (Figure 1.2) (7).

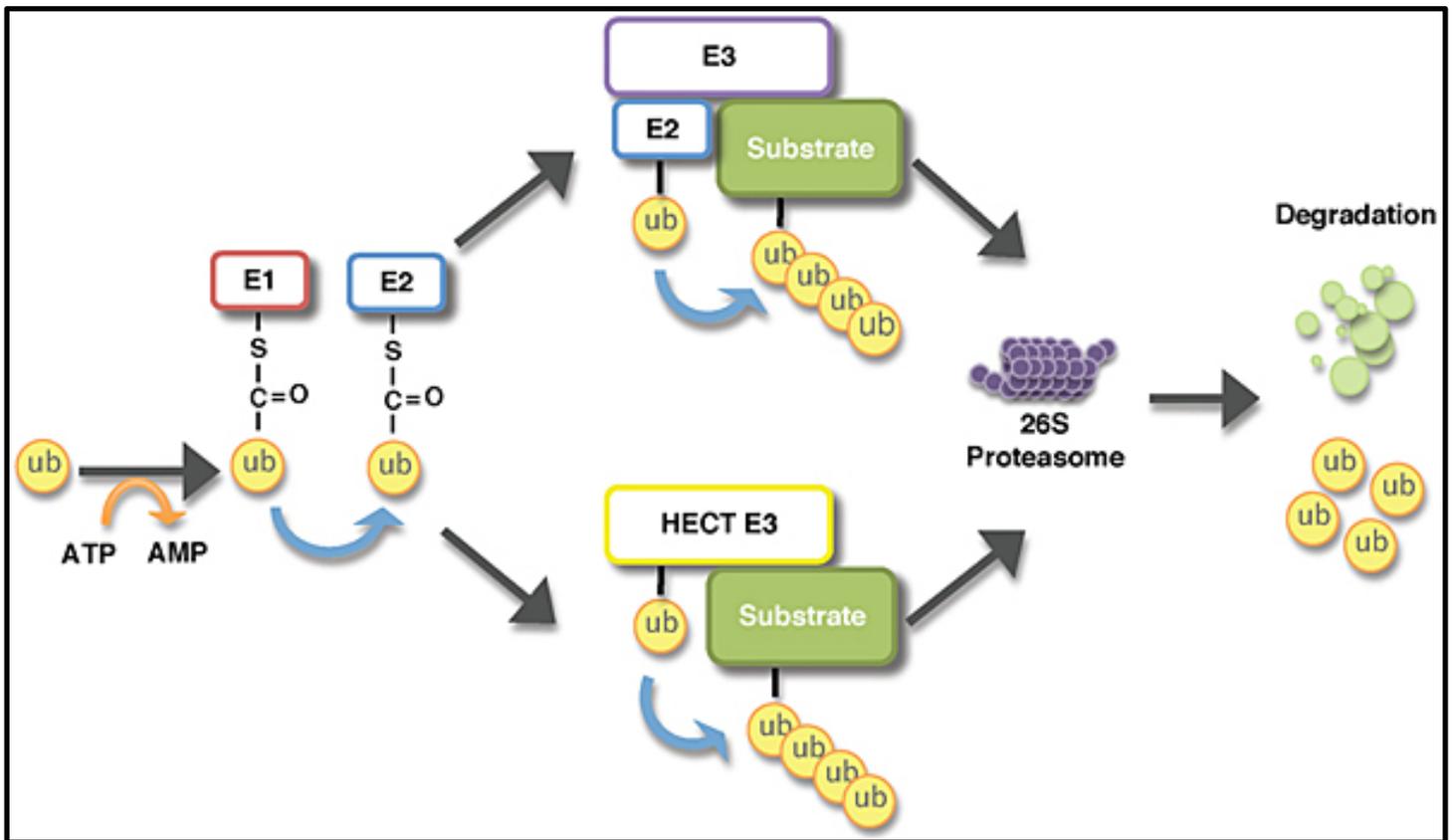


Figure 1.2 Illustration de la réaction d'ubiquitination suivie d'une dégradation protéasomale. L'enzyme E1 active la molécule d'ubiquitine via une réaction ATP-dépendante formant un lien thiol ester entre la E1 et l'ubiquitine. Celle-ci est ensuite transférée à la E2. Par la suite la E3 va permettre le transfert de l'ubiquitine à la protéine substrat. Dépendamment de la famille de E3 impliquée

quelques particularités se produisent dans le transfert. Il est généralement admis qu'une fois qu'un substrat possède une chaîne d'ubiquitine formée par 4 molécules ou plus, notamment sur la lysine K48, la protéine est dirigée vers une dégradation protéasomale (Modifiée de Front Biosci (Landmark Ed). 2012;17:2197-212.) (8).

Actuellement, on dénombre chez l'humain 2 enzymes E1: UBA1 et UBA6. UBA1 représente la principale isoforme impliquée dans le marquage des protéines destinées à la dégradation protéique. Il a été reporté que des déplétions de E1 provoquent une diminution de la viabilité des cellules leucémiques en général et plus particulièrement du myélome multiple (9). On compte 42 enzymes E2 chez l'humain. L'E2 détermine le destin de la protéine en déterminant si la protéine sera multi-, mono- ou poly-ubiquitinée. L'E2 détermine aussi le résidu lysine auquel sera conjugué l'ubiquitine (10). Chez l'humain on trouve environ 600 E3 qui peuvent être séparées en trois grandes familles. On retrouve les RING (Really Interesting New Gene) et les U-BOX E3 qui lient à la fois la E2 et le substrat pour assurer le transfert de l'ubiquitine de la E2 au substrat. Il existe également les E3 de la famille des HECT (homology to E6AP C terminus) qui contrairement aux RING et U-BOX ne transfèrent pas l'ubiquitine de la E2 au substrat. En effet, l'ubiquitine leur est transférée de la E2 avant d'être transférée au substrat (Figure 1.3) (11).

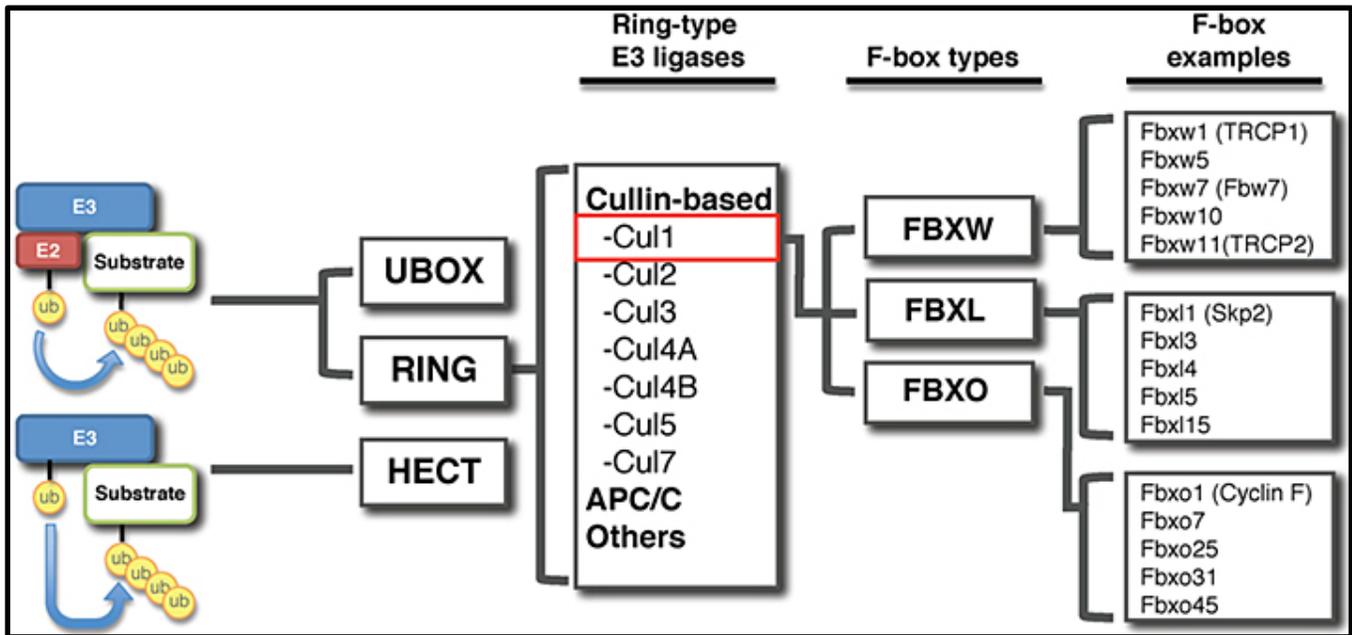


Figure 1.3 Illustration de plusieurs familles de E3 ligases. Les E3 sont principalement divisées en 3 classes majeurs : les E3 de type U-BOX, les E3 de type RING et les E3 de type HECT. Les E3 de type U-BOX et RING lient à la fois la E2 et le substrat pour assurer le transfert de l'ubiquitine. Tandis que les HECT transfèrent l'ubiquitine de la E2 vers eux avant de la transférer au substrat. Par ailleurs, les E3 de types RING sont d'avantage divisées en sous familles comme celles appartenant à la sous famille Culline, APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) et d'autres. La sous famille E3 de type RING Culline 1 nécessite des protéines reconnaissant les substrats nommées les protéines F-BOX. Ces dernières sont également divisées en 3 groupes: les protéines FBXW contenant des répétitions WD40, les FBXL riches en répétition leucine et les FBXO contenant d'autres domaines d'interactions (Modifiée de Front Biosci (Landmark Ed). 2012;17:2197-212.) (8).

La réaction d'ubiquitination peut se produire plusieurs fois de suite et former une chaîne d'ubiquitine. C'est ce qu'on appelle une poly-ubiquitination. En effet, une protéine peut être ubiquitinée de différentes façons : (i) Par une mono-ubiquitination dans laquelle une seule ubiquitine lie la protéine.

(ii) Par une multi-ubiquitination dans laquelle de multiples ubiquitines se lient à la protéine à différents résidus lysine. (iii) Par une poly-ubiquitination dans laquelle une chaîne de poly-ubiquitine se lie à la protéine (Figure 1.4) (5, 12).

Le type d'ubiquitination qu'a subi la protéine détermine le destin et les futures fonctions de la protéine. C'est entre autres ce qu'on appelle le code de l'ubiquitine (Figure 1.4). Chaque type d'ubiquitination possède une signification dans la cellule. Par exemple, la mono-ubiquitination semble être impliquée dans divers processus cellulaires notamment l'endocytose, la régulation des histones, la réparation de l'ADN ainsi que le transport des protéines. La multi-mono-ubiquitination est également impliquée dans l'endocytose, tandis que la poly-ubiquitination sur la lysine 48 (K48) est bien caractérisée par son rôle qui consiste à cibler les protéines vers la dégradation protéique par le protéasome 26S. Cette chaîne est reconnue par le protéasome et permet la dégradation de la protéine cible. Ceci dit, une protéine doit avoir une chaîne composée d'au moins quatre ubiquitines pour que celle-ci soit reconnue par le protéasome et dégradée. La poly-ubiquitination sur la lysine 63 (K63) est impliquée dans la réparation de l'ADN et l'endocytose principalement (12-14).

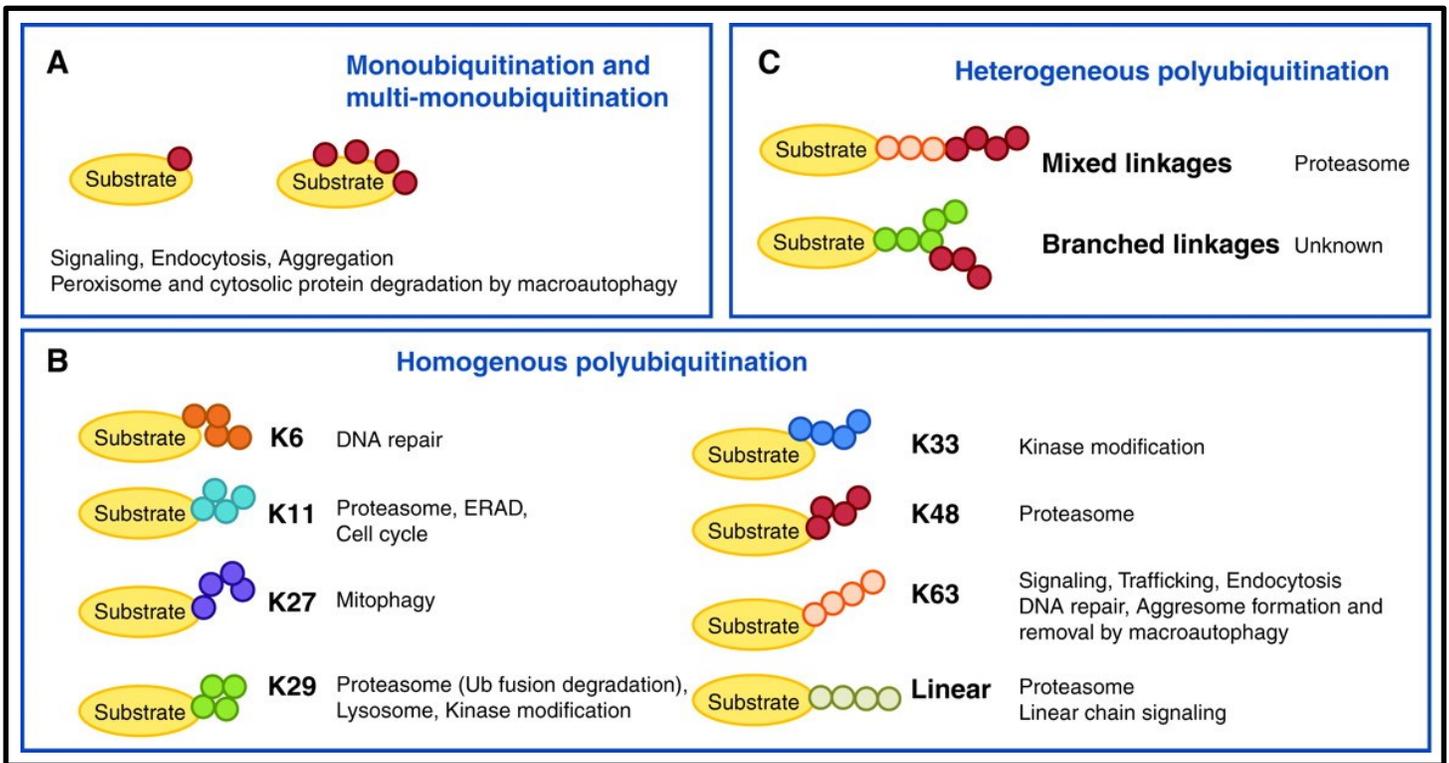


Figure 1.4 Le code de l'ubiquitine. Une molécule d'ubiquitine peut ubiquitiner sa protéine cible de différentes façons. En effet, par une mono-ubiquitination dans laquelle une seule ubiquitine lie la protéine ou par une multi-ubiquitination dans laquelle de multiples ubiquitines se lient à la protéine (A). Elle peut également former une poly-ubiquitination dans laquelle une chaîne de poly-ubiquitine se lie à la protéine (B et C) (Modifiée de Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(12):a006734.) (15).

1.2 Déubiquitination

L'ubiquitination, est une réaction réversible, et le détachement de l'ubiquitine est assuré par des enzymes appelées des déubiquitinases (DUBs). La balance entre l'ubiquitination et la déubiquitination contrôle le niveau et les fonctions des protéines cibles. Ainsi ce système arrive à réguler l'homéostasie de la cellule (16). Pour l'instant, 100 DUBs ont été identifiées chez l'humain. Ces dernières sont divisées en

8 familles: les USP (Ubiquitin-Specific Proteases), les UCH (Ubiquitin C-terminal Hydrolases), les OTU (Ovarian Tumor Proteases), MJD (Machado-Joseph disease protein domain proteases), les JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metallopeptidases), les MCPIP (Monocyte chemotactic protein-induced proteins) (17, 18) et récemment découvertes la famille MINDY en 2016 (19) et ZUFSP en 2018 (20). La plupart des sous-familles sont des protéases à cystéine également nommées protéases à thiol sauf une famille qui sont constituées de métalloprotéases (3, 12, 21). En effet, la familles JAMM constituent l'exception et appartient à la classe catalytique des métalloprotéases (22).

Par ailleurs seule 7 membres des 14 déubiquitinases de la famille JAMM possèdent un motif JAMM fonctionnel liant l'ion Zn^{2+} . À partir de ces 7 déubiquitinases 6 d'entre elles possèdent une activité peptidase connu (PSMD14, MYSM1, BRCC36, CSN5, AMSH et AMSH-LP) (Figure 1.5) (23).

Les DUBs possèdent trois fonctions principales : (i) La maturation de l'ubiquitine à partir de précurseur d'ubiquitine inactif, (ii) Le retrait de chaîne d'ubiquitine des protéines modifiées afin de prévenir la dégradation protéique par le protéasome. (iii) Le remodelage et le désassemblage de chaînes d'ubiquitine (24).

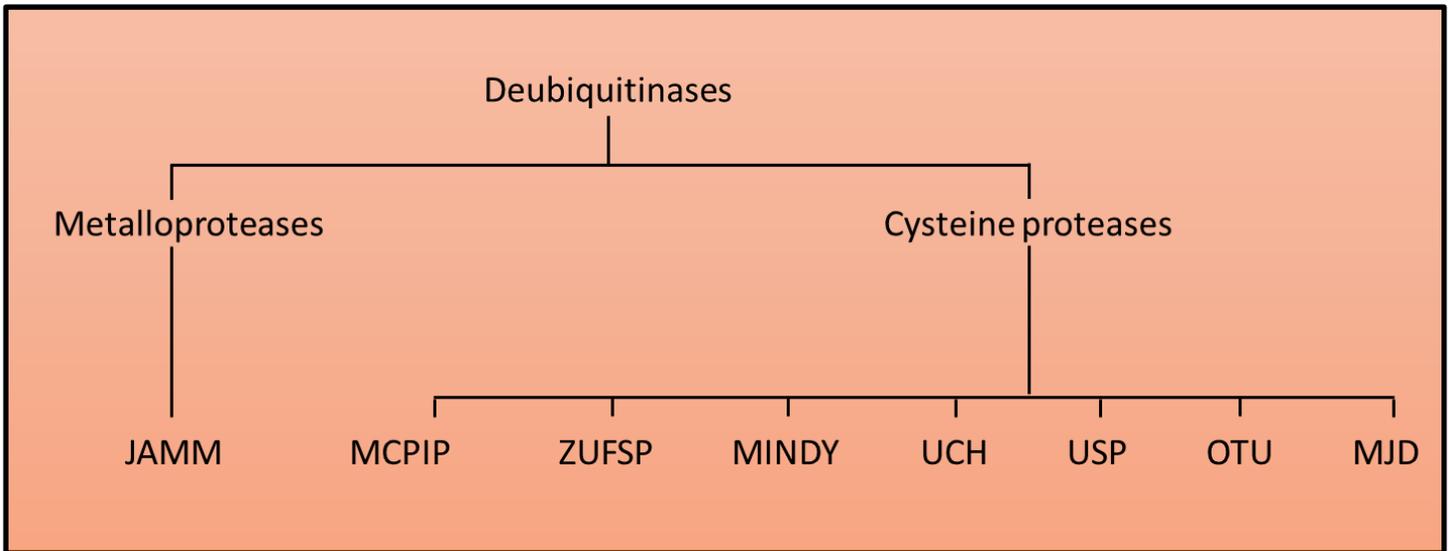


Figure 1.5 Les différentes familles de déubiquitinases. Jusqu'à ce jour, 8 familles de déubiquitinases ont été découvertes. On distingue d'abord les protéases à cystéine aussi nommées protéases à thiol dont les familles MCPIP, ZUFSP, MINDY, UCH, USP, OTU et MJD. Puis la famille JAMM faisant partie des métalloprotéases nécessitant l'ion zinc.

1.3 Protéasome

Le protéasome 26S (PM 2400 kDa) est un complexe multi-protéique composé de plusieurs sous-unités (Figure 1.6). Il est constitué d'un cœur catalytique 20S au centre et de deux complexes régulateurs 19S (PM 700 kDa) présents chacun aux deux extrémités du complexe catalytique 20S (7). Le protéasome est présent dans le noyau et le cytoplasme des cellules eucaryotes (25). La fonction principale du protéasome est de dégrader les protéines. Les protéines dégradées par ce dernier peuvent faire partie des régulateurs du cycle cellulaire, des facteurs anti-apoptotiques, des molécules de signalisation cellulaire, des facteurs de transcriptions, des molécules inhibitrices ou activatrices etc. (Tableau I). La dérégulation de la dégradation de ces protéines peut produire des effets létaux sur les cellules et particulièrement dans

des cellules cancéreuses dont la prolifération est rapide. En effet, les cellules cancéreuses nécessitent une grande synthèse protéique ainsi qu'une mitose non contrôlée (26).

Protein	Function	Associated Disease	% Disorder
p21 ^{cip1}	Cell cycle regulator	Cancer	57
p21 ^{kip1}	Cell cycle regulator	Cancer	98
p33	Tumor suppressor	Cancer	77
p53	Tumor suppressor	Cancer	62
p63	Tumor suppressor	Cancer	51
p73	Tumor suppressor	Cancer	33
Rb	Tumor suppressor	Cancer	35
BIM _{EL}	Pro-apoptotic protein	Cancer	38
MCL-1	Anti-apoptotic protein	Cancer	30
c-Fos	Transcription factor	Cancer	33
IκBα	NF-κB inhibitor	Cancer	43
ODC	Biosynthesis of polyamines	Cancer	15
HIF-1α	Transcription factor	Cancer	55
C/EBPα	Transcription factor	Myeloproliferative disease	40
PGC-1α	Transcription co-activator	Neurological disorders	96
tau	Neuronal protein, stabilizes microtubules	Alzheimer's	80
α-synuclein	Presynaptic neuronal protein	Parkinson's	31

Tableau I. Protéines substrats du protéasome 20S. La dérégulation de la dégradation de ces protéines clés dans la cellule peut mener au développement de plusieurs cancers (Modifiée de Biomolécules. 2014;4(3):862-84) (27).

Le complexe 20S est formé de deux anneaux identiques β au centre auxquels se superposent deux anneaux identiques α . Ces quatre sous-unités, en forme d'anneau, se lient et forment ensemble le complexe 20S « $\alpha \beta \beta \alpha$ » du protéasome. Chaque anneau α ou β est lui-même constitué de 7 sous-unités différentes. Ces dernières sont nommées $\alpha 1$ à $\alpha 7$ ou $\beta 1$ à $\beta 7$. Chez les bactéries et les archaebactéries on ne retrouve qu'un seul variant de la sous-unité α et β (28). Au sein de ces sous-unités, ce sont principalement les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ des deux anneaux identiques β qui présentent des activités protéolytiques. En effet, elles présentent des spécificités de coupures différentes. La sous-unité $\beta 1$ effectue des coupures de types caspase après les acides aminés acides (aspartate). Tandis que la sous-unité $\beta 2$ effectue des coupures de type trypsine après les acides aminés basiques (arginine et lysine). Alors que la sous-unité $\beta 5$ effectue des coupures de type chymotrypsine après les acides aminés hydrophobiques (glycine, alanine, valine, leucine et l'isoleucine) ou acides aminés aromatique (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) (7, 29-31).

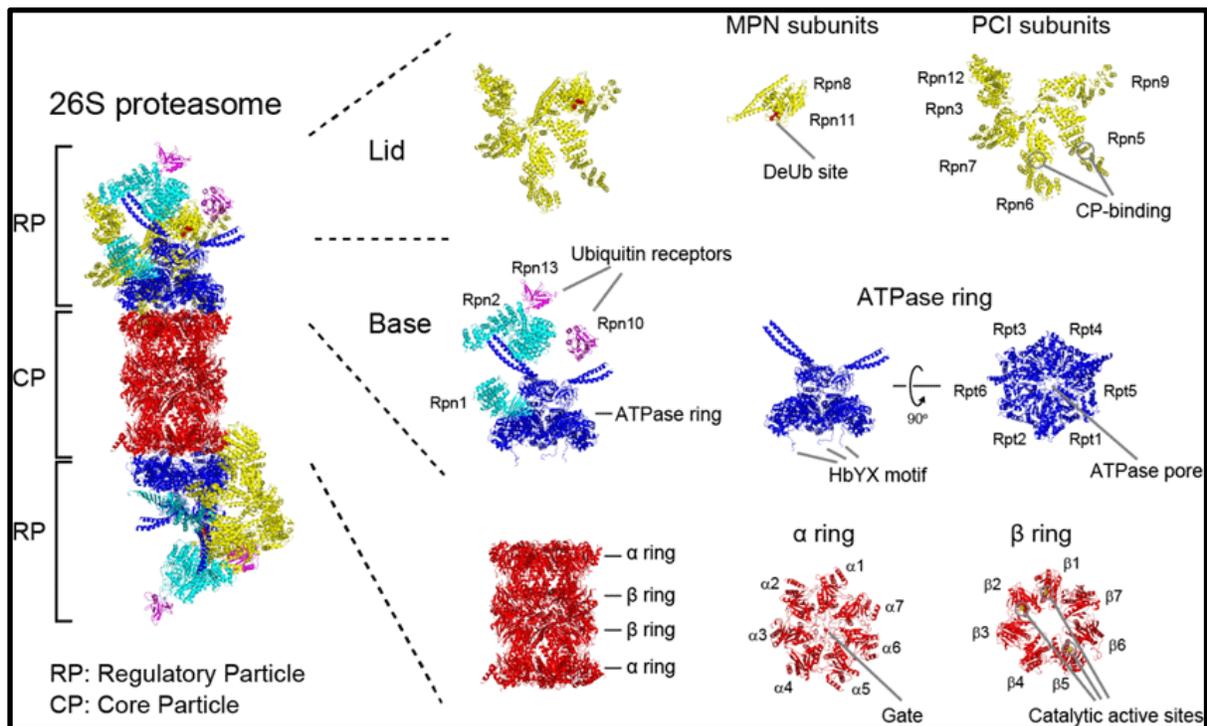


Figure 1.6 Le protéasome 26S. Voici un model représentatif du protéasome 26S. Ce dernier est constitué d'un complexe catalytique (CP) et de deux complexes régulateurs (RP). Chaque complexe est

bien évidemment formé de plusieurs sous-unités (Modifiée de Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. 2017) (32).

Les deux complexes régulateurs 19S liés aux deux extrémités du cœur catalytique 20S sont constitués chacun d'une base et d'un couvercle. Ce dernier est constitué de 9 sous-unités non-ATPasique contenant des protéines déubiquitinases (PSMD14, USP14 et UCH37). Ces dernières ont pour rôle la reconnaissance des chaînes de poly-ubiquitine fixées sur des protéines destinées à la dégradation. Ce couvercle lie ces chaînes par ces deux récepteurs à ubiquitine S5A et ADRM1 et les détache principalement des protéines par la déubiquitinase associée au protéasome PSMD14. En ce qui concerne la base des complexes régulateurs, elle est constituée de 9 sous-unités dont 6 possèdent une activité ATPasique. La base est responsable du dépliement des protéines. Elle favorise leur entrée dans le cœur catalytique 20S et assure la liaison avec la sous unité catalytique (Tableau II) (7, 29-31).

On retrouve trois déubiquitinases au sein de la sous-unité régulatrice du protéasome PSMD14, USP14, et UCH37 qui appartiennent à différentes familles. PSMD14 est une métalloprotéase contenant le domaine JAB1/MPM/Mov34 (JAMM). Alors qu'USP14 fait partie des protéases spécifiques à l'ubiquitine (USP) et qu'UCH37 appartient aux hydrolases à ubiquitine avec un domaine hydrolase C-terminal de l'ubiquitine (UCH), PSMD14 constitue une sous-unité entière du complexe régulateur du protéasome 19S. Tandis que USP14 et UCH37 sont des protéases associées au complexe régulateur 19S (33).

Il a été reporté que des mutations de gène codant PSMD14, USP14 et UCH37 entraînent la formation de protéines non fonctionnelles, avec des effets délétères chez les levures et les souris (34-36). En effet, des mutations ponctuelles de substitution d'acide aminé du domaine MPN+ de PSMD14 chez la levure ont produit des mutants présentant une diminution de la prolifération, une sensibilité à la température, une sensibilité aux analogues d'acide aminé et à la protéolyse dépendante du protéasome

(34). D'autres études ont également trouvé que chez les souris atteintes d'ataxie (ax^J/ax^J), une insertion de 5,2 kb (particule intracisternale A) dans l'intron 5 d'USP14 a été identifiée. Cette mutation altère l'expression de USP14 et a été liée aux désordres de transmission synaptique dans le système nerveux central et périphérique des souris ax^J (35). Par ailleurs, il a été reporté par Al-Shami A en 2010 qu'une déplétion complète de UCH37 dans un modèle murin a engendré une létalité prénatale associée avec des défauts dans le développement du cerveau embryonnaire (36).

Dans le protéasome 26S, PSMD14 est responsable d'enlever les chaînes de poly-ubiquitine des protéines cibles. En parallèle, UCH37 et USP14 raccourcissent les longues chaînes de poly-ubiquitine relâchées par PSMD14 et permettent ainsi de recycler les molécules d'ubiquitines en les libérant.

Sous-complexe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>	Fonction
Base	Rpn1	PSMD2/S2	Ubp6 et Ubiquitine/lie l'UBL
	Rpn2	PSMD1/S1	Structurale
	Rpn13	ADRM1	Ubiquitine / lie l'UBL
	Rpt1	PSMC2/S7	ATPase
	Rpt2	PSMC1/S1	ATPase
	Rpt3	PSMC4/S6	ATPase
	Rpt4	PSMC6/S10	ATPase
	Rpt5	PSMC3/S6a	ATPase
	Rpt6	PSMC5/S8	ATPase
Couvercle	Rpn3	PSMD3/S3	Structurale
	Rpn5	PSMD12	Structurale
	Rpn6	PSMD11/S9	Structurale
	Rpn7	PSMD6/S10	Structurale
	Rpn8	PSMD7/S12	Structurale
	Rpn9	PSMD13/S11	Structurale
	Rpn11	PSMD14/Poh1/Pad1	Déubiquitinase
	Rpn12	PSMD8/S14	Structurale
	Sem1	PSMD9/Dss1/Rpn15	Structurale
Cofacteur Additionnel	Rpn10	PSMD4/S5a	Ubiquitine/ lie l'UBL
DUBs Associées	Ubp6	Usp14	Déubiquitinase
	ND	Uch37	Déubiquitinase

Abréviations: DUB, déubiquitinase; ND: non disponible; UBL, protéine similaire à l'ubiquitine (ubiquitin-like).

Tableau II. Les sous unités du protéasome 26S. Voici l'ensemble des noms et fonctions des sous unités du protéasome (Modifiée de Annu Rev Biochem. 2018) (37).

1.4 Protéasome et son implication dans le cancer

Le dysfonctionnement du SUP est associé à différents types de cancers. Plusieurs travaux visant ce système permettent de mieux le comprendre. Ces recherches ont notamment permis de comprendre que le SUP est essentiel au maintien de l'homéostasie de la cellule. La dérégulation de la dégradation protéique joue un rôle primordial dans la survie, la croissance cellulaire ainsi que le développement des cancers humains (38, 39). Il a été reporté que les niveaux d'ARN messagers (ARNm) codant pour les différents composants du protéasome sont augmentés considérablement dans plusieurs lignées de cellules hématopoïétiques malignes cancéreuses vis-à-vis des cellules issues de personnes normales (26). Il a également été reporté qu'une augmentation du niveau d'activité des protéasomes a été associée avec divers types de cancers dont celui du colon (40), de la prostate (41) et de la leucémie (26). Les cellules tumorales semblent être plus dépendantes au protéasome et donc plus sensibles à son arrêt de fonctionnalité que les cellules non tumorales (42, 43). Plusieurs études ont démontré qu'en inhibant le protéasome par des inhibiteurs chimiques, une dérégulation de la balance des protéines anti et pro-tumorales est créée. Celle-ci s'accompagne d'une accumulation de protéines suppresseurs de tumeurs causant un arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose (41, 44, 45). Il a aussi été démontré que dans certaines tumeurs, l'inhibition du protéasome entraîne un plus grand effet apoptotique que des agents cytotoxiques utilisés de nos jours (46, 47). Ceci démontre que l'inhibition du protéasome présente une stratégie thérapeutique permettant de surmonter l'acquisition de résistance des cellules cancéreuses face aux agents cytotoxiques anti-tumorales notamment en augmentant la chimiosensibilité des cellules résistantes (48).

1.5 Immunoprotéasome

Il existe par ailleurs d'autres types de protéasomes dont l'immunoprotéasome 20Si (Figure 1.7-1.8). Ce dernier, est constitué de variants différents de sous-unité par rapport à celles présentes dans le complexe catalytique du protéasome 20S, en particulier $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$ (49, 50). Il a été démontré qu'une stimulation par les cytokines, par le facteur nécrotique α et par l'interferon- γ entraîne une augmentation de l'expression des sous-unités $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$ afin de former la sous-unité catalytique 20S de l'immunoprotéasome. Ce dernier se lie par ses deux extrémités à deux complexes 11S au lieu des complexes 19S (Figure 1.9) (51). Par ailleurs, il a été reporté que l'immunoprotéasome joue un rôle dans la fabrication des antigènes au sein de la réponse immunitaire notamment en produisant des peptides immunogénique (49, 50). Face au protéasome 20S, l'immunoprotéasome possède une plus grande activité catalytique de type trypsine et chymotrypsine, mais une plus faible activité de type caspase. Ces propriétés enzymatiques que possède l'immunoprotéasome lui permettent de former des peptides qui peuvent se lier au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I qui permet la présentation des antigènes (52, 53). Par ailleurs, il a été démontré qu'il y a une augmentation de l'expression de l'immunoprotéasome dans le myélome multiple. Le bortézomib qui sera détaillé dans les sections suivantes inhibent également l'immunoprotéasome mais à un degré plus faible que le protéasome 20S normal (54, 55). De plus, il a été démontré que l'immunoprotéasome joue un rôle dans la résistance au bortézomib (56).

Jouant un grand rôle au sein de la cellule et particulièrement vital pour les cellules cancéreuses, le protéasome présente une cible unique. En effet, de nombreux groupes de recherche essayent de découvrir de nouvelles cibles du SUP permettant de surmonter la résistance acquise par les cellules cancéreuses du myélome multiple et d'autres cancers hématologiques face aux inhibiteurs de protéasome actuels. De nos jours, les principales stratégies utilisées consistent à : (i) Cibler l'immunoprotéasome. (ii) Cibler les

ubiquitines E3 ligases. (iii) Cibler la sous-unité régulatrice 19S. (vi) Cibler les déubiquitinasés associées à la sous-unité régulatrice et développer de nouvelles thérapies combinatoires.

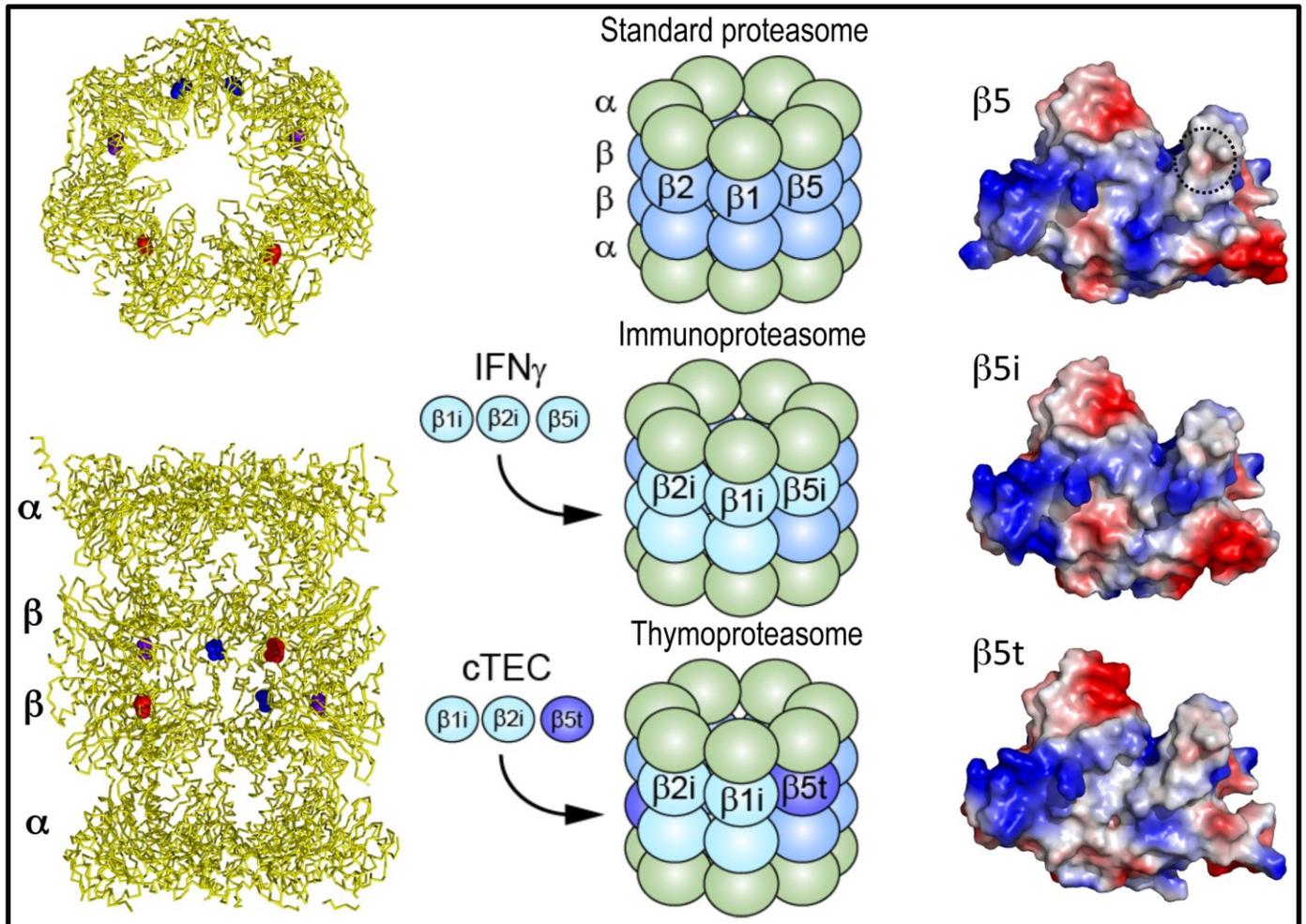


Figure 1.7 Les différents types de protéasomes. Le protéasome a acquis au cours de l'évolution chez les vertébrés une diversité au niveau de ses sous unités catalytiques β . En effet, chez les vertébrés on a à ce jour identifier deux complexes 20S spécifique: l'immunoprotéasome et le thymoprotéasome. L'immunoprotéasome possède des sous unités $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$ à la place de $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ permettant d'augmenter la production des ligands du complexe CMH. En ce qui concerne le thymoprotéasome, il possède des sous unités $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5t$ à la place de $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ et joue un rôle dans la sélection positive

des cellules T CD8+ (Modifiée de Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. 2017 et Keio J Med. 2013) (32, 57).

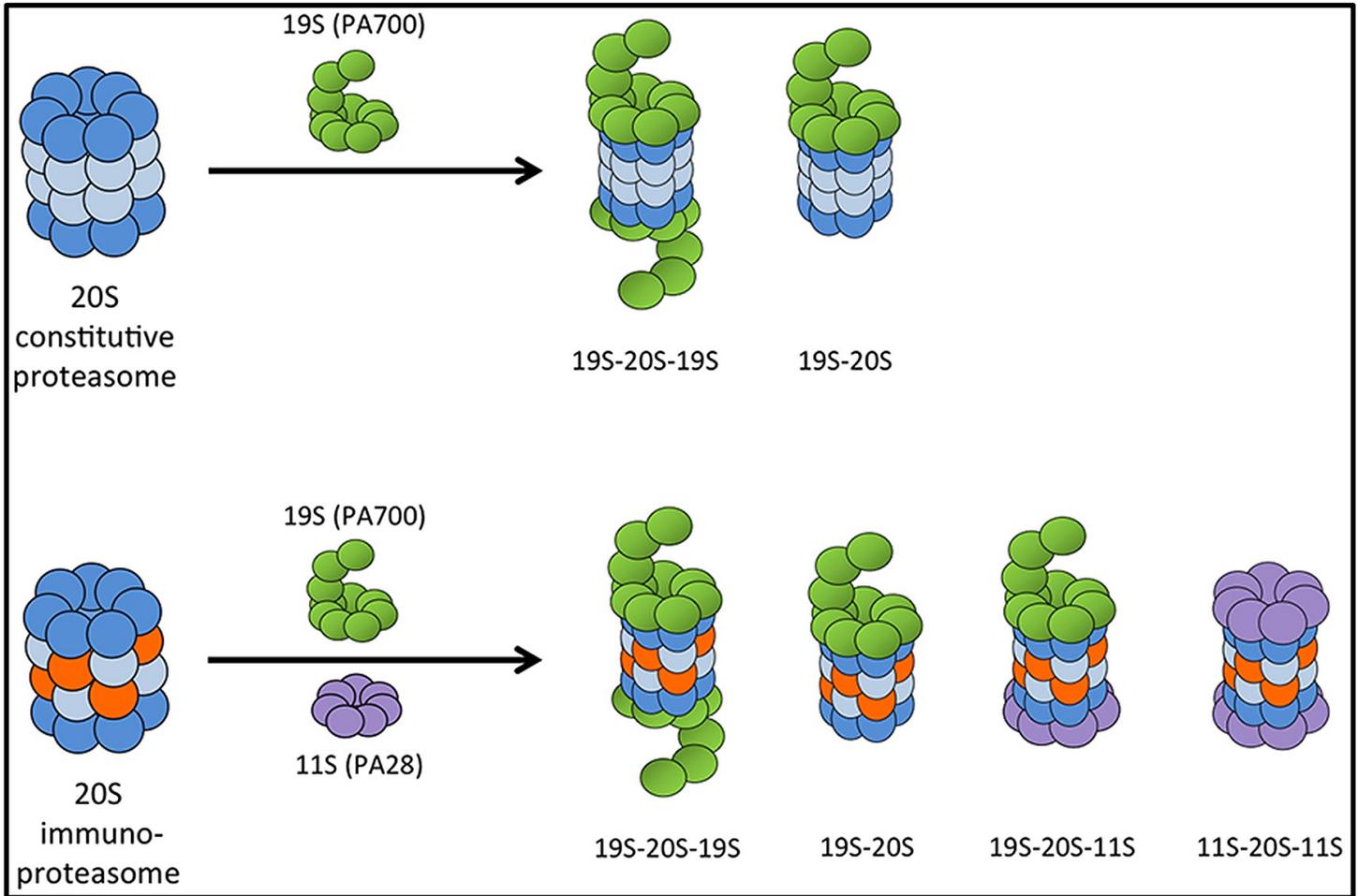


Figure 1.8 Les différentes combinaisons de protéasomes possibles. Le protéasome 20S peut s'associer avec un seul ou deux complexes régulateurs 19S. Lorsqu'il se lie avec deux complexes régulateurs 19S il forme ce qu'on appelle le protéasome 26S. L'immunoprotéasome 20S quant à lui peut s'associer également au complexe régulateur 19S ou 11S (Modifiée de Front Microbiol. 2015) (58).

1.6 Thérapie innovante contre le cancer: inhibition du protéasome

Les inhibiteurs du protéasome ont d'abord été utilisés pour mieux comprendre le fonctionnement du protéasome avant de trouver qu'ils représentent un potentiel intéressant en tant que molécules à effet thérapeutique anticancéreux. Durant la dernière décennie, une nouvelle stratégie thérapeutique a émergé. Cette dernière consiste à inhiber le protéasome afin de traiter les personnes atteintes de myélome multiple (cancer des plasmocytes ou les lymphocytes B) et de lymphome (lymphome non hodgkinien qui touche les lymphocytes en général) (38, 59, 60). Les cellules cancéreuses du myélome multiple sont des cellules prolifératives qui produisent d'énormes quantités de protéines défectueuses nécessitant d'être dégradées par le protéasome (61).

Cette énorme quantité de protéines produite par le cancer du myélome multiple le rend une cible intéressante pour les inhibiteurs de protéasome. Puisque le protéasome est responsable de la dégradation plus de 80% des protéines intracellulaire des cellules de mammifère (62). Contrairement à d'autres cancers, le myélome multiple se distingue par sa production élevée de protéines. Cette caractéristique rend le myélome multiple plus sensible aux inhibiteurs de protéasome contrairement à d'autres types de cancer. De plus, il est important de noter que les inhibiteurs de protéasome tuent également les cellules humaines normales et saines. Cependant, grâce à une fenêtre thérapeutique les scientifiques ont démontré qu'il est possible de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et non les cellules normales. Ce concept de fenêtre thérapeutique se base sur une dose létale pour les cellules cancéreuses mais non létale pour les cellules normales.

Le myélome multiple est un cancer malin de cellules néoplasiques nommées plasmocytes (lymphocyte B activé) qui se développent dans la moelle osseuse. Il est caractérisé par la présence d'immunoglobuline monoclonale dans le sang et l'urine appelé des protéines-M (63). Ce cancer est souvent accompagné avec des effets secondaires, entre autres lésions de l'os, déficit rénale, hypercalcémie

et anémie (64). En déséquilibrant le remodelage de l'os, le myélome multiple induit des altérations osseuses. Chez les patients atteints de ce type de cancer, on distingue une augmentation de la formation d'ostéoclastes et une diminution de la formation d'ostéoblastes. Les cellules du myélome sécrètent un facteur activateur des ostéoclastes, le RANKL, qui permet d'activer le récepteur RANK présent à la surface des ostéoclastes. Ce dernier active le facteur nucléaire kappa B favorisant ainsi l'activation des ostéoclastes et donc la résorption osseuse. Par ailleurs, les plasmocytes malins catabolisent l'ostéoprotégérine qui se lie au récepteur de RANKL et le neutralise. De plus, les cellules malignes du myélome sécrètent une cytokine DKK1 qui inhibe les ostéoblastes. Ainsi, ce déséquilibre entre différents facteurs impliqués dans le remodelage osseux aboutit à des lésions osseuses chez les patients atteints de myélome multiple (65). Le myélome multiple est le second cancer hématologique malin le plus répandu. Il représente 13% des cancers hématologiques et 1% de tous les cancers (66). Il a été démontré que le microenvironnement de la moelle osseuse joue un rôle dans la survie et le développement du myélome multiple (63).

Le lymphome est un cancer qui touche le système lymphocytaire. Dans ce type de cancers, on assiste à la prolifération non contrôlée de cellules lymphoïdes, les lymphocytes. Il existe deux types de lymphomes : le lymphome hodgkinien et le lymphome non-hodgkinien. Le lymphome hodgkinien se caractérise par la présence de cellules anormales lymphoïdes qui se regroupent et forment un granulome hodgkinien. Aussi, le lymphome se caractérise généralement par la présence de cellules volumineuses, appelées des cellules de Steinberg. Inversement dans le lymphome non-hodgkinien on ne retrouve pas de granulome hodgkinien ni de cellules de Steinberg. Le bortézomib agit sur les lymphomes non-hodgkinien (38, 59, 60).

Tous ces cancers décrit ci-dessus font partie des cancers du sang, des leucémies. En 2003, l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration « FDA ») a

approuvée le premier inhibiteur du protéasome: le bortézomib (Figure 1.9) (39). Aussi appelé Velcade et Cytomib par les compagnies biopharmaceutiques Millennium Pharmaceuticals et Venus Remedies respectivement. Agissant comme un agent antinéoplasique, la thérapie à base de bortézomib est devenue un traitement contre le myélome multiple à tous les stades de son développement. Il est également utilisé contre le lymphome non-hodgkinien. Cette thérapie innovante a permis d'accroître de façon significative le taux de survie des patients atteints du myélome multiple et du lymphome non-hodgkinien (67). Le succès qu'a connu cet inhibiteur du protéasome notamment dans le cadre de ces deux types de cancers, démontre l'importance du système ubiquitine-protéasome dans le traitement du cancer.

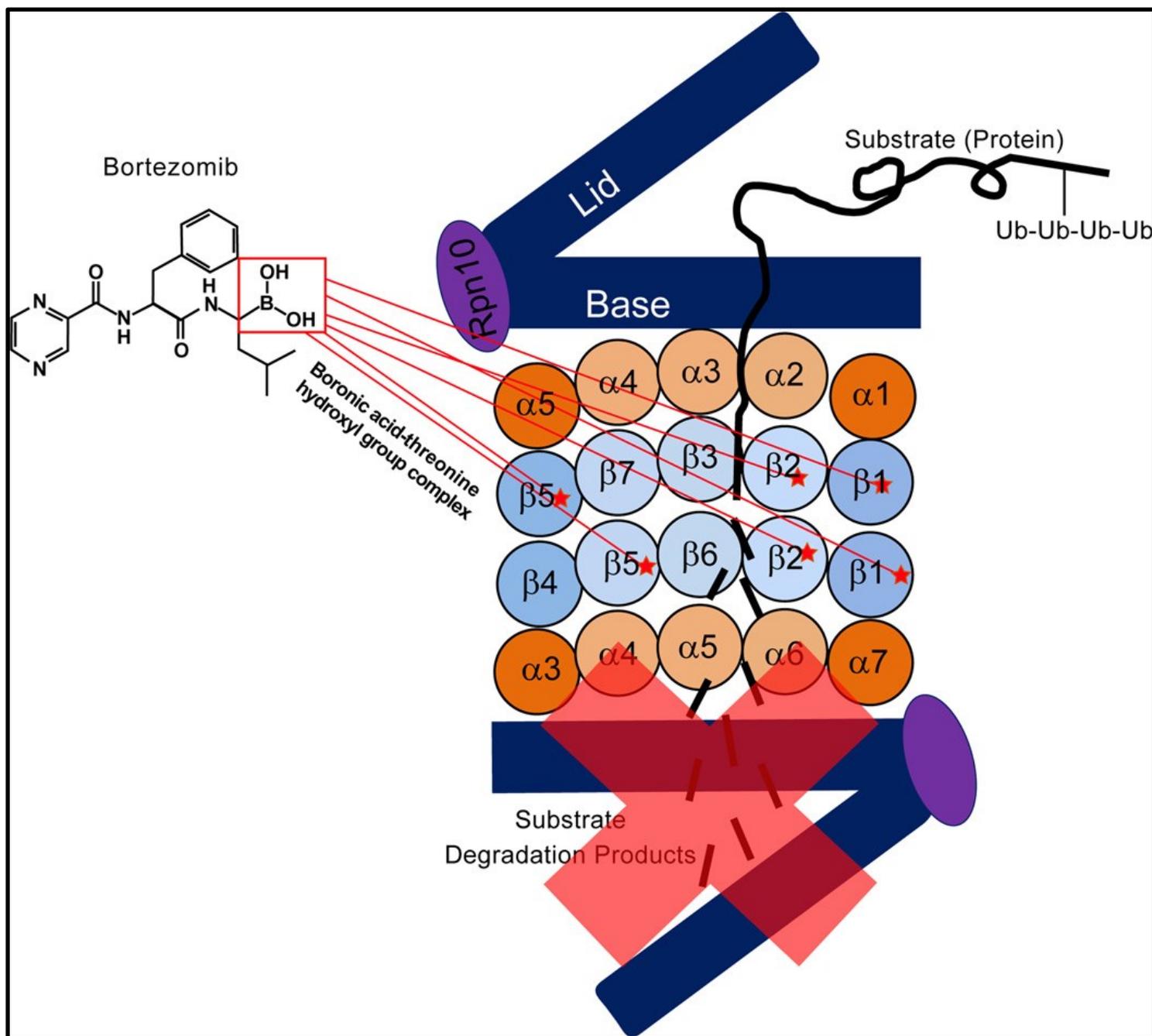


Figure 1.9 Mécanismes d'action du bortézomib. Le bortézomib se lie avec le site actif thréonine hydroxyle de la sous-unité $\beta 5$ ce qui bloque l'activité protéolytique de type chymotrypsine du complexe catalytique du protéasome 20S. Il se lie aussi à la sous-unité $\beta 1$ et $\beta 2$ mais avec une faible affinité (Modifiée de Therapeutic Drugs. J Clin Cell Immunol. 2012) (68).

1.7 Avantages et inconvénients de la chimiothérapie à base de bortézomib

Le bortézomib est un peptide dérivé des acides boroniques. Il est composé, allant de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, d'un acide pyrazinoic, d'une phenylalanine, d'une leucine suivie d'un acide boronique. Il a été produit en 1995 par Myogenics, il était nommé MG-341 au début. Puis, par la suite il a été renommé PS-341. Le produit a fini par être acheté en 1999 par Millennium Pharmaceuticals qui l'a renommé bortézomib. Son nom chimique est [3-méthyl-1-(3-phényl-2-pyrazin-2-ylcarbonylamino-propanoyl) amino-butyl] acide boronique et sa formule chimique étant $C_{19}H_{25}BN_4O_4$. Le bortézomib est un inhibiteur réversible du protéasome 20S. L'acide boronique du bortézomib se lie avec le site actif thréonine hydroxyle de la sous-unité $\beta 5$ ce qui bloque l'activité protéolytique de type chymotrypsine du complexe catalytique du protéasome 20S. Il se lie aussi à la sous-unité $\beta 1$ et $\beta 2$ mais avec une faible affinité (Figure 1.11) (38, 39). Entraînant l'arrêt du fonctionnement du protéasome, le bortézomib finit par déclencher l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose dans les cellules cancéreuses, notamment en affectant la voie NF-Kb (38, 69) et la balance des protéines pro- et anti-inflammatoire (70, 71). Il a été reporté qu'il induit l'apoptose en activant p53 qui dépend de la surexpression de Noxa (70-72). Toutefois, les effets cytotoxiques du bortézomib peuvent être contournés à travers l'induction de mécanismes de survie impliquant la surexpression de Akt (73), la réponse au stress par le réticulum endoplasmique, la réponse de déroulement des protéines, la dégradation des protéines mal repliées par les aggrésomes médiées par l'histone déacetylase (HDAC) et l'autophagie (74, 75). Sur le plan pharmacocinétique, le bortézomib atteint de plus grandes concentrations dans le plasma lorsqu'il est administré de manière intraveineuse que sous-cutané. Il possède une demi-vie de plus de 40 heures (76).

Cette percée créée par le système d'action du bortézomib représente une innovation dans la lutte contre le cancer. Depuis, la découverte de son mécanisme d'action une nouvelle voie a été ouverte pour la recherche ciblant le système ubiquitine-protéasome afin de traiter le myélome multiple ainsi que

d'autres types de cancers. Depuis sa validation par la FDA, le bortézomib a prouvé qu'en ciblant le SUP on peut espérer traiter certains types de cancers humains. En effet, depuis son arrivé sur le marché, le taux de survie des patients atteints de myélome multiple en particulier a augmenté de 2 à 3 fois (77). Outre son effet sur les cellules cancéreuses, il a été reporté qu'il favorise la formation des os par des mécanismes mal compris (78). Les effets anti-tumoraux du bortézomib ont été attribué à l'altération de l'activité du facteur de transcription NF-kB (qui joue un rôle essentiel dans la croissance, la survie et la chimiorésistance en régulant l'expression de IL-6 et IGF-1) (69, 79, 80), à l'accumulation de protéines du cycle cellulaire (81), à un déséquilibre de la balance entre les protéines pro- et anti-apoptotiques (82, 83), à la stimulation du stress du réticulum endoplasmique (84) et à la détérioration des voies de réparation de l'ADN (85). En conditions normales, le facteur NF-Kb est séquestré dans le cytoplasme et inactivé par Ikb qui le lie. Lorsque la cellule est soumise à un stress, Ikb est poly-ubiquitiné et dégradé par le protéasome, ce qui libère NF-kB et le rend actif. Ce dernier entre dans le noyau et favorise la survie cellulaire en activant la transcription de divers gènes dont les gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, cIAP1 et cIAP2) (86-88).

Toutefois, bien qu'étant une molécule antinéoplasique aux diverses vertus, le traitement au bortézomib est associé avec des complications. En effet, certains patients traités par ce médicament ne répondent pas ou ne réagissent pas de manière optimale. On observe également des rechutes chez les patients qui répondent au traitement de ce médicament. Malgré l'espoir qu'a fourni le bortézomib, la plupart des patients atteints du myélome multiple présentent une rechute face au traitement et meurent. De plus, il a aussi été observé qu'il provoque des neuropathies périphériques, de la fatigue, des effets gastro-intestinaux et de la cytopénie. La neuropathie touche les neurones qui transportent les flux nerveux ou l'information au système nerveux central. Elle touche 37 à 44% des patients traités (89). De plus, ce médicament provoque une thrombopénie dans un tiers des patients traités (90).

Le mécanisme de résistance développé par les cellules cancéreuses des patients traités par le bortézomib n'est pas très bien compris. Sur la base d'études effectuées sur des cellules, les chercheurs ont émis plusieurs hypothèses qui tentent d'élucider les différents mécanismes développés par les cellules cancéreuses présentant une résistance au bortézomib: (i) l'apparition de mutations ou une surexpression de la sous-unité $\beta 5$ à laquelle se lie le bortézomib principalement (91, 92), (ii) une surexpression ou une activation des effecteurs en aval (Bcl-2 (93) et NF-kB (94)), (iii) la diminution des niveaux des protéines pro-apoptotique et l'augmentation des niveaux des protéines anti-apoptotique (Bcl-2, Akt, MKP-1) (74), (iv) l'altération de la synthèse des protéines, le traitement et le transport par une grande sécrétion de protéine chaperonne GRP-78 (réponse aux protéines dépliées), une surexpression des protéines de choc thermique, la phosphorylation de eIF2 α par la kinase régulatrice de l'inhibiteur hème ou encore par l'induction d'autophagie (74, 95, 96). Ceci dit sur le plan clinique on ne connaît toujours pas l'importance de chacun des mécanismes chez les patients.

Cependant, le bortézomib a mis en valeur l'importance du système ubiquitine-protéasome comme cible thérapeutique pour le traitement du myélome multiple. Ceci montre l'urgence et le besoin de chercher de nouvelles composantes du protéasome, comme cibles pour développer de nouveaux traitements contre le myélome multiple.

1.8 Seconde génération d'inhibiteurs du protéasome

Afin de surmonter cette résistance au bortézomib, les chercheurs se sont dirigés vers la recherche de nouveaux inhibiteurs du protéasome plus efficace et spécifique que le bortézomib. Ainsi, la seconde génération des inhibiteurs du protéasome a commencé à faire son apparition (97). L'idée était de développer des molécules qui possèdent une plus grande capacité d'inhibition du protéasome tout en ayant

une plus grande spécificité afin de réduire les effets hors-cible. La seconde génération d'inhibiteurs incluant le Carfilzomib (approuvé par la FDA en août 2012) qui a par ailleurs montré une activité anticancéreuse chez une minorité de patients atteints de myélome multiple présentant une rechute ou une résistance au bortézomib (97). Il présente également moins de neuropathie périphérique que son prédécesseur (98). D'autres inhibiteurs du protéasome issus de la seconde génération ont apparus dont l'Oprozomib, l'Ixazomib, le Marizomib, l'Ixazomib etc. Ces derniers se caractérisent par des propriétés pharmacologiques différentes et démontrent des activités anticancéreuses chez les patients présentant une résistance au bortézomib (99).

En résumé, la balance entre la synthèse et la dégradation protéique est hautement régulée dans les cellules normales. La plupart des protéines intracellulaires sont dégradées par le système ubiquitine-protéasome. Ce système permet de dégrader 80 à 90% des protéines intracellulaires. Les protéines destinées à la dégradation par le protéasome sont marquées en général par une chaîne de plusieurs ubiquitines. Cette ou ces étiquettes d'ubiquitine permettent au protéasome 26S de reconnaître et de dégrader en peptide les protéines destinées à la dégradation et permet à la cellule de recycler les acides aminés et les molécules d'ubiquitines(29, 30). Ce cercle permanent existant entre synthèse et dégradation protéique dépendante du protéasome doit fonctionner en permanence dans les cellules de mammifères. Le déséquilibre de ce système, en inhibant le protéasome, provoque une accumulation de protéines engendrant un stress protéotoxique induisant une mort cellulaire. Par l'intermédiaire d'une fenêtre thérapeutique dose dépendante, on arrive à cibler d'avantage les cellules cancéreuses à l'encontre des cellules saines. Cela s'explique par la grande charge de protéines produites par les cellules cancéreuses nécessitant leur dégradation.

1.9 Hypothèse et objectifs

Depuis son apparition sur le marché, le bortézomib a permis d'augmenter le taux de survie des patients atteints de myélome multiple et de lymphome non- hodgkinien. Cependant les cellules cancéreuses des patients traités par ce médicament développent une résistance. Ultiment les patients rechutent face au traitement et succombent au cancer. Par conséquent, cette maladie demeure un problème de santé public majeur et oblige un besoin absolu de développer de nouvelles thérapies.

Afin de contourner cette résistance acquise face aux inhibiteurs du protéasome tel que le bortézomib, nous avons décidé d'adopter une nouvelle approche thérapeutique. En effet, notre hypothèse consiste à investiguer d'autres composantes du système ubiquitine protéasome comme les déubiquitinasés et les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine. Nous pensons que les DUB et les E2 sont des cibles thérapeutiques anticancéreuses possibles dont l'inhibition pourrait surpasser la résistance acquise au bortézomib.

Ainsi, nos objectifs étaient les suivants :

1- Faire des cribles pour des DUB et E2 dont l'inhibition surpasses la résistance acquise aux inhibiteurs du protéasome et valider les cibles obtenues en tant que nouvelles cibles candidates pour le traitement du MM et d'autres types de cancers.

2- Rechercher des biomarqueurs potentiels permettant la prédiction de la résistance aux inhibiteurs du protéasome.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Les cellules cancéreuses adhérentes de l'ostéosarcome U2OS, du col de l'utérus HeLa, du côlon HCT 116 et du rein embryonnaire HEK293T sont maintenues dans un milieu riche en glucose DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium # Life Technologies 11995065). Tandis que les cellules cancéreuses en suspension du lymphome Raji, du myélome multiple JJN-3, du myélome RPMI 8226 ainsi que celles du mésothéliome MET5A, NCIH290, yMESO14, WM 3248, H2373, H1187, MSTO211, yMESO45, H1299, SK MEL2, MOLT4 sont maintenues dans un milieu riche en glucose RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium # Life Technologies 11875-093). Ces milieux sont supplémentés avec 5% sérum de veau (new born serum NBS # Thermoscientific SH30541.03) ou 10 % sérum de fœtus de bovin (fetal bovine serum FBS # Wisent 95150), 1 % pénicilline et streptomycine (100 U/ml et 0,1 mg/ml respectivement) et de 1 % glutamine (584 mg/ml). Les cellules sont maintenues en culture à 37 °C avec 5 % CO₂. Par ailleurs, la Figure S6.1A est une représentation schématique expliquant la procédure utilisée pour générer des cellules résistantes au bortézomib.

2.2. Construction et Purification de plasmides

Plasmides: LentiCRISPR-v2 (Addgene; 52961), pRSV-Rev, pMDLg/pRRE, pMD2-VSVG et GFP N3, pENTR-GFP (Voir tableau VI.).

Plasmides de PSMD14: pENTR-myc-PSMD14 WT, pENTR-myc-PSMD14 CD, LentiCRISPR-v2-gARN1-PSMD14, LentiCRISPR-v2-gARN2-PSMD14 et LentiCRISPR-v2-gARN3-PSMD14

Plasmides de UCH37: LentiCRISPR-v2-gARN1-UCH37, LentiCRISPR-v2-gARN2-UCH37 et LentiCRISPR-v2-gARN3-UCH37

Plasmides de USP14: LentiCRISPR-v2-gARN1-USP14, LentiCRISPR-v2-gARN2-USP14 et LentiCRISPR-v2-gARN3-USP14

2.2.1 ARNg

Les séquences d'ARN guide (ARNg) ont été générées à l'aide des séquences des gènes humains des protéines PSMD14, USP14 et UCH37 fournies par le site NCBI. Voici les liens des pages des gènes PSMD14, USP14 et UCH37 utilisées respectivement « <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10213> », « <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9097> » et « <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51377> ». Le programme CHOPCHOP a également été utilisé pour déterminer de façon automatique des séquences d'ARNg « <https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/> ». Le choix de l'ARNg se fait en fonction de l'exon ciblé, du pourcentage GC, des séquences hors cible et finalement de l'efficacité prédite. Par la suite, le site Off-Spotter a été utilisé pour vérifier les séquences du génome reconnu par notre ARNg choisi « <https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter/> ». Cette vérification permet de détecter les effets hors cible de l'ARNg choisi. Finalement le site Reverse Complement a été utilisé pour obtenir la séquence complémentaire de l'ARNg « http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html ». Les gARN utilisés sont présentées dans le tableau V.

2.2.2 Digestion et purification

La digestion du plasmide LENTiv2 (13450 paires de base) avec l'enzyme de restriction *BsmBI* permet de retirer du plasmide une séquence de 2 kb afin d'introduire la séquence d'ADN qui code pour un ARN guide (ARNg) entre les deux sites de restriction créés.

Pour cela une digestion et une déphosphorylation du plasmide LENTiv2 a été réalisée à l'aide de 5 µg de plasmide LENTiv2 (# Addgene plasmid # 52961), 3 µl de FastDigest *BsmBI* (# FD0454), 3 µl de FastAP (# EF0654), 6 µl 10X tampon *FastDigest*, 0.6 µl 100 mM DTT et 42,4 µl d'H₂O pour un volume final de 60 µl. Ce mélange est gardé à 37°C pendant 30 min. Ces plasmides digérés sont déposés sur gel d'agarose 2%. La portion du gel contenant les plasmides est coupée puis solubilisée utilisant la trousse *QIAquick Gel Extraction* (#28704 et 28706) à 50°C pendant 10 min. Ce mélange est ensuite déposé sur une colonne, centrifugé, lavé avec 750 µl de tampon PE et élué avec 50 µl de tampon d'Elution.

2.2.3 Hybridation des séquences d'ADN codant pour un ARNg

Une phosphorylation et une hybridation de la séquence d'ADN sens et non-sens codant pour chaque ARNg utilisé a été fait. Pour ce faire 1 µl de la séquence d'ADN sens (100 µM), 1 µl de la séquence d'ADN non-sens (100 µM), 1 µl du 10X T4 tampon Ligation (# NEB B0202S), 6.5 µl d'H₂O et 0.5 µl de T4 PNK (# NEB M0201S) pour un volume final de 10 µl. Ce mélange est mis dans un thermocycler à 37°C pendant 30 min. Puis à 95°C pendant 5min avant de descendre jusqu'à 25°C en diminuant de 5°C chaque minute. Finalement, les oligonucléotides sont dilués à 1:200 avec de l'eau stérile

2.2.4 Ligation

La réaction de la ligation a été réalisée dans un tube eppendorf contenant 5 µl de tampon Ligase (50 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP et 10 mM DTT), 4 µl du plasmide LentiCRISPRv2 digéré et purifié, 1µl d'ADN (ARNg) voulu et 1 µl de ligase T4 (# NEB M2200S) avant de garder à température ambiante 10 min.

2.2.5 Transformation

Des bactéries de type *E. coli* TOP 10 ont été utilisées pour le clonage des séquences ADNs (ARNg) dans le plasmide LentiCRISPRv2. Pour ce faire, 7,5 µl du mélange de ligation sont ajoutés à 100 µl de cellules compétentes d'*E. coli* TOP 10. Les tubes sont mis sur glace pendant 20 min avant de les placer sur une plaque chauffante à 42 °C pendant 1 minute et 20 secondes. Par la suite, 500 µl de milieu LB (Broth Lennox # 800-060-LG) sont ajoutés et les cellules sont mise dans un incubateur sous agitation à 37°C pendant une heure. Après cette incubation, les échantillons sont centrifugés à 3 500 rpm pendant 5 min afin d'éliminer 600 µl du surnageant. Les cellules concentrées sont mélangées par pipette et étalées sur des boites de pétris contenant agar (# AGR 003.1) supplémenté de l'ampicilline à 100 µg/ml. Les boites sont ensuite mises dans un incubateur à 37 °C pendant au moins 12 h. Une seule colonie a été sélectionnée par type de ligation et vérifiée pour la présence du plasmide par la méthode d'extraction au phénol chloroforme et a été cultivée dans 5 ml du milieu LB en présence de l'ampicilline. Après croissance, 1 ml a été mélangé avec 200 µl de glycérol et congelé à -80 °C pour la conservation. Les 4 ml restants ont été utilisés pour les préparations des plasmides par « mini-préparation » afin de les utiliser lors de la transfection des cellules 293T.

2.2.6 Crible des plasmides: méthode d'extraction au phénol chloroforme

La vérification de la présence de l'insert correspondants aux ADNs codants les ARN guides dans le plasmide Lenti2 est réalisée par la méthode d'extraction au phénol chloroforme. 80 µl des cellules de la colonie sélectionnée sont mélangés avec 40 µl de LB 6X (10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 0.15 % orange G, 0.03 % xylene cyanol FF, 60 % glycerol and 60 mM EDTA) et 80 µl de phénol chloroforme. Le mélange

est vortexé puis centrifugé à 14 000 rpm pendant 2 min. Un échantillon de 25 µl du surnageant est déposé sur un gel d'agarose.

2.2.7 Purification des plasmides

La mini-préparation a été réalisée à l'aide de la trousse (EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps, numéro de catalogue # BS614) de Bio Basic selon la recommandation du fournisseur. Les 4 ml restants des échantillons bactériens sont centrifugés à 3 500 rpm pendant 10 min. 100 µl de solution I (solution de resuspension des cellules: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA et 100 µg/ml RNase A) sont ajoutés au culot puis homogénéisés par vortex. L'échantillon est incubé à température ambiante pendant 1 min avant d'ajouter 200 µl de solution II (solution de lyse des cellules: 0.2 M NaOH et 1 % SDS) et de mélanger par simple inversion 4 à 6 fois. Après 1 min d'incubation à température ambiante, 350 µl de solution III (solution de neutralisation: 3 M acétate de potassium et 2 M acide acétique) sont ajoutés et mélangés par inversion 4 à 6 fois. Le surnageant obtenu après centrifugation (12 000 rpm pendant 5 min) est transféré sur une colonne. Après centrifugation (10 000 rpm pendant 2 min) de la colonne, le filtrat est jeté et l'ADN plasmidique est lavé deux fois par 750 µl avec une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min puis élué par 60 µl de solution d'éluion. Les plasmides purifiés sont gardés à -20 °C.

2.3 Préparation des gels

2.3.1 Gel d'agarose 0, 7 et 2 %

- 0,7 % : Pour préparer deux grands gels (30 puits) et deux petits gels (15 puits), 300 ml de TAE 1X sont utilisés auxquels on ajoute 2,1 g d'agarose (# AGA 002.500). L'ensemble est dissout aux micro-ondes pendant environ 2 min avant d'ajouter 15 µl de bromure d'éthidium.

- 2 % : Les mêmes étapes sont utilisées que pour la préparation d'un gel 0,7 % (voir ci-dessus) en utilisant 6 g d'agarose.

2.3.2 Gel d'acrylamide 6, 8, 10 et 15 %

Pour chaque gel 8 ml de solution contenant 6, 8, 10 ou 15 % d'acrylamide (# BioShop ACR001.5 # Sigma 146079), dépendamment du gel voulu, sont versés entre les plaques de verres tenu par un support pour couler le gel avant d'ajouter 600 µl d'isopropanol et d'attendre qu'il polymérise. Par la suite, l'isopropanol est retiré. Les gels sont lavés avec de l'eau stérile avant de déposer 3 ml de gel de concentration et de mettre les peines. Après polymérisation les gels sont immédiatement utilisés ou conservés à 4 °C. Voir ci-dessous les différents volumes prélevés de chaque composé pour obtenir 6 gels de chaque type de concentration:

- Gel de séparation d'acrylamide de 6 %, préparation pour un volume final de 50 ml : 26,5 ml d'H₂O, 10 ml de 30 % Acrylamide mix, 12,5 ml de 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,5 ml de 10 % SDS (# BioShop SDS001.100), 0,5 ml de 10 % APS (Amonium Persulfate# BioShop AMP001.100) et de 0,04 ml TEMED (# Invitrogen 15524010).

- Gel de séparation d'acrylamide de 8 %, préparation pour un volume final de 50 ml : 23,2 ml d'H₂O, 13,4 ml de 30 % Acrylamide mix, 12,5 ml de 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,5 ml de 10 % SDS, 0,5 ml de 10 % APS et de 0,03 ml TEMED.

- Gel de séparation d'acrylamide de 10 %, préparation pour un volume final de 50ml : 20 ml d'H₂O, 16,6 ml de 30 % Acrylamide mix, 12,5 ml de 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,5 ml de 10 % SDS, 0,5 ml de 10 % APS et de 0,02 ml TEMED.

- Gel de séparation d'acrylamide de 15 %, préparation pour un volume final de 50 ml : 11,4 ml d'H₂O, 25 ml de 30 % Acrylamide mix, 12,5 ml de 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,5 ml de 10 % SDS, 0,5 ml de 10 % APS et de 0,02 ml TEMED.

-Gel de concentration, préparation pour un volume final de 50 ml : 34 ml d'H₂O, 8,5 ml de 30 % Acrylamide mix, 6,25 ml de 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,5 ml de 10 % SDS, 0,5 ml de 10 % APS et 0,05 ml de TEMED.

2.3.3 Migration

La migration des échantillons sur gel d'agarose s'est effectuée à 120 V pendant environ 20 min. Tandis que la migration des échantillons sur gel de polyacrylamide s'est effectuée à 150 V jusqu'à ce que les échantillons traversent le gel de concentration. Par la suite la migration est poursuivie à 200 V jusqu'à ce que le tampon laemmli commence à sortir du gel (entre 1 à 2 h).

2.4 Immunobuvadage

2.4.1 Procédure de l'immunobuvardage

Les cellulesensemencées dans des pétris sont lysés avec une solution de lyse (25 mM Tris 7,5 pH et 1 % SDS). Puis récoltés dans des tubes eppendorf de 1,5 ml. Le lysat est ensuite chauffé à 100 °C

pendant 5 min afin de s'assurer de la lyse complète des cellules. Par la suite, les échantillons sont soniqués afin de détruire la chromatine. Puis dosés par technique de dosage colorimétrique BCA (BiCinchoninic acid Assay). La concentration protéique des échantillons est alors déterminée. Finalement, les échantillons sont centrifugés puis dilués dans du tampon de dénaturation laemmli (laemmli 2X: Tris/HCl 68,8 mM, SDS 2,1 %, glycérol 26,3 %, bleu de bromophénol 0,01 %, pH 6,8), additionné de bêta-mercaptoéthanol ce qui permet de dénaturer, de solubiliser et de modifier les charges des protéines. Ce tampon confère une charge négative aux protéines responsables de la migration des protéines de la borne négative vers la borne positive. Les échantillons sont ensuite mis sur plaque chauffantes à 100 °C pendant 5 min. 40 µg par µl de protéine sont chargés sur gel d'acrylamide, dans une cuve contenant une solution d'électrophorèse TGS 1x (Tris-glycine-SDS). 4 µl de marqueur de poids moléculaire sont chargés au premier puits du gel (# : 161-0373 (BIO-RAD Laboratories))

Après migration, les protéines sont transférées sur membrane PVDF (polymère de fluorure de vinylidène, PolyVinylidene Fluoride) pré-incubée dans du méthanol 100 %. L'étape de montage s'effectue dans le tampon de transfert (200 ml de solution tampon TG 10X (tris-glycine concentré 10 fois) sans SDS, 400 ml de méthanol 100 %, 10 ml de SDS 10% et 1400 ml d'eau = pour un volume final de 2 L). Les protéines chargées négativement migrent vers le positif (borne positif ← éponge - papier watman – Membrane – Gel - papier watman - éponge ← borne négatif). Les protéines se fixent à la membrane grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines.

Le transfert liquide s'effectue à 4 °C pendant 3 h à 0,5 A ou 30-35 V durant toute la nuit. Une fois le transfert effectué, les membranes sont incubées dans du rouge Ponceau S (0.5 % Ponceau S, 1 % acide acétique glacial) pour vérifier l'efficacité du transfert. Ensuite, la membrane est incubée dans une solution de lait 5 % dilué dans du PBS tween 0,1 % (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7.4 et 0.1 % Tween 20) pendant 1 h afin de bloquer les sites aspécifiques. 3 à 4 lavages de

10 min chacun sont effectués dans du PBS tween 0,1 % afin d'enlever l'excédent de lait. Par la suite, les membranes sont incubées avec une solution contenant l'anticorps primaire (PBS tween 0,1 %, 1 % de BSA, 1 mM d'azoture de sodium et l'anticorps primaire) à une température ambiante pendant 3 h ou pendant toute la nuit.

Après incubation, les anticorps sont récupérés, la membrane est lavée 3 à 4 pendant 10 min avec du PBS tween. La membrane est ensuite incubée avec une solution d'anticorps secondaire (solution de lait 5 % dans du PBS tween 0,1 % et l'anticorps secondaire) pendant 1h à température ambiante. 3 à 4 lavages sont effectués avec du PBS tween pendant 10 min chacun. Le signal des bandes est obtenu à l'aide de l'appareil LAS-3000 LCD couplé au logiciel MultiGauge.

2.4.2 Les anticorps utilisés

Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont décrits plus en détail dans le tableau Tableau III. Les anticorps utilisés (nom, dilution, compagnie et numéro de catalogue).

2.5 Transfection

ARNi ont été transfectés avec de la lipofectamine ARNi MAX (Life Technologies) et Opti-MEM. Les plasmides ont été transfectés avec la lipofectamine 2000 (Life Technologies) et Opti-MEM pour vérifier l'expression avant leur utilisation pour générer des virus. Le milieu est remplacé par un milieu non complet avant d'ajouter le mélange de transfection. Le mélange Opti-MEM, lipofectamine et ARNi ou plasmide est ajouté en fin d'après-midi. Le lendemain matin, après une durée de transfection de plus de 16 h le milieu de transfection non complet est remplacé par un milieu complet. Après 6 h une double

transfection est effectuée dans le cas d'un ARNi. Le criblage des déubiquitinasés a été réalisé par la librairie Dharmacon (# GU-104705-05). Tandis que le criblage des enzymes de conjugaisons a été réalisé par la librairie Sigma (services personnalisés de synthèse de siRNA).

2.6 Production virale et infection

Le knockout a été réalisé par le système CRISPR/Cas9 par l'intermédiaire de plasmides lentiviraux LentiCRISPRv2. Au cours du jour 1, environ 5.10^6 de cellules cancéreuses de type 293T sont ensemencées dans des pétris de 10 cm contenant 10 ml de milieu DMEM additionné de 10 % FBS. Lors du jour 2, ces cellules sont transfectées en utilisant du PEI (Polyéthylèneimine #Polysciences 23966): dans un tube eppendorf de 1,5 ml, 12 μ g du plasmide LENTiv2 contenant un ARNg, 3 μ g du plasmide RSV-Rev, 3 μ g de pRRE, 6 μ g de plasmide VSVG et 50 ng de plasmide GFP sont mélangées dans 500 μ l d'OPTI-MEM (Thermo Fisher # 31985070). Les gARN utilisés sont présentées dans le tableau V. 48 μ l de PEI sont ensuite ajoutés au mix de telle sorte à obtenir un ratio de 2 (PEI): 1 (ADN). Par la suite, l'échantillon est vortexé avant d'être incubé pendant 5 min à température ambiante. Ce mélange est donc déposé goutte à goutte sur les cellules 293T suivi d'une incubation à 37 °C. Pendant la troisième journée, le milieu est aspiré et renouvelé avec 10 ml de milieu frais dans les pétris avant de ré-incuber à 37 °C.

Au cours de la quatrième journée, le surnageant est récolté, filtré à l'aide d'une seringue et d'un filtre millipore de 0,45 μ m. Ce surnageant constitue le stock viral synthétisé par les cellules 293T et sera utilisé pour l'infection des cellules U2OS. Pour être infecté les cellules U2OS sont ensemencé à une densité de 25 % dans 10 ml du milieu DMEM et incubé une journée à 37 °C. Le milieu de culture est renouvelé par 4 ml du même milieu et les cellules adhérentes obtenus sont infectées goutte à goutte avec

1 ml du stock viral supplémenté avec du polybrène (6 µg/ml, Hexadimethrine bromide # Sigma H9268-10G) pour favoriser l'infection. Les cellules U2OS infectées sont incubées à 37 °C pendant 48 h.

Si l'infection n'est pas effectuée après la récolte des virus, ces derniers peuvent être congelé à une température de -80 °C. Lors de l'infection, les virus congelés peuvent être décongelé rapidement à 37 °C. Afin d'obtenir des populations stables exprimant nos plasmides LentiCRISPRv2, les cellules sont soumises à une sélection à la puromycine (2 µg/ml) 48 h après l'infection. Finalement, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1x avant de mettre un nouveau milieu ou de les prélever pour analyse.

2.7 Test de prolifération MTT

Le test de prolifération MTT a été réalisé dans des plaques de 24 puits. 35 000 cellules sont ensemencées en triplicat dans un volume final de 1 ml de milieu de culture par puit. Les cellules sont incubées à 37 °C pendant 24 h, 48 h, et 72 h avec ou sans bortézomib pour la validation des cellules U2OS. Mais pour le test MTT réalisé après knockout de PSMD14, le bortézomib n'a pas été ajouté. Les cellules sont ensuite traitées avec 100 µg/ml de sel de tétrazolium MTT de formule chimique (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium # BioShop MTT222.1) dissout dans du DMSO (diméthylsulfoxyde Sigma D8418). Les plaques sont ensuite incubées pendant 3 h à 37 °C. Après incubation, le milieu est retiré et les puits sont lavés avec 1 ml de PBS, 200 µl de DMSO sont déposés dans chaque puit et sont ensuite prélevés et déposés dans une plaque de 96 puits pour être lu par dosage spectrophotométrique à 490 nm. Le tétrazolium MTT est réduit par la déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en précipité de formazan de formule chimique (1-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-3,5-diphénylformazan). Ce produit apparait violet. La quantité produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est rajouté pour solubiliser le formazan.

2.8 Immunofluorescence

Les cellules ont été fixées avec une solution à 3 % de paraformaldehyde (aldéhyde paraformique, NaOH, NaPO₄ ou PBS 10X à pH = 7, 4) pendant 20 minutes. Puis les cellules ont été perméabilisées dans un tampon de perméabilisation (PBS 1x, 0, 5% de NP-40 et 1 mM d'azoture de sodium) pendant 30 minutes. Après avoir lavé les cellules avec du tampon de lavage (PBS 1x, 0,1% NP-40 et 1 mM d'azoture de sodium) avant incubation pendant 1 heure ou toute une nuit dans du tampon de blocage (10% de FBS et tampon de lavage). Les cellules ont été colorées avec des anticorps primaires pendant 3 h et des anticorps secondaires ainsi que la coloration DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) a été utilisée pour les noyaux pour 1 h. Les images étaient prises en utilisant un microscope inversé Olympus BX53 avec un objectif 63X ou 100X et une caméra monochrome CCD (dispositif à transfert de charge) utilisant le programme cellSens. Par la suite les images ont été éditées et traitées en utilisant le logiciel ImageJ.

Le marquage des cellules au BrdU (bromodésoxyuridine Sigma # B5002) a été fait en traitant les cellules avec 20 µM pendant 1 h avant d'être laver avec du PBS 1X et fixer comme indiqué ci-dessus. La microscopie à contraste de phase a été réalisée avec un microscope inversé Olympus IX73 et une caméra SC30 couleur CCD (dispositif à transfert de charge) utilisant le programme cellSens. Les images ont été éditées et traitées en utilisant le logiciel ImageJ.

2.9 Analyse bio-informatique

Les patients atteints de myélome multiple ont été séparés dans le nombre de groupes indiqué en fonction du gène, et les courbes de Kaplan-Meier de survie globale (OS) ont été utilisées pour estimer la survie entre les groupes élevés et faibles. Le test du log-rank a été utilisé pour calculer les p-values entre les groupes élevés ou bas. Les données d'expression des gènes et de survie ont été téléchargés à partir du portail de données sur le myélome multiple du consortium de recherche (Multiple Myeloma Research

Consortium Data Portal Hub (Arkansas dataset)). Pour l'expression des gènes, les données utilisées et extraites de la base de données ont été obtenues par d'autres équipes en réalisant l'extraction de l'ARN à partir de cellules plasmiques CD138 positives sélectionnées à partir de la moelle osseuse de 256 patients atteints de myélome multiple non traités. Les patients ont ensuite été traités par chimiothérapie et leur survie a été monitorée.

Pour les cancers de mésothéliome, leucémie myéloblastique aigüe et du sein les données d'expression des gènes et de survie ont été téléchargées à partir du portail de données TCGA (Atlas du génome du cancer).

2.10 Cytométrie en flux

Les cellules flottantes du milieu ont été transférées dans des tubes de cytométrie en flux. Les pétris ont été lavés avec du PBS 1X avant d'être transférés dans des tubes de cytométrie en flux avec le milieu. Les tubes ont été centrifugés pour garder les cellules mortes pendant que le surnageant est jeté. Les cellules adhérentes sont trypsinisées et transférées dans des tubes de cytométrie en flux. Les cellules sont ensuite centrifugées afin de les laver et de jeter le surnageant. Après que les cellules sont suspendues dans 75 % d'éthanol froid, vortexées et stockées pendant la nuit à -20 ° C, l'éthanol est aspiré et les cellules sont lavées avec du PBS 1X avant d'être mises en suspension dans de la RNase (100 µg / ml). Puis incubées à 37 ° C pendant 20 minutes. Enfin 20 µl d'iodure de propidium (50 µg/mL) et vortexés. L'exposé a été réalisé en utilisant un cytomètre de flux LSRII (Becton Dickinson) et les données ont été traitées avec le logiciel FlowJo V887 (Tree Star, Inc.).

2.11 RT-qPCR

Après la transfection du siRNA, l'ARN total a été extrait en utilisant du PureZOL (1 ml pour une plaque de 6 cm) afin de gratter les cellules avant de les transférer dans de nouveaux tubes et de les stocker à - 80 °C. Après 200 µl de chloroforme ont été ajoutés par tubes et mis en boîte pendant 15-30 secondes avant la centrifugation et le transfert de la phase supérieure. 0, 5 ml d'isopropanol sont ensuite ajoutés et mélangés par inversion et incubés pendant 10 min avant d'être centrifugés. Le surnageant a été aspiré et le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol à 75% et centrifugé. Cette étape de lavage a été répétée avant de laisser sécher le culot. Finalement, le culot a été mis en suspension dans 100 µl de DEPC-eau (pyrocarbonate de diéthyle).

L'ARN total purifié a été utilisé pour synthétiser l'ADNc du premier brin en utilisant le protocole Invitrogen superscript III Reverse Transcriptase. Les ADNc ont ensuite été utilisés pour une PCR en temps réel en utilisant la trousse de quantification d'ADN vert SYBR (Life Technologies) pour quantifier les niveaux d'ARNm de gènes spécifiques. La PCR a été effectuée sur des systèmes de PCR en temps réel Applied Biosystems 7500 (Life Technologies). Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau IV.

2.12 Essai de formation de colonies (CFA)

Les cellules ont été lavées, après 15 jours de prolifération, avec du PBS IX et fixées avec une solution de paraformaldehyde à 3% pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules ont été colorées avec 0, 2% de violet cristallisé pendant 30 minutes avant d'être lavées avec de l'eau et séchées. Les images ont été prises par un scanner HP.

3. RÉSULTATS

3.1 Criblage par ARNi des DUBs et E2s du génome humain

Pour entamer ce projet, il nous a fallu générer un modèle d'étude reflétant la résistance acquise au bortézomib observée chez les patients atteints de MM. Nous avons alors décidé de générer des cellules cancéreuses résistantes au bortézomib. Pour ce faire, nous avons traité des cellules cancéreuses avec ce médicament en commençant par une dose minimale non ou peu létale (Figure S6.1). Des cellules sensibles issus de différents types de cancers ou des cellules transformées (U2OS, HeLa, HCT 116, HEK293T, Raji, JLN3, MSTO-211H et NCI-H1299) sont traitées et maintenues en culture dans des pétris pendant des durées de plus de 6 mois. Les concentrations de bortézomib sont augmentées au fur et à mesure que les cellules acquièrent la résistance. Le passage à une concentration de bortézomib plus élevée se fait lorsque les cellules arrivent à pousser à la concentration précédente. Ainsi, des cellules cancéreuses résistantes à des concentrations de bortézomib allant jusqu'à 50 nM ont été obtenues et validées. En effet une validation a été réalisée pour toutes les lignées de cellules cancéreuses résistantes générées. Le principe de cette méthode de validation de l'état de résistance des cellules est basé sur la comparaison de la prolifération cellulaire des lignées de cellules cancéreuses parentales et celles générées résistantes avec ou sans traitement au bortézomib. Comme attendu les cellules parentales sensibles au bortézomib démontrent une prolifération normale en absence du médicament et une forte mortalité en présence du médicament. Tandis que les cellules cancéreuses résistantes générées prolifèrent en absence ou en présence du bortézomib (Figure S6.1). Les profils de cytométrie en flux des lignées cellulaires résistantes générées traitées au bortézomib démontrent l'absence de mort comparés à celles des cellules sensibles (Figure S6.2).

Par la suite, 3 lignées cellulaires cancéreuses parentales sensibles et celles générées résistantes (U2OS, HeLa et HCT 116) ont été utilisées pour réaliser des criblages ARNi ciblant l'ensemble des déubiquitinasés (DUB: 100 gènes) et des enzymes de conjugaison (E2: 40 gènes) du génome humain. La réalisation des criblages sur ces lignées non leucémiques s'explique par leur facilité dans la manipulation

par rapport aux cellules leucémiques en suspension. De plus, l'objectif de ce projet vise à utiliser cette nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement du myélome multiple et des cancers leucémiques en générale tel les lymphomes mais également d'autres types de cancers comme les cancers solides.

L'effet de la déplétion de ces enzymes suite à la transfection cellulaire par l'ARNi sur la prolifération est monitoré par le test de prolifération MTT (Figure 3.1A). Les résultats générés par ces criblages sont représentés sous forme de carte thermique révélant plusieurs cibles potentielles. En rouge sont représentées les enzymes dont la déplétion diminue la prolifération cellulaire. Tandis qu'en bleu celles dont la déplétion augmente la prolifération cellulaire (Figure 3.1B). Les résultats des criblages sont également présentés sous forme de graphique à note Z présentant les 5 plus fortes et plus faibles mises en évidence dans chaque type cellulaire (Figure S6.3). Des cibles communes ou uniques ont été déterminées par ces criblages notamment entre les cellules sensibles ou résistantes d'une même lignée ou entre lignées différentes (Figure 3.1C). Les meilleures cibles mises en évidence par le criblage ayant engendré une diminution dramatique de la prolifération cellulaire dans les cellules sensibles ou résistantes ont été validées par un autre groupe de ARNi. L'efficacité de ces ARNi a été validée par RT-qPCR (Figure 3.1D). Leur effet sur la prolifération cellulaire a également été monitoré par le test MTT (Figure 3.1E). Certaines cibles ont reproduit leur effet antiprolifératif tel que PSMD14, PRPF8, UBL5 et UBE2S. Tandis que d'autres ont moins bien confirmé leur effet antiprolifératif et laisse une ambiguïté tel que UBE2C, UBE2M, UEV3, UBE2D4 et UBE2R2. Il est à noter que UBL5 est une protéine similaire à l'ubiquitine "ubiquitin-like" associée aux protéines du spliceosome. Il a été démontré que sa déplétion diminue l'efficacité de l'épissage des pré-ARNm (100). Par ailleurs, des immunobuvardages de protéines marqueurs ont été réalisés après déplétion des meilleures cibles mises en évidence par les criblages. Ces résultats révèlent une perturbation cellulaire distinctive des autres cibles candidates lorsqu'on déplete la déubiquitinase PSMD14 (Figure S6.5).

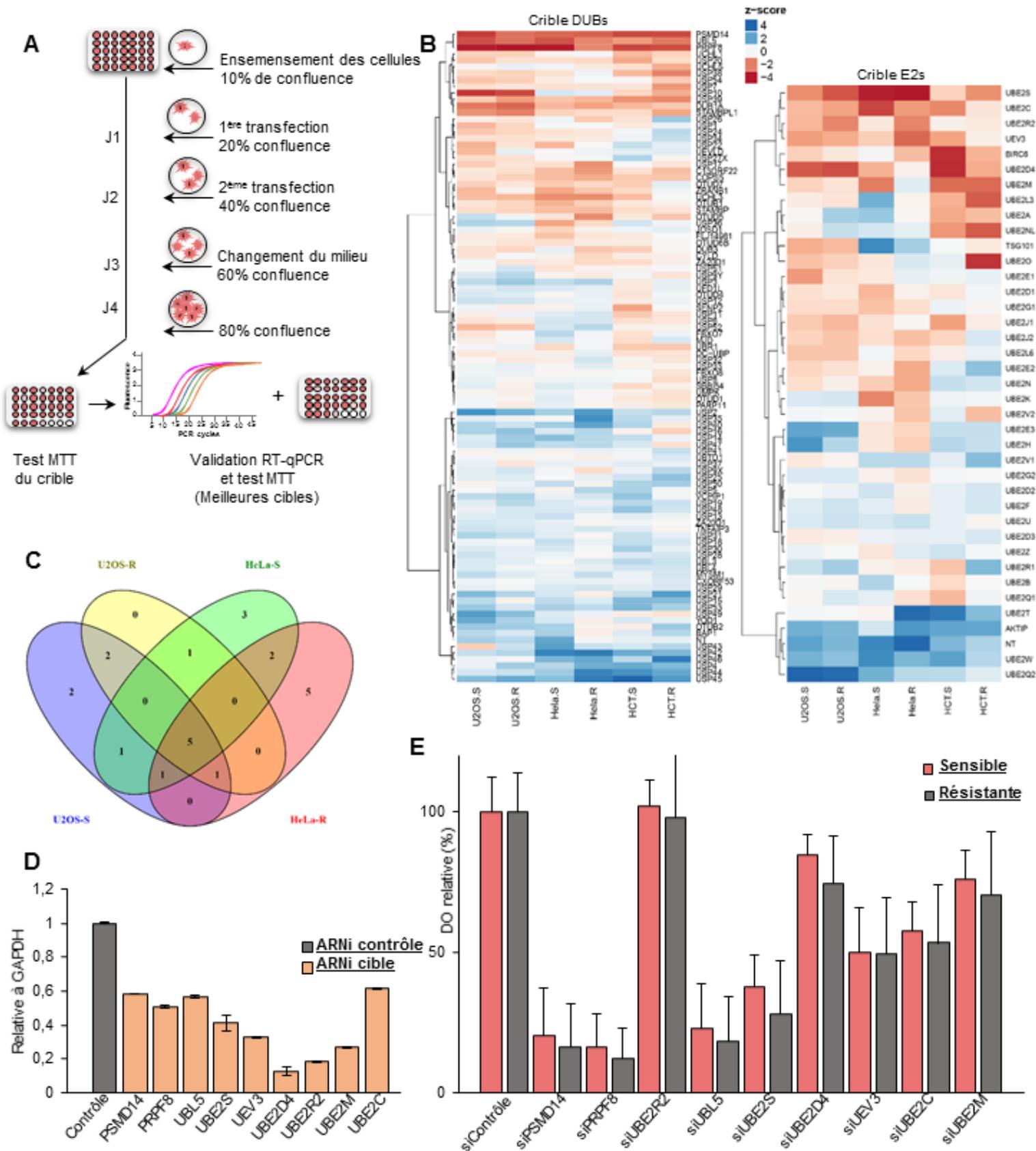


Figure 3.1 Criblage ARNi des DUBs et E2s dans des cellules sensibles ou résistantes au bortézomib

(A). Représentation schématique de la procédure utilisée pour les criblages ARNi des DUBs et E2s réalisés dans des cellules U2OS, HeLa et HCT 116 sensibles ou résistantes au bortézomib. J: Jour.

(B). Carte thermique montrant les scores Z dérivés du signal de la densité optique déterminée par spectrophotométrie du test MTT: en rouge, les enzymes dont la déplétion diminue la prolifération cellulaire; en bleu, celles dont la déplétion augmente la prolifération cellulaire et en blanc, celles dont la déplétion ne change pas la prolifération cellulaire. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

(C). Représentation schématique des cibles communes ou unique de E2 entre quatre des six lignées de cellules utilisées (U2OS et HeLa). S: Sensible; R: Résistante.

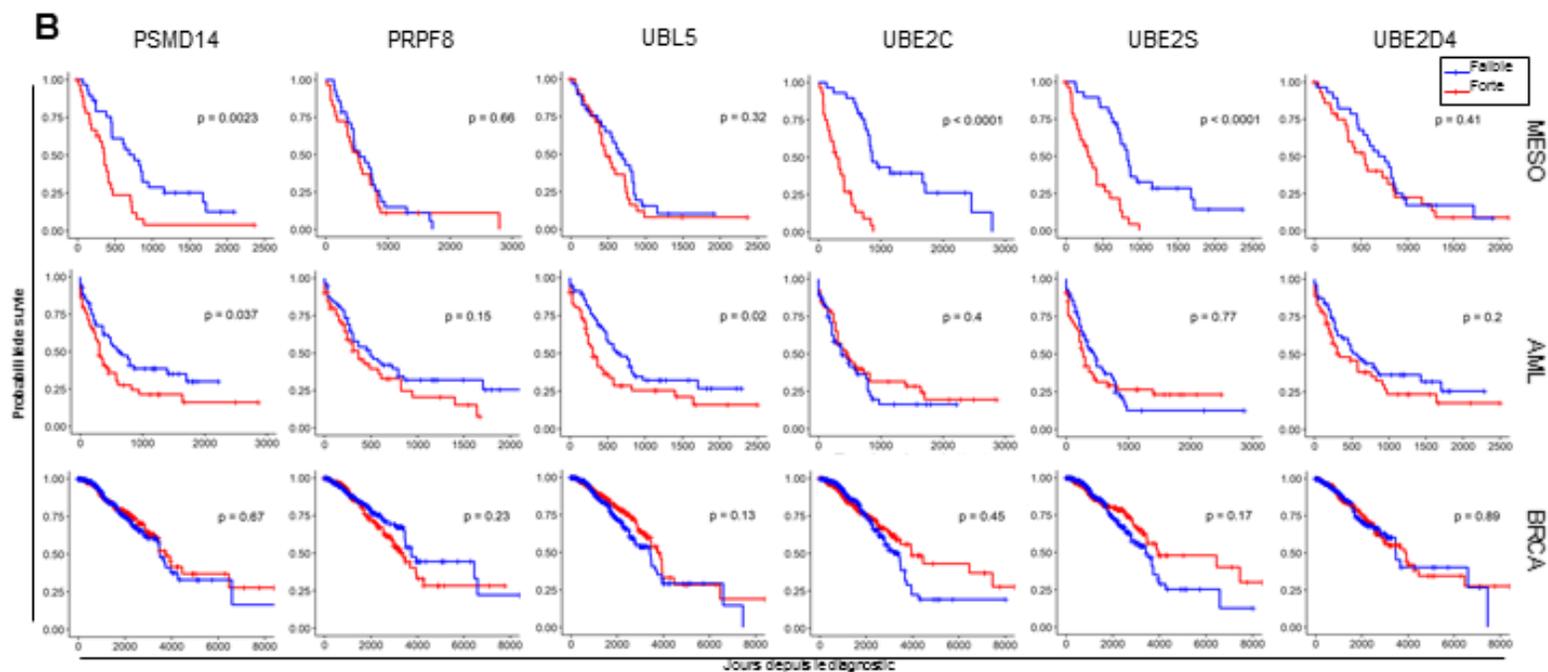
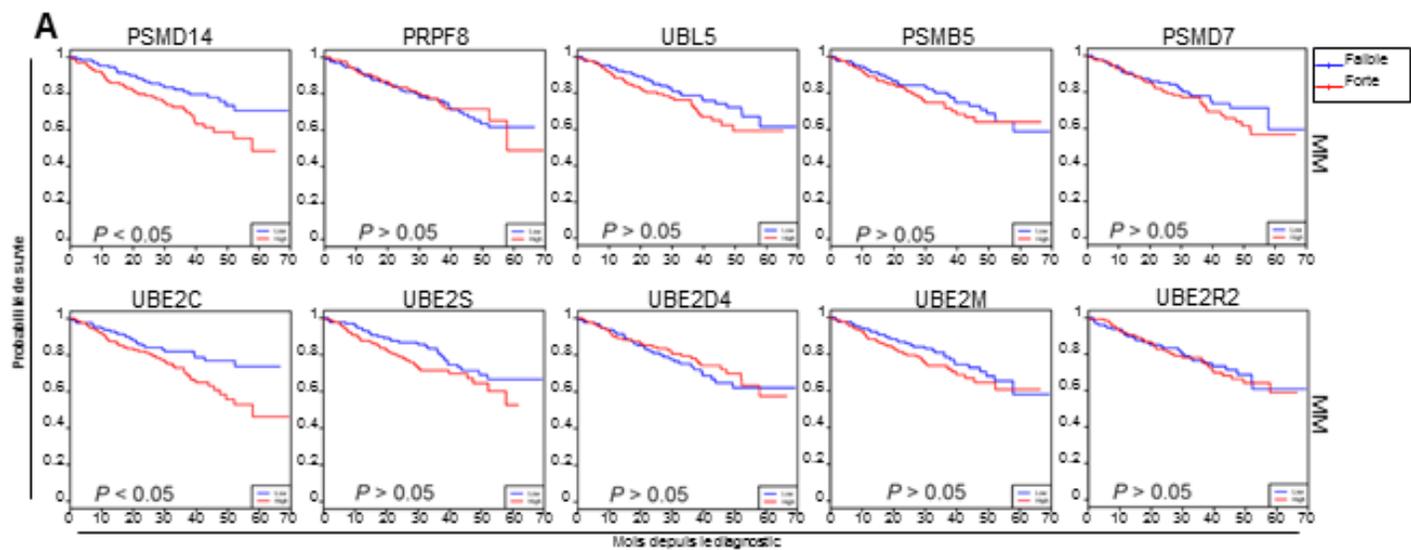
(D). Efficacité des ARNi de validation des meilleures cibles évaluée par RT-qPCR dans des cellules U2OS. Le résultat est d'une expérience.

(E). Test MTT des ARNi de validation des meilleures cibles dans des cellules U2OS. Le résultat est d'une expérience.

3.2 Analyse bio-informatique des meilleures cibles issues des criblages des DUBs et E2s

Les meilleures cibles mises en évidence des criblages ont été traitées par une analyse bio-informatique liant leur niveau d'expression d'ARNm dans des cellules cancéreuses de patients atteints de cancers du myélome multiple avec la survie des patients traités au bortézomib (Figure 3.2A). Dans le MM, une expression élevée de la DUB PSMD14 et la E2 UBE2C est lié avec un mauvais pronostic de survie chez les patients. En effet, les patients exprimant fortement ces protéines semblent avoir une espérance de vie plus courte. Contre toute attente, ceci n'a pas été le cas pour PSMB5 la cible de la thérapie actuelle le bortézomib.

Cette analyse a également été réalisée pour d'autres types de cancers non traités au bortézomib tel que le mésothéliome, la leucémie myéloblastique aigue et le cancer du sein (Figure 3.2B). Par ailleurs, d'autres cibles ont également démontré un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de ces cancers lorsqu'ils les expriment fortement. En effet une expression élevée de: (1) PSMD14, UBE2C et UBE2S dans le mésothéliome, (2) PSMD14 et UBL5 dans la leucémie myéloblastique aigue (3) et finalement aucune cible pour le cancer du sein est corrélée à un mauvais pronostic de survie. Ces études bio-informatique, ont révélé des similitudes mais également des particularités de pronostic de survie pour chaque type de cancer (Figure 3.2C). Par ailleurs, des cellules du mésothéliome résistantes au bortézomib ont été générées et déplétées des meilleurs cibles mises en évidence par les criblages (Figure S6.10). Ces résultats démontrent une diminution de la prolifération des cellules sensibles ou résistantes après déplétion des cibles comparées au contrôle.



C

Cible	PSMD14	PRPF8	UBL5	UBE2C	UBE2S	UBE2D4	
Cancer							Significative $p < 0.05$
MM							
MESO							Non Significant $p > 0.05$
AML							
BRCA							

Figure 3.2 Pronostic de survie des patients atteints de cancers en fonction de l'expression des ARNm des meilleures cibles

Les courbes de survie globale (OS) de Kaplan-Meier ont été générées et le test du « log-rank » a été utilisé pour calculer les valeurs-p entre les groupes exprimant des niveaux d'ARNm élevés ou faibles. En bleu (faible expression d'ARNm) et en rouge (forte expression d'ARNm)

(A) Patients atteints de myélome multiple (MM) traité au bortézomib.

(B) Patients atteints du mésothéliome (MESO), la leucémie myéloblastique aigue (AML) et le cancer du sein (BRCA).

(C) Tableau récapitulatif des résultats bio-informatiques obtenus dans la figure 3.2A et B. En rouge claire les cibles dont une forte expression est corrélée à un mauvais pronostic de survie pour les patients ($p < 0.05$ significative). Tandis qu'en blanc les cibles dont une forte expression n'est pas corrélée à un mauvais pronostic de survie pour les patients ($p > 0.05$ non significative). Patients atteints du myélome multiple (MM), mésothéliome (MESO), la leucémie myéloblastique aigue (AML) et le cancer du sein (BRCA).

3.3 Déplétion de la déubiquitinase PSMD14 et résistance acquise au bortézomib

Après avoir mis en évidence et validé plusieurs cibles potentielles permettant de surpasser la résistance acquise au bortézomib, nous avons voulu concentrer nos efforts sur une cible particulièrement intéressante: la déubiquitinase associée au protéasome PSMD14.

Dans le but de confirmer d'avantage la diminution de la prolifération accompagnant la déplétion de PSMD14, nous avons tout d'abord commencé par étudier l'effet de la déplétion de PSMD14 de façon individuelle et spécifique. Cela s'est fait dans des lignées cellulaires parentales sensibles ou résistantes générées (U2OS, HeLa et HEK293T). La prolifération cellulaire a été monitoré par essai MTT (Figure 3.3A), Tandis que l'efficacité des ARNi a été vérifiée par immunobuvardage (Figure 3.3B). On remarque une augmentation de l'expression du facteur de transcription et suppresseur de tumeur p53, de l'inhibiteur 1 des kinases cycline-dépendantes p21 et un clivage de caspase 3. La protéine p53 est connue pour induire l'expression de p21 entraînant un arrêt en G1. Elle est également connue pour l'activation de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose, la réparation de l'ADN etc. Par ailleurs, on remarque dans quelque cas l'activation de la caspase 9 et le clivage de PARP1. Le clivage des caspases et de PARP1 est connu pour être un marqueur apoptose. De plus on distingue une diminution de la fraction de RB phosphorylation. RB est un suppresseur de tumeur qui lie et inhibe le facteur de transcription E2F entraînant un arrêt du cycle cellulaire en G1. Pour finir on a aussi observé une augmentation du marqueur de dommage à l'ADN γ H2AX et du marqueur d'autophagie LC3B-II. En effet, lors d'un dommage double brin de l'ADN il est connu qu'il y a phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139 favorisant la décondensation de la chromatine et le déclenchement de la machinerie de réparation de l'ADN. En ce qui concerne la protéine LC3B-II, elle est connue pour être un marqueur de l'activité autophagique. De plus, elle est impliquée dans la formation de la membrane des autophagosomes. Ces derniers fusionnent avec les lysosomes entraînant une dégradation

de leur contenu. Cela témoigne d'une présence d'un arrêt du cycle cellulaire, de dommage à l'ADN, de l'autophagie et de l'apoptose suite à la déplétion de PSMD14. Les données de cytométrie en flux confirment la présence de l'apoptose puisqu'elle démontre un pic sub-G1 (Figure S6.7).

Sachant que la technique des ARNi est souvent critiquée pour ses effets hors cible, PSMD14 a également été déplétée par technique CRISPR / Cas9 (Figure 3.3C et S6.4). Cette fois-ci l'effet sur la prolifération a été évalué par le test de formation de colonie (Figure 3.3D). La forte induction protéique de p53, p21 et myc laisse place au doute sur la spécificité de la mort cellulaire observée après la déplétion de PSMD14. Pour ce faire des cellules HCT 116 p53 $-/-$, HCT 116 p21 $-/-$ et HCT 116 ont été utilisées. La diminution de la prolifération a été observée dans toutes les 3 lignées parentales cellulaires utilisées mais également dans les résistantes générées (Figure 3.3E). Par ailleurs, un immunobuvardage a été réalisé pour vérifier l'efficacité de la déplétion de PSMD14 mais également pour valider l'expression de p53 et p21 des cellules utilisées (Figure 3.3F). De plus, la Figure S6.6 comparant l'effet de la déplétion de PSMD14 seule à la déplétion de l'oncogène Myc et PSMD14 simultanément suggère qu'il n'y a aucune différence dans la diminution de prolifération entre les conditions. Les données démontrent que la mort cellulaire suivant la déplétion de PSMD14 est indépendante de p53, p21 et Myc.

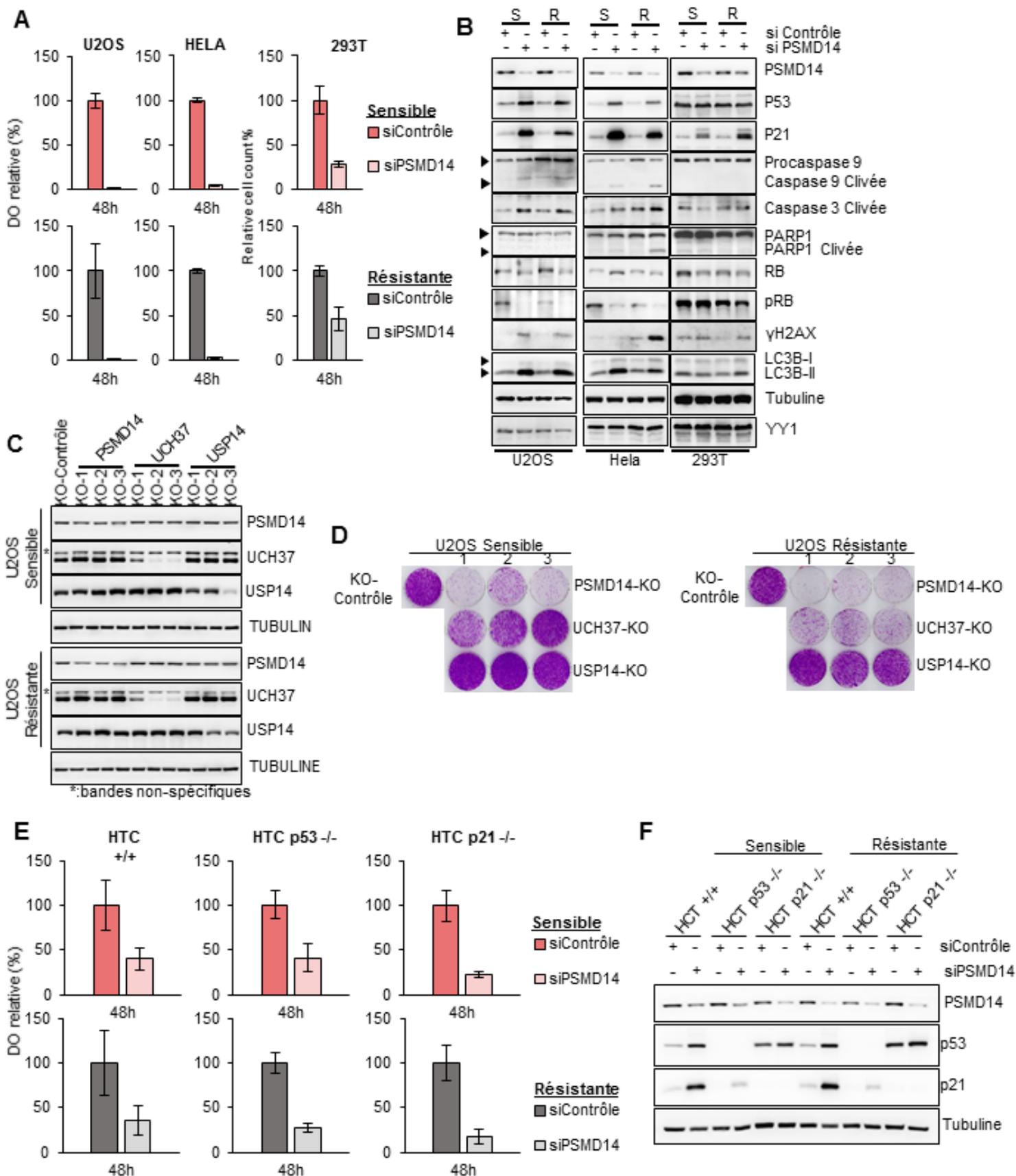


Figure 3.3 Analyse phénotypique et moléculaire suite à la déplétion de PSMD14

(A). Test MTT des cellules U2OS, HeLa et 293T sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 comparée au contrôle. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes. L'écart type du triplicat de 1 expérience représentative est représenté par les barres d'erreur.

(B). Immunobuvardage de protéines marqueurs des cellules U2OS, HeLa et 293T sensibles ou résistantes déplétées de PSMD14 comparée au contrôle. S: Sensible; R: Résistante. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

(C). Immunobuvardage de PSMD14, UCH37 et USP14 suite à leur déplétion par CRISPR/Cas9 dans des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib. Asterisk: bandes non spécifiques. Le résultat est d'une expérience.

(D). Essai de formation de colonies des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14, UCH37 et USP14 par CRISPR/Cas9. Le résultat est d'une expérience.

(E). Test MTT des cellules HCT 116, HCT 116 p53 $-/-$ et HCT 116 p21 $-/-$ sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 comparée au contrôle. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes. L'écart type du triplicat de 2 expériences représentatives est représenté par les barres d'erreur.

(F). Immunobuvardage des protéines indiquées pour les cellules HCT 116, HCT 116 p53 $-/-$ et HCT 116 p21 $-/-$ sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 comparée au contrôle. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

3.4 Inhibition chimique de l'activité catalytique de PSMD14

Des cellules U2OS stables exprimant Myc-PSMD14-type sauvage (catalytiquement active (WT)) et Myc-PSMD14-CD (catalytiquement inactive) ont été générées (Figure 3.4A). Un essai MTT et formation de colonie ont été réalisés sur ces cellules démontrant une diminution de la prolifération dans les cellules PSMD14-CD (Figure 3.4B, C). En 2017, le groupe de Li, J. a récemment reporté un inhibiteur pour PSMD14, le capzimin (101). Cette molécule chimique a été utilisée sur nos lignées U2OS et JJN3 révélant une diminution dramatique de la prolifération cellulaire confirmant d'avantage nos résultats de déplétion de PSMD14 par ARNi ou CRISPR / Cas9 (Figure 3.4D). Dans l'article de Li, J. et al, ils ont démontré que le capzimin inhibe d'autres déubiquitines de la famille JAMM. Ils ont comparé le degré d'inhibition de le capzimin dans 4 déubiquitines de la famille JAMM à savoir PSMD14, BRCC36, COPS5 et STAMBP révélant qu'il inhibe principalement PSMD14 suivi de BRCC36, STAMBP et finalement COPS5 à des degrés beaucoup plus faibles (101). Cela pousse à s'interroger sur son effet inhibiteur sur les autres déubiquitines de la famille JAMM. Pour ce faire, nous avons décidé de les dépléter par ARNi individuellement et de les diviser en deux groupes. Un groupe a été traité par 10 μ M de capzimin tandis qu'un autre groupe contrôle a été traité par le DMSO afin de distinguer l'effet produit par l'inhibiteur et celui produit par la déplétion de chaque déubiquitine de la famille JAMM. Seul la déubiquitine PSMD14 semble diminuer la prolifération cellulaire le plus proche du niveau de prolifération produit par le traitement au capzimin des cellules sensibles et les résistantes. À noter que dans les cellules sensibles, PRPF8 a diminué également la prolifération cellulaire à un niveau proche de PSMD14. Ceci a également été observé dans les criblages. Indiquant que l'inhibiteur semble inhiber principalement la déubiquitine PSMD14 de la famille JAMM (Figure 3.4E, F).

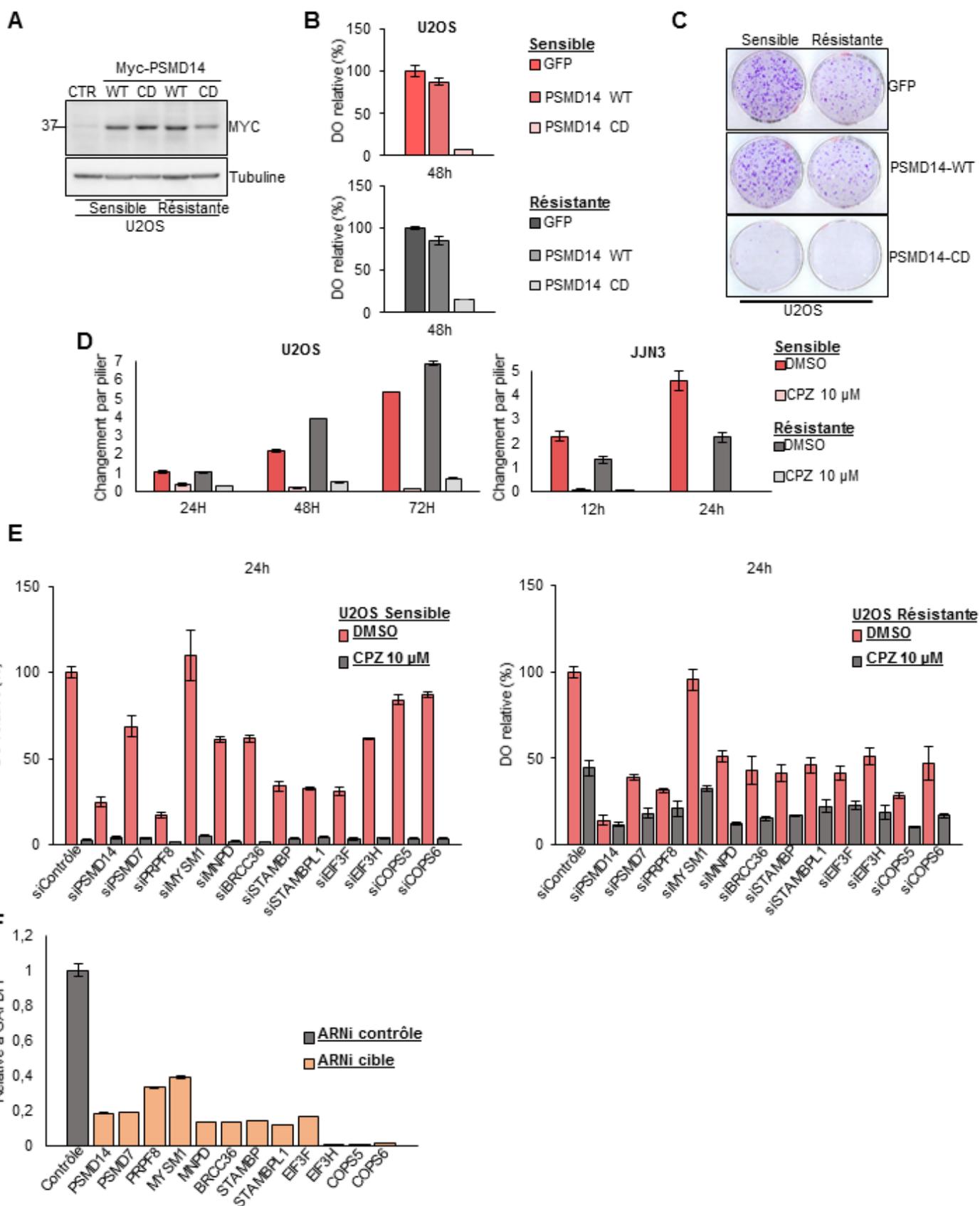


Figure 3.4 Activité catalytique de PSMD14 et viabilité cellulaire

(A). Immunobuvardage de PSMD14 étiquetée Myc des cellules U2OS stable sensibles ou résistantes au bortézomib exprimant: GFP (CTR: contrôle), Myc-PSMD14 de type sauvage (WT) ou Myc-PSMD14 catalytiquement inactive (CD). Le résultat est d'une expérience.

(B). Test de prolifération MTT des cellules U2OS stable sensibles ou résistantes au bortézomib exprimant: GFP (CTR: contrôle), Myc-PSMD14 de type sauvage (WT) ou Myc-PSMD14 catalytiquement inactive (CD). Le résultat est d'une expérience. L'écart type du triplicat de l'expérience est représenté par les barres d'erreur.

(C). Essai de formation de colonies des cellules U2OS stable sensibles ou résistantes au bortézomib exprimant: GFP (CTR: contrôle), Myc-PSMD14 de type sauvage (WT) ou Myc-PSMD14 catalytiquement inactive (CD). Le résultat est d'une expérience.

(D). Test de prolifération MTT des cellules U2OS et J2N3 sensibles ou résistantes au bortézomib traitées avec du DMSO ou de la capzimin (CPZ) pour les doses et durées indiquées. Le résultat est d'une expérience. L'écart type du triplicat de l'expérience est représenté par les barres d'erreur.

(E). Test de prolifération MTT des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplété de chaque déubiquitine de la famille JAMM puis traitées avec du DMSO ou la capzimin (CPZ). Le résultat est d'une expérience. L'écart type du triplicat de l'expérience est représenté par les barres d'erreur.

(F). Évaluation de l'efficacité par RT-qPCR des déplétions siRNA ciblant individuellement les déubiquitines de la famille JAMM. Le résultat est d'une expérience. L'écart type du triplicat de l'expérience est représenté par les barres d'erreur.

3.5 Effet de la déplétion des composantes importantes du protéasome 26S

Des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib ont été déplétées individuellement en plusieurs composantes notamment des sous-unités ou des protéines associées importantes au bon fonctionnement du protéasome 26S par ARNi (Figure 3.5A). Sachant que le protéasome est formé de deux complexes, un complexe régulateur et un complexe catalytique, on a voulu comparer l'effet de la déplétion des sous unités de chaque complexe sur la prolifération cellulaire par test MTT (Figure 3.5B). Par ailleurs, des déplétions de plusieurs sous-unités simultanément ont également été révélées (Figure S6.7). Ce sont principalement la sous unité régulatrice PSMD14 et les sous unités catalytiques qui diminuent radicalement la prolifération cellulaire. Sachant que la thérapie actuelle à base de bortézomib cible principalement la sous-unité catalytique PSMB5, on a voulu détecter par immunobuvardage l'expression protéique de plusieurs protéines clés impliquées dans des voies cellulaires importantes suite à leur déplétion (Figure 3.5C). Il semble que la déplétion de PSMD14 affecte plus les cellules cancéreuses sensibles mais également les résistantes, tandis que la déplétion de PSMB5 semble peut ou ne pas affecter les cellules résistantes. Par ailleurs, la Figure S6.6 suggère une diminution de l'incorporation de BrdU dans les cellules déplétées par PSMD14 et PSMB5 témoignant une faible prolifération.

Par la suite nous nous sommes intéressés à l'étonnante augmentation de l'expression du marqueur de dommage à l'ADN γ H2AX produite suite à la déplétion de PSMD14 comparée à PSMB5 vu dans nos résultats (Figure 3.5C). Cela nous a encouragé à pousser l'analyse en effectuant des immunofluorescences pour γ H2AX (Figure 3.5D). À notre grande surprise, en plus de confirmer nos précédents résultats, nos résultats démontrent que la déplétion de PSMD14 entraîne une localisation cytoplasmique anormale dans les cellules sensibles et résistantes. Ce phénomène est observé dans la déplétion de PSMB5 mais uniquement dans les cellules sensibles.

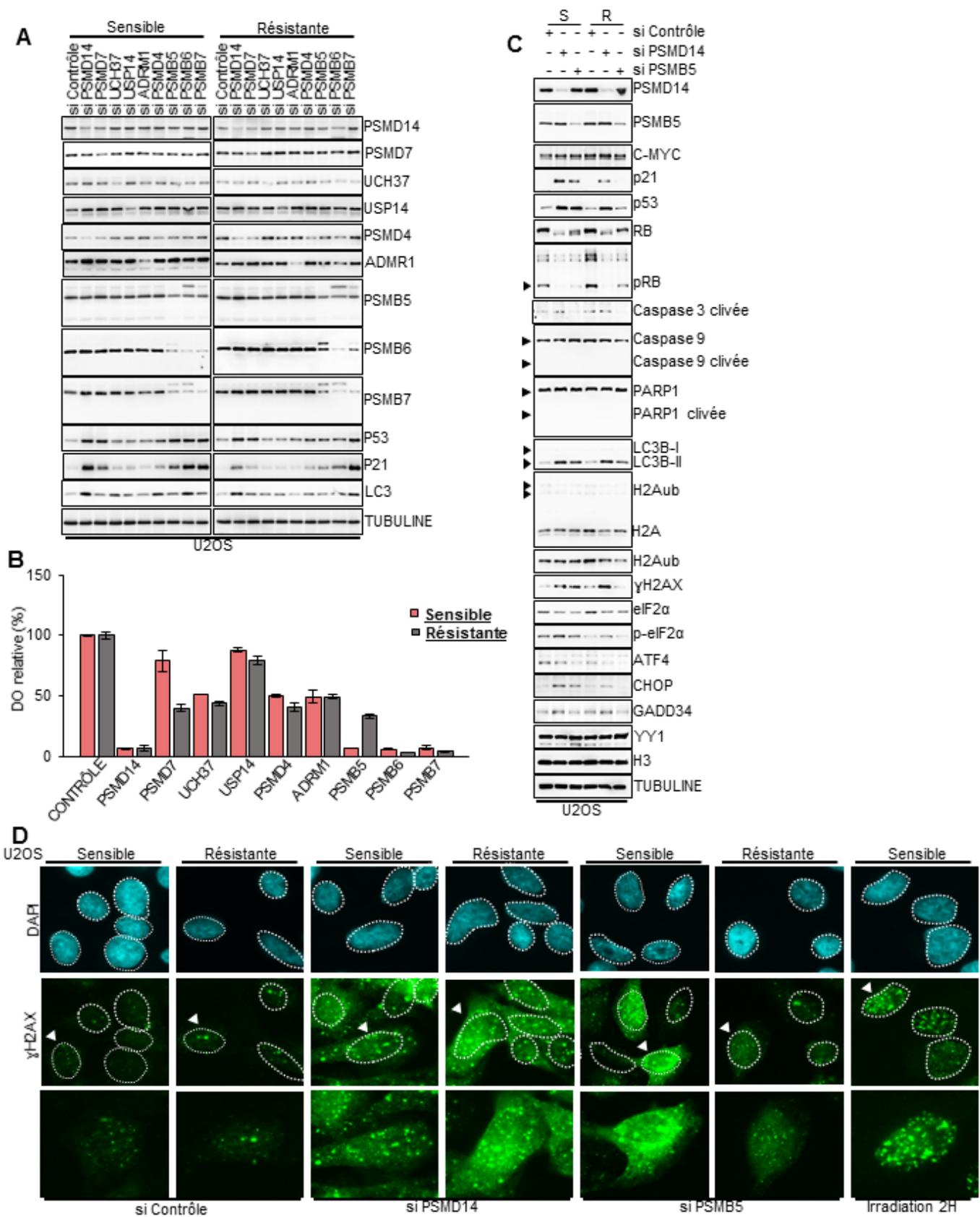


Figure 3.5 Comparaison des effets des déplétions des composantes importantes du complexe régulateur ou catalytique du protéasome 26S dans des cellules résistantes au bortézomib

(A). Immunobuvardage des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées par ARNi de plusieurs composantes importantes du protéasome 26S. Des sous unités du complexe régulateur ou catalytique du protéasome 26S ont été ciblées. Le résultat est d'une expérience.

(B) Test MTT des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées par ARNi de plusieurs composantes importantes du protéasome 26S. Le résultat est d'une expérience. L'écart type du triplicat de l'expérience est représenté par les barres d'erreur.

(C) Immunobuvardage de protéines marqueurs des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 ou PSMB5 comparées au contrôle. Le résultat est d'une expérience.

(D). Immunofluorescence du marqueur de dommage à l'ADN γ H2AX des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 ou PSMB5. Le résultat est d'une expérience.

3.6 Fraction d'ubiquitine suite à la déplétion de PSMD14 ou PSMB5

Afin de mieux comparer l'effet biologique notamment sur la fraction d'ubiquitine produit par notre cible majeur PSMD4 à l'actuelle thérapie, nous avons décidé de dépléter PSMD14 et PSMB5 dans des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib et de détecter la fraction d'ubiquitine par immunobuvardage (Figure 3.6A, B, C). Les résultats démontrent que la déplétion de PSMD14 comparé à PSMB5 crée une plus grande accumulation de protéine ubiquitinées et une diminution d'ubiquitine libre. On a également conduit des immunofluorescences pour détecter les protéines conjuguées à l'ubiquitine sur nos échantillons (Figure 3.6D). Ces dernières ont confirmé que la déplétion de PSMD14 comparé à PSMB5 crée une plus grande accumulation de protéines ubiquitinées.

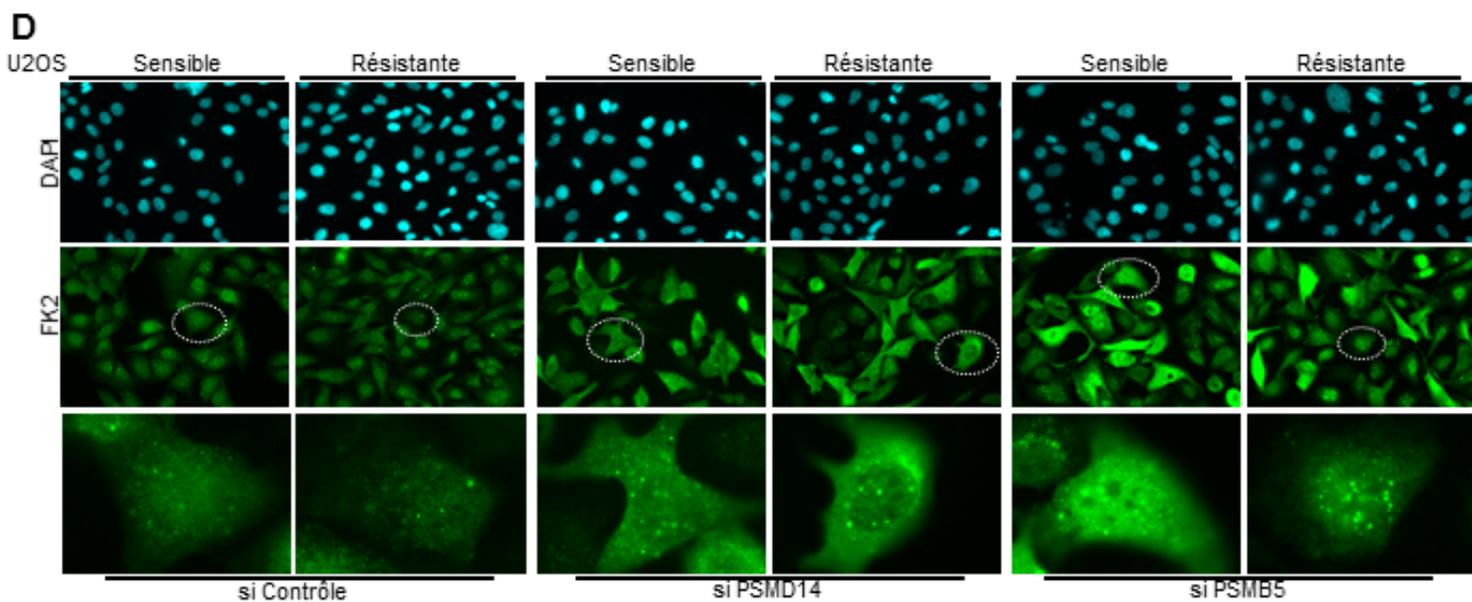
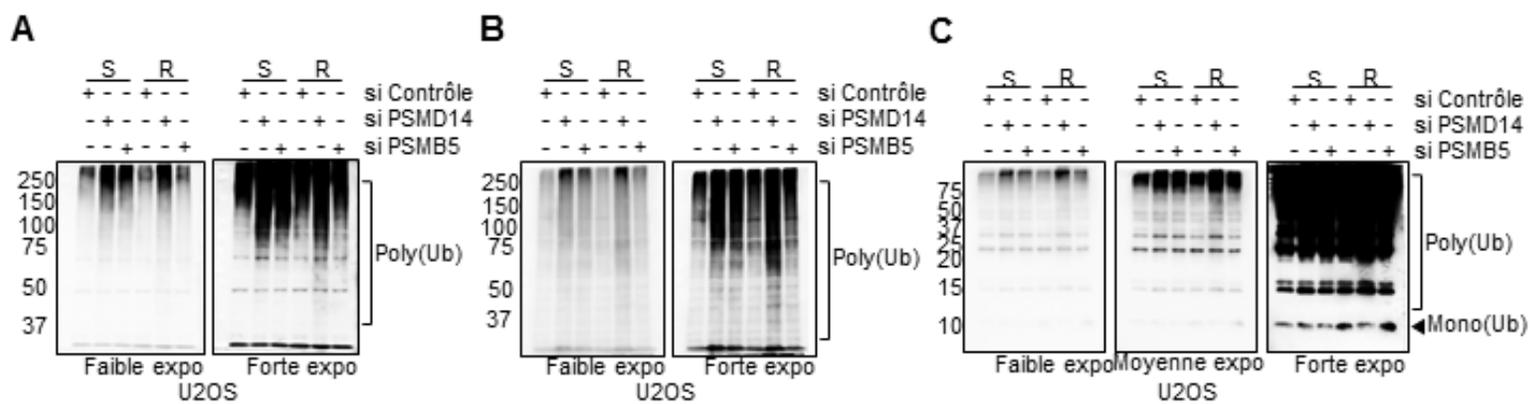


Figure 3.6 Effet de la déplétion de PSMD14 sur la fraction d'ubiquitine comparé à celui de PSMB5

(A). Immunobuvardage de l'ubiquitine conjuguée, détectée dans un gel de polyacrylamide 8% par l'anticorps FK2, des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 ou PSMB5. Le résultat est d'une expérience.

(B). Immunobuvardage de l'ubiquitine conjuguée plus l'ubiquitine libre (mono ou poly), détectée dans un gel de polyacrylamide 8% par l'anticorps anti-ub P4D1, des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 ou PSMB5. Le résultat est d'une expérience.

(C). Immunobuvardage de l'ubiquitine conjuguée plus l'ubiquitine libre (mono ou poly), détectée dans un gel de polyacrylamide 15% par l'anticorps anti-ub P4D1, des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 ou PSMB5. Le résultat est d'une expérience.

(D). Immunofluorescence de l'ubiquitine conjuguée, détectée par l'anticorps FK2, des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 ou PSMB5. Le résultat est d'une expérience.

3.7 Biomarqueurs potentiels et prédiction de la résistance au bortézomib: H2Aub et HSP70

Il est connu dans la littérature que l'inhibition du protéasome est suivie d'une déubiquitination massive de l'histone H2Aub (102). Par ailleurs, plusieurs études ont corrélé la hausse de l'expression de protéines de choc thermique (HSP) avec la résistance aux inhibiteurs de protéasome (103-105). Cela nous a poussé à réaliser des immunobuvardages pour H2Aub et HSP70 pour plusieurs lignées cellulaires sensibles et résistantes au bortézomib (Figure 3.7A, Figure S6.9). Ces résultats ont révélé que les sensibles répondent comme prédit par la littérature cependant les résistantes ne semblent pas reprendre de la même manière. En effet, les cellules sensibles au bortézomib ont diminué leur niveau protéique de H2Aub suite à l'inhibition du protéasome. Ils ont également augmenté l'expression de leur protéine HSP70. Tandis que les cellules résistantes au bortézomib n'ont pas diminué leur niveau d'H2Aub ou augmenté leur niveau d'HSP70. L'expression protéique de ces deux protéines est demeurée plus ou moins stable dans les cellules résistantes après inhibition du protéasome. Étonnement ce résultat a pu être renversé pour les cellules résistantes lorsqu'on les traite par le capzimin (Figure 3.7B), révélant une fois de plus l'efficacité du traitement ciblant la déubiquitinase PSMD14. Afin de confirmer d'avantage nos résultats nous avons réalisé des immunobuvardages pour H2Aub et HSP70 dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses majoritairement d'origine mésothéliale (Figure 3.7C). Par la suite, une quantification de bandes de ces immunobuvardages pour chaque lignée a été corrélée à sa concentration inhibitrice médiane (IC50) face au bortézomib (Figure 3.7D). Nous avons obtenu une forte corrélation pour H2Aub (0,779) et une moyenne corrélation pour HSP70 (-0,415).

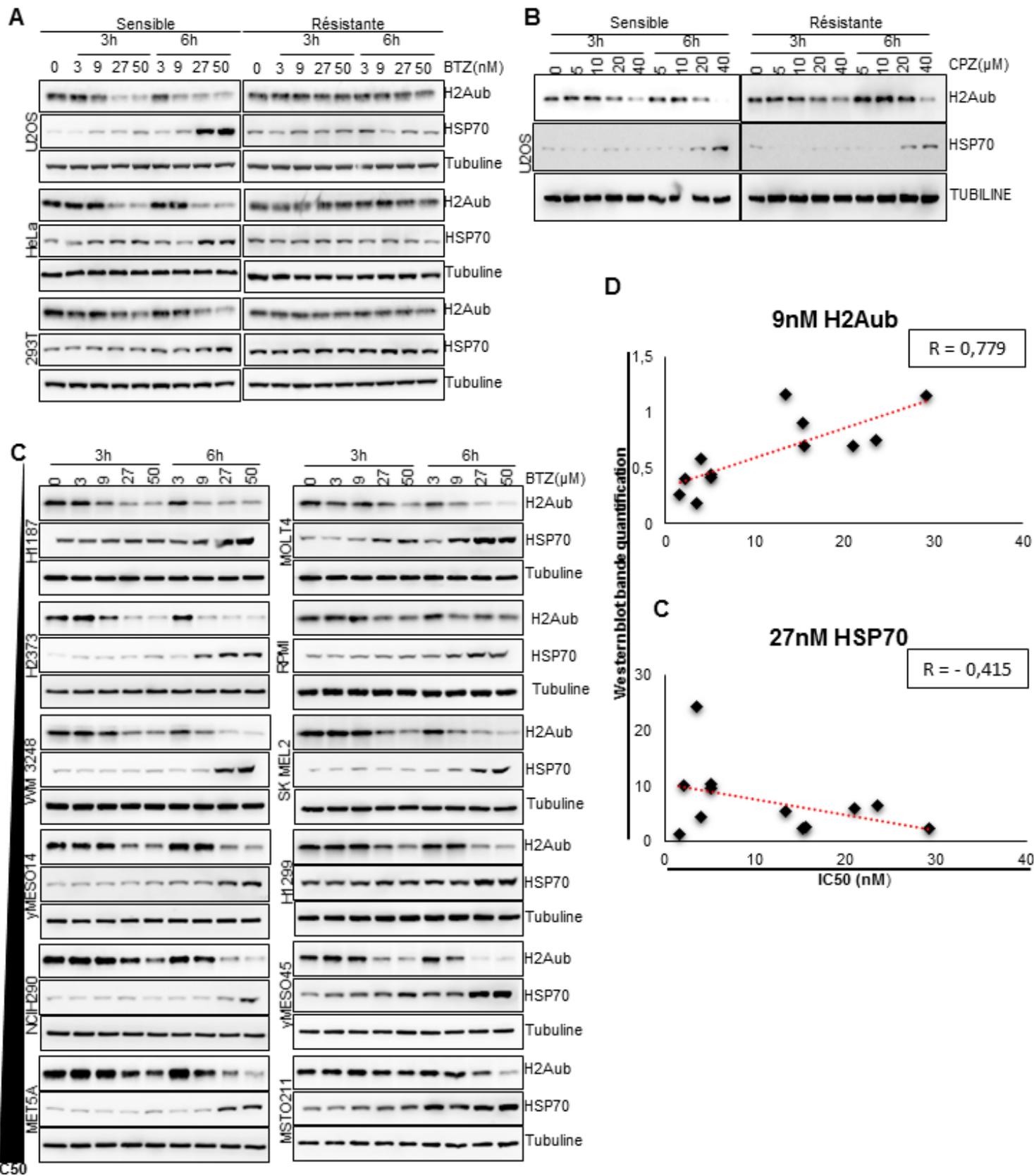


Figure 3.7 Détection des biomarqueurs potentiel H2Aub et HSP70 et prédiction de la résistance au bortézomib

(A). Immunobuvardage de H2Aub et HSP70 dans des cellules U20S, HeLa et HEK293T sensibles ou résistantes en fonction des doses de bortézomib et les temps d'incubation. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

(B). Immunobuvardage de H2Aub et HSP70 des cellules U20S sensibles ou résistantes aux bortézomib traitées avec le capzimin pour les doses et les temps indiqués. Le résultat est d'une expérience.

(C). Immunobuvardage de H2Aub et HSP70 de différentes lignées cellulaires (12 types) traitées avec diverses doses de bortézomib. Le résultat est d'une expérience.

(D) Quantification de bande de protéine H2Aub ou HSP70 illustrées dans la figure 3.7C corrélée à la concentration inhibitrice médiane (IC50) de chaque lignée cellulaire au bortézomib. La corrélation est calculée par le coefficient de corrélation linéaire noté r (compris entre -1 et 1)

4. DISCUSSION

À l'heure actuelle, malgré l'espoir qu'a fourni le bortézomib chez les patients atteints du myélome multiple, plusieurs présentent une rechute et succombent à leur maladie. En effet, les cellules cancéreuses des patients traités finissent par développer une résistance au bortézomib au cours du traitement. D'où la nécessité de générer de nouvelles approches thérapeutiques plus efficace et sécuritaire pour lutter contre le cancer. Afin de contourner cette résistance, notre laboratoire a décidé d'adopter une stratégie innovante.

Celle-ci consiste à investiguer d'autres composants du système ubiquitine protéasome comme les déubiquitinases et les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine. On pense que les DUB et les E2 sont des cibles thérapeutiques anticancéreuses dont l'inhibition pourrait surpasser la résistance acquise au bortézomib.

4.1 Cribles des DUBs et E2s et étude détaillée de la déplétion de la déubiquitinase PSMD14

Pour entamer ce projet, des cellules cancéreuses résistantes au bortézomib issues de différents types de cancers ont été générées. Quelques-unes de ces dernières ont été utilisées pour réaliser des criblages ARNi ciblant l'ensemble des DUB et E2 du génome humain (Figure 3.1). Ces résultats ont révélé plusieurs cibles potentielles pour surmonter la résistance acquise au bortézomib. Certaines cibles diminuant la prolifération cellulaire ont déjà été reportées dans la littérature comme PSMD14, PRPF8, UBE2C, UBE2S confirmant la robustesse de nos criblages.

La validation avec d'autres séquences ARNi a permis de confirmer certaines cibles majeures (PSMD14, PRPF8 et UBE2S) au détriment d'autres (UBE2R2, UBE2D4 et UBE2M).

L'étude bio-informatique quant à elle a permis de démontrer qu'une expression élevée de PSMD14 et UBE2C représente un mauvais pronostique chez les patients atteints de myélome multiple (Figure 3.2). Curieusement, une expression élevée de PSMB5, qui est la cible du bortézomib, ne représente pas un mauvais pronostique chez les patients atteints de myélome multiple. Ceci, rentre en contradiction avec

les études précédentes puisqu'elles démontrent qu'une expression élevée de PSMB5 représente également un mauvais pronostic chez les patients atteints de myélome multiple (91).

L'investigation détaillée de la déplétion de PSMD14 a solidement confirmé sa nécessité pour la prolifération cellulaire (Figure 3.3). Outre les tests de prolifération cellulaire plusieurs marqueurs de mort cellulaire ont été détectés comme l'activation de la caspase 3, dans quelque cas la caspase 9 et PARP1 suggèrent une mort cellulaire fort probablement par apoptose vu les marqueurs utilisés. Les données de cytométrie en flux appuient cette conclusion (Figure S6.8). Notre étude a par ailleurs démontré que la déplétion de PSMD14 ne se limite pas qu'à l'apoptose précédé par un arrêt du cycle cellulaire (diminution de RB phosphorylé) mais serait une mort complexe. En effet, elle fait intervenir également l'autophagie visible par l'augmentation des niveaux de LC3B-II et le dommage à l'ADN avec une hausse des niveaux protéiques de γ H2AX. L'article de Butler, L. R et al en 2012 a déjà lié PSMD14 au dommage à l'ADN (106). Il suggère que PSMD14 permet de débiquitiner les chaînes polyubiquitinées K63 formées sur des protéines nucléaires lors de la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Par ailleurs, il a également démontré que les cellules déficientes en PSMD14 sont plus sensibles aux agents endommagent l'ADN. Il a également vu un enrichissement du protéasome 19S aux sites de dommage à l'ADN par une colocalisation de γ H2AX et PSMC5. Ceci ainsi que nos résultats suggère un rôle primordial du protéasome et particulièrement de sa sous-unité PSMD14 dans le noyau au niveau des mécanismes de réparation de l'ADN.

Nos résultats ont par ailleurs comparé la déplétion de PSMD14 avec les deux autres débiquitinases associées au protéasome USP14 et UCH37. Cela a révélé la supériorité de la diminution de la prolifération suivant la déplétion de PSMD14 par rapport à USP14 et UCH37. La déplétion de USP14 et UCH37 a déjà été proposé comme une méthode permettant de surpasser la résistance acquise au bortézomib par Tian, Z. et al en 2014 (107). Cela dit, nos résultats démontrent une faible diminution et

aucune diminution de la prolifération cellulaire après déplétion de UCH37 de USP14 respectivement dans les cellules résistantes au bortézomib (Figure 3.3).

Un autre fait intéressant est l'augmentation drastique de p53 et p21 après déplétion de PSMD14. Ceci a récemment été reporté en ce qui concerne p53 par Wang, C. H et al en 2018 (108). Cela dit, notre étude a démontré que la diminution de la prolifération et la mort cellulaire observés sont indépendantes de p53, p21 et Myc (Figure 3.3, Figure S6.6).

La diminution dramatique de la prolifération et la mort cellulaire observés après déplétion de PSMD14 sont en partie due à son activité catalytique (Figure 3.4). Ainsi, les protéines destinées à la dégradation par le protéasome ne peuvent plus être déubiquitinées. Or cette déubiquitination nécessaire précède l'entrée et la dégradation protéasomale des protéines. Nous avons également inhibé PSMD14 par molécule chimique le capzimin (101) et cela s'est traduit également par une diminution drastique de la prolifération cellulaire et cela même dans les cellules du myélome multiple résistantes au bortézomib. Ce résultat a par ailleurs été obtenu de façon non spécifique par Song, Y. et al en 2017 (109). En effet, ils ont utilisé *O*-phenanthroline pour inhiber PSMD14 dans des cellules cancéreuses du myélome multiple. Tout d'abord, l'*O*-phenanthroline est un chélateur d'ion de métal inhibant plusieurs protéases comme les métalloprotéases. C'est également un agent intercalant de l'ADN et de l'ARN et un inhibiteur de la cholinestérase (109-111). Par la suite, la comparaison de l'effet inhibiteur de PSMD14 par l'*O*-phenanthroline dans des cellules sensibles ou résistantes au bortézomibs s'est faite sur des cellules du myélome multiple MM.1S et ANBL-6.BR. Les MM.1S sont sensibles au dexaméthasone qui est une hormone glucocorticoïde utilisé également dans le traitement de myélome multiple, tandis que les ANBL-6.BR sont résistantes au botézomibe. Or cette comparaison s'est faite entre deux lignées distinctes, pourtant les cellules ANBL-6.BR résistantes au botézomibe possèdent leur lignée parentale sensible au

botézomibe. De plus, dans une de leurs études précédentes sur la résistance au bortézomib ils ont utilisé les cellules ANBL-6 et ANBL-6.BR sensibles et résistantes au botézomibe (107).

Une comparaison de la déplétion de PSMD14 et de plusieurs composantes importantes au bon fonctionnement du protéasome a été réalisée (Figure 3.5). Cette dernière a révélé que plusieurs d'entre elles diminuent la prolifération cellulaire dans les cellules résistantes principalement la déubiquitinase PSMD14 et les sous-unités catalytiques PSMB6 et PSMB7. Étonnamment la déplétion de PSMB5 a réduit la prolifération des cellules résistantes au bortézomib de 33,26%, suggérant que l'inhibition de PSMB5 au niveau protéique par le bortézomib diffère de l'inhibition de PSMB5 au niveau de son ARNm. Ceci a été suggéré en 2017 par Mo, H. M et al (112). Afin de mieux comparer la thérapie actuelle à notre cible majeure une déplétion de PSMB5 et PSMD14 a été réalisée, révélant une supériorité des effets moléculaire résultant de la déplétion de PSMD14. En effet, elle semble créer un plus grand arrêt du cycle cellulaire accompagné par une plus grande diminution de la fraction phosphorylée de RB et une plus grande expression de p53/p21, ainsi qu'un plus grand arrêt de la synthèse protéique visible par un plus grand niveau protéique de eif2 α phosphorylée. Nous avons également observé plus d'apoptose et d'autophagie perçue par l'augmentation des niveaux de la caspase 3 active et LC3B-II. Finalement, nous avons observé plus de dommage de l'ADN traduit par une hausse des niveaux du marqueur de dommage à l'ADN γ H2AX. Ceci ne semble pas être le cas de PSMB5 dans les cellules résistantes. Cette comparaison s'est poursuivie dans le cadre du stock cellulaire d'ubiquitine. La déplétion de PSMD14 a créé une plus grande accumulation de protéine poly-ubiquitinée et une diminution de l'ubiquitine libre par rapport à la déplétion de PSMB5 (Figure 3.6), suite à la hausse des niveaux protéiques de γ H2AX observé (Figure 3.5). Étonnement la déplétion de PSMD14 et PSMB5 ont démontré la présence cytoplasmique anormalement élevée de γ H2AX dans les cellules sensibles (Figure 3.6). La déplétion de PSMD14 a produit ce phénotype également dans les cellules résistantes, ce qui ne semble pas être le cas de la déplétion de PSMB5. Il est à

noter que Dou, Z et al en 2017 ont observé eux aussi la présence de l'histone γ H2AX cytoplasmique retrouvée avec des fragments cytoplasmiques de chromatine dans des cellules primaires et cancéreuses en sénescence (113). Or on détecte de la sénescence lorsqu'on déplete PSMD14 dans les sensibles et résistantes notamment avec une augmentation des niveaux de LC3B-II. Ceci est également le cas pour PSMB5 mais pourtant on observe l'histone γ H2AX cytoplasmique que chez les sensibles pour PSMB5 (Figure 3.5). Cela peut s'expliquer par les niveaux protéiques élevés de LC3B provoqués par la déplétion de PSMB5. En effet, la déplétion de PSMD14 produit de plus grand niveau de LC3B-II que PSMB5. Cette quantité produite par la déplétion de PSMB5 peut être suffisante pour induire une localisation anormal cytoplasmique de γ H2AX dans les sensibles mais pas dans les résistantes. Par ailleurs, Jung, E. J. et al ont également rapporté en 2008 une localisation cytoplasmique de γ H2AX associée à la mort cellulaire de cellule U2OS produites par une surexpression du récepteur tropomyosine kinase A (TrkA) (114).

L'ensemble de ces comparaisons témoignent toutefois du potentiel thérapeutique jamais exploité jusqu'à nos jours de PSMD14 pour les patients atteints de myélome multiple sensible mais également résistant au bortézomib. L'inhibition de PSMD14 est plus efficace par rapport à PSMB5 et diminue d'avantage la prolifération des cellules cancéreuses sensibles mais également résistantes au bortézomib.

4.2 Biomarqueurs potentiels et prédiction de la résistance aux inhibiteurs du protéasome

Il est connu dans la littérature que l'inhibition du protéasome est suivie d'une déubiquitination massive de l'histone H2Aub (102). Par ailleurs, plusieurs études ont corrélé la hausse de l'expression de protéines de choc thermique (HSP) avec la résistance aux inhibiteurs de protéasome (103, 115, 116). Intuitivement, cela nous a poussé à investiguer cet aspect d'avantage (Figure 3.7A, Figure S6.8). Il s'est avéré que les cellules sensibles répondent comme prédit par la littérature alors que les cellules résistantes ne semblent pas répondre de la même façon. En effet, les cellules sensibles au bortézomib ont diminué leur niveau protéique de H2Aub suite à l'inhibition du protéasome et augmenté l'expression de leur protéine HSP70, tandis que les cellules résistantes au bortézomib n'ont pas diminué leur niveau d'H2Aub ou augmenté leur niveau d'HSP70. L'expression protéique de ces deux protéines est demeurée plus ou moins constante et invariable dans les cellules résistantes après inhibition du protéasome. Étonnement ce résultat a pu être renversé dans les cellules résistantes lorsqu'elles sont traitées par le capzimin (Figure 3.7B), révélant une fois de plus l'efficacité que peut traduire un éventuel traitement ciblant la déubiquitinase PSMD14 notamment pour les cellules résistantes.

5. CONCLUSIONS

Le but de ce projet est d'investiguer d'autres composantes du système ubiquitine protéasome comme les déubiquitinases et les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des patients atteints de myélome multiple résistant au bortézomib. Les DUB et E2 sont des cibles thérapeutiques anticancéreuses dont l'inhibition pourrait surpasser la résistance acquise au bortézomib.

Plusieurs cibles potentielles ont été révélées et les meilleures cibles ont été validées. Par la suite, l'étude s'est focalisée sur l'évaluation détaillée d'une cible particulière, majeure et prometteuse, la déubiquitinase associée au protéasome PSMD14. L'inhibition de cette dernière a révélé son efficacité drastique à surpasser la résistance acquise au bortézomib.

Par ailleurs, la comparaison de l'inhibition de PSMD14 à PSMB5, l'actuelle cible de la thérapie à base de bortézomib, a nettement démontré la supériorité et l'efficacité de PSMD14. La supériorité des effets moléculaires résultant de la déplétion de PSMD14 par rapport à PSMB5 se traduit par un plus grand arrêt du cycle cellulaire, un plus grand arrêt de la synthèse protéique, plus d'apoptose et d'autophagie et plus de marqueur de dommage à l'ADN γ H2AX cytoplasmique.

Tout cela témoigne une fois de plus l'efficacité que peut traduire un éventuel traitement ciblant la déubiquitinase associée au protéasome PSMD14. Le potentiel thérapeutique de PSMD14 n'a jamais été exploité jusqu'à nos jours pour les patients atteints de myélome multiple sensible mais également résistant au bortézomib ainsi que d'autres cancers.

Comme perspective, il sera intéressant d'effectuer des ciblage pour des molécules chimique ciblant PSMD14 ou autres cibles candidates du criblage et d'essayer de les valider dans des modèles animaux. À long terme, cela pourrait amener une ou plusieurs molécules chimiques à la phase clinique.

6. DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

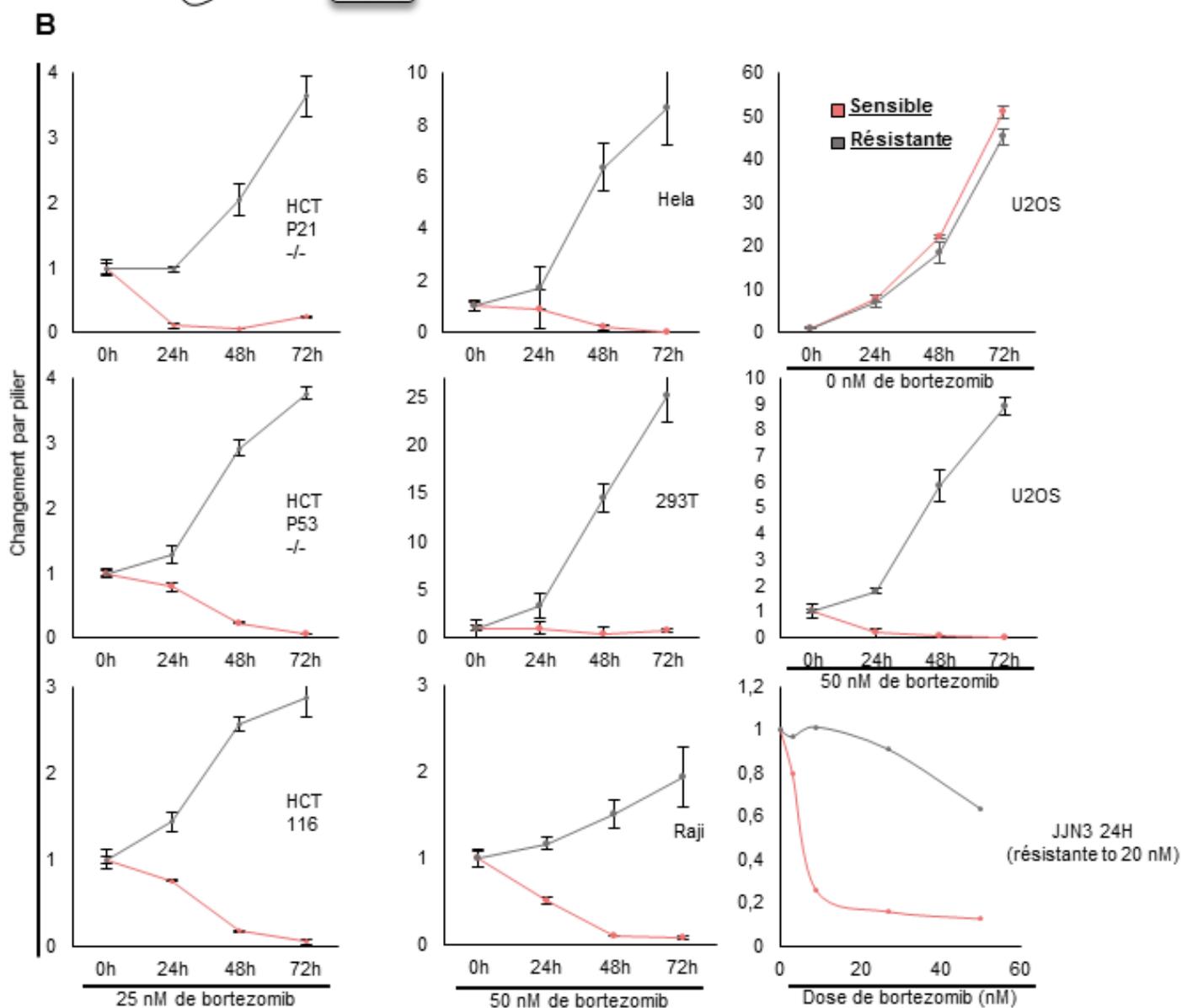
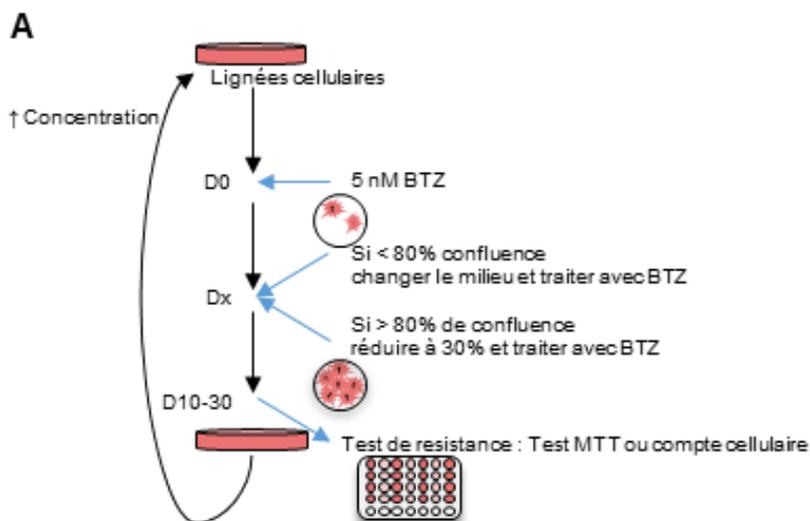


Figure S6.1 Procédure de génération des cellules résistantes au bortézomib

(A). Représentation schématique de la procédure utilisée pour générer des cellules résistantes au bortézomib. Au début, les cellules ont été traitées avec la dose la plus faible de 5 nM de bortézomib non létale. En fonction de leur confluence et de leur métabolisme, le milieu est changé ou la confluence est des cellules est réduite avant de les traiter au bortézomib. Au fur et à mesure, les cellules deviennent progressivement résistantes à la dose traitée. Cette résistance peut être vérifiée par un test MTT ou un comptage cellulaire. De plus, la dose est lentement augmentée chaque fois que les cellules deviennent résistantes à la dose traitée de bortézomib (5, 7,5, 10, 20, 25, 30 et 50 nM).

(B). Test MTT validant l'état de résistance au bortézomib des cellules résistantes générées. Graphique comparant la prolifération de différents types de cellules sensibles aux résistantes traitées par le bortézomib. La mort cellulaire a été évaluée par le test de prolifération MTT à différents temps. Le résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes (U2OS, HeLa, Raji). Le résultat est d'une expérience. (HEK293T, HCT et JLN3). L'écart type du triplicat de 1 expérience représentative est représenté par les barres d'erreur.

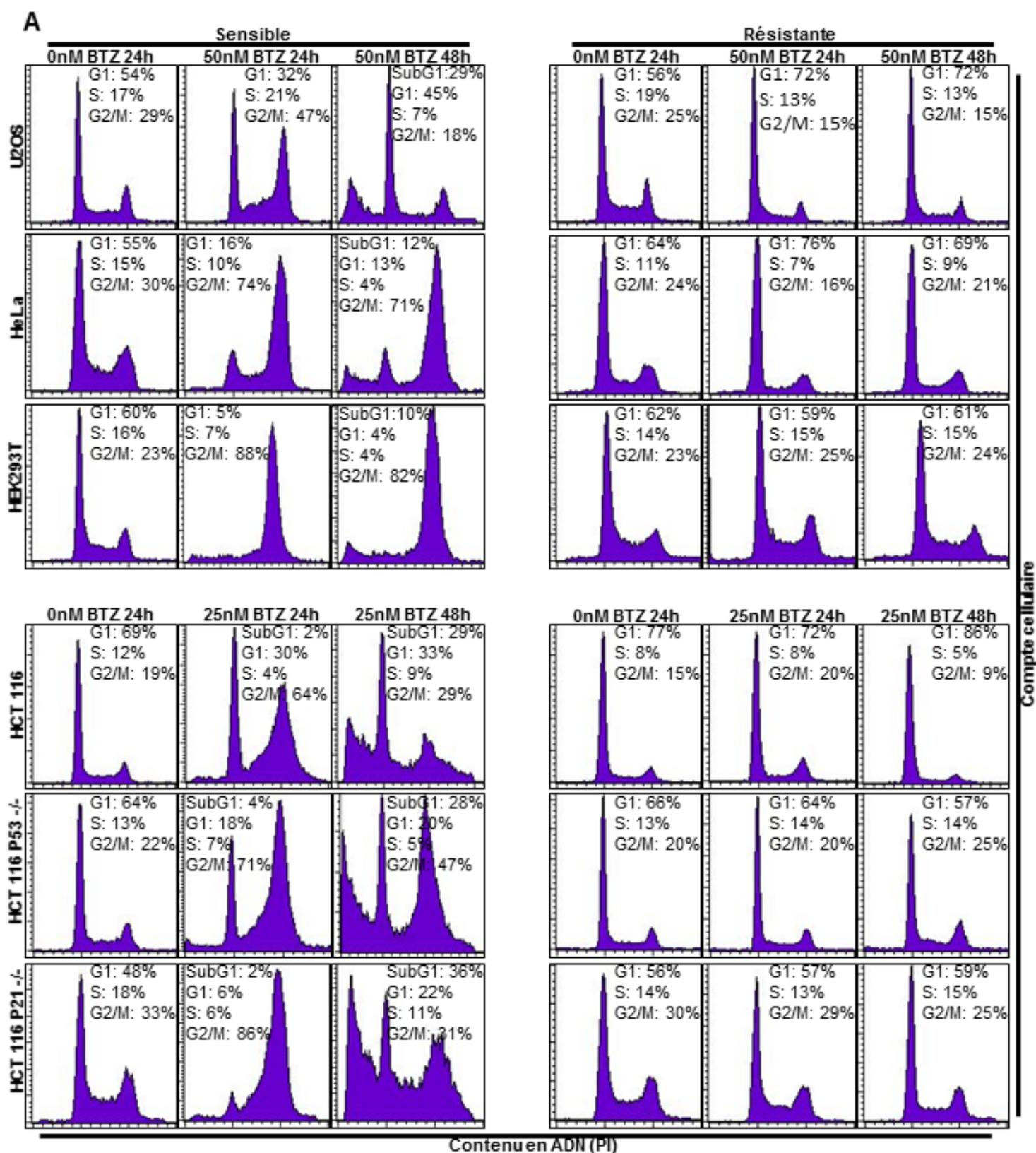


Figure S6.2 Profile de cytométrie en flux des cellules sensibles ou résistantes après traitement au bortézomib

(A). Cytométrie en flux avec coloration à l'iodure de propidium (PI) réalisée pour différents types de cellules sensibles ou résistantes traitées au bortézomib. Le résultat est d'une expérience.

Figure S6.3 Valeur note Z issues des criblages de DUBs et E2s effectués

(A). Graphiques à note Z (Z-scores) des criblages DUBs et E2s réalisés dans différents types de cellules sensibles ou résistantes au bortézomib. Ces graphiques illustrent les 5 plus fortes et faibles cibles mises en évidence dans chaque type cellulaire. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

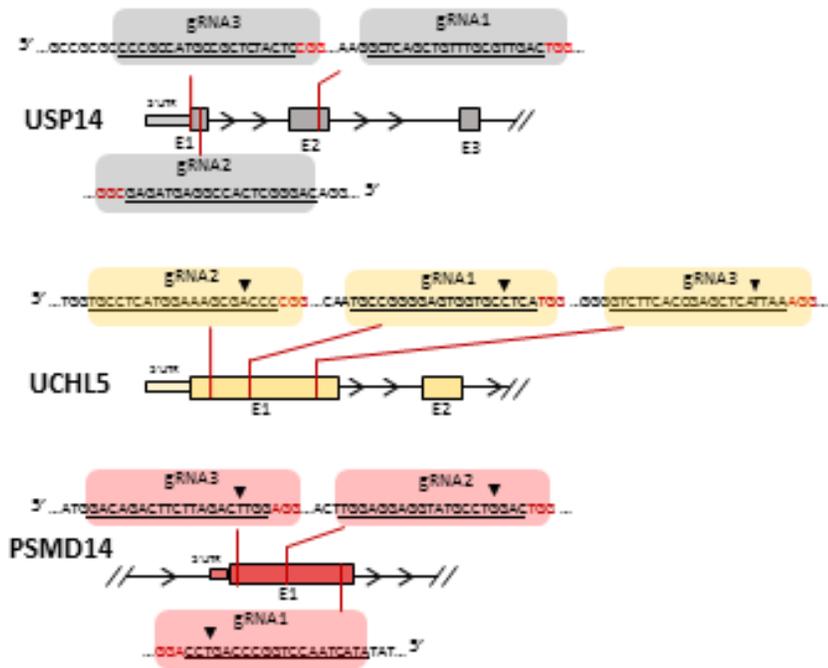
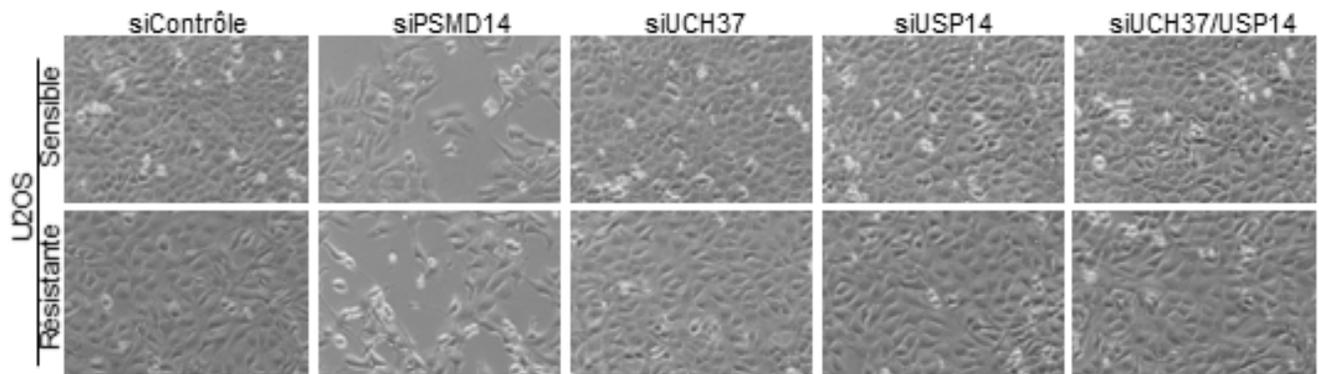
A**B**

Figure S6.4 Comparaison des effets des déplétions des 3 DUBs associées au protéasome

(A). Schéma illustrant les séquences d'hybridation ciblées par les gARN utilisés pour PSMD14, USP14 et UCH37. Ces séquences sont représentées sur les exons de leur gène d'intérêt avec les sites de clivage prédits de la Cas9.

(B). Photo en contraste de phase de cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées en PSMD14, UCH37, USP14 et UCH37/USP14 comparées au contrôle. Le résultat est d'une expérience.

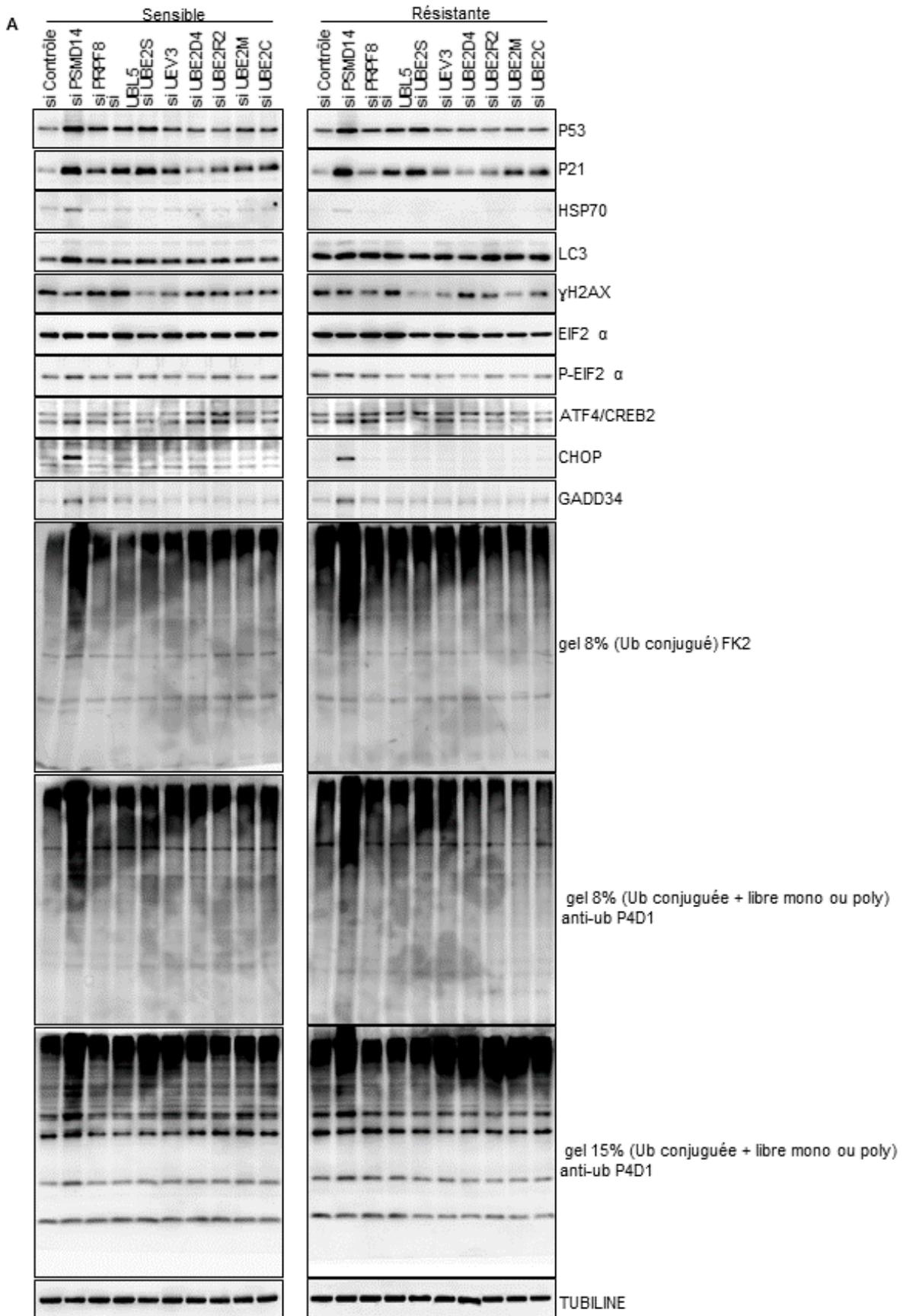


Figure S6.5 Validation et comparaison des effets des déplétions des meilleures cibles DUBs et E2s du criblage

(A). Immunobuvardages de plusieurs protéines marqueurs réalisés sur des échantillons de cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib après déplétion ARNi des meilleures cibles obtenues par les criblages. Le résultat est d'une expérience.

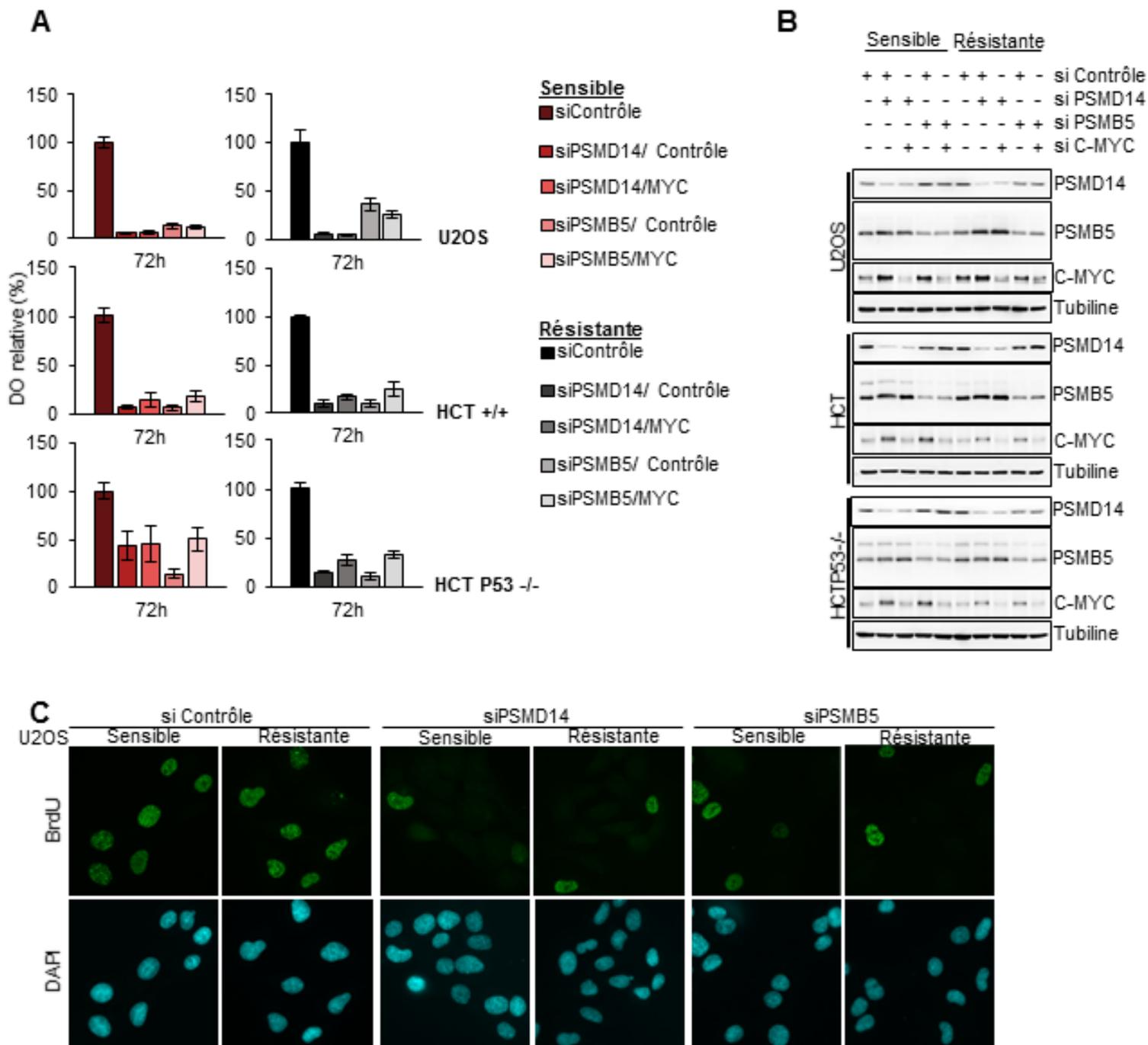


Figure S6.6 Comparaison des effets de PSMD14 et PSMB5 sur la prolifération

(A). Test de prolifération MTT des U2OS, HCT 116 et HCT 116 p53 ^{-/-} cellules de bortézomib sensibles ou résistantes après déplétion de PSMD14/Contrôle, PSMD14/MYC, PSMB5/Contrôle et de PSMB5/MYC. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes. L'écart type du triplicat de 1 expérience représentative est représenté par les barres d'erreur.

(B). Immunobuvardage des U2OS, HCT 116 et HCT 116 p53 ^{-/-} cellules de bortézomib sensibles ou résistantes après déplétion de PSMD14/Contrôle, PSMD14/MYC, PSMB5/Contrôle et de PSMB5/MYC. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

(C). Coloration au BrdU (bromodésoxyuridine) et au DAPI des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib après déplétion de PSMD14 ou PSMB5 comparées au contrôle. Le résultat est d'une expérience.

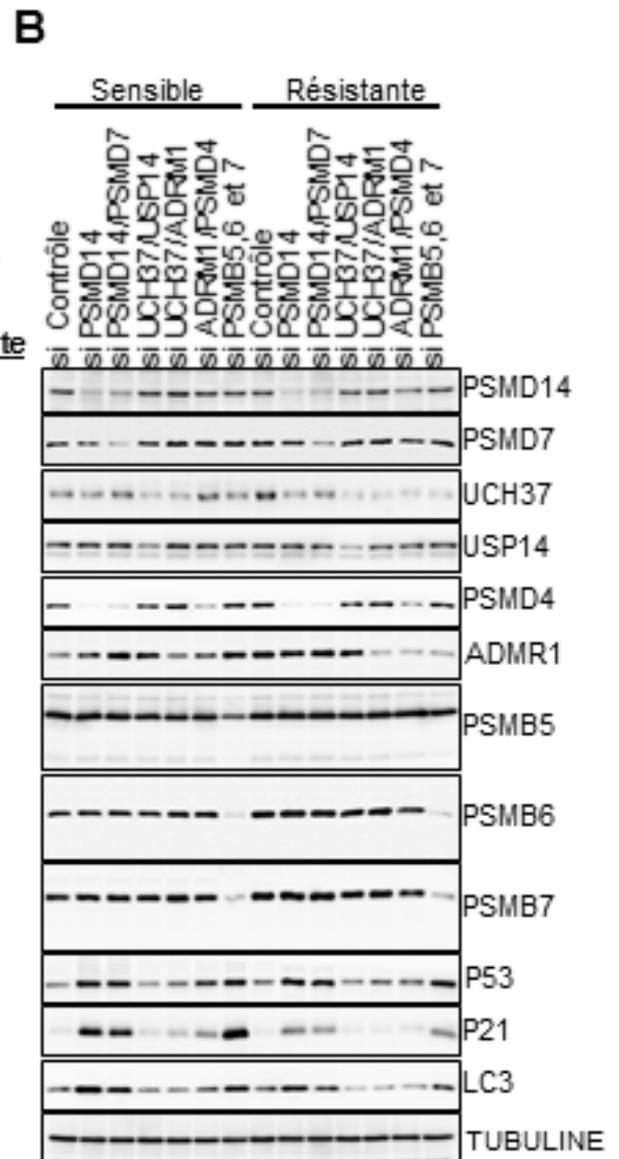
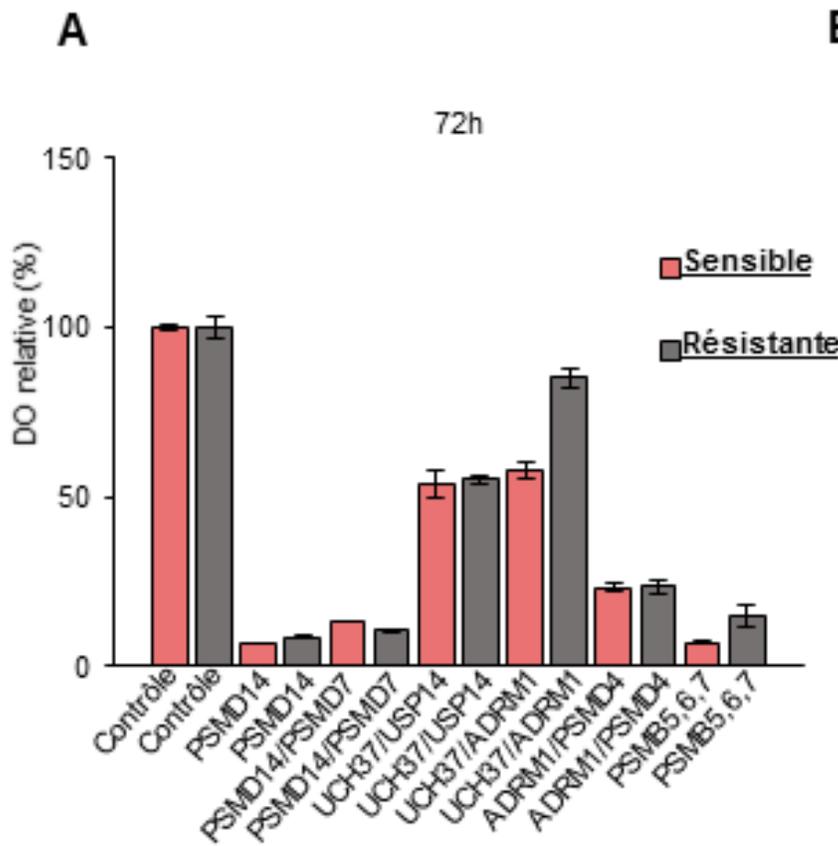


Figure S6.7 Effet de la déplétion combinée de plus d'une sous unité du protéasome sur la prolifération cellulaire

(A). Test MTT des cellules U2OS sensibles ou résistantes aux bortézomib déplétées de combinaison des composantes du complexe régulateur et catalytique du protéasome 26S. Le résultat est d'une expérience. L'écart type du triplicat de 1 expérience représentative est représenté par les barres d'erreur.

(B). Immunobuvardage des cellules U2OS sensibles ou résistantes aux bortézomib déplétées de combinaison de composantes du complexe régulateur et catalytique du protéasome 26S pour vérifier l'efficacité des déplétions. Le résultat est d'une expérience.

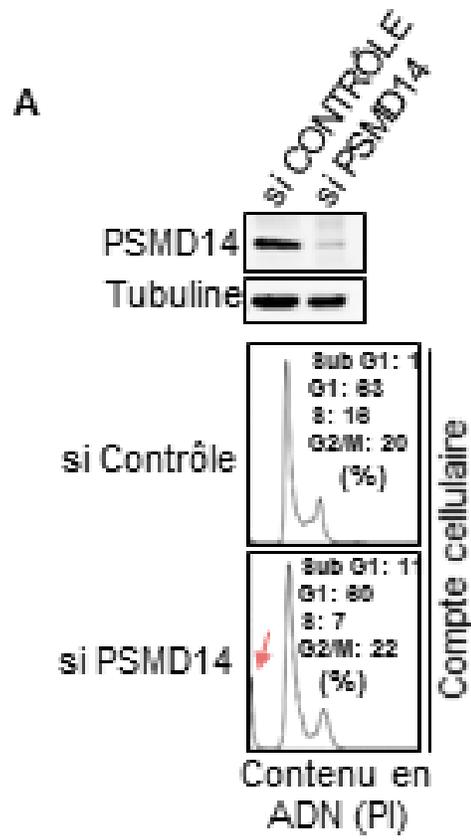


Figure S6.8 La déplétion de PSMD14 et apoptose

(A). Immunobuvardage et profil de cytométrie en flux des cellules U2OS déplétées de PSMD14 comparées au contrôle. Le résultat est d'une expérience.

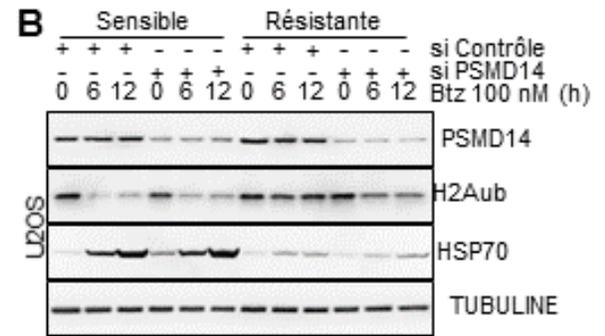
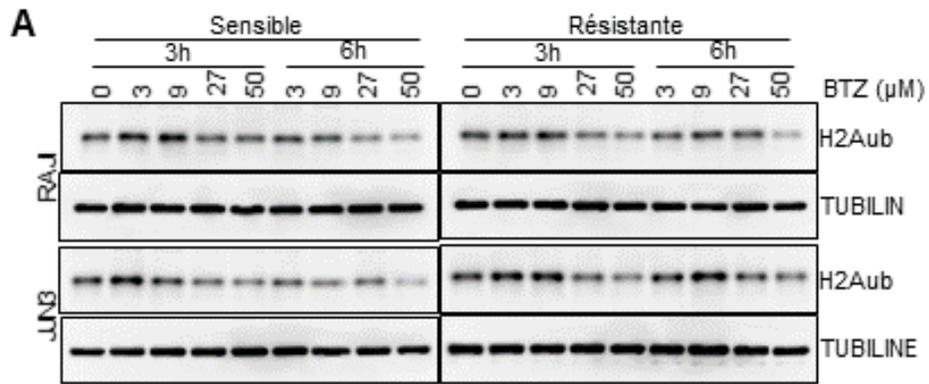


Figure S6.9 Variation des niveaux d'H2Aub et HSP70 dans des cellules du myélome multiple et lymphome suite à une inhibition du protéasome

(A). Immunobuvardage des cellules Raji et JJN3 sensibles ou résistantes au bortézomib traitées au bortézomib pour les temps et doses indiqués. Le résultat est d'une expérience.

(B). Immunobuvardage des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib déplétées de PSMD14 et traitées au bortézomib comparées au contrôle. Le résultat est d'une expérience.

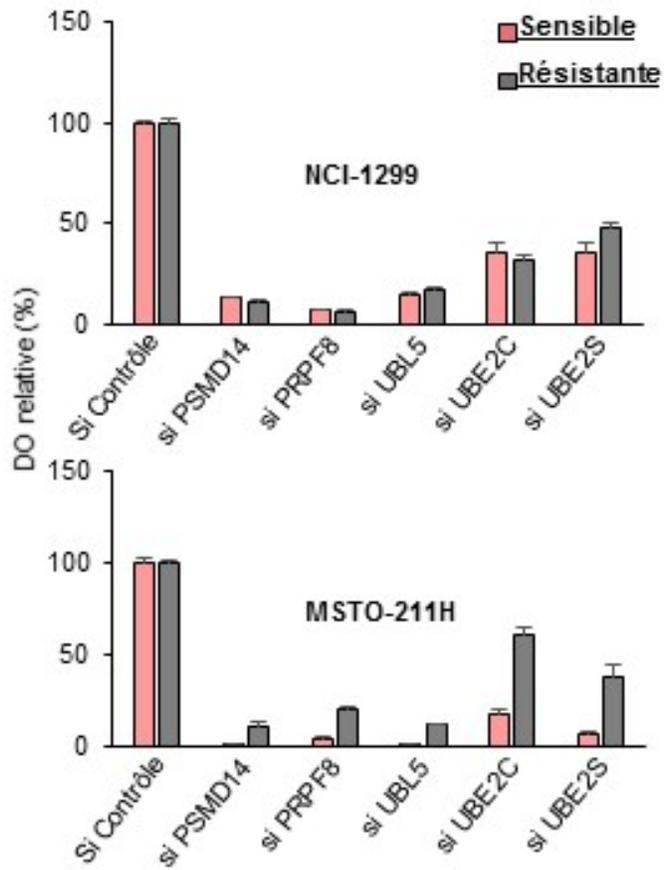
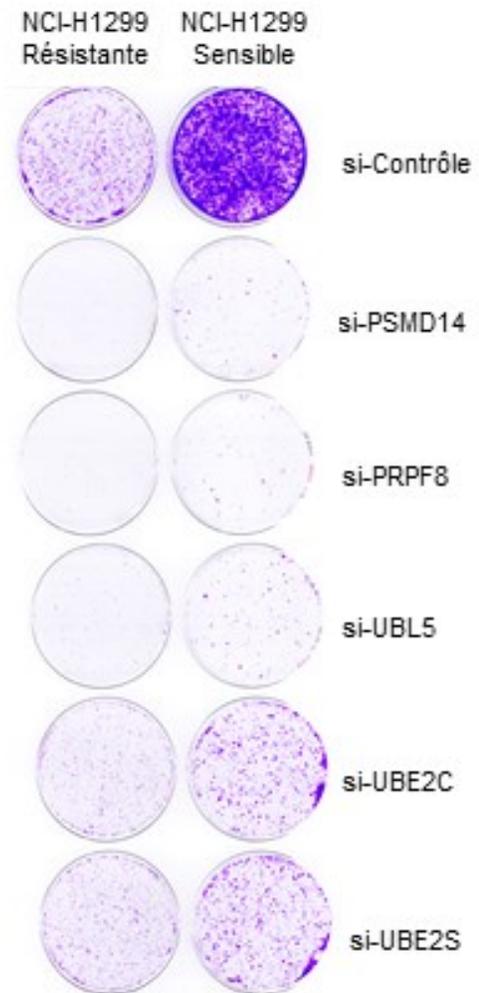
A**B**

Figure S6.10 Effets des déplétions des meilleures cibles DUBs et E2s du criblage dans des cellules du mésothéliome résistantes au bortézomib

(A). Test MTT des cellules cancéreuses du mésothéliome NCI-1299 et MSTO-211H sensibles ou résistantes au bortézomib après déplétion ARNi des meilleures cibles obtenues par les criblages. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes (NCI-1299). Le résultat est d'une expérience (MSTO-211H).

(B). Essai de formation de colonies des cellules cancéreuses du mésothéliome NCI-1299 sensibles ou résistantes au bortézomib après déplétion ARNi des meilleures cibles obtenues par les criblages. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes (NCI-1299). Le résultat est d'une expérience (MSTO-211H).

Tableau III. Liste des anticorps

Proteins	Antibodies	Specificity	Company	Catalogue number	Dilution
PSMD14	D18C7	RABBIT MONOCLONAL	CELL SIGNALING	4197S	1/1000
UCH37	EPR4896	RABBIT MONOCLONAL	ABCAM	AB124931	1/1000
USP14	6 E 6	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-100630	1/1000
PSMD7	Anti-PSMD7	RABBIT POLYCLONAL	BETHYL	A303-828A	1/1000
PSMD4	E2	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-393546	1/1000
ADRM1	F-12	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-166754	1/1000
PSMB5	Anti-PSMB5	Rabbit POLYCLONAL	BETHYL	A303-847A	1/1000
PSMB6	E1K9O	RABBIT MONOCLONAL	CELL SIGNALING	13267	1/1000
PSMB7	E1L5H	RABBIT MONOCLONAL	CELL SIGNALING	13207	1/1000
TUBILIN	B512	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-23948	1/50000
P53	DO-1	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-126	1/1000
P21	ANTI-P21	MOUSE MONOCLONAL	BD PHARMIGEN	556431	1/1000
LC3	2775	RABBIT POLYCLONAL	CELL SIGNALING	2775	1/1000
H2A	ANTI-HISTONE H2A	RABBIT POLYCLONAL	ABCAM	AB18255	1/1000
H2AUB	D27C4	RABBIT MONOCLONAL	CELL SIGNALING	8240S	1/1000

YH2AX	CLONE JBW301	MOUSE MONOCLONAL	MILLIPORE	05-636	1/1000
HSP70	C92F3A-5	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-66048	1/1000
CASPASE 3	5A1E	RABBIT MONOCLONAL	CELL SIGNALING	9664	1/1000
CASPASE 9		Rabbit		NEB 95015	1/1000
PARP	F-2	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-8007	1/1000
RB	4H1	MOUSE MONOCLONAL	CELL SIGNALING	9309S	1/1000
P-RB	Ser807/811	RABBIT POLYCLONAL	CELL SIGNALING	9308S	1/1000
C-MYC	9E10	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-40	1/1000
EIF2A	D-3	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-133132	1/1000
P-EIF2A		RABBIT POLYCLONAL	CELL SIGNALING	9721	1/1000
ATF4 (CREB2)	B-3	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-390063	1/1000
CHOP	9C8	MOUSE MONOCLONAL	THERMOFISH ER	MA1-250	1/1000
GADD34		RABBIT	PROTEINTEC H	10449-1- AP	1/1000
YY1	H-414	RABBIT POLYCLONAL	SANTA CRUZ	SC-1703	1/1000
H3					1/1000
UB (CONJUGATED FORME)	FK2	MOUSE MONOCLONAL	MILLIPORE	04-263	1/1000
UB (CONJUGATED AND FREE FORME)	P4D1	MOUSE MONOCLONAL	SANTA CRUZ	SC-801	1/1000

ANTI-MOUSE		IGG(H+L)	JACKSON IMMUNOREA SEARCH	115-036- 003	1/1000
ANTI-RABBIT		IGG(H+L)	JACKSON IMMUNOREA SEARCH	111-036- 003	1/1000

Tableau IV. Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR

Nom de l'oligo	Paire de base couverte	Gène	Sequence de l'oligo	Application
PSMD14-F1	182 bp	hPSMD14	AAGTTATGGGTTTGATGCTTGGGA	RT-qPCR
PSMD14-R1		hPSMD14	ATACCAACCAACAACCATCTCC	RT-qPCR
PRPF8-F1	218 bp	hPRPF8	ATGGCCGGAGTGTTTCCTTAT	RT-qPCR
PRPF8-R1		hPRPF8	TGGTCTCGAATGATCTTCCTGAC	RT-qPCR
UBL5-F1	134 bp	hUBL5	GGGAAGAAGGTCCGCGTAAA	RT-qPCR
UBL5-R1		hUBL5	ACGTGGTCCTTAAAAATCGTGT	RT-qPCR
UBE2S-F1	216 bp	hUBE2S	ACAAGGAGGTGACGACACTGA	RT-qPCR
UBE2S-R1		hUBE2S	CCACGTTCGGGTGGAAGAT	RT-qPCR
UEV3-F1	87 bp	hUEV3	GAGCCACGATGGACCTTGAAA	RT-qPCR
UEV3-R1		hUEV3	TCACCACCTTGAATGAGCAG	RT-qPCR
UBE2D4-F1	145 bp	hUBE2D4	GTCTCCAGCGTTGACTGTGTC	RT-qPCR
UBE2D4-R1		hUBE2D4	CCACTCTCTTGCTAGTCTGTTG	RT-qPCR
UBE2R2-F1	115 bp	hUBE2R2	AACTGGGAGGTGGCCATCTT	RT-qPCR
UBE2R2-R1		hUBE2R2	AGAATCTGAAGGTAGGTGGT	RT-qPCR
UBE2M-F1	135 bp	hUBE2M	GGAAGCCAGTCCTTACGATAAAC	RT-qPCR
UBE2M-R1		hUBE2M	CGTTCTGCTCAAACAGCCG	RT-qPCR
UBE2C-F1	129 bp	hUBE2C	ATGGCTTCCAAAACCGCGA	RT-qPCR
UBE2C-R1		hUBE2C	CATGAGGGTCATCAGCTCCT	RT-qPCR
MYSM1-F1	105 bp	MYSM1	AAGCCGCACTGTTTTACAAGT	RT-qPCR
MYSM1-R1		MYSM1	TTATGGCCGGTCTTCTGATTTG	RT-qPCR
MNPD-F1	181 bp	MNPD	CTGGGGAAGAGCCCTTCAGA	RT-qPCR
MNPD -R1		MNPD	TGAACGGCTGGAACCTTGTGA	RT-qPCR
BRCC36-F1	104 BP	BRCC36	CGCCCCATGAGAGTTGTGG	RT-qPCR
BRCC36-R1		BRCC36	TGATCCATCATCTGGTACAT	RT-qPCR
STAMBPF1	187 bp	STAMBPF1	TCGATGGATTGCGCCATGT	RT-qPCR
STAMBPF1-R1		STAMBPF1	GTGTTGCAGTAATCAGACCCA	RT-qPCR
STAMBPL1-F1	113 bp	STAMBPL1	GAGGATGGCGTCTGTGTATTG	RT-qPCR
STAMBPL1-R1		STAMBPL1	GCTGGTAATCTCGATGGTTAGG	RT-qPCR
EIF3F-F1	204 bp	EIF3F	AGGGTGCTGCCCGAGTTAT	RT-qPCR
EIF3F-R1		EIF3F	TGTCATGGCCCGTAGCGTA	RT-qPCR

EIF3H-F1	227 bp	EIF3H	TCGGGAGATTCAGCCGTGA	RT-qPCR
EIF3H-R1		EIF3H	CTCCGCATCATTTCATCTGATA	RT-qPCR
COPS5-F1	184 bp	COPS5	TGGGTCTGATGCTAGGAAAGG	RT-qPCR
COPS5-R1		COPS5	CTATGATACCACCCGATTGCATT	RT-qPCR
COPS6-F1	88 bp	COPS6	GCATTGGTGTAGACCACGTAG	RT-qPCR
COPS6-R1		COPS6	CTGTGCTGTGCTATCAGGTGT	RT-qPCR

Tableau V. Liste des gARN utilisés pour la technique CRISP/Cas9

Nom de l'oligo	Gène	Sequence de l'oligo	Application
gRNA_F1	hPSMD14	caccgATACTAACCTGGCCCAGTCC	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R1	hPSMD14	aaacGGACTGGGCCAGGTTAGTATc	pLentiCRISPR_V2
gRNA_F2	hPSMD14	caccgTGGAGGAGGTATGCCTGGAC	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R2	hPSMD14	aaacGTCCAGGCATACCTCCTCCAc	pLentiCRISPR_V2
gRNA_F3	hPSMD14	caccgGACAGACTTCTTAGACTTGG	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R3	hPSMD14	aaacCCAAGTCTAAGAAGTCTGTc	pLentiCRISPR_V2
gRNA_F1	hUCH37	caccgGTCTTCACCGAGCTCATTA	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R1	hUCH37	aaacTTAATGAGCTCGGTGAAGAc	pLentiCRISPR_V2
gRNA_F2	hUCH37	caccgTGCCTCATGGAAAGCGACCC	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R2	hUCH37	aaacGGGTCGCTTTCCATGAGGCAc	pLentiCRISPR_V2
gRNA_F3	hUCH37	caccgTGCCGGGAGTGGTGCCTCA	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R3	hUCH37	aaacTGAGGCACCACTCCCCGGCAc	pLentiCRISPR_V2
gRNA_F1	hUSP14	caccgGCTCAGCTGTTTGCGTTGAC	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R1	hUSP14	aaacGTCAACGCAAACAGCTGAGCc	pLentiCRISPR_V2
gRNA_F2	hUSP14	caccgCAGGGCTCACCGAGTAGAG	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R2	hUSP14	aaacCTCTACTCCGGTGAGCCCTGc	pLentiCRISPR_V2
gRNA_F3	hUSP14	caccgCCCGCCATGCCGCTTACTC	pLentiCRISPR_V2
gRNA_R3	hUSP14	aaacGAGTAGAGCGGCATGGCGGGc	pLentiCRISPR_V2

Tableau VI. Liste des plasmides utilisés

Nom du plasmide	compagnie	Insertion	Application
pLentiCRISPR_V2	addgene	gRNA	Knockout de gène
Myc-pENTR	ThermoFisher	PSMD14	Expression de protéine

Contribution

Ces travaux ont débuté lors du stage de baccalauréat (hiver 2016); travaux que j'ai poursuivis lors des stages d'été (été 2016) et de maîtrise (2016-18). Tout d'abord une analyse moléculaire et phénotypique détaillée de la déplétion de PSMD14 dans plusieurs lignées cellulaires a été réalisée. J'ai effectué les tests MTT et d'immunobuvardage après déplétion de PSMD14 utilisant les cellules U2OS, HEK293T et HeLa (Figure 3.3). Les expériences reliées à l'étude sur les effets de la déplétion de PSMD14 en présence ou en absence de gènes importants à la prolifération cellulaire, en utilisant des cellules HCT 116 p53 $-/-$, HCT 116 p21 $-/-$ et HCT 116 sensibles ou résistantes au bortézomib, furent également menées par moi (Figure 3.3). La comparaison entre l'effet de la déplétion de PSMD14 ainsi que celui de chaque déubiquitine de sa famille de protéine a été effectué. J'ai réalisé les déplétions ARNi, les tests MTT et la RT-qPCR utilisant des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib traitées ou non au capzmin (Figure 3.4).

Une comparaison entre l'effet de la déplétion de PSMD14 ainsi que d'autres protéines du protéasome a été également effectuée. J'ai réalisé les déplétions ARNi, tests MTT et d'immunobuvardage utilisant des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib (Figure 3.5) ainsi que les tests d'immunobuvardage des cellules déplétées de PSMD14 par technique CRISPR / Cas9 (Figure 3.3). Les tests MTT et d'immunobuvardage des cellules U2OS déplétées de combinaison des composantes du complexe régulateur et catalytique du protéasome 26S ont été effectués par moi (Figure S6.7). Les expériences sur les effets de la déplétion de PSMD14 et la protéine PSMB5, cible du bortézomib ont été effectuées par moi, soit les déplétions ARNi, tests d'immunofluorescence et d'immunobuvardage utilisant des cellules U2OS sensibles ou résistantes au bortézomib (Figure 3.5 et 3.6) ainsi que les expériences en présence ou en absence de gènes importants à la prolifération cellulaire (Figure S6.6). Les cellules résistantes au bortézomib ont été générées au laboratoire par moi (NCI-1299 et MSTO-211H), et

collaborateurs (U2OS, HEK293T, HeLa, Raji et JLN3 et HCT). Les tests MTT qui valident l'état de résistance des cellules U2OS, HEK293T, HeLa et Raji ont été effectués par moi (Figure S6.1) ainsi que les tests d'immunobuvardage des cellules U2OS, HEK293T et HeLa traitées au bortézomib (Figure 6.7) et U2OS traitées au capzimin (Figure 6.7). Cette analyse a été-poursuivie en utilisant différentes lignées cellulaires (40 types). Ce travail a été partagé entre moi et les collaborateurs en ce qui concerne les traitements au bortézomib (Figure 6.7) et les tests d'immunobuvardage (Figure 6.7). J'ai également réalisé la quantification des bandes d'immunobuvardage de H2Aub et HSP70 et fait l'analyse de corrélation (Figure 6.7 et S6.9).

Le Dr Anderson et son équipe ayant publié des résultats similaires aux nôtres, nous avons décidé d'élargir notre étude par un criblage de d'autres cibles de déubiquitines et d'enzymes de conjugaison de l'ubiquitine, tout en étudiant les phénotypes associés à la déplétion des cibles étudiées. Moi-même et plusieurs collaborateurs ont effectué les tests MTT des criblages (Figure 3.1 et S6.3). J'ai récolté et analysé les données informatiques du criblage et réalisé les déplétions, les tests RT-qPCR, MTT, CFA et d'immunobuvardage des meilleures cibles mises en évidence par les criblages utilisant différents types cellulaires U2OS, NCI-1299 et MSTO-211H sensibles ou résistantes au bortézomib (Figure 3.1, S6.3, S6.5 et S6.10). Finalement, j'ai réalisé l'interprétation intégrée des études et analyses bio-informatiques menées sur les tissus humains (Figure 3.2).

7. BIBLIORAPHIE

1. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
2. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*. 2015;349(6255):1483-9.
3. Kaushal K, Antao AM, Kim KS, Ramakrishna S. Deubiquitinating enzymes in cancer stem cells: functions and targeted inhibition for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2018.
4. The Nobel Prize in Chemistry. *NobelPrizeorg*. 2004;Fri. 24 Aug 2018.
5. Cao B, Mao X. The ubiquitin-proteasomal system is critical for multiple myeloma: implications in drug discovery. *Am J Blood Res*. 2011;1(1):46-56.
6. Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 5):937-53.
7. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994;79(1):13-21.
8. Lau AW, Fukushima H, Wei W. The Fbw7 and betaTRCP E3 ubiquitin ligases and their roles in tumorigenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:2197-212.
9. Xu GW, Ali M, Wood TE, Wong D, Maclean N, Wang X, et al. The ubiquitin-activating enzyme E1 as a therapeutic target for the treatment of leukemia and multiple myeloma. *Blood*. 2010;115(11):2251-9.
10. van Wijk SJ, Timmers HT. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J*. 2010;24(4):981-93.
11. Sun Y. E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia*. 2006;8(8):645-54.
12. Mansour MA. Ubiquitination: Friend and foe in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;101:80-93.
13. Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ*. 2005;12(9):1191-7.
14. Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*. 2009;458(7237):438-44.
15. Wong E, Cuervo AM. Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(12):a006734.
16. Crawford LJ, Irvine AE. Targeting the ubiquitin proteasome system in haematological malignancies. *Blood Rev*. 2013;27(6):297-304.
17. Liang J, Saad Y, Lei T, Wang J, Qi D, Yang Q, et al. MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling. *J Exp Med*. 2010;207(13):2959-73.
18. Liang J, Wang J, Azfer A, Song W, Tromp G, Kolattukudy PE, et al. A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages. *J Biol Chem*. 2008;283(10):6337-46.
19. Abdul Rehman SA, Kristariyanto YA, Choi SY, Nkosi PJ, Weidlich S, Labib K, et al. MINDY-1 Is a Member of an Evolutionarily Conserved and Structurally Distinct New Family of Deubiquitinating Enzymes. *Mol Cell*. 2016;63(1):146-55.
20. Kwasna D, Abdul Rehman SA, Natarajan J, Matthews S, Madden R, De Cesare V, et al. Discovery and Characterization of ZUFSP/ZUP1, a Distinct Deubiquitinase Class Important for Genome Stability. *Mol Cell*. 2018;70(1):150-64 e6.
21. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 2005;123(5):773-86.
22. Fraile JM, Quesada V, Rodriguez D, Freije JM, Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*. 2012;31(19):2373-88.

23. Shrestha RK, Ronau JA, Davies CW, Guenette RG, Strieter ER, Paul LN, et al. Insights into the mechanism of deubiquitination by JAMM deubiquitinases from cocrystal structures of the enzyme with the substrate and product. *Biochemistry*. 2014;53(19):3199-217.
24. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1695(1-3):189-207.
25. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev*. 2003;29 Suppl 1:3-9.
26. Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):7071-5.
27. Ben-Nissan G, Sharon M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules*. 2014;4(3):862-84.
28. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1997;386(6624):463-71.
29. Goldberg AL, Akopian TN, Kisselev AF, Lee DH, Rohrwild M. New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Biol Chem*. 1997;378(3-4):131-40.
30. Hochstrasser M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(2):215-23.
31. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002;82(2):373-428.
32. Tanaka K. *Protein Metabolism: Focusing on the Ubiquitin Proteasome System*. Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. 2017.
33. Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*. 2012;482(7384):186-91.
34. Maytal-Kivity V, Reis N, Hofmann K, Glickman MH. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem*. 2002;3:28.
35. Wilson SM, Bhattacharyya B, Rachel RA, Coppola V, Tessarollo L, Householder DB, et al. Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nat Genet*. 2002;32(3):420-5.
36. Al-Shami A, Jhaveri KG, Vogel P, Wilkins C, Humphries J, Davis JJ, et al. Regulators of the proteasome pathway, Uch37 and Rpn13, play distinct roles in mouse development. *PLoS One*. 2010;5(10):e13654.
37. Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2018.
38. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):349-60.
39. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11(3):239-53.
40. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med*. 1997;3(2):231-4.
41. Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):3850-5.
42. Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2002;16(4):433-43.

43. Dou QP, Li B. Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Updat.* 1999;2(4):215-23.
44. Yang H, Chen D, Cui QC, Yuan X, Dou QP. Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res.* 2006;66(9):4758-65.
45. Sun J, Nam S, Lee CS, Li B, Coppola D, Hamilton AD, et al. CEP1612, a dipeptidyl proteasome inhibitor, induces p21WAF1 and p27KIP1 expression and apoptosis and inhibits the growth of the human lung adenocarcinoma A-549 in nude mice. *Cancer Res.* 2001;61(4):1280-4.
46. Orłowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res.* 2008;14(6):1649-57.
47. Wojcik C. Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(11-12):908-17.
48. Orłowski RZ. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(4):303-13.
49. Neefjes J, Jongema ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):823-36.
50. Tanaka K. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J Leukoc Biol.* 1994;56(5):571-5.
51. Hill CP, Masters EI, Whitby FG. The 11S regulators of 20S proteasome activity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;268:73-89.
52. Angeles A, Fung G, Luo H. Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:1904-16.
53. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev.* 2005;207:19-30.
54. Kuhn DJ, Orłowski RZ. The immunoproteasome as a target in hematologic malignancies. *Semin Hematol.* 2012;49(3):258-62.
55. Altun M, Galardy PJ, Shringarpure R, Hideshima T, LeBlanc R, Anderson KC, et al. Effects of PS-341 on the activity and composition of proteasomes in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2005;65(17):7896-901.
56. Kuhn DJ, Hunsucker SA, Chen Q, Voorhees PM, Orłowski M, Orłowski RZ. Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood.* 2009;113(19):4667-76.
57. Tanaka K. The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles. *Keio J Med.* 2013;62(1):1-12.
58. McCarthy MK, Weinberg JB. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front Microbiol.* 2015;6:21.
59. Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nature reviews Drug discovery.* 2006;5(7):596-613.
60. Skrott Z, Cvek B. Linking the activity of bortezomib in multiple myeloma and autoimmune diseases. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;92(2):61-70.
61. McBride A, Ryan PY. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13(3):339-58.
62. Collins GA, Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell.* 2017;169(5):792-806.
63. Rollig C, Knop S, Bornhauser M. Multiple myeloma. *Lancet.* 2015;385(9983):2197-208.

64. Maes K, Menu E, Van Valckenborgh E, Van Riet I, Vanderkerken K, De Bruyne E. Epigenetic modulating agents as a new therapeutic approach in multiple myeloma. *Cancers (Basel)*. 2013;5(2):430-61.
65. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*. 2003;102(3):1064-9.
66. Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3076-84.
67. Anderson KC. Therapeutic advances in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(5 Suppl):676-9.
68. Pellom ST, Jr., Shanker A. Development of Proteasome Inhibitors as Therapeutic Drugs. *J Clin Cell Immunol*. 2012;S5:5.
69. Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009;114(5):1046-52.
70. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000;288(5468):1053-8.
71. Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res*. 2005;65(14):6282-93.
72. Ri M, Iida S, Ishida T, Ito A, Yano H, Inagaki A, et al. Bortezomib-induced apoptosis in mature T-cell lymphoma cells partially depends on upregulation of Noxa and functional repression of Mcl-1. *Cancer Sci*. 2009;100(2):341-8.
73. Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Perrone G, Miura N, Yasui H, et al. PI3K/p110{delta} is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Blood*. 2010;116(9):1460-8.
74. McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 2008;11(4-5):164-79.
75. Miller CP, Singh MM, Rivera-Del Valle N, Manton CA, Chandra J. Therapeutic strategies to enhance the anticancer efficacy of histone deacetylase inhibitors. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:514261.
76. Moreau P, Karamanesht, II, Domnikova N, Kyselyova MY, Vilchevska KV, Doronin VA, et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and covariate analysis of subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(12):823-9.
77. Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orłowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*. 2012;120(5):947-59.
78. Heider U, Kaiser M, Muller C, Jakob C, Zavrski I, Schulz CO, et al. Bortezomib increases osteoblast activity in myeloma patients irrespective of response to treatment. *Eur J Haematol*. 2006;77(3):233-8.
79. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*. 2002;21(37):5673-83.
80. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*. 1996;87(3):1104-12.

81. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2001;61(7):3071-6.
82. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood.* 2003;101(4):1530-4.
83. Gomez-Bougie P, Wulleme-Toumi S, Menoret E, Trichet V, Robillard N, Philippe M, et al. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2007;67(11):5418-24.
84. 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.
85. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood.* 2003;101(6):2377-80.
86. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):5923-9.
87. Chen C, Edelstein LC, Gelinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol.* 2000;20(8):2687-95.
88. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998;281(5383):1680-3.
89. Argyriou AA, Iconomou G, Kalofonos HP. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood.* 2008;112(5):1593-9.
90. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med.* 2003;348(26):2609-17.
91. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood.* 2008;112(6):2489-99.
92. Lu S, Yang J, Song X, Gong S, Zhou H, Guo L, et al. Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326(2):423-31.
93. Smith AJ, Dai H, Correia C, Takahashi R, Lee SH, Schmitz I, et al. Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells. *J Biol Chem.* 2011;286(20):17682-92.
94. Yang DT, Young KH, Kahl BS, Markovina S, Miyamoto S. Prevalence of bortezomib-resistant constitutive NF-kappaB activity in mantle cell lymphoma. *Mol Cancer.* 2008;7:40.
95. Fournier MJ, Gareau C, Mazroui R. The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules. *Cancer Cell Int.* 2010;10:12.
96. Kern J, Untergasser G, Zenzmaier C, Sarg B, Gastl G, Gunsilius E, et al. GRP-78 secreted by tumor cells blocks the antiangiogenic activity of bortezomib. *Blood.* 2009;114(18):3960-7.
97. Kuhn DJ, Orlowski RZ, Bjorklund CC. Second generation proteasome inhibitors: carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPSI). *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(3):285-95.

98. Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, Parlati F, Shenk KD, Lee SJ, et al. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res.* 2011;17(9):2734-43.
99. Buac D, Shen M, Schmitt S, Kona FR, Deshmukh R, Zhang Z, et al. From bortezomib to other inhibitors of the proteasome and beyond. *Curr Pharm Des.* 2013;19(22):4025-38.
100. Oka Y, Varmark H, Vitting-Seerup K, Beli P, Waage J, Hakobyan A, et al. UBL5 is essential for pre-mRNA splicing and sister chromatid cohesion in human cells. *EMBO Rep.* 2014;15(9):956-64.
101. Li J, Yakushi T, Parlati F, Mackinnon AL, Perez C, Ma Y, et al. Capzimin is a potent and specific inhibitor of proteasome isopeptidase Rpn11. *Nat Chem Biol.* 2017;13(5):486-93.
102. Dantuma NP, Groothuis TA, Salomons FA, Neeffjes J. A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J Cell Biol.* 2006;173(1):19-26.
103. Shringarpure R, Catley L, Bhole D, Burger R, Podar K, Tai YT, et al. Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *Br J Haematol.* 2006;134(2):145-56.
104. Chauhan D, Li G, Shringarpure R, Podar K, Ohtake Y, Hideshima T, et al. Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res.* 2003;63(19):6174-7.
105. Shah SP, Nooka AK, Jaye DL, Bahlis NJ, Lonial S, Boise LH. Bortezomib-induced heat shock response protects multiple myeloma cells and is activated by heat shock factor 1 serine 326 phosphorylation. *Oncotarget.* 2016;7(37):59727-41.
106. Butler LR, Densham RM, Jia J, Garvin AJ, Stone HR, Shah V, et al. The proteasomal deubiquitinating enzyme POH1 promotes the double-strand DNA break response. *EMBO J.* 2012;31(19):3918-34.
107. Tian Z, D'Arcy P, Wang X, Ray A, Tai YT, Hu Y, et al. A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance. *Blood.* 2014;123(5):706-16.
108. Wang CH, Lu SX, Liu LL, Li Y, Yang X, He YF, et al. POH1 Knockdown Induces Cancer Cell Apoptosis via p53 and Bim. *Neoplasia.* 2018;20(5):411-24.
109. Song Y, Li S, Ray A, Das DS, Qi J, Samur MK, et al. Blockade of deubiquitylating enzyme Rpn11 triggers apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance. *Oncogene.* 2017;36(40):5631-8.
110. Sammes PG, Yahioğlu G. 1,10-Phenanthroline: a versatile ligand. *Chemical Society Reviews.* 1994;23(5):327-34.
111. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1318 hpnngcaJ, 2018).
112. Mo HM, Wu QY, Han DY, Liu R, Ma X, Zhou P, et al. [Effects of PSMB5 on proliferation and bortezomib chemo-resistance in human myeloma cells and its related molecular mechanisms]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2017;38(12):1053-7.
113. Dou Z, Ghosh K, Vizioli MG, Zhu J, Sen P, Wangenstein KJ, et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature.* 2017;550(7676):402-6.
114. Jung EJ, Kim CW, Kim DR. Cytosolic accumulation of gammaH2AX is associated with tropomyosin-related kinase A-induced cell death in U2OS cells. *Exp Mol Med.* 2008;40(3):276-85.
115. Ding H, Peterson KL, Correia C, Koh B, Schneider PA, Nowakowski GS, et al. Histone deacetylase inhibitors interrupt HSP90**RASGRP1* and HSP90**CRAF* interactions to upregulate BIM and circumvent drug resistance in lymphoma cells. *Leukemia.* 2017;31(7):1593-602.

116. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(22):14374-9.