

Université de Montréal

**Analyse préliminaire du rôle des "Ubiquitin specific
peptidases" et de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A dans
les leucémies myéloïdes aiguës**

par

Marie-Noëlle Séguin-Grignon

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences biomédicales option générale

Directeur de recherche : Dr Josée Hébert

Membre de jury : Dr Caroline Laverdière

Président-rapporteur : Dr Raouf Fetni

Décembre 2014

© Marie-Noëlle Séguin-Grignon, 2014

Résumé

On note un taux élevé de résistance aux traitements dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA). Cette résistance peut être associée aux altérations de *TP53*. Les « ubiquitin specific peptidases » (USP) sont impliquées dans plusieurs cancers mais leurs rôles ne sont pas élucidés dans les LMA. L'analyse de l'expression génique par RT-PCR quantitative de 21 USP et des gènes de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* dans 111 échantillons de LMA a montré une dérégulation de *USP44*, *USP1*, *USP28* et *CDKN1A* dans respectivement 72%, 44%, 25% et 42% des cas. *CDKN1A*, une cible importante de TP53, pourrait avoir un rôle dans la résistance au traitement. Nous avons développé un modèle expérimental pour évaluer la réponse des cellules leucémiques à la doxorubicine et au nutlin 3, un modulateur non génotoxique de TP53, selon l'expression initiale de *CDKN1A*. Ce travail préliminaire suggère que certains membres de la famille des USP et *CDKN1A* pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques dans les LMA.

Mots-clés : Leucémie myéloïde aiguë, « Ubiquitin specific peptidases » (USP), cibles thérapeutiques, *TP53*, *CDKN1A*.

Abstract

There is a high rate of drug resistance in acute myeloid leukemia (AML) which may be associated with *TP53* alterations. The « Ubiquitin specific peptidases » (USP) are involved in several cancers but their roles in AML are not elucidated. Gene expression analysis of 21 USP and genes of the *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* axis by quantitative RT-PCR in 111 AML samples, showed a deregulation of *USP44*, *USP1*, *USP28* and *CDKN1A* in respectively 72%, 44%, 25% and 42% of cases. *CDKN1A*, an important TP53 target, may have a role in treatment resistance. We have developed an experimental model to assess the response of leukemic cells to doxorubicin and nutlin 3, a non genotoxic TP53 modulator, in relation to the *CDKN1A* expression level. This preliminary work suggests that some members of the USP family and *CDKN1A* could represent novel therapeutic targets in AML.

Keywords : Acute myeloid leukemia, « Ubiquitin specific peptidases » (USP), therapeutic targets, *TP53*, *CDKN1A*.

Table des matières

Résumé.....	ii
Liste des abréviations.....	xi
Introduction.....	1
L'ubiquitination	1
L'ubiquitination, une modification post-traductionnelle	1
Ajout de l'ubiquitine	2
La déubiquitination	3
Le système de l'ubiquitination possède divers rôles cellulaires	5
La famille des « ubiquitin specific peptidases » est caractérisée par son domaine catalytique	10
Le cancer est un ensemble de maladies génétiquement diversifiées	11
Caractéristiques et modèles du cancer	11
La transformation maligne et la cellule souche cancéreuse.....	13
La thérapie ciblée dans les cancers	14
La résistance aux thérapies anticancéreuses	15
La thérapie ciblée et les cellules souches cancéreuses.....	17
L'ubiquitination joue un rôle important dans l'oncogenèse	18
Les cancers hématologiques	19
La leucémie myéloïde aiguë	20
L'axe « USP7-MDM2-TP53-CDKN1A » dans le cancer	30
TP53 est l'acteur central de l'apoptose.....	30
USP7 est la déubiquitinase de TP53	39
MDM2 est l'Ub ligase de TP53	42
CDKN1A est une cible importante de TP53.....	45
Hypothèse et objectifs de ce projet.....	48
1-Évaluer le rôle potentiel des membres sélectionnés de la famille des USP dans les LMA.....	49
I. Étude de l'expression génique de différentes USP dans des cellules primaires et des lignées cellulaires de LMA.....	49

II. Étude de l'impact d'une dérégulation des gènes testés sur la survie globale des patients avec LMA.....	49
2-Évaluer l'axe <i>USP7-MDM2-TP53-CDKN1A</i> dans la LMA	51
I. Étude de la dérégulation de l'expression génique de ces gènes dans des LMA sélectionnées.....	51
II. Étude de l'impact d'une dérégulation des gènes de l'axe sur la survie globale des patients avec LMA.....	51
III. Étude de l'expression protéique des gènes de cet axe dans les lignées cellulaires de LMA.....	51
IV. Mise en place d'un système <i>in vitro</i> de traitement des cellules à la doxorubicine et/ou au nutlin 3 évaluant la réponse au traitement selon le statut initial d'expression de CDKN1A	51
Matériel et méthodes.....	52
Culture de lignées cellulaires et d'échantillons primaires de leucémie myéloïde aiguë.....	52
Lignées cellulaires	52
Échantillons primaires de leucémie myéloïde aiguë.....	52
Analyse de l'expression de différents gènes de la famille des USP et des gènes de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A par RT-qPCR	53
Étape 1 : Extraction de l'ARN et synthèse du « cADN ».....	53
Étape 2 : Quantification de l'expression génique	54
Analyse des données de l'expression génique par RT-qPCR.....	55
Méthodes statistiques utilisées pour corrélérer l'expression des gènes avec les caractéristiques morphologiques, génétiques et cliniques des leucémies étudiées.....	56
Élaboration d'un système de traitement <i>in vitro</i> des cellules leucémiques pour évaluer l'expression protéique des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A et analyser l'impact de leur variation d'expression sur les traitements à la doxorubicine et/ou à la nutlin 3.....	57
Traitements <i>in vitro</i>	57
Quantification de la viabilité cellulaire et de l'apoptose des cellules traitées	58
Étude de l'expression protéique des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A par Western Blot	59

Récolte pour extraction protéique et congélation	59
Extraction protéique.....	60
Western blot et immunomarquage	61
Résultats	65
Expression génique des membres sélectionnés de la famille des USP dans les LMA	65
Expression de <i>USP44</i> dans les échantillons leucémiques étudiés	66
Expression de <i>USP1</i> dans les échantillons leucémiques étudiés	69
Expression de <i>USP28</i> dans les échantillons leucémiques étudiés	70
Expression de <i>USP44</i> et de <i>USP28</i> dans trois lignées cellulaires de LMA	72
Expression génique des membres de l'axe <i>USP7-MDM2-TP53-CDKN1A</i> dans les échantillons primaires de LMA étudiés	72
Expression génique de <i>USP7</i>	72
Expression génique de <i>MDM2</i>	73
Expression génique de <i>TP53</i>	75
Expression génique de <i>CDKN1A</i>	76
Expression génique des membres de l'axe dans les lignées cellulaires de LMA	76
La dérégulation de l'expression de <i>USP1</i> et <i>USP28</i> est associée à une modification de la survie des patients avec LMA <i>de novo</i> dans la cohorte étudiée.....	77
Évaluation de l'impact de la sous-expression de <i>TP53</i> et la surexpression de <i>CDKN1A</i> sur la survie globale des patients avec LMA <i>de novo</i> dans la cohorte étudiée.....	78
L'expression protéique des membres de l'axe <i>USP7-MDM2-TP53-CDKN1A</i> varie dans les lignées de LMA étudiées.....	80
Mise au point d'un système <i>in vitro</i> vérifiant si l'expression basale de <i>CDKN1A</i> dans des cellules de LMA module la réponse au traitement à la doxorubicine et/ou au nutlin 3.....	84
Mise au point de l'analyse de l'effet cytotatique et cytotoxique du traitement à la doxorubicine et/ou au nutlin 3 dans le système <i>in vitro</i>	86
Mise au point de l'analyse des modifications protéiques des membres de l'axe <i>USP7-MDM2-TP53-CDKN1A</i> dans le système <i>in vitro</i>	92
Discussion.....	96

L'expression de certaines USP est dérégulée dans notre cohorte de leucémies myéloïdes aiguës	96
Modification de l'expression de <i>USP44</i>	98
Sous-expression de <i>USP1</i>	100
Sous-expression de <i>USP28</i>	101
<i>TP53</i> et les principaux responsables de son statut d'ubiquitination, <i>USP7</i> et <i>MDM2</i> , sont peu modulés dans notre cohorte de LMA	103
<i>TP53</i>	103
<i>USP7</i>	106
<i>MDM2</i>	107
<i>CDKN1A</i> est le gène de l'axe <i>USP7-MDM2-TP53-CDKN1A</i> le plus modulé dans notre cohorte de LMA	110
Le modèle expérimental développé permettra d'évaluer <i>in vitro</i> si le niveau basal d'expression de <i>CDKN1A</i> a un impact sur la réponse des cellules leucémiques à la thérapie	112
Analyse de l'effet cytostatique et cytotoxique	113
Analyse de l'induction protéique de <i>TP53</i> et de <i>CDKN1A</i>	115
Perspectives thérapeutiques	118
Potentiel thérapeutique des USP	118
Potentiel thérapeutique de l'axe <i>USP7-MDM2-TP53-CDKN1A</i>	119
Conclusion	124
Annexe A	xiii
Annexe B	xiv
Annexe C	xviii
Annexe D	xix

Liste des tableaux

Tableau I. Exemples de quelques classes de molécules en étude clinique dans les leucémies myéloïdes aiguës

Tableau II. Description résumée des caractéristiques des spécimens leucémiques étudiés

Tableau III. Nomenclature FAB

Tableau IV. Description des lignées cellulaires utilisées pour ce travail

Tableau V. Caractéristiques cliniques et biologiques des échantillons primaires de LMA utilisés dans l'étude RT-qPCR

Tableau VI. Liste des gènes sélectionnés et séquences des amorces utilisées pour l'étude RT-qPCR

Tableau VII. Description des anticorps utilisés pour l'étude d'expression des membres de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A*

Tableau VIII. Expression relative de *USP44* selon les groupes WHO 2008

Tableau IX. Expression relative de *USP44* selon le type de caryotype

Tableau X. Expression génique de *USP44*, *USP1* et *USP28* dans les lignées de LMA

Tableau XI. Expression relative de *MDM2* selon les groupes WHO 2008

Tableau XII. Expression relative de *TP53* selon le type de caryotype

Tableau XIII. Expression relative de *CDKN1A* selon les groupes WHO 2008

Tableau XIV. Expression des gènes *USP7*, *MDM2*, *TP53* et *CDKN1A* dans les lignées LMA

Tableau XV. Formule complète du caryotype des échantillons primaires de LMA utilisés dans l'étude RT-qPCR

Liste des figures

- Figure 1. Schématisation de la variété des modifications par l'ubiquitine.
- Figure 2. Schémas de la structure du protéasome.
- Figure 3. Structure d'une USP.
- Figure 4. Survie globale après le diagnostic des LMA.
- Figure 5. Interactions principales et simplifiées de l'axe USP7-MDM2-TP53.
- Figure 6. Expression relative (RQ) de *USP44* dans 103 échantillons de LMA par rapport au gène contrôle *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales selon la classification WHO 2008.
- Figure 7. Expression relative (RQ) de *USP44* dans 103 échantillons de LMA par rapport au gène contrôle *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales selon le type de caryotype.
- Figure 8. Expression relative (RQ) de *USP1* dans 75 échantillons de LMA par rapport au gène contrôle *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales.
- Figure 9. Expression relative (RQ) de *USP28* dans 72 échantillons de LMA par rapport au gène contrôle *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales.
- Figure 10. Expression relative (RQ) de *USP7* dans 111 échantillons de LMA par rapport au gène contrôle *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales.
- Figure 11. Corrélation entre l'expression génique relative de deux différents groupes de transcrits du gène *MDM2* évalués dans cette étude en ciblant deux domaines différents.
- Figure 12. Courbes de survie globale des patients atteints de LMA *de novo* selon l'expression génique des USP indiquées.
- Figure 13. Courbes de survie globale des patients atteints d'une LMA *de novo* selon l'expression des gènes de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A*.
- Figure 14. Expression protéique de *USP7* dans différentes lignées cellulaires leucémiques, étudiée par Western Blot avec l'anticorps H-200 sur un gel SDS-PAGE de 8%.

- Figure 15. Expression protéique de MDM2 dans différentes lignées de LMA, étudiée par Western Blot avec l'anticorps SMP14 sur un gel SDS-PAGE de 8%.
- Figure 16. Expression protéique des différentes isoformes de MDM2 dans des lignées leucémiques et dans la lignée MCF-7, étudiée par Western Blot avec les anticorps C-18 et SMP14 sur un gel SDS-PAGE de 8%.
- Figure 17. Expression protéique basale de TP53 dans des lignées de LMA, étudiée par Western Blot avec l'anticorps DO-1 sur un gel SDS-PAGE de 15%.
- Figure 18. Expression protéique de CDKN1A dans différentes lignées cellulaires, étudiée par Western Blot avec l'anticorps F-5 (sc-6246) sur un gel SDS-PAGE de 15%.
- Figure 19. Analyse du décompte cellulaire suite à un traitement *in vitro* au nutlin 3 ou à la doxorubicine.
- Figure 20. Analyse de la viabilité cellulaire suite à un traitement *in vitro* au nutlin 3 ou à la doxorubicine
- Figure 21. Analyse de la survie cellulaire relative par la méthode Annexine V-PI suite à un traitement *in vitro* au nutlin 3 ou à la doxorubicine.
- Figure 22. Analyse du décompte cellulaire et de la survie cellulaire relative suite à un traitement *in vitro* combinant la doxorubicine avec le nutlin 3 à 48h.
- Figure 23. Expression protéique cytoplasmique et nucléaire des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A suite à un traitement *in vitro* des cellules de la lignée cellulaire OCI AML3 au nutlin 3 ou à la doxorubicine durant 24 et 48h.
- Figure 24. Expression protéique cytoplasmique et nucléaire des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A suite à un traitement *in vitro* des cellules leucémiques primaires au nutlin 3 ou à la doxorubicine durant 24 et 48h.
- Figure 25. Représentation schématique de MDM2 ainsi que des anticorps et des amorces utilisés.

Liste des abréviations

3D: tridimensionnelle
aa: acides aminés
ABI: Applied Biosystems ®
abnl: anomalie
ADN: acide désoxyribonucléique
AIFM1: "apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1"
AKT1: "v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1"
APAF1 : "apoptotic peptidase activating factor 1"
APC/C : "anaphase-promoting complex"
ara-C : cytosine arabinoside
ARN: acide ribonucléique
ASXL1: "additional sex combs like 1"
ATCC : "American Type Culture Collection"
ATM: "ataxia telangiectasia mutated"
ATRA: acide rétinoïque all-trans
BAD : "BCL2-associated agonist of cell death"
BAK1 : "BCL2-antagonist/killer 1"
BAX: "BCL2-associated X protein"
BBC3 : "BCL2 binding component 3"
BCL2: "B-cell chronic lymphoid leukemia/lymphoma 2"
BCL2L1 : "BCL2-like 1"
BCL2L11: "BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)"
BCL2L2: "BCL2-like2"
BCLQ : banque de cellules leucémiques du Québec
BER: "base-excision repair"
BID: "BH3 interacting domain death agonist"
BIRC5: "baculoviral IAP repeat containing 5"
BM11: "B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (mouse) polycomb ring finger oncogene"
BRCA: "breast cancer, early onset"
BSA : "bovine serum albumin", albumine de sérum bovin
cADN : ADN complémentaire
Caryo : caryotype
CASP3: caspase 3, "apoptosis-related cysteine peptidase"
CASP8 : caspase 8, "apoptosis-related cysteine peptidase"
CASP9 : caspase 9, "apoptosis-related cysteine peptidase"
cat: catalogue
CDC20: "cell division cycle 20"
CDKN1A: "cyclin-dependent kinase inhibitor 1A" (p21, Cip1)
CDKN1B: "cyclin-dependent kinase inhibitor 1B" (p27, Kip1)
CDKN2A: "cyclin-dependent kinase inhibitor 2A" (ARF)

CEBPA : "CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha"
 CHFR: "checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase"
 CHEK1: "checkpoint kinase 1"
 CHEK2 : "checkpoint kinase 2"
 CK2 : "cystein kinase 2"
 CK: "complex karyotype", caryotype complexe
 CKI: "Cyclin-dependent kinase inhibitor ", inhibiteur de CDK
 CLSPN: claspin
 CN: caryotype normal
 Comp: complexe
 CR: "complete remission", rémission complète
 CRi: CR avec récupération incomplète
 CRYAB: crystallin, alpha B
 CS: cellules souches
 CSC: cellules souches cancéreuses
 CSH: cellules souches hématopoïétiques
 CSL: cellules souches leucémiques
 C-term: extrémité C-terminale (ou terminaison carboxyle)
 Cys: cystéine
 DDR: "DNA damage response"
 del: délétion
 DFS: "disease-free survival", survie sans maladie
 DISC: "death-inducing signaling complex "
 DMSO : diméthylsulfoxyde
 DO : densité optique
 dom: domaine
 Doxo :doxorubicine
 DSB: "double-strand break", bris double brin
 DSMZ: "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH"
 DTT: dithiothréitol
 DUB: déubiquitinase
 DUSP: domaine associé aux USP
 E1: enzyme d'activation
 E2: enzyme de conjugaison
 E2F1: "E2F transcription factor 1"
 E3: ubiquitine ligase
 EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique
 EGTA: acide éthylène glycol tétraacétique
 FACS : "fluorescence-activated cell sorting", cytométrie en flux
 FANCD2: "Fanconi anemia, complementation group D2"
 FBXW7 : "F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase "
 FDA: "Food and Drug Administration"

FISH: "fluorescence in situ hybridization", hybridation in situ en fluorescence
 FLT3-ITD : "fms-related tyrosine kinase 3, internal tandem duplication"
 FOXO4: "forkhead box O4"
 H2A: histone 2A
 H2B: histone 2B
 HDAC: histone déacétylase
 HECT: "homology to E6AP carboxyl terminus"
 HEPES: "4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid"
 HiDAC: thérapie avec hautes doses de cytarabine
 HMR: Hôpital Maisonneuve-Rosemont
 hnRNP : "heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K"
 HPRT1 : "hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1"
 HR: "homologous recombination", recombinaison homologue
 HRP : "Horseradish Peroxidase"
 HSP90: "heat shock protein 90"
 HSV : virus de l'*herpes simplex*
 ID1 : "inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein"
 IgG : immunoglobuline de type G
 inv: inversion
 IRIC : Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
 JAMM : JAB1/MPN/MOV34 metalloenzymes
 KCl: chlorure de potassium
 kDa: kiloDalton
 LLA: leucémie lymphoblastique aiguë
 LMA : leucémie myéloïde aiguë
 LMA NOS: LMA non spécifiée autrement, "not otherwise specified"
 LMA-MRC: LMA reliée à une myélodysplasie
 LMC : leucémie myéloïde chronique
 LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique
 LPA : leucémie promyélocytaire aiguë
 lys, K : lysine
 MATH: "meprin and TRAF homology"
 MCL1: "myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)"
 MCM-BP: "minichromosome maintenance complex binding protein"
 MCPIP: "monocyte chemotactic protein-induced protein"
 MDM2 : "mouse double minute 2, proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase"
 MDM4: : "mouse double minute 4, p53 regulator"
 MECOM: "MDS1 and EVI1 complex locus"
 MEOX2: "mesenchyme homeobox 2"
 MM: marqueur de poids moléculaire
 MO: moelle osseuse

Mono : LMA à composante monoblastique, leucémie monoblastique et monocyttaire aiguë
 mono. : monoclonal
 MRD: "minimal residual disease", maladie résiduelle minimale
 mTOR: "mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)"
 MYB: "v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog"
 MYC : "v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog"
 NaCl: chlorure de sodium
 NC : non classifiable
 NER: "nucleotide excision repair"
 NFκB: "nuclear factor kappa B"
 NHEJ: "non-homologous end joining"
 no: nombre
 NPM1 : "nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)"
 N-term: extrémité N-terminale (ou terminaison amine)
 OTU : "ovarian tumour proteases"
 PARP: poly(ADP-ribose) polymerase
 PBS : "phosphate-buffered saline", tampon phosphate salin
 PBS-MT : PBST avec lait ("milk Tween")
 PBS-T : PBS avec Tween-20
 PCD : "programmed cell death", mort cellulaire programmée
 PCNA : "proliferating cell nuclear antigen"
 PCR : "polymerase chain reaction", réaction de polymérisation en chaîne
 PI : iodure de propidium
 PI3K: "phosphatidylinositol-3-kinase"
 PMAIP1 : "phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1", (NOXA)
 PML: "promyelocytic leukemia"
 PMSF: "phenylmethylsulfonyl fluoride"
 poly: polyclonal
 PPM1D: "protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D"
 PPM1G: "protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1G"
 PRC1 : "polycomb repressive complex 1"
 PRKDC: "protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide" (DNAPK)
 PSMD14 : "proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase 14"
 PTEN: "phosphatase and tensin homolog"
 PTM: "posttranslational modification", modification post-traductionnelle
 PVDF: polyfluorure de vinylidène
 qPCR : PCR quantitative (en temps réel)
 R point: point de restriction
 RARA: "retinoic acid receptor, alpha"
 RAS: "rat sarcoma viral oncogene homolog"
 RB1: "retinoblastoma 1"

RCHY1: "ring finger and CHY zinc finger domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase", (PIRH2)
 RFWD2 : "ring finger and WD repeat domain 2, E3 ubiquitin protein ligase", (COP-1)
 RIN: "RNA integrity number"
 RING: "really interesting new gene", domaine ubiquitine ligase
 RITA : "reactivation of TP53 and induction of tumor cell apoptosis" (NSC 652287)
 ROS : "reactive oxygen species", espèces réactives de l'oxygène
 RPN1 : "ribophorin 1"
 RQ : "relative quantification", expression relative
 RT-qPCR: qPCR suite à une transcription inverse, "reverse transcription"
 RUNX1: "runt-related transcription factor 1" (AML1, CBFA2)
 RUNX1T1: "runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)" (ETO)
 SAC : "spindle assembly checkpoint"
 SCF: "SKP1-CUL1-F-box-protein"
 SDS: sodium dodécyl sulfate
 SDS-PAGE: gel de SDS-polyacrylamide
 SEM : erreur standard de la moyenne
 SEN : signal d'exclusion nucléaire
 SIVA1: facteur inducteur de l'apoptose
 SLN : signal de localisation nucléaire
 SP: sang périphérique
 SSB: "single-strand break", bris simple brin
 STAT: "signal transducer and activator of transcription"
 STUB1 : "STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase"
 t: translocation
 TBP : "TATA box protein"
 TBS: "tris-buffered saline"
 TBST: TBS-Tween 20
 TGF- β : "tumor growth factor- β "
 T-IC: "tumor initiating cell"
 TNF: "tumor necrosis factor", facteur de nécrose tumorale
 TP : température pièce
 TP53 : "tumor protein 53"
 TP73: "tumor protein 73"
 TRAF : "tumor necrosis factor-receptor associated factor"
 Tris: trishydroxyméthylaminométhane
 TSG: "tumor suppressor gene", gène suppresseur de tumeur
 TSG101 : "tumor susceptibility gene 101"
 TUB: tubuline
 Ub: ubiquitine
 UBD: "ubiquitin binding domain"

UBQ: "ubiquitin-like", domaine semblable à l'ubiquitine
UCH: "ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase"
UCHL5 : "ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5"
UPL: "universal probe library"
USP: "ubiquitin specific peptidase"
USP14: "ubiquitin specific protease 14"
USP28: "ubiquitin specific protease 28"
USP7 : "ubiquitine specific protease 7"
USP9X: "ubiquitin specific protease 9X"
WHO: "World Health Organization"
WNT1: "wingless-type MMTV integration site family, member 1"
WT : "wild type"
XIAP : "X-linked inhibitor of apoptosis"
XPO1: "exportin 1"
Zn: zinc
Znf: domaine en doigt de zinc
 $\Delta\Delta$ Ct: "delta delta cycle threshold"
 ϵ : epsilon

Remerciements

Je tiens à remercier mes proches qui m'ont soutenue tout au long de mes recherches et de ma rédaction. Mes amis Émilie Proteau-Dupont, Annie-Claude Rouleau, Aleksandra Permiakova, Jules Bélanger et Mario Sirois. Ma famille Andrée Séguin, Olivier Sackhouse, Catherine Séguin-Grignon, Gaétan Grignon et Hélène Morency. Je tiens à spécifier que je remercie ces deux derniers tout particulièrement pour leurs suggestions de corrections et leurs judicieux conseils.

Je n'aurais pas eu autant de plaisir au laboratoire et je n'aurais pas autant appris sans Amélie Giguère, Sawcène Hazourli et toute l'équipe de la Banque de cellules leucémiques du Québec.

Merci aux membres de mon jury : Dr Raouf Fetni et Dre Caroline Laverdière, ainsi que ma directrice Dre Josée Hébert.

Merci aux organismes subventionnaires qui m'ont appuyée, le Fonds de recherche du Québec en santé (FRQS) et les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC).

Introduction

L'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle (PTM; « Posttranslational modification ») versatile et réversible, tout comme la phosphorylation, impliquant différentes voies cellulaires dont celles reliées à la tumorigenèse. Ce système est composé d'enzymes pouvant ajouter ou enlever l'ubiquitine (Ub). Plusieurs de ces enzymes étant altérées dans différents cancers, il est intéressant de considérer les acteurs de ce système comme des cibles thérapeutiques potentielles en oncologie.

L'ubiquitination, une modification post-traductionnelle

L'Ub est le prototype d'une famille de protéines très conservées dans l'évolution. Elle est composée de 76 acides aminés (aa), soit environ 9 kiloDaltons (kDa). Cette protéine très stable codée chez les mammifères par quatre gènes (*RPS27A*, *UBA52*, *UBB* et *UBC*) est exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes [1, 2]. Elle peut être attachée à un nombre remarquable de protéines par l'ubiquitination [3], et enlevée par une enzyme de déubiquitination (DUB, déubiquitinase). Historiquement, le premier rôle attribué à l'ubiquitination a été celui d'envoyer les protéines au protéasome, un complexe multi-protéique servant à la dégradation protéique. Cette découverte s'est mérité le Prix Nobel de Chimie en 2004. Cette fonction contrôle précisément la disponibilité des protéines et, ainsi, plusieurs voies de signalisation [4]. De plus, ce système participe à d'autres processus cellulaires, tels que la division cellulaire et la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) [1, 3, 4].

L'Ub est reconnue par un domaine de reconnaissance (UBD; « ubiquitin binding domain »). Il existe une quinzaine d'UBD dont le motif d'interaction avec l'Ub (UIM; « Ubiquitin-interaction motif ») et le domaine associé à l'Ub (UBA; « Ubiquitin associated domain »). Ces domaines sont très variés structurellement ce qui leur permet de lier différents types d'Ub [3, 5].

Ajout de l'ubiquitine

La liaison de l'Ub sur sa cible se fait entre la glycine à l'extrémité C-terminale (C-term, terminaison carboxyle) de l'Ub et le groupe epsilon (ϵ) d'une lysine (lys, K) sur la protéine cible. Il est à noter que l'Ub elle-même possède sept lys (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) pouvant participer à la formation de chaînes d'Ub d'orientations différentes et de densité différente [1, 2, 5, 6]. La possibilité de former différents schémas d'ubiquitination permet d'augmenter la précision et la diversité des signaux codés par l'Ub (figure 1) [7]. L'ubiquitination peut être en compétition directe ou indirecte avec d'autres PTM, telles que la méthylation, l'acétylation et la sumoylation ou coopérer avec celles-ci [2, 5].

L'ubiquitination se fait en trois étapes à l'aide de trois familles d'enzymes, soit l'enzyme d'activation (E1), l'enzyme de conjugaison (E2) et l'Ub ligase (E3). D'abord, l'Ub est activée par la liaison de son résidu glycine en C-term à un résidu cystéine (Cys) de l'enzyme E1. Par la suite, l'Ub est transférée sur un groupe Cys de l'enzyme E2. Ce groupement Cys est contenu dans un domaine très conservé nommé le « Ub-conjugating catalytic » (UBC). Dans la plupart des cas, c'est cette dernière enzyme qui est responsable du type de liaison entre les Ub. Pour les enzymes de type E2, il existe principalement trois types de domaine liant l'Ub, soit le HECT (« homology to E6AP C-term »), le RING (« really interesting new gene », domaine ubiquitine ligase) et la boîte Ub (« U-box »). Lors de la dernière étape, l'une des nombreuses E3 permet le transfert de l'Ub sur une protéine cible [1, 2, 6, 8, 9]. Dans plusieurs des cas, des cofacteurs sont essentiels, on parle alors d'E4 [10]. Chez l'humain, il existe plus de 700 E3 pour l'Ub, permettant une grande spécificité et une régulation fine de ce processus. Par contre, seulement une ou deux E1 et une cinquantaine d'E2 sont présentes dans le génome [4, 6, 7, 11].

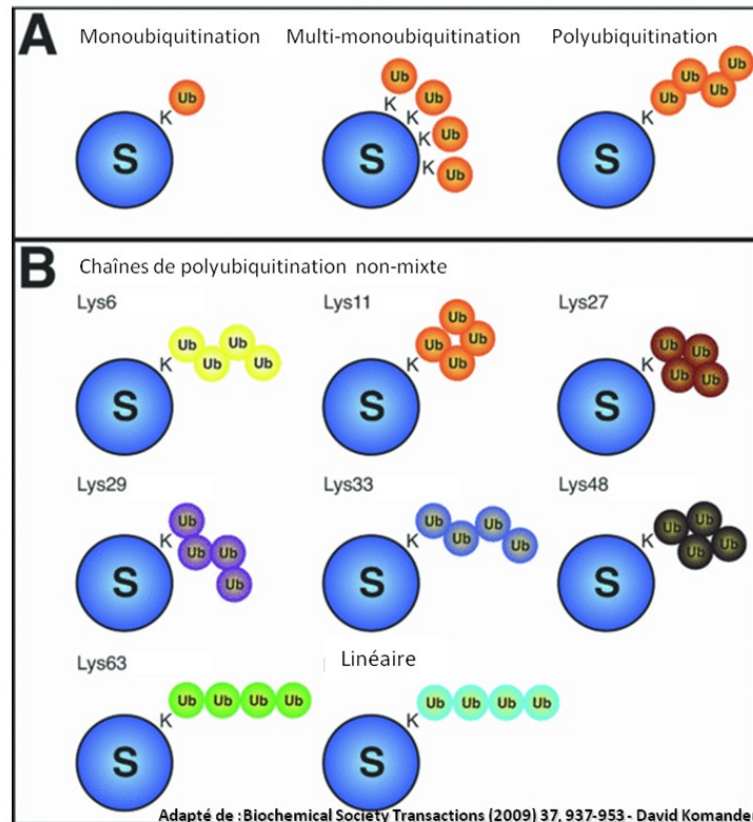


Figure 1. Schématisation de la variété des modifications par l'ubiquitine. (A) Les différents types d'ubiquitination; **(B)** les différentes possibilités de chaînes de polyubiquitination non-mixte. S : substrat; K : Lys : lysine; Ub : Ubiquitine. Figure adaptée de Komander *et al.*, (2009), *Biochemical Society Transactions*, **37**, 937-953, © the Biochemical Society [2].

La déubiquitination

La déubiquitination est également régulée de façon précise. Les DUB possèdent des domaines de reconnaissance pour les différents types d'Ub et les différentes cibles. L'action de la DUB est contrôlée selon différents paramètres de sa cible, tels que sa localisation cellulaire, son expression et ses partenaires [12]. D'une part, pour certaines DUB, l'incorporation à un complexe protéique est requise afin que la conformation tridimensionnelle (3D) soit en position active. Certaines DUB ont des co-facteurs, par exemple USP1 interagit avec le « U2 small nuclear ribonucleoprotein particle auxiliary factor 1 », qui augmente son activité catalytique. D'autre part, afin de mettre fin rapidement à leur activité, certaines DUB peuvent être clivées ou envoyées au

protéasome par des régulateurs négatifs. Par exemple, USP7 (« ubiquitin specific protease 7 ») est inactivée suite au clivage par des caspases, lors de l'activation de l'apoptose. De plus, les DUB peuvent subir différentes PTM afin de contrôler leur localisation, leur disponibilité et leur activité, telles que la phosphorylation qui augmente l'activité enzymatique de USP28 (« ubiquitin specific protease 28 ») [12, 13]. Finalement, une interaction entre une DUB et une Ub ligase est possible [14]. Ces interactions permettent entre autres de résoudre l'instabilité protéique des Ub ligases qui s'auto-ubiquitinent, telles que MDM2 (« mouse double minutes 2, proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase ») qui est stabilisée par USP7 [12]. Ces enzymes seront abordées ultérieurement dans ce mémoire.

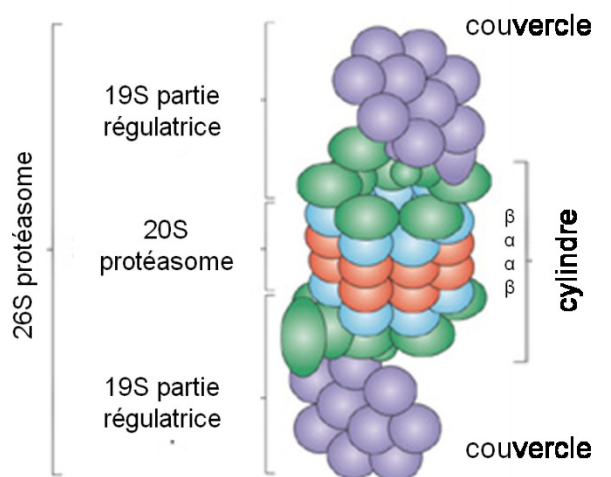
Le génome humain comprend au moins 98 DUB, divisées en six familles : (1) « ubiquitin C-terminal hydrolases » (UCH), (2) « ubiquitin specific Peptidases » (USP), (3) « ovarian tumour proteases » (OTUs), (4) Josephins (MJD), (5) JAB1/MPN/MOV34 metalloenzymes (JAMM), et (6) MCPIP (« monocyte chemotactic protein-induced protein ») [7, 12, 13, 15]. Dans ce travail, il sera question de la famille des USP. Cette dernière famille regroupe au moins 50 Cys protéases qui utilisent le groupement thiol du résidu Cys polarisé par un résidu aspartate (asp) et assisté par un résidu histidine (his) afin d'effectuer l'ubiquitination. Ces trois résidus forment la triade catalytique [12, 13].

Les DUB possèdent différents rôles cellulaires. D'abord, ces enzymes sont essentielles à la formation d'unités libres d'Ub à partir des pro-protéines. Ensuite elles servent aussi à recycler les protéines d'Ub, entre autres celles qui ont été accidentellement liées par des molécules nucléophiles ou celles des substrats allant au protéasome. Finalement, ces enzymes servent à renverser l'action des Ub ligases afin de corriger et/ou de façonner l'ubiquitination des substrats [7, 13, 15, 16].

Le système de l'ubiquitination possède divers rôles cellulaires

La dégradation par le protéasome est induite par l'ubiquitination

Le système de l'ubiquitination permet aux cellules de contrôler 80-90% des protéines cellulaires par la dégradation [8, 17]. Un exemple illustrant bien l'importance de ce contrôle précis est celui de la protéine TP53 régulée par son Ub ligase MDM2 et la DUB USP7, dont il sera question dans ce mémoire. Ce système complexe permet à la cellule de contrôler la quantité et la localisation de TP53 afin d'obtenir l'effet désiré, soit une division cellulaire ou le déclenchement de l'apoptose [16].



Adapté de: Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 2. Schéma de la structure du protéasome. Le 26S protéasome comprend deux parties régulatrices, nommées également couvercles, de part et d'autre de la partie centrale de forme cylindrique composée de quatre anneaux (deux α et deux β) et possédant l'activité catalytique. Adapté suite à la permission de Macmillan Publishers Ltd : Murata, S. *et al.*, Molecular Cell Biology, « Molecular mechanisms of proteasome assembly », 10, 104-115, copyright (2009) [18].

Le protéasome (Figure 2) est un groupe de protéines catalysant de manière Ub-dépendante la dégradation protéique. Nommé également le 26S protéasome, il contient plus de trente protéines qui sont divisées en deux sous-complexes : un cylindre 20S et une partie régulatrice 19S formant un couvercle [17]. Dans les anneaux β du cylindre, il existe une activité semblable à la chymotrypsine, une semblable à la trypsine et une semblable à celle des caspases. Le blocage du 20S protéasome, tel qu'effectué par le bortezomib (Velcade®) qui cible l'activité catalytique des sous-unités β , permet de

bloquer la progression du cycle cellulaire et d'induire l'apoptose selon le contexte [19]. Les deux complexes 19S sont chargés de reconnaître les protéines polyubiquitinées ayant une chaîne d'au moins quatre Ub liées par leur résidu K48. De plus, ils possèdent la capacité, grâce à son activité ATPase, de dérouler les protéines permettant leur passage dans le cylindre étroit du 20S protéasome [19].

Le complexe régulateur 19S comprend trois DUB dont PSMD14 (« proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase 14 »), UCHL5 (« ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 », nommée aussi UCH37) et USP14 (« ubiquitin specific protease 14 ») [12, 15]. UCHL5 a comme fonction d'enlever l'Ub des chaînes à partir de l'extrémité libre. Elle semble jouer un rôle dans l'oncogenèse et est devenue une cible thérapeutique intéressante [20]. En effet, le b-AP15, une molécule qui inhibe l'activité d'USP14 et d'UCHL5, est en évaluation pré-clinique. Elle a l'avantage de ne pas causer de résistance lors de la surexpression de BCL2 (« B-cell chronic lymphoid leukemia (CLL) /lymphoma 2 »), contrairement au Bortezomib. Selon des résultats préliminaires, cette molécule semble également efficace dans les tumeurs solides et dans le myélome multiple [21-23].

Il existe une variante du protéasome dans les cellules immunologiques, nommée immunoprotéasome, permettant la fabrication des peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Dans ce cas, les sous-unités 19S sont remplacées par des sous-unités 11S et les sous-unités catalytiques sont remplacées par $\beta 5i$, $\beta 2i$ et $\beta 1i$ [8, 11].

L'ubiquitination régule l'endocytose

La mono-ubiquitination et les chaînes d'Ub liées par le résidu K63 dictent principalement l'internalisation des récepteurs de type récepteurs tyrosine kinases. La décision de les dégrader ou non dans le lysosome dépend ensuite du code d'Ub présent [2, 15]. Par la régulation de l'endocytose et du temps de demi-vie, l'ubiquitination régule certaines voies de signalisation comme celles du « nuclear

factor kappa B » (NFκB) et du « tumor growth factor beta » (TGF-β) [12, 15]. Les chaînes liées par le résidu K63 de l'Ub servent de signal de recrutement des kinases dans la cascade [2].

En bref, l'ubiquitination régule les deux modes de dégradation des protéines. Il est à noter que les protéines modifiées par l'Ub ou celles liant l'Ub sont sujettes à des modifications allostériques pouvant activer/inactiver ou masquer/exposer certains domaines de localisation. Ce système peut donc également contrôler l'activité et la disponibilité des protéines cellulaires sans avoir recours à la dégradation [2].

L'ubiquitination contrôle la structure de la chromatine

Dans le noyau, l'ADN est enroulé autour des histones qui régulent la compaction de la chromatine et ainsi l'accessibilité du code génétique. En effet, les histones 2A (H2A) et les histones 2B (H2B) subissent diverses PTM. Par exemple, l'ubiquitination dynamique de H2B permet le contrôle de la transcription. De plus, la déubiquitination de H2B dans les régions télomériques est essentielle pour la répression de la transcription de ces régions [12, 15].

Le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN sont régulés par l'ubiquitination

Le principe de base du fonctionnement du cycle cellulaire est celui de réguler durant de courtes périodes de temps, la présence ou l'absence de plusieurs acteurs. En effet, l'expression successive des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (CDK) contrôlée, entre autres, par le système de l'Ub-protéasome, est un aspect essentiel au bon déroulement de ce processus [15]. Ensemble, ces acteurs principaux contrôlent les différentes cibles impliquées dans les étapes du cycle cellulaire. Il existe également des inhibiteurs de ces kinases (CKI, « Cyclin-dependent kinase inhibitor »), tels que CDKN1A (« cyclin-dependent kinase inhibitor 1A », précédemment nommée CIP1/P21) dont il sera question ultérieurement dans ce mémoire [24, 25].

En général, les cellules sont en phase G0, où elles ne se divisent pas. Si la cellule reçoit suffisamment de signaux favorables à sa division, elle entre d'abord en phase G1, où elle augmente de volume et se prépare pour la synthèse de l'ADN de la phase S. Avant de commencer cette étape, la cellule passe un point de restriction (« R point »), après lequel elle devient indépendante des signaux externes. Lors de la synthèse de l'ADN, la cellule vérifie son intégrité génomique. Après la phase S, elle entre en phase G2 où elle continue de croître et de se préparer pour la mitose (phase M). Cette dernière phase est composée de plusieurs étapes dont la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase, la télophase et la cytokinèse. Un deuxième point de contrôle est présent lors de la métaphase afin de s'assurer que tous les chromosomes sont bien attachés par leur centromère, et les kinétochores aux microtubules du fuseau mitotique avant l'anaphase; c'est le « spindle assembly checkpoint » (SAC). À la fin de la métaphase, il y aura une division cellulaire en deux cellules de composition génétique identique [24-26].

Il est à noter que plusieurs Ub ligases sont importantes dans le cycle cellulaire. Il y a deux principales classes d'Ub ligases: « SKP1-CUL1-F-box-protein » (SCF) et l'« anaphase-promoting complex » (APC/C). Ces deux complexes possèdent une structure similaire avec des sous-unités constantes et d'autres variables. Par exemple, l'APC/C possède deux activateurs possibles déterminant les cibles protéiques, soit CDC20 (« cell division cycle 20 ») et FBXW7 (« F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin ligase », une Ub ligase de type E3) [27]. Ces complexes impliqués dans la division cellulaire sont des cibles intéressantes pour la thérapie en oncologie. Par exemple, une molécule inhibitrice de Cdc34 (une enzyme de type E2), le CC0651, empêche l'ubiquitination par le complexe SCF induisant l'accumulation de CDKN1B (« cyclin-dependent kinase inhibitor 1B », aussi nommée P27 et KIP1) et l'arrêt de la prolifération cellulaire [8, 26, 28].

Les cellules doivent en tout temps surveiller l'intégrité de leur génome [29]. Lors de dommages à l'ADN, différentes voies peuvent être mises en œuvre afin de les réparer ou de permettre l'élimination de la cellule [24]. Le système réparant l'ADN se nomme

DDR (« DNA damage response ») [29]. Il existe deux principaux types de dommages à l'ADN qui définissent la voie de réparation, soit ceux affectant un seul brin d'ADN (SSB; « single-strand breaks ») et ceux affectant les deux brins d'ADN (DSB; « double-strand breaks »). Les voies de réparation de l'ADN comprennent d'abord des composantes détectant le dommage, puis une accumulation de facteurs permettant la réparation de l'ADN [29, 30].

Dans le cas des SSB, la méthode de correction est essentiellement l'élimination du brin altéré et la resynthèse du brin d'ADN à l'aide du brin complémentaire intact. Les petits adduits à l'ADN sont réparés par le mécanisme appelé BER (« base excision repair ») où le dommage est détecté par les polymérases poly(ADP-ribose) 1 et 2 (PARP1 et PARP2, « poly(ADP-ribose) polymerase »). Pour les plus gros adduits créant une distorsion de la double hélice d'ADN, le processus est appelé NER (« Nucleotide excision repair ») [29].

Pour les DSB, les deux brins sont altérés; la cellule doit donc trouver un autre modèle afin de le réparer correctement. Cela est possible seulement lors des phases S et G2 du cycle cellulaire, où la cellule possède deux copies de son génome. La voie de réparation impliquée se nomme alors la recombinaison homologue (HR) et implique les Ub ligases BRCA1 et 2 (« breast cancer, early onset »). Le reste du temps, la cellule relie les deux extrémités de la cassure par un processus cellulaire nommé « non-homologous end joining » (NHEJ), altérant ainsi le génome [29].

Le système d'ubiquitination est omniprésent durant les différentes étapes du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN [2]. Par exemple, USP28 contrôle la voie de signalisation comprenant la kinase du point de contrôle du cycle cellulaire CHEK2 (« checkpoint kinase 2 »), TP53 et le BBC3 (« BCL2 binding component 3 », précédemment nommé PUMA). Cette voie majeure de l'apoptose agit en réponse à un DSB. De plus, USP1 est impliquée dans le processus de réparation de l'ADN en déubiquitinant une protéine impliquée dans l'anémie de Fanconi, soit FANCD2 (« fanconi anemia, complementation group D2 »). Cette DUB permet à la cellule de

terminer la phase S et de poursuivre son cycle cellulaire suite à un dommage à l'ADN [15]. USP1 contrôle aussi l'antigène de prolifération nucléaire (PCNA; « proliferating cell nuclear antigen »), un acteur impliqué dans la synthèse d'ADN par « translesion », un mécanisme permettant à la cellule de passer par-dessus les dommages non réparables de l'ADN [13].

La famille des « ubiquitin specific peptidases » est caractérisée par son domaine catalytique

La plus grande famille de DUB est celle des USP. La majorité des membres de cette famille possède une triade catalytique, décrite précédemment, faisant partie du domaine catalytique de taille très variable (de 300 à 800 aa) [12]. Toutefois, la structure 3D de ce domaine est très conservée et rappelle celle d'une main droite, puisqu'elle est composée de trois sous-domaines suivant la forme des doigts, de la paume et du pouce (figure 3). L'Ub se loge au creux de la main, et le site actif se situe à la limite entre le pouce et la paume. Malgré la grande diversité des domaines de liaison, la plupart des DUB doivent d'abord subir un changement de conformation en refermant le domaine analogue aux doigts sur l'Ub, afin d'enligner la triade catalytique et être ainsi activée [13, 15].

Les USP sont composées de plusieurs autres domaines reliés à leurs fonctions, diversifiant ainsi leur structure. D'abord, il y a les domaines de régulation et d'interaction protéiques. Par exemple, le domaine MATH (« meprin and TRAF homology ») de USP7 qui participe à la reconnaissance de TP53. Plusieurs de ces domaines servent à la reconnaissance spécifique de l'Ub sur son substrat. Parmi ceux-ci il y a le domaine en doigt de Zinc (Znf :« Zn-finger »), le domaine associé aux USP (DUSP), et le domaine semblable à l'Ub (UbQ) [13, 31]. Les domaines reconnaissant les différentes chaînes d'Ub exploitent, pour la plupart, leur distance et leur orientation afin de les différencier [6].

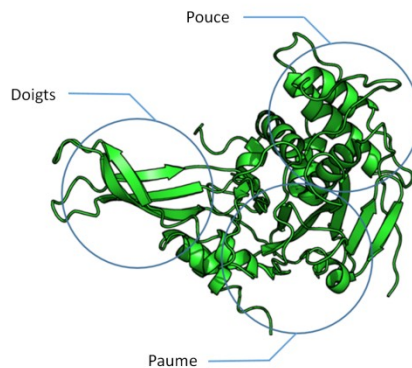


Figure 3. Structure d'une USP. Structure 3D d'une USP rappelant la forme d'une main. La partie stable est représentée par la paume, tandis que les doigts et le pouce sont mobiles et se referment sur la protéine cible. Le site catalytique se trouve à la jonction de ces deux parties et est actif lorsqu'elles sont refermées. Adaptée de Komander *et al.*, (2010), *Subcellular Biochemistry*, **54**, 69-87, copyright Springer [32].

Le cancer est un ensemble de maladies génétiquement diversifiées

Au Canada, deux canadiens sur cinq seront atteints d'un cancer au cours de leur vie. Le nombre estimé de nouveaux cas de cancers et de décès par cancer en 2014 était de 187 600 et 75 500 respectivement [33]. Dans cette section, les caractéristiques communes et les modèles décrivant les cancers seront abordés. Ensuite, il sera question de la thérapie en oncologie et des différentes formes de résistance aux traitements. Finalement, le lien avec l'ubiquitination sera élaboré, et ce, en particulier dans le contexte des cancers hématologiques.

Caractéristiques et modèles du cancer

Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg ont défini six caractéristiques des cancers, soit l'indépendance face aux signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'évitement de l'apoptose, un potentiel de division cellulaire illimité, la possibilité d'activer l'angiogenèse et finalement l'invasion tissulaire (métastases) [34]. Plus récemment, le groupe de Luo *et al.* a décrit les stress des cellules cancéreuses, dont le stress que subit l'ADN, le stress de réplication, le stress protéique, mitotique, métabolique et oxydatif [35]. Toutes ces caractéristiques ne sont pas nécessairement

présentes dans l'ensemble des cellules cancéreuses, mais font plutôt référence aux thèmes importants d'un point de vue biologique et clinique [36].

Un des premiers modèles du cancer, celui de l'évolution clonale par étapes, présentait les tumeurs comme un ensemble de cellules identiques pouvant changer dans le temps. Par la suite, une version tenant compte de l'hétérogénéité tumorale proposait que les clones ayant un avantage prolifératif occupent la plus grande partie de la masse tumorale (sélection darwinienne) [37, 38].

Enfin, un modèle plus récent est basé sur le fait que plusieurs études démontrent l'existence d'une population rare de cellules ayant des propriétés de cellule souche (CS), nommées cellules souches cancéreuses (CSC). Ceci a été étudié dans différents cancers dont les LMA, le cancer du sein et les glioblastomes. Cependant certains cancers ne semblent pas posséder cette population de CSC [37-40].

En pratique, les CSC sont étudiées en laboratoire en utilisant des modèles expérimentaux de transplantation, en particulier des souris immunodéficientes humanisées. Une CSC doit être capable de s'auto-renouveler et donc de générer à nouveau des cellules cancéreuses. Les propriétés différenciant le modèle murin et l'humain, ainsi que les étapes d'isolement des cellules *ex vivo* et leur transplantation, induisent une pression de sélection importante sur ces cellules. Ces stress peuvent faire en sorte que le nombre réel de CSC n'est pas bien estimé et que nous étudions plutôt par ce système de transplantations successives les cellules pouvant initier une tumeur (T-IC : « tumor initiating cell »). Toutefois, ces deux types de cellules, CSC et T-IC, possèdent certaines caractéristiques communes telles que la résistance aux traitements, la capacité d'échapper à la mort cellulaire et la quiescence [37, 39].

En général, les propriétés des CS sont régulées par des gènes tels que *MYC* (« v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog ») et *BM11* (« B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (mouse) polycomb ring finger oncogene ») et différentes voies de signalisation telles que les voies Hedgehog, Notch et WNT1 (« wingless-type

MMTV integration site family, member 1 ») [40]. Il est à noter que ces principales différences entre les CS et les progéniteurs, tant pour les cellules normales que pour les cellules cancéreuses, sont reliées à des modifications épigénétiques [38, 39].

La transformation maligne et la cellule souche cancéreuse

Les causes de la transformation cellulaire maligne ne sont pas élucidées. Les néoplasies originent soit d'une CS normale altérée ou de l'acquisition de propriétés des CS par les progéniteurs. Le micro-environnement peut grandement influencer cette transition [37, 39]. En effet, plusieurs études sur la plasticité des T-IC et sur la capacité d'induire des propriétés souches par des facteurs de croissance, montrent que ces caractéristiques sont malléables [39]. En effet, les myofibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire peuvent sécréter des molécules ou interagir directement avec les cellules tumorales afin de renforcer leur survie et favoriser leur progression [40].

Il existe principalement trois familles de gènes modifiés dans les cancers soit les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur (TSG : « tumor suppressor gene ») et les gènes de maintien de l'intégrité cellulaire [39]. Différentes modifications génétiques sont impliquées dans les cancers, dont les réarrangements chromosomiques incluant les translocations réciproques, les inversions, et les délétions chromosomiques [41, 42]. Il existe plusieurs évidences quant à leur implication dans l'initiation de l'oncogenèse [43, 44].

Au cours du développement tumoral, plusieurs étapes sont présentes. Initialement, les systèmes de réparation de l'ADN sont généralement altérés, facilitant l'évolution vers le statut de cellule cancéreuse [41]. Plusieurs systèmes de protection contre le développement tumoral sont toutefois présents et induisent alors la sénescence ou l'apoptose [45, 46]. Ces systèmes complexes reposent sur quelques acteurs principaux, tels que le TSG *TP53* [47].

Au moment de la formation de métastases, différents mécanismes sont initiés, tels que la transition épithelio-mésenchymateuse. En général, seulement une partie des CSC est apte à coloniser un nouveau site [40]. Les cellules menant à la formation des métastases possèdent souvent un plus grand nombre de lésions génétiques que les cellules de la tumeur primaire [39]. En fait, les sous-clones impliqués dans les métastases peuvent présenter des aspects différents du clone majoritaire initial, tels que le niveau de différenciation ou le taux de T-IC [38].

La thérapie ciblée dans les cancers

L'objectif des thérapies en oncologie est de cibler les cellules cancéreuses, tout en épargnant les cellules normales. Ce sont donc les caractéristiques biologiques différenciant ces deux types de cellules qui sont exploitées afin de provoquer la nécrose, l'apoptose, une catastrophe mitotique, la sénescence ou la différenciation des cellules tumorales [35, 48]. De plus, les différences du microenvironnement peuvent aussi permettre de les cibler [48].

Toutefois, plusieurs obstacles sont présents dont celui de la grande hétérogénéité de la population cellulaire tumorale. Cette diversité cellulaire permet un principe de sélection et augmente la probabilité de résistance innée ou acquise. La thérapie doit donc viser les événements génétiques essentiels au cancer [34, 35, 45, 48, 49].

Plusieurs des thérapies utilisées en oncologie induisent des dommages à l'ADN ou aux fuseaux mitotiques [29, 30]. Ces thérapies peuvent induire différents types de dommages à l'ADN, soit directement ou indirectement. Les dommages directs incluent : (1) les SSB et les DSB qui sont produits entre autres, par les radiations ionisantes; (2) les adduits à l'ADN et les liaisons ADN-protéines produits entre autres, par les agents s'intercalant entre les bases de l'ADN tels que les anthracyclines; (3) l'incorporation des analogues des nucléotides par des molécules telles que la cytarabine [30].

Les bris indirects incluent : (1) ceux reliés à l'inhibition de l'ADN topoisomérase qui contrôlent la structure colloïdale de l'ADN; (2) ceux induits par l'inhibition des histones déacétylases (HDAC) ou des méthylases qui participent à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, (3) et ceux reliés aux molécules antimitotiques interférant avec la polymérisation de la tubuline et perturbant la séparation et la ségrégation des chromosomes [30].

La résistance aux thérapies anticancéreuses

Il existe deux types de résistance à la chimiothérapie, soit la résistance intrinsèque, présente avant l'initiation du traitement, et la résistance qui survient durant le traitement. La résistance entraîne une rechute qui est une des causes principales des décès reliés aux cancers. Il est à noter que la quiescence des CSC semble participer grandement à la résistance au traitement. Par exemple, la CS leucémique (CSL) a été identifiée comme la principale cause de rechute dans les LMA [49]. Nous aborderons d'abord les mécanismes généraux de la résistance, puis il sera question de manière plus spécifique de celle reliée aux CSC.

Les principales causes de résistance à la chimiothérapie sont: (1) la résistance due à l'élimination de la molécule chimique par des pompes à efflux, (2) la résistance due à la modification de la cible par mutation, délétion ou amplification, (3) la résistance reliée au fait que la cible est facultative pour les propriétés cancéreuses, (4) la résistance due aux défauts du système de réparation de l'ADN, (5) la résistance due à l'incapacité de la cellule tumorale à induire l'apoptose, (6) la résistance due à l'inactivation du médicament ou à l'absence de son activation [35, 45, 49].

Plusieurs stratégies existent pour contrer ces résistances. Premièrement, il y a l'utilisation de molécules qui modulent les pompes à efflux exprimées sur les cellules cancéreuses, tel qu'ABCB1 (« ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 », précédemment nommé MDR1) [49, 50].

Deuxièmement, la combinaison de deux thérapies ciblant de manière différente les cellules cancéreuses sans se nuire mutuellement peut mener à l'élimination d'un plus grand nombre de cellules tumorales [35]. Par exemple, une combinaison d'un agent inhibant les mécanismes de réparation de l'ADN et d'un agent dommageable pour l'ADN peut être utilisée. Dans ce cas, il y aura létalité synthétique, c'est-à-dire mort cellulaire suite à l'attaque simultanée de ces deux voies [29, 49, 51].

Troisièmement, la combinaison de molécules qui ont des cibles thérapeutiques différentes peut également être utilisée diminuant la probabilité que les deux cibles soient facultatives et augmentant ainsi les chances de succès de la thérapie [35, 49, 52].

Quatrièmement, plusieurs stratégies ont été élaborées afin d'empêcher les cellules cancéreuses de mettre leur cycle cellulaire en pause dans le but de réparer leurs dommages à l'ADN. Ces approches thérapeutiques permettent l'accumulation de défauts génétiques et entraînent la mort cellulaire lors de l'échec de la division cellulaire. Des molécules inhibant les points de contrôle dépendant et/ou indépendant de TP53, ainsi que les enzymes impliquées dans la détection, le signalement ou la réparation des dommages peuvent alors être considérées comme cibles thérapeutiques [30, 49].

Cinquièmement, une molécule thérapeutique peut agir adéquatement, mais il y a présence d'anomalies génétiques en aval qui mène à une résistance. Par exemple, la surexpression de *BCL2* rend certaines cellules leucémiques résistantes à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. Afin de contrer cet effet, on peut rétablir la balance entre les facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques en utilisant une molécule telle que l'ABT-737 qui mime les signaux pro-apoptotiques [49].

Sixièmement, plusieurs molécules chimiques nécessitent une activation enzymatique et l'inhibition de l'expression de cet activateur mène à l'inefficacité du médicament. Il a été démontré que dans ces cas, un inhibiteur de l'ADN méthyltransférase (voir

Tableau I, Annexe A) pourrait rétablir l'efficacité du médicament en permettant la réexpression du ou des activateurs [49].

La thérapie ciblée et les cellules souches cancéreuses

Plusieurs éléments supportent l'hypothèse que les CSC sont responsables de la résistance à la thérapie. En effet, les propriétés intrinsèques des CS peuvent mener aux différents mécanismes de résistance mentionnés dans la section précédente, tels qu'un grand nombre de pompes à efflux, la présence d'enzymes de détoxification, la surexpression des acteurs anti-apoptotiques, un système de réparation de l'ADN plus efficace, etc. [37, 39].

Dans les LMA en rechute, il semblerait que le clone principal fondateur de la leucémie ait survécu [53] ou que la rechute provienne de la survie de la CS pré-leucémique représentant un clone minoritaire au diagnostic [54, 55]. En effet, l'existence de CS pré-leucémiques a été documentée récemment et ces cellules résistantes à la chimiothérapie semblent impliquées dans la rechute leucémique [54, 55]. De plus, les caractéristiques souches peuvent être réactivées dans les cellules progénitrices et plusieurs évidences suggèrent que de nouvelles CSC peuvent survenir *in vivo* [38, 55].

Afin d'augmenter les chances de cibler les CSC, plusieurs stratégies sont possibles incluant l'utilisation d'inhibiteurs à large spectre des transporteurs ABC ou une thérapie ciblant un marqueur de surface de ces cellules, tel que démontré pour le marqueur CD44 exprimé par les CSL de LMA [56]. Il est à noter que ces techniques ne sont pas réellement spécifiques, mais en combinaison elles pourraient mener à une létalité synthétique dans les CSC. Récemment, l'utilisation d'un vecteur nommé aptamère, afin d'amener les molécules anti-cancéreuses directement dans les cellules y compris les CSC a été proposée [37]. Finalement, des thérapies ciblant les voies de signalisation importantes dans les CS telles que les voies de Notch et de Hedgehog sont en développement (voir Tableau I, Annexe A) [40].

L'inconvénient principal de cibler les caractéristiques souches est le risque d'éliminer également les CS saines des différents tissus. Cependant, il semble possible de cibler préférentiellement les CSC [40].

L'ubiquitination joue un rôle important dans l'oncogénèse

L'ubiquitination est impliquée dans la majorité des processus cellulaires essentiels à la tumorigenèse, tels que la division cellulaire et l'apoptose. L'ubiquitination est aussi impliquée dans la régulation des voies essentielles à l'embryogenèse et à l'homéostasie cellulaire qui sont réactivées et exploitées pour envahir l'organisme, telles que la transition épithélio-mésenchymateuse et la migration cellulaire. Bref, le système de l'ubiquitination est impliqué dans l'initiation et la progression du cancer, ainsi que dans la réponse aux traitements anticancéreux [57]. Plusieurs études reliant le système de l'ubiquitination et divers types de cancers ont été publiées dans les dernières années. Toutefois, l'étendue des connaissances quant à la régulation de l'ubiquitination dans les LMA demeure limitée [58, 59].

D'une part, les Ub ligases peuvent jouer le rôle d'un oncogène en participant à la dégradation d'une protéine suppresseur de tumeur, telle que MDM2 qui contribue à la dégradation des protéines TP53 et RB1 (« retinoblastoma 1 ») [8]. Dans d'autres cas, l'Ub ligase agit comme une protéine suppresseur de tumeur, car elle est impliquée dans la dégradation des protéines oncogéniques. Par exemple, FBXW7 envoie au protéasome la cycline E et MYC [60]. Le système de l'Ub-protéasome peut donc représenter une source de cibles potentielles pour le traitement contre les cellules cancéreuses [11]. Cependant, il est à noter qu'aucune enzyme de type E1 et seulement quelques E2 ont été impliquées dans les cancers [60].

L'un des intérêts de recherche dans ce domaine est que l'ubiquitination implique un grand nombre d'enzymes, une des classes protéiques les plus facilement accessibles à l'action de molécules thérapeutiques. De plus, plusieurs de ces enzymes, telle que USP7, sont dans un état inactif précédent leur liaison à leur cible ou à un cofacteur.

Étant donné le besoin de changement de conformation pour l'activation, il est possible de les inhiber à l'aide d'une petite molécule qui irait bloquer cette étape [61].

D'autre part, les DUB peuvent aussi avoir un rôle dans les cancers et sont également des cibles thérapeutiques intéressantes [61]. Cependant, à ce jour, aucun médicament ciblant cette classe d'enzymes n'est entré en phase clinique [8, 13]. Cela est probablement dû au fait que la majorité des recherches portent sur des Cys protéases, telles que les USP, et que les inhibiteurs de cette classe d'enzymes ont de mauvaise spécificité et biodisponibilité [8]. De plus, ces enzymes font partie de cascades très complexes que nous devons d'abord mieux comprendre. Plusieurs DUB restent toutefois intéressantes comme cibles, telles que USP7 dont il sera question dans ce mémoire [8, 11].

Les cancers hématologiques

La classification WHO (« World Health Organization ») 2008 [62] catégorise les néoplasies hématologiques selon le type cellulaire : myéloïde, lymphoïde et histiocytaire-dendritique, et selon différentes entités génétiques. Dans ce mémoire, nous étudierons les LMA, une sous-catégorie de cancers des cellules myéloïdes et notre travail portera sur les LMA de l'adulte.

Les cellules leucémiques sont détectées principalement dans la moelle osseuse (MO) et peuvent être détectées dans le sang périphérique (SP) et/ou moins fréquemment dans d'autres tissus tels que la peau par exemple. Pour le diagnostic des leucémies, il faut donc préférentiellement prélever un échantillon de MO afin d'analyser la morphologie, l'immunophénotype et le caryotype des cellules leucémiques [63].

Les leucémies sont des cancers hématologiques dont l'incidence augmente en partie en raison de l'augmentation de l'espérance de vie. Au Canada en 2014, le nombre estimé de nouveaux cas de leucémie était de 3400 (3,4% des 97700 nouveaux cas de cancer) chez les hommes et de 2600 (2,7 % de 93600 nouveaux cas de cancer) chez les

femmes. Les décès attribués à la leucémie étaient évalués à 3,8 % des 40000 décès reliés aux cancers chez les hommes et 3,1 % des 36600 décès reliés aux cancers chez les femmes [33]. La survie à 5 ans des patients atteints de leucémie s'est grandement améliorée au cours des dernières années. En effet, entre 1992-94 et 2006-08, le pourcentage de survie relative à 5 ans a augmenté de 44 % à près de 58% (toutes leucémies confondues) [33, 64] Cette amélioration est reliée à l'amélioration des méthodes diagnostiques, des soins de support ainsi qu'à l'utilisation des traitements tels que la chimiothérapie intensive et la greffe de cellules hématopoïétiques [33].

La leucémie myéloïde aiguë

La LMA est un ensemble de conditions malignes très hétérogènes quant aux caractéristiques biologiques et cliniques, aux altérations génétiques et à la réponse aux thérapies [33, 65, 66]. Ces maladies agressives sont caractérisées par une prolifération néoplasique clonale résultant en une accumulation de cellules hématopoïétiques immatures dans la MO et le SP. Ces cellules remplacent graduellement les cellules hématopoïétiques normales menant à différents symptômes cliniques tels que la fatigue, la dyspnée, les ecchymoses ou autres saignements, la survenue d'infections, une diminution de poids et les douleurs osseuses. La présence d'une splénomégalie est observée chez environ la moitié des patients et les autres organes pouvant être atteints sont principalement la peau et le système nerveux central [62].

Incidence et mortalité

Il est évalué qu'aux États-Unis, il y aura 18860 nouveaux cas de LMA en 2014, dont la majorité chez l'adulte et que 10460 décès seront attribués à ce cancer. La survie globale est d'environ 25% et l'âge moyen des patients au diagnostic est autour de 70 ans. De plus, il est à noter que les leucémies sont le type de cancer le plus fréquent chez les enfants. Les LMA représentent environ 20% des leucémies aiguës pédiatriques et sont plus communes durant les deux premières années de vie et l'adolescence [64, 67].

Étiologie

La cause des LMA demeure inconnue. Toutefois certains facteurs favorisent la survenue de cette pathologie. Une prédisposition pour certains sous-types de leucémies est bien décrite en présence de désordres héréditaires dont entre autres, la thrombocytopénie familiale reliée à des mutations du gène *RUNX1* (« runt-related transcription factor 1 », nommé aussi AML1), le syndrome de Down et l'anémie de Fanconi [66, 68]. De plus, certains produits chimiques, tels que le benzène et les agents utilisés en chimiothérapie (agents alkylants et inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II) augmentent le risque de LMA [66].

La cellule souche leucémique

Les CS hématopoïétiques (CSH) normales sont des cellules multipotentes responsables de la formation des cellules matures des différentes lignées hématopoïétiques du sang. Chez l'humain, nous pouvons enrichir une population cellulaire en CSH en purifiant les cellules par cytométrie en flux selon les marqueurs de surface qu'elles expriment soit les marqueurs $CD34^+CD38^-CD90^+CD45RA^-Lin^-CD49f^+$. Chez la souris, ces cellules sont bien définies et nous pouvons isoler une population de CSH en sélectionnant les cellules ayant l'immunophénotype nommé « SKL » ($Sca1^+cKit^+Lin^-$). Les marqueurs de lignées (« Lineage positive » ou Lin+) sont principalement B220 (cellules B), CD4 et CD8 (cellules T), Gr-1 et Mac-1 (cellules myéloïdes) et Ter-119 (cellules érythroïdes). De plus, selon les procédures, d'autres critères peuvent être ajoutés tels que $CD34^-Flk2^-$ ou encore les marqueurs de la famille SLAM, $CD150^+CD48^-CD244^-$ [69, 70]. Leur survie réside dans l'équilibre entre leur potentiel de différenciation et celui d'auto-renouvellement [69, 71]. La présence d'une niche et de voies cellulaires redondantes les protègent contre différents stress et favorisent leur quiescence, maximisant les chances de conserver l'homéostasie.

Il est maintenant établi qu'une CSL ou une cellule progénitrice réactivant des propriétés souches est à l'origine des LMA. Dans ce cancer, les CSL sont rares [72] et semblent être en haut de la pyramide de différenciation comme c'est le cas pour les

CSH normales [73, 74]. Les CSL diffèrent des CSH normales entre autres par leur immunophénotype qui est caractérisé par les marqueurs CD90⁻CD117⁻CD123⁺[75]. De plus, ces cellules possèdent les caractéristiques souches leur permettant de s'auto-renouveler et de pouvoir propager la leucémie dans une xélogreffe par leur potentiel de T-IC [72-74].

Dans le premier modèle des CSL, les cellules possédant les propriétés souches étaient enrichies dans la fraction CD34⁺ CD38⁻. Toutefois des études plus récentes ont démontré la présence de T-IC dans d'autres fractions cellulaires, soulignant le fait que l'hétérogénéité tumorale s'applique également au compartiment des CSL [38, 72]. Ces cellules semblent être à l'origine de la résistance au traitement et à l'apparition des rechutes dans la LMA. Une hétérogénéité tant au point de vue des marqueurs cellulaires que des propriétés moléculaires de ces cellules semble présente entre les individus ainsi qu'au sein de la même leucémie compliquant les options thérapeutiques [74].

Diagnostic et pronostic

L'analyse des cellules leucémiques au diagnostic est effectuée dans le but de préciser le type de leucémie afin de la classer selon les différentes entités définies dans la classification WHO 2008. La morphologie des cellules des différentes lignées hématopoïétiques est évaluée sur le frottis médullaire suite à la coloration au Wright-Giemsa ou au May-Grünwald-Giemsa et la cytochimie permet d'étudier l'activité de la myéloperoxidase et des estérases. L'immunophénotype par cytométrie en flux permet de détecter la présence de marqueurs de surface. Ces techniques permettent de déterminer le type cellulaire et le degré de maturation des cellules leucémiques [66].

La cytogénétique, quant à elle, est une méthode permettant d'appuyer le diagnostic de la leucémie et d'établir son pronostic. Cette technique consiste en l'étude des anomalies chromosomiques par le caryotypage et par d'autres techniques telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, « fluorescence *in situ* hybridization »). La

détection des translocations chromosomiques peut aussi être effectuée par la réaction quantitative en temps réel de polymérisation en chaîne (qPCR) suite à une transcription inverse (RT-qPCR). Cette technique, plus sensible que la cytogénétique standard, est utilisée pour le suivi du patient et la détection de la maladie résiduelle minimale (MRD, « minimal residual disease ») [66].

Plusieurs facteurs influencent le résultat de la thérapie. Cependant, les deux facteurs pronostiques les plus importants pour la prédiction des rechutes dans les LMA sont l'âge et les anomalies génétiques [76]. L'âge est associé aux anomalies cytogénétiques de moins bon pronostic, et il est aussi inversement proportionnel à la tolérance du patient aux effets secondaires de la chimiothérapie. D'ailleurs, un statut de performance est calculé afin de prévoir la capacité du patient à tolérer une chimiothérapie intensive. La présence d'antécédents médicaux est également utile pour prédire les complications possibles de ces thérapies [24, 66, 77].

Plusieurs classifications pronostiques basées sur les anomalies génétiques des LMA ont été décrites. La classification du groupe United Kingdom Medical Research Council présente les LMA en trois principaux groupes cytogénétiques pronostiques : favorable, intermédiaire et défavorable [78]. La classification du groupe European LeukemiaNet inclut aussi les principales mutations génétiques des LMA et subdivise le groupe intermédiaire en intermédiaire-I et -II [79]. Les translocations chromosomiques ayant un pronostic favorable sont la translocation $t(15;17)(q24;q21)$ /fusion *PML-RARA* (« promyelocytic leukemia »-« retinoic acid receptor, alpha ») associée à la leucémie promyélocytaire aiguë (LPA), l'inversion du chromosome 16, $inv(16)(p13.1q22)$, ou la translocation $t(16;16)(p13.1;q22)$ /fusion *CBFB-MYH11*, ainsi que la $t(8;21)(q22;q22)$ /fusion *RUNX1-RUNX1T1* (« RUNX1, translocated to, 1 (cyclin D-related) », nommé aussi ETO). Un caryotype normal (CN) avec présence d'une mutation biallélique du gène « CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha » (*CEBPA*) ou d'une mutation au niveau de l'exon 12 du gène « Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) » (*NPM1*) en absence d'une duplication en tandem du gène « fms-related tyrosine kinase 3 » (*FLT3-ITD*), est aussi associé à un

pronostic favorable. Les LMA de risque intermédiaire incluent les autres LMA avec CN, celles avec la t(9;11)(p22;q23)/fusion *MLLT3-MLL* et les autres LMA non classifiées dans les groupes de risque favorable et défavorable. Finalement, le groupe défavorable inclue les LMA avec les anomalies cytogénétiques suivantes: l'inv(3)(q21q26.2) ou la t(3;3)(q21;q26.2)/fusion *RPNI-MECOM* (« ribophorin 1 »-« MDS1 and EVI1 complex locus », précédemment nommé *EVII*), la t(6;9)(p22;q34)/fusion *DEK-NUP214*, la t(9;22)(q34;q11.2)/fusion *BCR-ABL1*, les délétions et monosomies des chromosomes 5 (5q- et -5) et 7 (7q- et -7), les anomalies du bras court du chromosome 17 (abnl(17p)), les translocations impliquant le gène *MLL* localisé à la bande chromosomique 11q23 autres que la t(9;11) et les caryotypes complexes [77].

Il est à noter que les LMA avec abnl(17p) ont un très mauvais pronostic, qui persiste même suite à une transplantation allogénique. La survie sans évènement à 2 ans est seulement de 11% dans ce sous-groupe de patients, versus 49% en absence d'anomalies des chromosomes 5 et 17 [80-82]. Une étude récente a établi que la survie globale à 3 ans des patients avec une mutation de *TP53* (bande chromosomique 17p13.1) était de 0%. Dans cette étude, les auteurs présentent un nouveau modèle pronostique basé sur l'analyse de différentes altérations moléculaires telles que les fusions *PML-RARA* et *RUNX1-RUNX1T1*, la présence de mutations de type *FLT3-ITD* et de mutations des gènes *NPM1*, *CEPBA*, *RUNX1*, *ASXL1* (« additional sex combs like 1 ») et *TP53*. Selon leur analyse, le pronostic des LMA avec caryotype complexe varie selon la présence ou non de mutations de *TP53* [83]. Cela a aussi été confirmé dans deux autres études [80, 84] (figure 4).

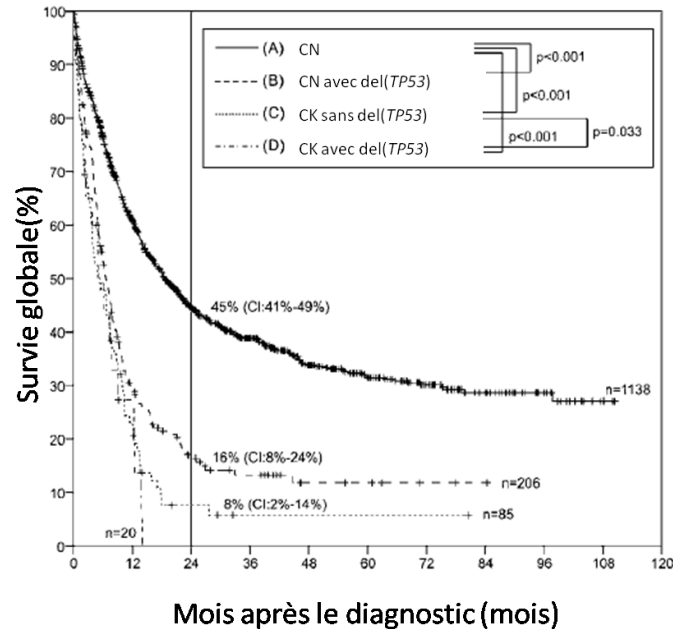


Figure 4. Survie globale des LMA. LMA classées selon la présence d'un caryotype normal (CN) ou d'un caryotype complexe (CK, « Complex karyotype ») et selon la présence ou non de délétion de *TP53* (*del(TP53)*). Adapté de Seifer et al [82], Figure 1, page 4. Adapté suite à la permission de Macmillan Publishers Ltd : Leukemia, « The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia », 23, 656-63, copyright (2009).

Classification des leucémies myéloïdes aiguës

La classification WHO 2008 des LMA intègre les anomalies cytogénétiques et définit quatre groupes principaux : (1) LMA avec anomalies cytogénétiques récurrentes (environ 25% des LMA); (2) LMA avec changements liés à une myélodysplasie (« with myelodysplasia-related changes », LMA-MRC); (3) LMA reliée à une thérapie (« therapy-related myeloid neoplasms », t-LMA); (4) LMA non spécifiées autrement (LMA NOS) regroupant les 25 à 30% des LMA ne pouvant être classées dans les sections précédentes. Cette dernière catégorie se base principalement sur la classification Franco-Américaine-Britannique (FAB) (voir section suivante). Elle comprend entre autres (a) les LMA avec différenciation minimale; (b) les LMA sans maturation, (c) les LMA avec maturation; (d) les leucémies aiguës myélomonocytaires; (e) les leucémies aiguës monoblastiques et monocytaires; (f) les leucémies érythroïdes; (g) les leucémies aiguës mégacaryoblastiques; (h) les leucémies basophiliques; (i) les leucémies myéloïdes aiguës avec myélofibrose [63]. Les catégories de leucémies

nécessaires à la compréhension des résultats décrits dans ce mémoire sont brièvement définies dans le tableau II [33, 63, 77].

Tableau II. Description résumée des caractéristiques des spécimens leucémiques étudiés

Nomenclature WHO 2008	FAB	Caractéristiques morphologiques	Fréquence
LMA avec particularités			
LMA avec changements reliés à une myélodysplasie ("acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes", LMA-MRC) (synonyme : LMA avec dysplasie multilignée)	-	≥20% de blastes avec myélodysplasie dans au moins 50% des cellules de deux lignées ou plus ou SMD ou SMD/NMP préalable	24 à 35%
LMA non spécifiées autrement			
LMA avec diff. minimale ("acute myeloid leukaemia with minimal differentiation")	M0	LMA avec différenciation minimale	<5%
LMA sans maturation ("acute myeloid leukaemia without maturation")	M1	LMA avec un haut pourcentage de blastes dans la MO sans évidence significative de maturation et ≥90% de cellules non-érythroïdes	5 à 10%
LMA avec maturation ("acute myeloid leukaemia with maturation")	M2	≥20% de blastes dans la MO ou SP, évidence de maturation, monocytes <20% des cellules de la MO	10%
Leucémie myélomonocytaire aiguë ("acute myelomonocytic leukaemia")	M4	neutrophiles et leurs précurseurs ainsi que monocytes et leurs précurseurs représentent chacun ≥20% des cellules de la MO	5 à 10%
Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë ("acute monoblastic and monocytic leukaemia")	M5	≥80% des cellules sont de lignée monocytaire (monoblastes, promonocytes et monocytes)	<5%

LMA: Leucémie myéloïde aiguë; WHO: "World Health Organization"; SMD: syndrome myélodysplasique; SMD/NMP: syndrome myélodysplasique/néoplasies myéloprolifératives; diff. : différenciation; MPO: myeloperoxidase; SBB: Sudan Black B; MO: moelle osseuse; SP: sang périphérique.

La classification FAB permet une classification selon la morphologie

La classification FAB définit principalement huit différentes classes (définies dans le tableau III) basées sur la morphologie des blastes leucémiques.

Tableau III. Nomenclature FAB

Abréviation	Définition
M0	LMA avec différenciation minimale
M1	LMA sans maturation
M2	LMA avec maturation
M3	Leucémie promyélocytaire aiguë
M4	Leucémie myélomonocytaire aiguë
M5	Leucémie monoblastique aiguë
M6	Érythroleucémie aiguë
M7	Leucémie mégacaryoblastique aiguë

FAB: "French American British"; LMA: Leucémie myéloïde aiguë.

Le traitement standard de la leucémie myéloïde aiguë

Le traitement des LMA comporte deux phases : l'induction et la consolidation. L'induction vise à obtenir une rémission complète (CR, « complete remission ») en éliminant les cellules leucémiques. Le régime d'induction standard est composé de trois jours d'anthracycline de manière concomitante à sept jours de cytosine arabinoside (ara-C) en perfusion continue. Ce régime porte le nom de « 3 + 7 » et permet une CR dans 60 à 80% des cas chez l'adulte de moins de 60 ans [77, 85, 86]. De plus hautes doses de daunorubicine (anthracycline) ont démontré une amélioration de la survie [87, 88].

Il est bien établi qu'une thérapie supplémentaire est essentielle après l'obtention d'une CR afin d'espérer une survie à long terme sans maladie (DFS : « disease-free survival ») et ultimement une guérison [66]. La thérapie de consolidation comprend habituellement, chez les patients âgés de moins de 60 ans, trois ou quatre cycles de cytarabine à hautes doses (HiDAC) (3 g/m² aux 12h, jours 1, 3 et 5). Les thérapies de maintenance sont, encore de nos jours, réservées principalement aux études cliniques sauf pour les LPA avec la translocation t(15;17). Finalement, la transplantation de CSH peut être envisagée en tant que thérapie post-rémission pour les risques génétiques intermédiaires et défavorables [77, 86]. Il existe deux types de transplantation, soit (1)

la greffe allogénique utilisant les CS soit d'un donneur HLA compatible familial ou non-apparenté, soit des cellules de sang de cordon, et (2) la greffe autologue où des cellules du patient sont réintroduites suite à un régime de préparation intensif (chimiothérapie avec ou sans radiothérapie) [66, 77]. La première modalité est favorisée dans le traitement des LMA.

La majorité des rechutes de LMA se produisent durant les trois premières années suite au diagnostic. Malheureusement, pour ces patients les options de traitement ne sont pas satisfaisantes et leur pronostic est défavorable. Cependant, leur survie est influencée positivement par la capacité à induire une deuxième CR et par la possibilité d'une consolidation avec une transplantation allogénique [77].

Les critères de réponse à la thérapie

Après la chimiothérapie d'induction, la réponse est en général évaluée au jour 28, lors de la récupération hématologique. Les critères de CR sont définis par : (1) la présence de moins de 5% de blastes avec absence de bâtonnets d'Auer dans la MO, (2) l'absence de maladie extramédullaire, (3) la présence d'un décompte de neutrophiles supérieur à $1,0 \times 10^9/L$ dans le SP et (4) d'un taux de plaquettes supérieur à $100 \times 10^9/L$ et, finalement, (5) l'indépendance du patient aux transfusions de globules rouges. Parfois, il y a présence de neutropénie ou de thrombocytopénie résiduelle, on parlera alors d'une CR avec récupération incomplète (CRi). On parle de rémission cytogénétique, lorsque le caryotype, anormal au diagnostic, est normal après l'induction (sur un minimum de 20 métaphases). Aucun critère standard n'est actuellement bien établi pour définir la CR moléculaire dans la LMA [77]. Cependant, dans le cas de la LMC avec la t(9;22) et la leucémie promyélocytaire aiguë avec la t(15;17), la CR moléculaire est bien définie. En effet, dans ces deux types de leucémie, l'utilisation de la PCR est de mise pour le suivi moléculaire du patient sous traitement [89, 90].

Les thérapies à l'étude dans les leucémies myéloïdes aiguës

Les chercheurs tentent depuis plusieurs années d'identifier des molécules plus spécifiques et plus efficaces pour traiter les LMA. Un des meilleurs exemples de ce type de traitement est l'acide rétinoïque all-trans (ATRA) utilisé pour traiter les LPA avec la t(15;17). L'ATRA, un dérivé de la vitamine A, lie la protéine de fusion PML-RARA, libérant ainsi le complexe répresseur de la transcription. Ceci ramène la conformation accessible de la chromatine, réactivant ainsi la différenciation cellulaire. Depuis l'utilisation de cette molécule, en combinaison avec une chimiothérapie incluant des anthracyclines, le pronostic s'est grandement amélioré avec un taux de survie dépassant 80% à long terme [66, 91].

L'utilisation d'anticorps (Ac) monoclonaux est une autre option thérapeutique. Par exemple, un Ac anti-CD33 conjugué à une toxine (GO; Gemtuzumab ozogamicin) a été utilisé en combinaison avec la chimiothérapie dans des études cliniques [77]. Malheureusement, la toxicité de cette molécule et des études peu concluantes quant à son efficacité ont mené à son retrait du marché en 2010. Certains sous-groupes de patients semblent toutefois avoir un avantage de survie avec cette molécule. De nouvelles molécules anti-CD33 sont actuellement en développement [92, 93].

Comme troisième exemple, l'utilisation de molécules permettant de contrer la répression de l'expression génétique bloquant la différenciation cellulaire, telles que les agents déméthylants, est maintenant approuvée par la FDA (« Food and Drug Administration ») pour le traitement des syndromes myélodysplasiques à haut risque. Ces molécules sont présentement en étude clinique dans les LMA [77].

Finalement, plusieurs classes d'inhibiteurs sont également en développement ou en étude clinique dans les LMA (voir le tableau I, Annexe A) [94]. Notons par exemple, les inhibiteurs des tyrosines kinases tels que les inhibiteurs de *FLT3*. Des études cliniques où ces molécules sont combinées à la chimiothérapie ont montré des réponses prometteuses chez les patients avec la mutation *FLT3-ITD* [77]. Les inhibiteurs de *BCL2* sont aussi des molécules étudiées [24, 66, 91]. L'inhibiteur Obatoclax par

exemple cible, entre autres, l'apoptose dépendante de BAX (« BCL2-associated X protein ») dans les cellules leucémiques [95]. Enfin, il y a les inhibiteurs de MDM2 qui seront décrits ultérieurement dans ce mémoire.

L'axe « USP7-MDM2-TP53-CDKN1A » dans le cancer

Dans ce mémoire, nous étudierons plus spécifiquement l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A dans les LMA. Il s'agit d'une voie très importante dans le contrôle et la fonction de TP53 et de l'apoptose. La figure 5 résume les principales interactions entre les membres de cet axe.

La régulation de l'apoptose repose, entre autres, sur la balance entre l'ubiquitination et la déubiquitination, et ceci tant par le système de l'ubiquitine-protéasome, que dans la régulation de la localisation cellulaire et de la fonction de divers acteurs importants, particulièrement TP53. Citons quelques exemples qui ne seront pas détaillés dans ce mémoire, dont USP28 qui régule l'axe CHEK2-TP53-PUMA, et USP9X (« ubiquitin specific protease 9X »), une DUB responsable du contrôle de MCL1 (« myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related) »), une protéine nécessaire pour la survie des CS, surexprimée dans différents cancers [16].

TP53 est l'acteur central de l'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée

L'apoptose, également nommée la mort cellulaire programmée (PCD, « programmed cell death »), est la voie d'élimination cellulaire la plus rapide et activant peu les réponses de stress au niveau tissulaire. Morphologiquement, elle est caractérisée par une condensation de la chromatine, la perte de volume cellulaire et la formation de corps apoptotiques [95, 96]. L'activation des caspases, enzymes responsables de ce phénotype, se produit d'une manière très hiérarchique où des caspases initiatrices débudent la cascade et des caspases effectrices ciblent les différentes protéines menant à l'apoptose [95].

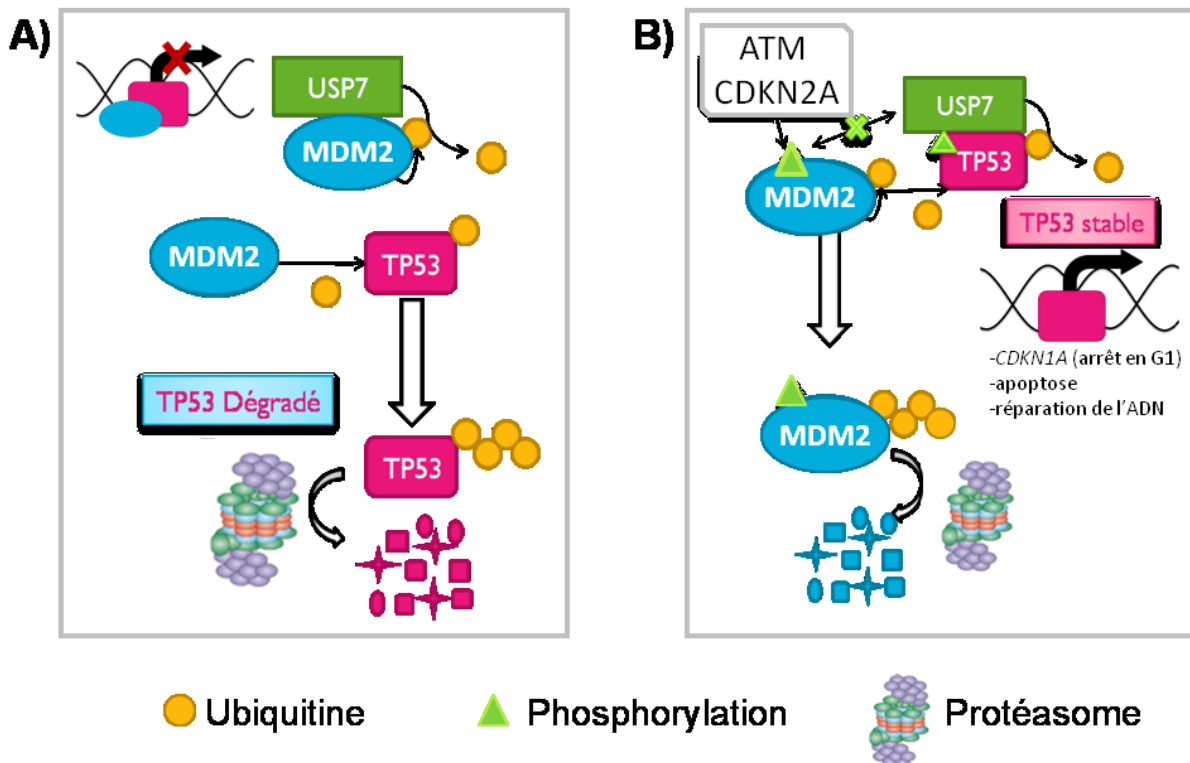


Figure 5. Interactions principales et simplifiées de l'axe USP7-MDM2-TP53. (A) Dans une cellule saine, MDM2 est stabilisée par USP7 et inhibe TP53 en bloquant sa transcription et en l'envoyant à la dégradation. (B) Lors d'un stress cellulaire, des signaux provenant de différentes voies cellulaires, dont celles de ATM et CDKN2A (précédemment nommée ARF) mènent à la phosphorylation de MDM2 et TP53. L'affinité de USP7 pour TP53 est alors augmentée, stabilisant TP53 et permettant l'arrêt du cycle cellulaire en G1 par CDKN1A, l'apoptose et/ou la réparation de l'ADN, selon le contexte cellulaire. La double hélice noire représente l'ADN, la flèche noire pleine courbée représente la transcription, la croix rouge représente l'arrêt de la transcription. Utilisation de l'image du protéasome suite à la permission de Macmillan Publishers Ltd : Murata, S. *et al.*, *Molecular Cell Biology*, « Molecular mechanisms of proteasome assembly », 10, 104-115, copyright (2009)

Au niveau moléculaire, l'apoptose est effectuée principalement par deux voies, soit la voie classique comprenant la cascade des caspases et une voie indépendante de ces enzymes [95]. Cette deuxième voie a, entre autres, été observée dans des cellules leucémiques suite à un traitement par l'ara-C ou par la doxorubicine [97]. Cette voie implique l'activation du facteur induisant l'apoptose de la mitochondrie (AIFM1 : « apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1 »). Suite à un dommage à l'ADN, ce facteur est relocalisé au noyau et induit la condensation et la fragmentation de l'ADN [98].

La voie classique peut être activée soit par des signaux intracellulaires de stress, c'est-à-dire par la mitochondrie et/ou par BCL2. Dans cette voie, l'apoptose est initiée par une protéine cytoplasmique nommée le facteur de l'activation de la peptidase apoptotique (APAF1; « apoptotic peptidase activating factor 1 ») qui formera l'apoptosome avec le cytochrome C. Ce complexe protéique est nécessaire à l'activation de la caspase 9 (CASP9, « apoptosis-related cysteine peptidase »). L'autre mécanisme d'activation de l'apoptose est médié par des signaux extra-cellulaires, plus précisément par les voies des récepteurs de mort cellulaire, tels que le récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF, « tumor necrosis factor »). Dans cette voie, l'activation de la caspase 8 (CASP8, « apoptosis-related cysteine peptidase ») est primordiale et se fait par un complexe protéique nommé DISC (« death inducing signaling complex ») induisant une signalisation de la mort cellulaire [99].

P53 est « le gardien du génome » et l'élément central de l'apoptose

On a d'abord cru que *TP53* était un oncogène puisqu'il transformait les cellules dans lesquelles il était introduit. Cependant, il a été découvert ultérieurement que cette propriété était secondaire à une mutation et que le gène non muté était en fait un TSG important [100-102]. Il fait partie d'une famille de trois protéines, incluant TP63 et TP73 qui peuvent aussi être impliquées dans l'apoptose. Dans ce travail, il ne sera question que de *TP53*, en raison de son rôle important dans la tumorigenèse et dans la réponse aux traitements [103].

Le gène *TP53* non muté ou « wild type » (WT), aussi appelé le « gardien du génome », comprend 11 exons et 10 introns [95]. Il mène à la formation d'une protéine nucléaire possédant quatre domaines protéiques : (1) le domaine de trans-activation (résidus 1-42), (2) une région de résidus PXXP répétés (résidus 61-94), (3) le domaine central permettant la liaison à l'ADN (résidus 102-292) et (4) le domaine d'oligomérisation (résidus 324-355) permettant à la protéine de former un complexe de quatre unités de TP53 [103]. Il possède deux promoteurs différents menant à deux

isoformes, la forme complète (qui agit comme TSG) et la forme sans son extrémité N-terminale (N-term, terminaison amine) agissant comme un dominant négatif (oncogène) [95].

Au niveau cellulaire, TP53 joue plusieurs rôles dont la modulation de la transcription, la synthèse et la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Selon sa localisation et ses PTM, TP53 peut avoir des fonctions variées [104]. Dans le noyau, il active deux grandes familles de gènes : (1) les régulateurs du cycle cellulaire, tels que CDKN1A et (2) les gènes favorisant l'apoptose, tels que BBC3, BAX et BAK1 (« BCL2 antagonist/killer 1 ») [104]. Les protéines de la famille BCL2 sont regroupées en protéines anti-apoptotiques, incluant BCL2, BCL2L1 (« BCL2-like1 », précédemment nommée BCL-XL), BCL2L2 (« BCL2-like 2 », précédemment nommée BCL-W) et MCL1, et en protéines pro-apoptotiques, incluant BAX, BAK1, BCL2L11 (« BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) », précédemment nommée BIM), BBC3, BID (« BH3 interacting domain death agonist »), BAD (« BCL2-associated agonist of cell death ») et PMAIP1 (« phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 », précédemment nommée NOXA) [47].

Dans le cytoplasme, TP53 peut mener à la déstabilisation de la membrane mitochondriale et à sa perméabilisation. TP53 peut donc activer directement BAX et BAK1, antagoniser BCL2L1, transformer BCL2 en protéine pro-apoptotique et augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, « Reactive Oxygen Species »). Tous ces effets activent alors l'apoptose par la voie mitochondriale [96, 97, 105]. TP53 régule également le métabolisme cellulaire en supprimant la glycolyse principalement pour mieux gérer la présence accrue de ROS, par exemple dans les cellules cancéreuses [106].

Les CSH expriment le gène *TP53* afin de maintenir leur état de quiescence cellulaire. Ceci leur permet une plus grande résistance aux stress cellulaires (surtout les ROS) et aux dommages à l'ADN. Cette dépendance des CSH envers un certain niveau de TP53

indique que les thérapies ciblant préférentiellement cet axe peuvent avoir un impact sur les CSH et donc sur l'hématopoïèse normale à long terme. On doit donc tenir compte de ceci lors des traitements modulant TP53 [71].

Au niveau basal, l'expression de TP53 est très faible, puisque cette protéine est constamment dégradée par le système de l'Ub-protéasome. Plus d'une dizaine d'Ub ligases sont impliquées dans ce mécanisme, mais la principale enzyme est MDM2. Plusieurs stress cellulaires activent l'expression et la stabilisation de TP53. Ce contrôle par PTM et dégradation au protéasome permet à TP53 d'augmenter sa quantité rapidement et pour une courte durée [105]. Par exemple, l'expression d'un oncogène, les dommages à l'ADN, l'hypoxie, la perte des facteurs de croissance, les drogues cytotoxiques, le stress ribosomal, etc. mènent à la stabilisation de TP53 suite à sa phosphorylation [96, 107]. Il est à noter que la décision de mort cellulaire ou non médiée par TP53 dépend grandement du contexte cellulaire ainsi que des PTM de TP53 [103].

Premièrement, le contexte cellulaire est important. En effet, les concentrations des protéines pro- et anti-apoptotiques lors du deuxième pic d'activation de TP53 sont déterminantes. Normalement, l'activation d'ATM (« ataxia telangiectasia mutated ») suite à des bris d'ADN stabilise TP53. Ensuite, ce dernier active le PPM1D (« protein phosphatase, Mg^{2+}/Mn^{2+} dependent, 1D », précédemment nommée WIP1) permettant l'inactivation d'ATM. En absence de son activité, MDM2 envoie TP53 à la dégradation, diminuant à nouveau sa concentration. Ceci crée un pic court d'activation de TP53. Si les dommages sont encore suffisants, un second pic est induit et ainsi de suite. Ce serait principalement durant le deuxième pic d'activation que la balance pro- et anti-apoptotique jouerait son rôle [108].

Deuxièmement, la protéine TP53 possède la caractéristique de pouvoir intégrer un grand nombre de signaux cellulaires par sa grande versatilité de PTM. En effet, elle est sujette à la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination et la sumoylation. Ces modifications peuvent être en compétition et mènent à différents effets de TP53.

L'activation de TP53 passe également par différentes kinases, chacune ayant des sites de phosphorylation pouvant être communs ou non. TP53 peut également être acétylée afin de faciliter le remodelage de la chromatine et ainsi promouvoir l'activation des cibles transcriptionnelles de TP53. Par exemple, suite à un dommage à l'ADN, la sérine 15 de TP53 est phosphorylée par PRKDC (« protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide », aussi nommé DNAPK) et ATM. Comme il en sera question dans les sections suivantes, TP53 peut être ubiquitinée par différentes Ub ligases, dont MDM2, RCHY1 (« ring finger and CHY zinc finger domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase », précédemment nommée PIRH2), RFWD2 (« ring finger and WD repeat domain 2, E3 ubiquitin protein ligase », précédemment nommée COP-1) et STUB1 (« STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase », précédemment nommée CHIP) [10, 107, 109]. Cette protéine peut également être déubiquitinée par USP2, USP4, USP5, USP7, USP10 et USP29. La sumoylation de TP53 sur sa lysine 386 a été observée, mais sa fonction reste à déterminer. Bref, l'intégration de ces PTM est le mécanisme clé permettant à TP53 d'avoir des effets différents selon le contexte cellulaire [107, 109].

TP53 est impliquée dans le cancer et dans la réponse à la chimiothérapie

TP53 est un suppresseur de tumeur important et une cible thérapeutique intéressante [110]. Les altérations structurales et/ou la perte de TP53 sont significatives pour l'induction et/ou la progression des cancers. En effet le gène *TP53* est altéré dans plus de 50% des cancers humains, soit par perte de la région chromosomique, soit par mutation ponctuelle [111].

Cependant, ni la perte isolée de l'apoptose dépendante de TP53, ni la perte isolée de son effecteur principal pour l'arrêt du cycle cellulaire, CDKN1A, ne semblent être des lésions transformantes. Ce serait plutôt la dérégulation de plusieurs voies effectrices sous le contrôle de TP53 dans un même contexte qui serait à l'origine du rôle important de TP53 dans la carcinogenèse [47].

Les anomalies de *TP53* dans les cancers sont associées à une chimiorésistance et à une survie de courte durée chez les patients [112]. Dans les cancers hématologiques, les mutations de *TP53* sont aussi associées à un pronostic très défavorable [81-83, 113], mais sont plutôt de l'ordre de 10 à 20% [71, 113]. Dans les LMA, ce chiffre est d'environ 5 à 10% selon les études [97, 104, 110] et inclue les cas de LMA avec monosomie 17p au caryotype [112]. Toutefois, les anomalies de *TP53* sont beaucoup plus fréquentes dans les LMA avec caryotype complexe (CK, « complex karyotype »). En fait, 40% des patients ayant une LMA avec CK ont une perte de *TP53* et 60% ont une mutation, avec au total 70% des cas qui ont une altération de ce gène [42, 83, 84]. Pour les LMA avec CK, l'altération de *TP53* représente le facteur pronostique le plus important [84].

Par ailleurs, il a été démontré que même dans certains cas où *TP53* n'est pas muté, son activité est modifiée, et cette altération semble nécessaire pour la survenue du cancer [104]. Plus précisément, dans les leucémies, on relate l'altération tant de la voie extrinsèque qu'intrinsèque de l'apoptose. D'une part, il y a souvent expression du récepteur leurre (« decoy receptor ») de mort cellulaire nommé TRAIL, permettant aux cellules d'être résistantes à l'induction de l'apoptose par ce récepteur. D'autre part, les membres anti-apoptotiques de la famille de BCL2 sont souvent surexprimés ainsi que les inhibiteurs de caspases tels que XIAP (« X-linked inhibitor of apoptosis ») et BIRC5 (« baculoviral IAP repeat 5 », nommé précédemment survivin) [97]. Finalement, dans certains cancers dont les leucémies, il a également été proposé que *TP53* WT puisse être inactivée par l'expression élevée de MDM2 [110].

Approches thérapeutiques visant à réactiver ou stabiliser TP53

Étant donné que l'inactivation de *TP53* est une étape cruciale pour le développement de la majorité des cancers, la restauration de son expression et de ses fonctions est un objectif thérapeutique important [8]. Plusieurs molécules chimiques ont été développées dans le but de réactiver ou stabiliser *TP53* dans les cellules où cette protéine n'est pas altérée [110].

Premièrement, une petite molécule nommée RITA (« reactivation of TP53 and induction of tumor cell apoptosis », aussi nommée NSC 652287), permet la stabilisation de TP53 en empêchant son interaction avec MDM2. Afin de mener la cellule en apoptose, cette molécule nuit à l'activation de l'expression des gènes anti-apoptotiques et diminue indirectement la transcription de *CDKN1A* par l'interaction de MDM2 avec hnRNP K (« heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K ») [9, 96, 110, 114, 115]. Cette molécule a démontré entre autres une activité contre les cellules leucémiques de leucémie lymphoïde chronique et de LMA avec TP53 WT [110].

Deuxièmement, il y a également plusieurs molécules qui bloquent la poche de MDM2 pour la liaison de TP53, telles que les « nutlins » (nommés selon la ville Nutley du New Jersey, où est le centre de recherche de Roche). Ces molécules sont des analogues cis-imidazole qui stabilisent TP53 [9, 116, 117]. Ces molécules induisent principalement l'apoptose dépendante de TP53 lors des phases S et G2/M [97]. Les cellules cancéreuses avec amplification de MDM2 montrent une plus grande sensibilité au nutlin 3, mais celles avec un haut niveau de MDM4 (« mouse double minute 4, p53 regulator », également nommé MDMX), ont une moins grande sensibilité à cette molécule [115]. Cette approche active également fortement *CDKN1A*, menant parfois à un arrêt du cycle cellulaire et à une résistance au traitement [114]. De plus, le nutlin 3 induit l'apoptose dans les cellules ayant une protéine TP53 fonctionnelle, et agit de manière synergique avec des drogues cytotoxiques telles que la doxorubicine [118]. Dans les études pré-cliniques, le nutlin seul ou en combinaison avec un médicament de chimiothérapie a démontré un effet bénéfique pour le traitement des cancers du sang, dont les LMA. En effet, des réponses cytotoxiques et apoptotiques ont été détectées dans les cellules de lignées ou les cellules primaires de LMA [110].

Afin d'améliorer la biodisponibilité des nutlins dans les cellules cancéreuses, des modifications ont été apportées à sa structure chimique, donnant naissance à une série de molécules dont le RG7112 (RO5045337, Hoffman-La Roche) [117]. Cette molécule a été le premier médicament ciblant TP53 à être étudié en recherche clinique

(<http://clinicaltrials.gov/>, études : NCT01164033, NCT01143740, NCT00623870 et NCT00559533) [117]. Des formulations de cette famille de médicaments pouvant être prises par voie orale font l'objet d'études cliniques pour divers cancers et des réponses ont été démontrées entre autres chez des patients atteints de LMA [119].

Troisièmement, il y a la série des spiro-oxindoles, tel que la série MI (MI-63, MI-219 (AT-219) et MI-319) qui ont des effets très similaires au nutlin mais ayant une meilleure biodisponibilité orale. Dans une étude, Long *et al.* ont testé la capacité du MI-219 à induire l'apoptose *ex vivo* dans les cellules de LMA. Les cas présentant une mutation de TP53 étaient résistants, mais une résistance a également été détectée dans environ 30% des cas avec TP53 WT mettant en lumière l'existence d'une résistance intrinsèque probablement due à l'incapacité de ces cellules d'activer TP53 [120]. Cette molécule a montré une activité anti-tumorale dans les LMA et la leucémie myéloïde chronique [110]. La molécule la plus avancée de cette série est le MI-773 (SAR405838) et est en étude clinique [8, 121].

Quatrièmement, il y a les inhibiteurs de l'activité ligase de MDM2 tels que le HLI98 et le JNJ-26854165 (Johnson and Johnson) [115]. Cette dernière molécule inhibe également l'axe en ciblant la liaison du complexe MDM2-TP53 au protéasome [117]. Cet agent induit l'apoptose dans les cellules de lignées leucémiques avec ou sans TP53 WT, et il est aussi en étude clinique de phase I dans les tumeurs solides [110].

Cinquièmement, le groupe de Kojima *et al.* a démontré récemment que le transport nucléaire de TP53 par la protéine XPO1 (« exportin 1 », l'homologue de CRM1 « Chromosome region maintenance 1 » chez la levure) est activé dans les cellules de certaines LMA. Ceci est associé à un mauvais pronostic et une courte survie. L'inhibiteur KPT-185, inhibant XPO1, permet l'accumulation de TP53 ainsi que l'activation de la mort cellulaire. Cette molécule a également montré une synergie avec le nutlin 3 [122].

Finalement, dans les cas résistant à ces molécules et ceux où TP53 est mutée, des approches visant à retrouver la forme non-mutée de TP53, à mimer ou réactiver les fonctions TP53 WT, ou à activer des effecteurs en aval de TP53 sont également en développement. De manière intéressante, TP53 est une protéine très flexible et dans les cas où elle est mutée, on peut envisager de la forcer à retrouver sa forme fonctionnelle non mutée par liaison avec une molécule chimique provoquant des changements allostériques [109]. Le développement de MIRA-1 et de PRIMA-1 (ou APR-246, en étude clinique de phase I/II), des molécules visant à rétablir les propriétés WT de TP53 mutée, sont très intéressantes puisque cette approche permet de cibler un des mécanismes principaux de résistance aux traitements des cancers [110].

TP53 possède une voie de l'apoptose indépendante de la transcription, impliquant plutôt les protéines anti-apoptotiques telles que BCL2. Cette voie semble également être une cible thérapeutique potentielle [103], puisque la surexpression de BCL2 participe à la chimiorésistance des tumeurs solides et hématologiques. Une des molécules chimiques inhibitrices de BCL2, l'ABT-737, semble prometteuse dans le traitement de certaines leucémies, dont celles où il n'y a pas de surexpression de MCL1. De plus, cette molécule induit principalement une apoptose en G1, ce qui serait potentiellement complémentaire avec l'apoptose induite par le nutlin [97].

USP7 est la déubiquitinase de TP53

USP7 est une Cys protéase de la famille des USP. Elle a d'abord été identifiée comme cible d'une protéine virale du virus de l'herpes simplex (HSV). Par la suite, plusieurs partenaires de liaison ont été découverts. USP7 lie TP53 ainsi que son Ub ligase MDM2 par un motif en N-term semblable à TRAF (« TNF receptor associated factor ») [123].

Dans un contexte cellulaire normal, USP7 a une plus grande affinité pour MDM2 et cela permet de renverser son auto-ubiquitination. Dans ce contexte, TP53 est alors dégradée dans le protéasome au fur et à mesure que cette protéine est produite. À

l'inverse, suite à un dommage à l'ADN, MDM2 et TP53 sont phosphorylées, USP7 lie alors plus facilement TP53 menant à sa stabilisation [96, 124]. USP7 peut aussi être phosphorylée par CK2 (« casein kinase 2 »), menant à sa stabilisation. Cette phosphorylation peut être renversée par la phosphatase PPM1G (« protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1G ») [125]. Elle peut également être polyubiquitinée afin d'être envoyée au protéasome [126].

Les modèles expérimentaux de souris ont montré que *Usp7* possède des effets importants indépendamment de *Tp53*. USP7 interagit avec plusieurs autres protéines incluant PTEN (« phosphatase and tensin homolog »), une protéine suppresseur de tumeur dont la localisation cellulaire est contrôlée par son état d'ubiquitination [96]. USP7 interagit aussi avec : (1) FOXO4 (« forkhead box O4 »), un facteur de transcription qui diminue l'activité de la voie PI3K/AKT1 (« Phosphatidylinositol-3 kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 »); (2) PRC1 (« polycomb repressive complex 1 ») régulant négativement la transcription du locus *CDKN2A* (« cyclin-dependent kinase inhibitor 2A », nommé également ARF) [85]; (3) H2B une histone permettant à USP7 un contrôle durant la réparation de l'ADN [127]; (4) la claspine (CLSPN), une protéine qui permet l'activation de *CHEK1* (« checkpoint kinase 1 ») menant à l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M; (5) CHFR (« checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase »), une E3 Ub ligase impliquée dans le point de contrôle en mitose [96, 125]. En plus, il a été démontré récemment que l'association entre USP7 et MCM-BP (« minichromosome maintenance complex binding protein ») lui permet de participer à la réplication de l'ADN durant la transition S/G2, mais son rôle n'est pas encore bien élucidé dans ce processus [128].

USP7 est également impliquée dans le maintien des CS. Quoique moins bien documentée pour les CSH, ceci a été étudié pour les CS neurales. En effet, il a été démontré dans ces CS que USP7 permet la stabilisation de REST (« Repressor element-1 silencing transcription factor »), afin de conserver le statut souche de ces cellules. Dans les cellules cancéreuses neuronales, REST joue alors un rôle

oncogénique en protégeant les CSC, suggérant l'intérêt potentiel de l'utilisation d'inhibiteurs de USP7 dans le traitement de ces cancers [129, 130].

USP7, cible potentielle contre le cancer

USP7 peut être considérée comme une protéine oncogénique puisque lorsque cette protéine est absente, la cellule active TP53 et l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, l'inhibition presque complète de USP7 mène (1) à la déstabilisation de MDM2 et à la stabilisation de TP53; (2) à l'accumulation nucléaire de PTEN; (3) à l'augmentation de FOXO4; (4) à la perte de la répression de CDKN2A; (5) à la dégradation de la CLSPN, menant à l'inactivation de CHEK1 et à l'entrée en mitose malgré les dommages à l'ADN; (7) à la déstabilisation de CHFR et potentiellement à la stabilisation de HDAC1, ce qui mène à l'augmentation de certaines protéines telles que CDKN1A [96].

De manière intéressante, la surexpression de USP7 mène à un phénotype de mort cellulaire et d'arrêt du cycle cellulaire, lui donnant également un rôle de protéine suppresseur de tumeur. Étant donné la grande quantité de protéines USP7, elles réussissent à stabiliser non seulement MDM2, mais également TP53. Par contre, lorsque USP7 est partiellement inactivée, par la perte d'un allèle ou par un acide ribonucléique (ARN) interférent peu efficace, TP53 sera alors déstabilisée, et ce contexte favorisera la prolifération cellulaire [131].

Pour ces raisons, un inhibiteur puissant de USP7 peut être une approche thérapeutique intéressante dans les cancers. En effet, le rôle de USP7 dans la biologie de TP53, dans la régulation de plusieurs facteurs de transcription, dans la réponse aux dommages à l'ADN et son rôle potentiel dans les voies de l'inflammation, font de cette protéine une bonne cible thérapeutique [125, 132-134]. Par contre, la présence de redondance dans les fonctions des différentes E3 peut mener à une résistance intrinsèque, puisque d'autres enzymes pourront prendre le relais, limitant ainsi leur potentiel thérapeutique [8].

De petites molécules inhibant cette DUB, par exemple HBX 41,108 et la série P5091 résultent en la dégradation rapide de MDM2 et l'activation de TP53 et de CDKN1A. De manière intéressante, le HBX 41,108, permet une inhibition sélective et réversible de USP7 en liant son site actif [133-135]. Des études pré-cliniques avec le P5091 ont montré qu'il permet d'induire l'apoptose et de contrer la résistance au bortezomib dans les cellules de myélome multiple. Finalement, dans les modèles de souris, ce médicament était bien toléré [136]. Une autre molécule, le HBX19818, inhibe de manière irréversible USP7 suite à la formation d'un lien avec le site catalytique de l'enzyme, permettant une diminution quasiment complète de son activité, affectant la viabilité cellulaire peu importe le statut de TP53 [8, 132].

MDM2 est l'Ub ligase de TP53

MDM2 (aussi nommée HDM2) est une Ub ligase de 491 aa. Cette protéine est composée de quatre domaines. En N-term, il y a le domaine de liaison de TP53, sa principale cible. Une région acide et le domaine en doigt de zinc se retrouvent au centre de la protéine permettant les interactions avec plusieurs protéines ribosomales. Finalement, le domaine fonctionnel, nommé « RING finger », se retrouve en C-term. Le modèle murin *Mdm2*^{-/-} n'est pas viable à cause de la présence d'apoptose inappropriée durant l'embryogenèse. Il est à noter que dans les souris *Mdm2*^{-/-} et *Tp53*^{-/-} le phénotype sera complètement restauré. TP53 est donc reconnue comme sa cible la plus importante [47, 137].

MDM2 inhibe l'action de TP53 par trois mécanismes principaux : (1) MDM2 inhibe la transcription de *TP53*, (2) MDM2 ubiquitine TP53 et l'envoie ainsi vers la dégradation protéinique, et (3) MDM2 facilite l'exportation nucléaire de TP53 à l'aide de sa séquence SEN (signal d'exclusion nucléaire) [138]. L'homologue de MDM2, MDM4, est reconnu pour stabiliser MDM2 et TP53, mais ne peut ubiquitiner TP53. De manière intéressante, il a été proposé que MDM4 collabore avec MDM2 afin que cette dernière

protéine sélectionne TP53 comme cible plutôt que d'autres dont RB1 [60, 137]. MDM4 pourrait également stabiliser TP53 cytoplasmique [107].

De manière intéressante, MDM2 possède 37 isoformes identifiées qui varient grandement d'un contexte cellulaire à un autre [139]. Dans les situations de stress, l'expression de *MDM2* est régulée par un deuxième promoteur, le promoteur P2, situé dans le premier intron du gène [137]. L'expression de *MDM2* est alors contrôlée par TP53 menant à l'expression de la protéine 90 kDa. Il est à noter que son expression basale est contrôlée principalement par le promoteur P1 en amont du gène [47, 111]. De plus, plusieurs transcrits alternatifs existent. Les rôles de ces différentes protéines sont mal compris et peuvent grandement influencer les effets de MDM2. Par exemple, les deux versions de la protéine de 75 kDa sont tronquées en N-term et ne semblent pas être influencées par le gène TSG101 (« tumor susceptibility gene 101 »). Ce dernier, influence normalement la boucle de rétroaction entre MDM2 et TP53, en inhibant la dégradation de MDM2 [140].

Plusieurs études montrent que MDM2 interagit avec d'autres cibles que TP53. Par exemple, MDM2 peut inhiber RB1, une protéine suppresseur de tumeur [111, 141]. Afin de permettre l'entrée dans le cycle cellulaire, RB1 doit être dégradée par le système du protéasome grâce au signal de MDM2 [60]. De plus, MDM2 peut bloquer la croissance régénérative suite à une blessure tissulaire, et cela de manière indépendante de TP53. MDM2 agit également comme co-facteur de transcription pour NFκB aux promoteurs de cytokines, pouvant expliquer son rôle anti-inflammatoire. Cependant, MDM2 bloque cette voie dans les cellules ayant une activité constitutive de NFκB et augmente alors l'apoptose [141].

MDM2 joue également un rôle important dans les CSH. En l'absence de MDM2 dans les CSH, TP53 est stabilisée et contribue à l'augmentation des ROS, menant à la mort cellulaire et à la perte du réservoir de CS et des progéniteurs hématopoïétiques. Les traitements visant l'interaction MDM2-TP53 pourraient donc mener à l'extinction des CSH. Il faut donc en tenir compte lors de la planification du traitement. Dans le cas des

LMA où une greffe de CSH est possible, ceci peut être un avantage thérapeutique puisque cette approche ciblerait les CSL [142].

***MDM2* est un oncogène, mais en présence de *TP53* muté, il devient un TSG**

Plusieurs facteurs indiquent que *MDM2* joue le rôle d'un oncogène, mais d'autres propriétés suggèrent plutôt qu'il est un TSG, selon le statut de *TP53*. D'une part, *MDM2* inactive la forme WT de *TP53*, ce qui contribue à sa fonction oncogénique. En effet, dans certains types de cancers où *TP53* n'est pas muté, la surexpression de *MDM2* peut être un mécanisme important, mais non suffisant, dans la transformation néoplasique [47]. Par exemple, la surexpression de *MDM2* a été observée dans près de 53% des LMA, et elle a été associée dans différents cancers à un mauvais pronostic [97].

MDM2 possède également des fonctions indépendantes de *TP53* qui peuvent aussi soutenir son rôle d'oncogène. En effet, des expériences ont montré que l'expression ectopique de *MDM2* mène au développement tumoral, même en l'absence de *TP53*. Cela peut être expliqué par le fait que *MDM2* contrôle certains joueurs clés dans le cycle cellulaire (RB1 et le facteur de transcription E2F1 (« E2F transcription factor 1 »)), dans l'apoptose (TP73), dans l'invasion et dans le développement de métastases (E-cadherine). *MDM2* est donc une bonne cible thérapeutique [47, 137, 141]. Les points négatifs de cette approche thérapeutique sont les effets anti-prolifératifs et anti-inflammatoires pouvant affecter la guérison tissulaire [141].

D'autre part, dans les cas où *TP53* est muté, *MDM2* joue un rôle de suppresseur de tumeur. De plus, il a été démontré que *MDM2* exerce une certaine suppression du cycle cellulaire indépendamment de *TP53*. Il est possible que ses interactions avec d'autres partenaires tels que *CDKN1A* puissent expliquer ce phénomène. Il a également été proposé que *MDM2* augmente l'exportation nucléaire de *TP53* et favorise ainsi l'induction de l'apoptose, soutenant ce rôle de TSG [47].

CDKN1A est une cible importante de TP53

Le gène *CDKN1A* code pour une protéine de 165 aa, CDKN1A, également nommée WAF1/Cip1 ou p21. CDKN1A a d'abord été identifiée comme l'une des cibles principales de TP53 et permet l'arrêt du cycle cellulaire. Il fait partie de la famille des inhibiteurs de cyclines kinases CDK2 et CDK1(CDC2). De plus, il peut lier PCNA et E2F1, ce qui bloque respectivement la réplication de l'ADN et la transcription de gènes favorisant la croissance cellulaire [143-146].

Cet inhibiteur du cycle cellulaire est induit par une variété de facteurs de transcription dont les STAT (« signal transducer and activator of transcription »), E2F, CEBPA et CEBPB, MEOX2 (« mesenchyme homeobox 2 », précédemment nommée GAX) et TP53. D'autres suppresseurs de tumeur tels que BRCA1, TGF- β et WNT1 induisent sa transcription [143, 145]. Plusieurs autres facteurs influencent la traduction, la stabilité et la localisation de la protéine. Par exemple, la famille des microRNA miR-106b régule l'expression de CDKN1A et favorise la progression du cycle cellulaire [147]. Comme cette protéine possède un court temps de demi-vie, le contrôle de sa dégradation est important. En fait, la stabilisation de la protéine semble essentielle pour l'augmentation de cette protéine, peu importe le statut de transcription. Par exemple, les protéines du stress (HSP90 : « heat shock protein » 90) protègent CDKN1A de la dégradation, tandis que MDM2 favorise sa dégradation [145].

Initialement, *CDKN1A* a été catégorisé comme un TSG, en raison des résultats des études effectuées chez la souris. En effet, la présence de tumeurs spontanées chez les souris *Cdkn1a*^{-/-} appuie cette hypothèse. Par exemple, lorsque ces souris sont croisées avec celles exprimant un oncogène, tel que la protéine de fusion RUNX1-RUNX1T1 qui seule n'induit pas de leucémie, l'inactivation de CDKN1A entraînera l'induction d'une leucémie [143]. D'autres études appuient un rôle de suppresseur de tumeur pour CDKN1A. D'abord, son induction semble être une étape clé du succès de la chimiothérapie et elle peut aussi induire l'apoptose de manière indépendante de TP53 lors de l'utilisation de différents agents thérapeutiques. Par exemple, lorsqu'un inhibiteur du protéasome, le Bortezomib, est utilisé dans des LMA en l'absence de

TP53 fonctionnel, il y a induction de l'apoptose grâce entre autres, à l'accumulation de CDKN1A. Cette induction de l'apoptose semble être reliée à l'inhibition de MYB (« v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog ») qui ne peut plus activer BCL2, et l'inhibition de la cristallin α B (CRYAB), menant à l'activation de la caspase 3 (CASP3, « apoptosis-related cysteine peptidase ») [143].

Ensuite, CDKN1A possède aussi un rôle de suppresseur de tumeur par son contrôle sur l'expression de plusieurs gènes, entravant la progression du cycle cellulaire et/ou activant l'apoptose. En effet, CDKN1A influence l'activité des gènes de la famille E2F par la voie classique de l'inhibition des CDK et par le maintien de RB1 dans son état hypophosphorylée [143]. CDKN1A régule aussi la transcription induite par MYC et la transcription du facteur STAT3, expliquant l'association entre la fraction nucléaire de CDKN1A et l'arrêt de croissance [144, 145].

Finalement, dans un contexte où il y a instabilité génomique, CDKN1A semble aussi avoir un rôle anti-oncogénique. D'une part, la perte de *CDKN1A* coopère avec la perte d'*ATM* et favorise ainsi une aneuploïdie menant au développement du cancer. D'autre part, la diminution de l'expression de CDKN1A a été inversement corrélée avec l'apparition de microsatellites (marque d'instabilité chromosomique) dans les cellules de cancer du colon, et ce, indépendamment du statut de *TP53*. Il est à noter que CDKN1A joue un rôle semblable de protection de la stabilité génomique dans les CS [144, 145]. Le maintien du potentiel de repopulation des CS passe par la restriction de l'auto-renouvellement et CDKN1A est aussi important dans ce phénomène. Ceci a été étudié dans les CSH [144].

Il a aussi été suggéré que l'expression de *CDKN1A* inhibe le cycle cellulaire dans les cellules progénitrices, contrairement aux cellules différenciées, ce qui concorderait avec les deux rôles opposés de ce gène, soit celui de TSG et d'oncogène [144]. Cependant, CDKN1A semble également essentiel au maintien d'une réserve de CSC (rôle oncogénique), par exemple dans les leucémies exprimant la chimère oncogénique *Pml-rara* [144]. D'autres résultats suggèrent aussi que ce gène puisse être un

oncogène. Premièrement, les mutations de *CDKN1A* dans les cancers sont rares [144]. Il est possible que ceci soit relié au fait que la perte de la fonction de ce gène par mutation mènerait à une réponse au stress induisant la mort cellulaire [145].

Deuxièmement, *CDKN1A* est surexprimé dans différents types de cancers humains, tels que ceux de la prostate et du sein, et ceci est corrélé avec un stade avancé et un pronostic moins favorable de la maladie. Dans plusieurs de ces cas, la localisation de *CDKN1A* était principalement cytoplasmique, plutôt que nucléaire [144].

Troisièmement, les croisements entre des souris *Tp53* *-/-* ou *Atm* *-/-* avec des souris *Cdkn1a* *-/-* ont montré que l'absence de *Cdkn1a* supprime le développement de tumeurs lymphomateuses spontanées et induites par les radiations, et cela en raison de la perte de l'effet anti-apoptotique de *Cdkn1a*, soutenant également son rôle oncogénique [144].

Quatrièmement, *CDKN1A* peut aussi interagir avec plusieurs protéines de la voie de l'apoptose afin de les bloquer. D'abord, *CDKN1A* peut contrôler la localisation et l'abondance de TP53 fonctionnelle. De plus, elle peut lier la procaspase 3 et empêcher son activation. Elle peut aussi lier SAPK (« stress-activated protein kinase ») et ASK1 (« apoptosis signal-regulating kinase 1 ») deux protéines régulatrices de l'apoptose [49, 146].

Finalement, il a également été observé que *CDKN1A* permet la rétention nucléaire de la cycline D1, ce qui la protège de sa dégradation. *CDKN1A* facilite alors l'assemblage entre cette cycline et les CDK sans inhiber leur activité kinase, ce qui libère CDK2 et permet à la cellule d'outrepasser l'arrêt en G1/S.

CDKN1A, une cible thérapeutique potentielle

Étant donné son implication dans la résistance aux traitements et dans l'oncogénèse, il est donc devenu logique de vouloir cibler *CDKN1A*. De manière intéressante,

CDKN1A semble essentielle à la persistance de la faible population de CSH, et potentiellement de CSC, tel que mentionné auparavant. En effet, la restriction de prolifération est essentielle pour la conservation du potentiel des CS à long terme, tant pour les cellules saines que cancéreuses. C'est pourquoi CDKN1A ne jouerait pas un grand rôle dans l'initiation tumorale, mais serait plutôt impliquée dans le maintien de la tumeur [144].

Dans un contexte où *CDKN1A* est un TSG, il est possible d'envisager de mimer son action ou de le réactiver et ainsi induire la différenciation cellulaire, la sénescence et/ou la mort cellulaire [144]. L'idéal serait de pouvoir inhiber les effets oncogéniques de CDKN1A sans bloquer ses effets suppresseurs de tumeur. Une meilleure compréhension de l'effet du contexte cellulaire sur le choix entre ces deux fonctions est importante afin de prédire l'effet d'un traitement ciblant CDKN1A. De plus, une sélection des patients devra être effectuée à l'aide de biomarqueurs, afin de choisir le type d'approche (anti- ou pro-CDKN1A) la mieux adaptée à ce patient [143].

Hypothèse et objectifs de ce projet

La LMA demeure, à ce jour, un type de néoplasie avec un pronostic très défavorable. En effet, la majorité des patients décéderont suite à une rechute, à une résistance aux traitements ou suite à des complications liées à la thérapie [52]. Dans le but d'améliorer le pronostic de ces patients, plusieurs études tant fondamentales que cliniques sont en cours [81, 83, 122, 148].

Tel que discuté dans l'introduction, l'analyse des anomalies génétiques est essentielle afin d'établir le diagnostic et le pronostic des LMA [62]. La caractérisation des translocations chromosomiques a mené à l'identification de plusieurs gènes impliqués dans l'hématopoïèse normale et leucémique, en plus d'avoir permis le développement de thérapies ciblées, telles que l'Imatinib mesylate (Gleevec) dans les leucémies avec la translocation $t(9;22)(q34;q11.2)$ [43]. De plus en plus de données convergent vers un rôle important, mais encore mal élucidé, de la famille des USP dans la

cancérogénèse en général [15, 57, 61]. De manière intéressante, cette famille de gènes a été impliquée pour la première fois dans les cancers hématologiques, dans un cas de LMA présentant une translocation chromosomique t(7;21)(p22;q22). Cette translocation implique *USP42* (bande chromosomique 7p22) comme partenaire de *RUNX1* (bande chromosomique 21q22), un gène crucial pour l'hématopoïèse normale et la génération des CSH dans l'embryon [149, 150]. Cette translocation a ensuite été détectée dans un cas de LMA adulte caractérisé sur le plan moléculaire dans notre laboratoire. Nous avons démontré dans cette étude, que l'expression de *USP42* est dérégulée suite à la t(7;21) [151]. D'autres cas présentant la t(7;21) ont aussi été décrits [152-154] soulignant la récurrence de cette anomalie génétique dans les leucémies. De plus, une translocation chromosomique impliquant *RUNX1* et une autre USP, soit *USP16*, a également été rapportée dans des cas de leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) [155].

Le fait que des membres de la famille des USP soient réarrangés dans les leucémies myéloïdes nous permet d'émettre l'hypothèse que cette famille de gènes peut avoir un rôle dans la LMA, menant au premier objectif spécifique de ce projet.

1-Évaluer le rôle potentiel des membres sélectionnés de la famille des USP dans les LMA

- I. Étude de l'expression génique de différentes USP dans des cellules primaires et des lignées cellulaires de LMA**
- II. Étude de l'impact d'une dérégulation des gènes testés sur la survie globale des patients avec LMA**

Nous avons sélectionné 21 USP ayant une implication potentielle dans divers cancers ou dans une fonction liée à la cancérogénèse. Par exemple, les USP suivantes ont été étudiées : *USP7* qui est impliquée dans la régulation de TP53 et MDM2; *USP1* qui régule la réparation de l'ADN; *USP28* qui stabilise MYC en plus de participer aux

signaux de dommages à l'ADN et à l'activation de l'apoptose TP53-dépendante, et USP44 qui régule négativement le APC/C [57]. Ensuite, nous avons étudié leur expression génique par RT-qPCR dans trois lignées cellulaires soit OCI-AML3, HL-60 et Kasumi-1 et dans plus de 100 échantillons de LMA de morphologie et de génétique différentes. La corrélation entre l'expression des USP dérégulées dans les LMA étudiées et les caractéristiques morphologiques, cytogénétiques et la survie a été évaluée par des analyses statistiques.

Les cancers possédant une altération de TP53 sont caractérisés par une résistance à la thérapie et ceci inclut les LMA [82, 156, 157]. Tel que discuté dans l'introduction, la possibilité de cibler les différents niveaux de la voie protéique USP7-MDM2-TP53-CDKN1A est un ensemble d'options thérapeutiques intéressantes en cancérologie [61, 97, 110, 144, 148, 158]. Cependant, une meilleure compréhension de cet axe demeure nécessaire. En effet, les perturbations de cette voie sont multiples et mal élucidées, particulièrement dans les cas où TP53 n'est pas mutée [81]. Contrairement aux tumeurs solides où plus de 50% des cas possèdent une mutation du gène *TP53*, ce gène n'est pas muté dans la majorité des LMA; son inactivation se produit alors soit en aval de la voie ou au niveau protéique [82]. Les gènes contrôlant TP53 au niveau protéique (dont USP7 et MDM2), ainsi que les gènes en aval sont donc intéressants à étudier dans les LMA. C'est pourquoi nous avons investigué l'expression génique des membres de l'axe USP7-MDM2 -TP53-CDKN1A dans près de 100 échantillons primaires de LMA menant au deuxième objectif spécifique de ce projet.

2-Évaluer l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* dans la LMA

- I. Étude de la dérégulation de l'expression génique de ces gènes dans des LMA sélectionnées**
- II. Étude de l'impact d'une dérégulation des gènes de l'axe sur la survie globale des patients avec LMA**
- III. Étude de l'expression protéique des gènes de cet axe dans les lignées cellulaires de LMA**

Finally, *CDKN1A*, an important target of TP53, has already been associated with resistance to anti-cancer treatments in solid tumors [159, 160] and hematological cancers [161]. Given the presence of a variability of *CDKN1A* expression in the LMA tested, we wanted to study if its basal expression influenced *in vitro* the response to anthracyclines and/or to an axis modulator, either a TP53 stabilizer, the nutlin 3.

- IV. Mise en place d'un système *in vitro* de traitement des cellules à la doxorubicine et/ou au nutlin 3 évaluant la réponse au traitement selon le statut initial d'expression de *CDKN1A***
 - a) Mise au point et validation de la technique sur des lignées cellulaires de LMA**
 - b) Obtention de résultats préliminaires avec un échantillon primaire de LMA.**

Matériel et méthodes

Culture de lignées cellulaires et d'échantillons primaires de leucémie myéloïde aiguë

Lignées cellulaires

Les lignées de cellules leucémiques ont été mises en culture dans le milieu RPMI 1640 complet avec 10 à 20% de sérum de veau fœtal inactivé, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules adhérentes de la lignée MCF-7 ont été cultivées selon les instructions fournies par ATCC® (« American Type Culture Collection », Manassas, VA, États-Unis). Pour la liste des lignées cellulaires utilisées dans ce mémoire, veuillez vous référer au tableau IV. Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂. Les lignées cellulaires ont été mises en culture pour une durée variant entre une semaine et deux mois avant leur utilisation pour les expériences. Le milieu de culture a été changé à chaque 48-72 heures. Aucun changement de milieu spécifique n'a été effectué pour les expériences avec les molécules chimiques.

Échantillons primaires de leucémie myéloïde aiguë

Les échantillons de patients leucémiques ont été collectés et analysés par la Banque de cellules leucémiques du Québec (BCLQ) suivant un protocole accepté par les différents comités d'éthique, suite à un consentement libre et éclairé du patient. Les cellules ont été décongelées par une procédure standard. En bref, le vial de cellules est mélangé à 10 mL d'une solution de décongélation (milieu ISCOVE avec 20% de sérum fœtal inactivé), puis le culot cellulaire est lavé avec du milieu RPMI complet. Les cellules sont ensuite mises en culture en suspension suivant les mêmes conditions que les lignées cellulaires, cependant à des concentrations de 0,5 à 1 M/mL. Les cellules ont été conservées en culture pour 24 heures avant les expériences. Les caractéristiques morphologiques et cytogénétiques des spécimens leucémiques utilisés pour ce travail sont détaillées dans le tableau V en annexe B.

Tableau IV. Description des lignées cellulaires utilisées pour ce travail

Nom de la lignée cellulaire	Provenance	Dilution en culture	Description	Particularité
OCI-AML3	DSMZ, no ACC 582	0,5 à 2,5 M/mL	LMA avec <i>NPM1</i> muté	<i>TP53</i> WT
HL-60	ATCC [®] , cat# CCL-240 [™]	0,1 à 1 M/mL	LMA M3 avec la t(15;17)	délétion <i>TP53</i>
Kasumi-1	ATCC [®] , cat# CRL-2724 [™]	0,3 à 3 M/mL	LMA avec la t(8;21)	<i>TP53</i> WT
KG-1	ATCC [®] , cat# CCL-246	0,2 à 1 M/mL	LMA presque diploïde avec monosomies 5, 7, 8, 12 and 17	
K-562	ATCC [®] , cat# CCL-243 [™]	0,5 à 2 M/mL	LMC en phase blastique avec la t(9;22)	
KU-812	ATCC [®] , cat# CRL-2099 [™]	0,3 à 3 M/mL	LMC en phase blastique avec la t(9;22)	
REH	DSMZ, no ACC 22	1 M/mL	LLA B avec la t(12;21)	
KOPN8	DSMZ, no ACC 552	1,5 à 3,5 M/mL	LLA B avec la t(11;19)(q23;p13)	
MCF-7	Extrait protéique obtenu du laboratoire de El Bachir Affar ¹		cellules tumorales mammaires	Contrôle d'expression protéique de CDKN1A
MCF-7	ATCC [®] , cat# HTB-22		cellules tumorales mammaires	Utilisé pour l'extraction protéique en fractions

¹ Laboratoire du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (HMR)

DSMZ: "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH", Allemagne); ATCC[®]; LMA: leucémie myéloïde aiguë; *NPM1*: "nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)"; LLA: leucémie lymphoïde aiguë; LMC: leucémie myéloïde chronique; WT: "wild type".

Analyse de l'expression de différents gènes de la famille des USP et des gènes de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A par RT-qPCR

Étape 1 : Extraction de l'ARN et synthèse du « cADN »

L'ARN des différents échantillons a été extrait en utilisant une solution de TRIzol suivant les recommandations du fournisseur (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada; Cat #. 15596-026). Les cellules ont d'abord été isolées par centrifugation, puis lysées dans le TRIzol. Les phases ont été séparées en ajoutant 200 µL de chloroforme par 1 mL de TRIzol. Après avoir agité vigoureusement 15 secondes et les avoir laissés à la température pièce (TP) pour 10 min, les échantillons ont été centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C afin de séparer les phases. La phase supérieure aqueuse contenant l'ARN a été prélevée, puis l'ARN a été précipité avec 500 µL d'isopropanol. Après 10 minutes d'incubation à la TP, l'ARN a été sédimenté par centrifugation à

12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN a été lavé avec 1 mL d'éthanol 75%, puis centrifugé à nouveau à 7500 g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots ont été séchés pendant 10 à 20 min, puis solubilisés dans 50 µL d'eau DEPC par incubation à 60°C pour 15 minutes. Ces extraits ont été rapidement congelés sur glace sèche, puis conservés à -80°C. Il est à noter que l'extraction de l'ARN a été effectuée en collaboration avec Amélie Giguère, étudiante au doctorat dans le laboratoire de la BCLQ.

L'ARN a été quantifié à la plateforme de génomique de l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada) en utilisant le bioanalyseur Agilent Bioanalyzer 2100 et la trousse Agilent « RNA 6000 Nano Kit » utilisant des puces microfluidiques calculant la concentration de l'échantillon (entre 20 à 500ng/µL) et le RIN (« RNA integrity number »). Nous avons ensuite préparé les ADN complémentaires (cADN) à l'aide d'une trousse utilisant des amorces aléatoires et une reverse transcriptase en suivant le protocole du fournisseur (« High Capacity cDNA Reverse Transcription » de Applied Biosystems® (ABI), Life Technologies Inc.). Nous avons utilisé 2 µg d'ARN pour une réaction de 20 µL pour chaque échantillon dans un thermocycleur effectuant une première étape de 10 minutes à 25°C, puis une phase d'élongation de 2 heures à 37°C, puis une dernière phase de 5 minutes à 85°C.

Étape 2 : Quantification de l'expression génique

Pour la quantification des gènes cibles, nous avons établi une collaboration avec la plateforme de génomique de l'IRIC. Les expériences ont été effectuées en utilisant d'abord l'appareil « Light cycler 480 » de Roche (Mississauga, ON, Canada) avec la solution pour les réactions et les amorces « Mix Probe Master Mix » de Roche. Ensuite nous avons utilisé l'appareil « Fast/Prism 7900HT » d'ABI ainsi que la solution de réaction « Taqman fast universal PCR master mix » de la même compagnie.

Il est à noter que tous les couples d'amorces ont été précédemment validés en effectuant une courbe standard par l'équipe de la plateforme génomique de l'IRIC (voir tableau VI en Annexe C). Ces courbes ont permis de calculer une efficacité ($E=10^{(1/-pente)}$) et seulement les amorces dont l'efficacité était supérieure à 90% et près de 100% ont été conservées pour l'étude [162]. Les réactions ont été effectuées dans des plaques de 384 puits. Ces réactions de 10 μ L contenaient : 5 μ L de PCR Master Mix 2X (ABI), 0,05 μ L d'amorces (concentration finale 250 nM), sonde UPL (« universal probe library », de Roche) (concentration finale 100 nM), et 1,5 μ L de cADN. Les réactions ont été initiées par une phase de dénaturation à 95°C pour 10 minutes, puis l'amplification a été effectuée par une série de 40 cycles alternant 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

Analyse des données de l'expression génique par RT-qPCR

L'analyse des résultats de RTq-PCR a été effectuée selon la technique « delta delta cycle threshold » ($\Delta\Delta Ct$). Nous avons utilisé le logiciel SDS 2.2.2 afin de visualiser les courbes d'amplification de chaque gène, de situer le seuil d'élimination du bruit de fond pour chaque gène (seuil minimal, « baseline ») et valider les triplicatas. La quantification a été effectuée par rapport à deux gènes contrôles endogènes, soit *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) et *TBP* (« TATA box protein »), puisque leur expression était stable dans les différents types cellulaires et qu'ils avaient de bonnes courbes d'amplification dans les échantillons normaux et leucémiques testés. Pour les analyses, le gène *TBP* a été sélectionné pour sa constance et son expression similaire à celle des gènes étudiés dans ce travail. Les données ont également été calibrées par rapport à des échantillons contrôles de moelle osseuse de donneurs normaux qui ont été utilisés comme « calibrateurs » (voir Tableau V en annexe pour plus de détails). Bref, pour chaque gène étudié, nous avons utilisé la moyenne d'expression de ce gène (triplicata) dans chaque échantillon de patient comparé à la moyenne d'expression de ce même gène (triplicata de trois échantillons différents chacun en triplicata technique) dans la moelle normale afin de calculer l'expression relative (RQ; « relative quantification »).

Afin de trouver le RQ, d'abord le Ct doit être évalué sur les courbes d'amplification, c'est la valeur à laquelle la courbe PCR croise le seuil minimal (couvrant le bruit de fond). Plus cette valeur est petite, plus le gène est exprimé puisque la réaction devient exponentielle plus rapidement. L'écart entre le Ct du gène d'intérêt et celui du gène contrôle (ΔCt) est comparé à celui d'un échantillon calibrateur afin d'obtenir un $\Delta\Delta Ct$. Ensuite une valeur de RQ est obtenue en effectuant le calcul $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Une valeur de RQ=1 signifie que le gène cible est exprimé de manière équivalente dans l'échantillon étudié et les moelles normales (calibrateur). Nous avons considéré qu'une expression génique est significativement plus basse lorsque le RQ est inférieur à 0,5 et significativement plus élevée lorsque le RQ dépasse 5. Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec Amélie Giguère et l'équipe de la plateforme de génomique de l'IRIC.

Méthodes statistiques utilisées pour corrélérer l'expression des gènes avec les caractéristiques morphologiques, génétiques et cliniques des leucémies étudiées

L'expression des gènes d'intérêt a été analysée en relation avec les différents types morphologiques et cytogénétiques de leucémie étudiés. De plus, une analyse par rapport aux mutations *NPM1* et *FLT3-ITD* a été effectuée dans le groupe de LMA avec un caryotype normal. Une analyse quantitative des moyennes a été effectuée à l'aide du logiciel Graph PRISM 6, en calculant les moyennes des sous-groupes et en validant si elles étaient équivalentes ou distinctes selon des comparaisons multiples d'un test ANOVA (analyse de la variance) simple avec un intervalle de confiance fixé à 95%. Lorsque le $p < 0,05$, une différence significative est observée entre les groupes. Par contre, pour les gènes, tels que *CDKN1A* et *USP44*, où il y a présence de surexpression et de sous-expression, l'analyse des moyennes perd son sens. Une analyse qualitative de la distribution dans les différents intervalles d'expression (RQ < 0,5; RQ = [0,5-5,0] et RQ > 5), a été effectuée afin de qualifier si les sous-groupes étaient distincts ou non. C'est pourquoi un test du Chi^2 a été effectué.

Nous avons ensuite extrait de la base de données cliniques de la BCLQ, les temps de survie des patients avec une LMA *de novo* ayant eu un traitement anti-leucémique standard. Nous avons donc exclu les patients en rechute, ceux ayant une LMA secondaire suite à un syndrome myélodysplasique ou une néoplasie myéloproliférative et les leucémies reliées à une chimiothérapie ou une radiothérapie antérieure qui ont d'emblée un pronostic défavorable. Un total de 89 patients avec LMA *de novo* a été inclus dans notre analyse. À l'aide de ces données, nous avons établi des courbes de survie Kaplan-Meier. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad PRISM 6, afin de déterminer, par le test Log-Rank, si le groupe de LMA avec une modification d'expression d'un certain gène était accompagné d'une survie différente par rapport au groupe où l'expression de ce gène reste comparable à celle du calibrateur. Il est à noter qu'aucune analyse multifactorielle de type Cox Ph n'a été effectuée.

Élaboration d'un système de traitement *in vitro* des cellules leucémiques pour évaluer l'expression protéique des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A et analyser l'impact de leur variation d'expression sur les traitements à la doxorubicine et/ou à la nutlin 3

Traitements *in vitro*

Afin d'élaborer ce modèle expérimental, des lignées cellulaires ont d'abord été utilisées. Les doses et les dilutions cellulaires ainsi que la procédure ont été optimisées selon les méthodes décrites par l'équipe de M. Andreeff (Carter *et al.* [124] et Kojima *et al.* [112, 163]). Des cellules en croissance exponentielle ont été utilisées à une concentration de $0,7 \times 10^6$ cellules/mL pour les expériences de traitement avec l'inhibiteur de MDM2, le nutlin 3 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada; produit no. N6287), qui a été testé à une concentration de 0 à 60 μ M et/ou avec la doxorubicine, une anthracycline (Sigma-Aldrich; produit no. D1515) à une concentration de 0 à 250 nM, pour 24 et 48 heures. Après un décompte cellulaire, les cellules ont été distribuées dans chaque puit d'une plaque de 6 puits, de manière à obtenir un volume

total de 8 mL. Cette quantité servait à (1) conserver une partie des cellules en TRIzol pour une éventuelle extraction d'ARN ou ADN (2 M de cellules), (2) extraire les protéines (3 M de cellules), (3) faire un décompte de la viabilité cellulaire par exclusion au bleu de trypan (moins de 0,1 M de cellules) et (4) quantifier la survie cellulaire par cytométrie en flux (FACS, « fluorescence-activated cell sorting ») (0,5 M de cellules). Il est à noter que ces décomptes cellulaires sont ceux du temps zéro sauf pour le FACS où les cellules sont comptées juste avant le marquage. Les cellules ont été ajoutées dans les puits, ainsi qu'un contrôle négatif contenant seulement le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration équivalente à celle la plus élevée utilisée comme diluant dans les échantillons traités. Il est à noter que cette concentration ne dépasse jamais 0,1% v/v. Après 24h, la moitié du volume était récoltée et divisée pour les différentes utilisations nommées précédemment. Les cultures ont été effectuées à 37°C pour une autre période de 24h, puis l'expérience a été répétée à 48 heures.

Quantification de la viabilité cellulaire et de l'apoptose des cellules traitées

Quantification de la viabilité cellulaire

Lors de la récolte, un volume de 10 µL de chaque échantillon de cellules était conservé dans des eppendorfs à 37°C. La viabilité cellulaire a été quantifiée environ 1 heure après le début de la récolte en ajoutant 190 µL de bleu de trypan (Trypan Blue Stain 0,4%, cat# 15250-061, GIBCO) et en analysant les cellules au microscope Axioskop 2 plus (Zeiss), suite à une incubation à la TP de 15 minutes.

Étude de la mort cellulaire par cytométrie en flux

Lors de la récolte, le décompte cellulaire de quelques puits permettait d'évaluer la quantité minimale de volume à prélever dans des eppendorfs dans chaque puits afin d'obtenir au moins 0,5 M de cellules pour l'analyse. L'apoptose a été analysée en utilisant la méthode de marquage des phosphatidylsérines sur la membrane externe (marqueur précoce de l'apoptose) à l'annexine V et à l'iodure de propidium (PI)

(marqueur de l'intégrité de l'ADN) à l'aide de la trousse d'Invitrogen™ (Life Technologies Inc.; cat. no : V13242). D'abord, les cellules ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 4 minutes à 4°C, puis lavées dans 0,7 mL de tampon phosphate salin (PBS : « phosphate-buffered saline »; NaCl (chlorure de sodium) 0,137 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) froid. Les cellules ont été conservées sur glace, le temps de diluer le tampon d'incubation de l'Annexine V/PI (à partir du tampon 5X fourni dans la trousse). Le mélange servant au marquage a été préparé pour toutes les réactions nécessaires en respectant les proportions de 2 µL d'Annexine, 1 µL de PI (100 µg/ml) et 2 µL de tampon par réaction. Les cellules ont alors été centrifugées tel qu'indiqué précédemment, puis suspendues à nouveau dans 100 µL de tampon 1X. Le mélange a ensuite été réparti dans chaque tube (5 µL par réaction). Finalement, les cellules ont été analysées au FACS. Le spectre d'excitation est de 488 nm. Le filtre 515 nm a été utilisé pour la fluorescéine et celui de >580 nm a été utilisé pour la détection du PI. L'appareil utilisé pour la cytométrie en flux était le BD FACSCan™ de BD Biosciences possédant 1 laser et 3 couleurs.

Étude de l'expression protéique des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A par Western Blot

Récolte pour extraction protéique et congélation

Lors de la récolte, 3 M de cellules ont été prélevées pour l'extraction protéique dans des tubes de 15 mL et centrifugées à 1000 rpm pour 8 minutes. Le culot cellulaire a été lavé dans 5 ml de PBS 1X froid afin d'en retirer le maximum de protéines du RPMI complet pouvant nuire aux analyses. Les cellules étaient resuspendues dans 1 ml de PBS 1X et transférées dans des eppendorfs de 1,5 mL. Ces cellules ont été gardées sur glace jusqu'à l'extraction (si effectuée dans l'heure suivante) ou congelées sous forme de culot sec. Les culots secs sont obtenus suite à une centrifugation à 3000 rpm pendant 4 minutes à 4°C. Tout le volume liquide est retiré et les culots cellulaires sont rapidement mis sur glace sèche avant d'être transférés à -80°C.

Extraction protéique

Extraction des protéines totales

Les cellules ont d'abord été lavées en utilisant du PBS contenant du Tween-20 (un détergent, concentration finale 0,1% v/v) sur glace, puis lysées dans un tampon de lyse sur glace : Tris (trishydroxyméthylaminométhane) base 1 M pH 7,3, EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) 500 mM, NP-40 10 %, KCL 3 M, avec cocktail inhibiteur de α -protéase 1X (Sigma-Aldrich; cat. no P2714), PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 0,1 mM (Sigma-Aldrich; cat. no P7626), DTT (dithiothréitol) 0,1 mM (produit fourni par le laboratoire de El Bachir Affar, Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (HMR)). Pour les échantillons trop visqueux, une sonication de 6 secondes à une force de 2,5 a été effectuée.

Les protéines totales ont été quantifiées en utilisant la méthode de Bradford (BioRad, Hercules, CA, États-Unis; Cat. no B6916). La densité optique (DO) à 620 nm a été évaluée dans des plaques de 96 puits sur le lecteur de microplaques ELX808 (BioTek, Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) en comparaison à une courbe standard de BSA (« Bovine Serum Albumin », albumine de sérum bovin).

Une solution de tampon de chargement a été ajoutée à chaque échantillon afin que les concentrations finales soient de 50 μ g/mL de β -mercaptoéthanol, 50 mM de Tris, 10% v/v de Glycérol et 2% v/v de sodium dodécyl sulfate (SDS).

Extraction en fraction nucléaire et cytoplasmique des protéines

À la différence de l'extraction protéique totale, cette technique vise d'abord à séparer les fractions nucléaires et cytoplasmiques. Le culot sec ou frais était resuspendu et mélangé doucement dans 1 mL de solution de lyse de la membrane cytoplasmique : Hepes (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic) pH=7,9, 10 mM; KCl (chlorure de potassium) 10 mM; EDTA pH=7,5-8, 0,1 mM; EGTA (acide éthylène glycol tétraacétique) pH=7,5-8, 0,1 mM contenant également des inhibiteurs α -protéases 1X, PMSF 0,1 mM et DTT 0,1 mM. Les échantillons étaient laissés sur

glace 15 minutes avant d'ajouter 62,5 µl de NP-40 10% v/v. Ensuite, une agitation vigoureuse au vortex de 10 secondes suivie d'une centrifugation de 1 minute à 14000 rpm à 4°C permettait de séparer la fraction cytoplasmique du culot de noyaux. La fraction de 800 µL supérieure a été conservée et celle de 200 µL près du culot a été jetée. Le tampon de chargement était ajouté tel que dans la procédure d'extraction totale. Les noyaux étaient ensuite lavés dans 500 µL de PBS 1X, puis lysés dans un deuxième tampon de lyse attaquant la membrane nucléaire : HEPES (« 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ») 20 mM, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM. Cet extrait était soniqué 10 secondes à force 5, puis laissé à 4°C durant 15 minutes. Ensuite, une centrifugation de 5 minutes à 14000 rpm à 4°C était effectuée afin de séparer la solution de protéines du culot membranaire. La même solution de tampon de chargement y était ajoutée.

Western blot et immunomarquage

Séparation des protéines

Enfin, 30 µg de protéines totales ou 30 µg de protéines cytoplasmiques et 10 µg de protéines nucléaires ont été migrées dans un gel de SDS-Polyacrylamide (SDS-PAGE) à 200 V pendant environ 40 min, puis transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) 0,22 µm à 4°C avec une force de 0,4 A pour 3 heures 30 minutes ou 23 V pour 18 heures. Au départ, des membranes de nitrocellulose 0,45 µm étaient utilisées dans le but de pouvoir valider la qualité et la quantité des bandes de protéines en effectuant une coloration au ponceau. Cependant, ce type de membrane laissait passer les protéines de plus petit poids moléculaire dont CDKN1A et ne permettait pas les marquages successifs après une étape, nommée le « stripping », visant à enlever les Ac.

Traitements des membranes de PVDF

Immunomarquage

Les membranes ont été bloquées au moins 1 heure avec une solution de lait (PBS-MT, « milk tween », solution PBS 1X avec ajout de 0,1% tween et 5% *m/v* de poudre de lait écrémé), puis incubées avec différents Ac primaires dilués dans du PBS-T contenant 1% *m/v* de BSA (voir tableau II pour les informations sur les Ac utilisés). Il est à noter que toutes les étapes de lavage sont de 7 minutes chacune et ont été effectuées avec agitation douce. Tout d'abord, pour laver l'Ac primaire, deux premières étapes de lavage avec du PBS-MT et quatre autres avec du PBS-T ont été effectuées. L'un des Ac secondaires liés à l'enzyme HRP (« Horseradish Peroxidase ») a été incubé en présence de solution de PBS-MT durant 1 heure à TP avec agitation douce. Ensuite, d'autres lavages ont été effectués, soit deux au PBS-MT et deux au PBS-T. Un dernier lavage de quelques secondes au PBS a été effectué avant d'ajouter sur la membrane la solution de révélation provenant de la trousse de chemiluminescence Immun-Star™ HRP (BioRad, Montréal, Canada; no. Cat #170-5070). Les solutions « luminol/enhancer » et peroxide d'hydrogène ont été mélangées en ratio 1:1, puis la membrane y a été incubée de 3 à 5 minutes. Finalement, une photo a été prise avec l'appareil FUJI Film Las-3000 (Life Science, Montréal, Canada) en conservant la membrane dans un acétate transparent afin qu'elle garde son humidité. Les temps d'exposition ont été ajustés selon chaque membrane. De plus, une photo dans le spectre visible a été prise afin de visualiser l'échelle de marqueur moléculaire « Precision Plus Protein™ prestain » (BIO RAD, cat. No 161-0376).

« Stripping »

Habituellement, un stripping moyen est utilisé, mais ce dernier est plus puissant et une diminution significative des protéines étudiées a été notée, en particulier, celles de faible poids moléculaire. Le stripping doux, basé sur le protocole d'AbCam, consiste en deux nettoyages de la membrane durant 7 minutes avec agitation vigoureuse dans une solution contenant une concentration finale de glycine de 0,015 % *m/v*, de 0,001 % *m/v* de SDS et 0,01 % *v/v* de Tween 20. Ensuite cette solution de nettoyage a

été éliminée par deux lavages de 10 minutes avec du PBS 1X, puis deux autres lavages de 5 minutes avec du tampon Tris salin (TBS :« tris buffered saline »; 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM NaCl) contenant 0,1%v/v de Tween-20 (TBST). Enfin, la membrane a été remise dans une solution de blocage pour un nouveau marquage éventuel.

Tableau VII. Description des anticorps utilisés pour l'étude d'expression des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A

Protéine ciblée	Origine	Clone	Provenance	Numéro/code	Dilution utilisée	Caractéristiques
PARP	souris	mono.	Santa Cruz Biotechnology ¹	F-2, sc-8007	1/1000	Utilisé comme détecteur de dégradation
Tubuline	souris	mono.	Sigma	DM1A, T6199	1/8000	Utilisé comme contrôle de chargement
TP53	souris	mono.	Santa Cruz Biotechnology	Do-1, sc-126	1/5000	
MDM2	souris	mono.	Santa Cruz Biotechnology	SMP14, sc-965	1/500	Cible la partie centrale (aa 154-167)
MDM2	lapin	poly.	Santa Cruz Biotechnology	C-18, sc-812	1/500	Cible un peptide en C-term (domaine RING)
USP7	lapin	poly.	Santa Cruz Biotechnology	H-200, sc-30164	1/5000	
CDKN1A	souris	mono.	Santa Cruz Biotechnology	F-5, sc-6246	1/1000	
H2A	lapin	poly.	AbCam	ab18255	1/2000	Utilisé comme contrôle de chargement
IgG murin	chèvre	poly.	AbCam	ab6823	1/5000	Ac secondaire
IgG de lapin	chèvre	poly.	AbCam	ab6721	1/5000	Ac secondaire

¹Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tex., États-Unis)

mono. (monoclonal); poly. (polyclonal); aa (acides aminés); C-term (C-terminale); IgG (Immunoglobuline de type G).

Les anticorps utilisés

Dans nos différentes expériences d'analyse protéique, la tubuline a été utilisée comme contrôle de chargement des puits des gels de protéines. Pour le contrôle de chargement de la portion nucléaire, l'Ac contre l'histone H2A a été utilisé. Ces deux protéines ubiquitaires sont connues pour avoir une expression équivalente d'une cellule à l'autre dans un même type cellulaire et sont des standards dans la littérature scientifique. De plus, les protéines de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A ont également été ciblées

par des Ac. Finalement, afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de dégradation protéique, le clivage de la protéine PARP a été évalué à l'aide d'un Ac (voir le tableau VII).

Ordre d'utilisation des anticorps

Pour l'étude de l'expression protéique des membres de l'axe, des gels de 10% et 12% SDS-PAGE permettaient la migration de 30 µg de protéines de chaque lignée d'intérêt. Le premier gel permettait de séparer les bandes de plus haut poids moléculaire. Il était utilisé le premier jour afin d'analyser la protéine PARP, puis le deuxième jour sans stripping, MDM2 (C-18). Le troisième jour, un stripping doux permettait de cibler MDM2 avec le deuxième Ac, soit le SMP-14. Et finalement le quatrième jour, la tubuline était analysée suite à un stripping doux. Le second gel de 12% permettait d'analyser les protéines de plus faible poids moléculaire. Le premier jour, CDKN1A était analysée, puis le deuxième jour TP53 suite à un stripping doux. Finalement le troisième jour, la tubuline était également analysée pour cette membrane.

Pour l'étude de l'expression protéique suite au traitement *in vitro*, deux gels SDS-PAGE étaient effectués, soit un de 8% et un de 12%. La première membrane était utilisée d'abord pour le marquage d'USP7, puis de MDM2 par l'Ac SMP14. Suite à un stripping, le deuxième Ac ciblant MDM2 (C-18) était utilisé, puis finalement la tubuline. Pour la membrane de 12%, elle était coupée sur le long au niveau du poids moléculaire 30 kDa. La partie du bas servait à analyser d'abord CDKN1A, puis H2A sans stripping; et celle du haut permettait la détection de TP53, puis de la tubuline, suite à un stripping doux.

Résultats

Expression génique des membres sélectionnés de la famille des USP dans les LMA

Nous avons étudié l'expression de 21 USP dans ce projet (tableau VI, Annexe C). Une revue de la littérature nous a permis de sélectionner ces USP en fonction de leur modification d'expression connue dans un ou plusieurs cancers et/ou de leur rôle dans la modulation de suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes. Pour des raisons de faisabilité technique, les échantillons de patients ont été divisés de manière aléatoire en trois phases expérimentales. Nous avons également ajouté pour les deux dernières phases des gènes tels que *USP9X* et *USP10* en raison de la parution d'articles intéressants sur la fonction de ces gènes. En effet, *USP9X* stabilise MCL1, un acteur important dans la survie cellulaire, et sa surexpression a été associée à un mauvais pronostic dans le myélome multiple [164]. *USP10* est l'une des DUB de TP53 et son expression est diminuée dans plusieurs cancers dont les carcinomes à cellules claires [165]. Chacune des phases de cette étude a été effectuée en utilisant des gènes contrôles identiques et les mêmes calibrateurs. La méthode $\Delta\Delta C_t$ nous permet de comparer les données d'une phase à l'autre et de les considérer ensemble dans les analyses [166]. De plus, nous avons utilisé des critères stricts pour définir une surexpression, c'est-à-dire un RQ à plus de 5.

La phase 1 a été effectuée en collaboration avec Amélie Giguère. Pour les phases 1, 2 et 3, il y a eu respectivement 35, 44 et 44 échantillons étudiés dont certains doublets. Après révision des données cliniques, nous avons éliminé de l'analyse un patient âgé de moins de 18 ans et deux échantillons prélevés post-traitement. Au total, 111 échantillons de LMA adultes différents ont été analysés (Tableau V, annexe B). Il est à noter que les expériences présentant des courbes d'amplification non optimales n'ont pas été incluses dans l'analyse.

Pour la plupart des 21 USP, le RQ demeure entre 0,5 et 5. Toutefois, nous avons observé une grande variation de l'expression pour les gènes *USP1*, *USP28*, *USP44* et *USP7* dans les échantillons leucémiques primaires de LMA de la cohorte étudiée. Ces données seront discutées dans les sections suivantes. L'expression des gènes testés a été établie par rapport à une moyenne de trois échantillons de moelle normale et par rapport à deux gènes endogènes, *TBP* et *HPRT* dont le premier a été retenu pour la présentation des résultats en raison de la qualité et la constance des courbes d'amplification. Au total, en regroupant les résultats des 3 phases expérimentales, *USP1* est sous-exprimé dans 44% des échantillons (33/75) et *USP7* dans 8% (9/111). Pour *USP28* et *USP44*, le profil d'expression est variable et inclut des surexpressions et des sous-expressions selon l'échantillon étudié. Le profil d'expression de *USP28* démontre une surexpression dans 4% des cas (3/72) et une sous-expression dans 21% (15/72). *USP44* est surexprimé dans 16,5% des cas (17/103) et sous-exprimé dans 56,3% (58/103).

Expression de *USP44* dans les échantillons leucémiques étudiés

Expression de *USP44* selon la morphologie cellulaire

L'expression de *USP44* a été analysée dans les échantillons de LMA principalement en raison de sa fonction. En effet, *USP44* est une DUB importante dans le SAC, permettant d'éviter l'anaphase prématurée. Cette enzyme agit principalement en débiquitinant CDC20, un régulateur négatif de l'APC/C [7, 15].

Afin d'étudier une corrélation potentielle entre le type de leucémie et l'expression de *USP44*, nous avons d'abord analysé les échantillons leucémiques selon leur classification WHO 2008 [62].

La figure 6 montre le profil d'expression de *USP44* pour les 103 échantillons de la cohorte étudiée ayant des courbes adéquates pour analyse. On note que la surexpression de *USP44* est observée particulièrement dans les LMA sans maturation (11/44 cas) alors qu'une sous-expression est observée dans les LMA à composante

monoblastique (Mono) (13/16 cas) et les LMA avec changements reliés à une myélodysplasie (18/26 cas). Les données d'expression pour ce gène ont été analysées par un test du Chi^2 en raison de sa distribution dans trois groupes différents. Les trois groupes sont significativement différents l'un de l'autre avec une valeur $p= 0,0276$.

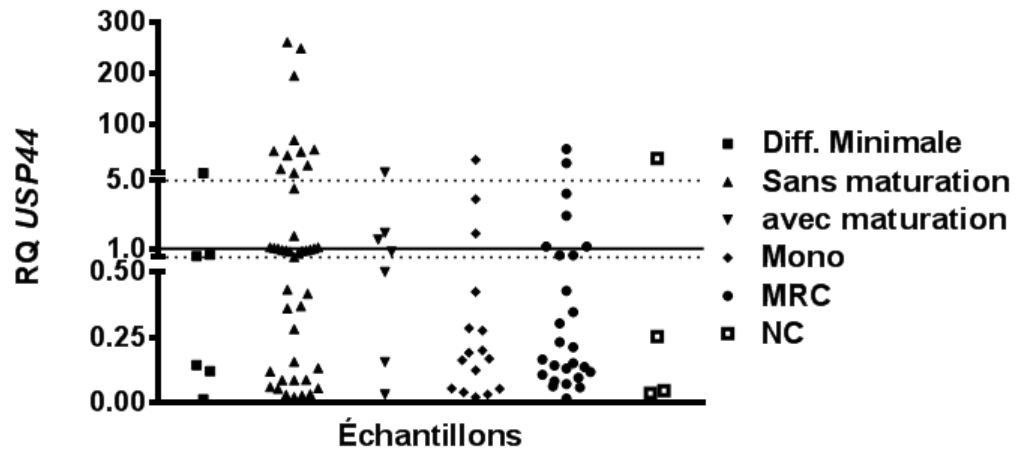


Figure 6. Expression relative (RQ) de *USP44* dans 103 échantillons de LMA par rapport au gène contrôle *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales selon la classification WHO 2008. Les lignes horizontales pointillées représentent les seuils établis pour une surexpression (RQ=5) et pour une sous-expression (RQ=0,5); la ligne horizontale pleine représente la moyenne des trois moelles normales (RQ=1). Diff. : Différenciation; Mono : leucémie monoblastique et monocyttaire aiguë; MRC: LMA avec changements reliés à une myélodysplasie; NC: non classifiable; USP :« ubiquitin specific peptidase »; RQ : expression relative.

Tableau VIII. Expression relative de *USP44* selon les groupes WHO 2008

RQ	Groupe WHO 2008							Total	
	Diff. min	Sans mat.	Avec mat.	ST*	Mono*	MRC*	NC		
>5	1	11	1	13	1	2	1	17	(16,5%)
0,5 à 5	2	15	3	20	2	6	0	28	(27%)
<0,5	3	18	3	24	13	18	3	58	(56,3%)
Total	6	44	7	57	16	26	4	103	

* $p=0.0276$; valeur obtenue selon le test du Chi^2 comparant les LMA avec composante monoblastique, les LMA-MRC et les trois autres types de LMA (à différenciation minimale, sans maturation et avec maturation).

USP: « ubiquitin specific peptidase»; WHO: "World Health Organization; RQ: expression relative; Diff. : différenciation; Min: minimale; Mat.: maturation; ST: sous-total; Mono: monoblastique et monocyttaire; MRC: LMA reliée à une myélodysplasie; NC: non classifiable.

Expression de *USP44* en fonction du caryotype des cellules leucémiques

USP44 possède une fonction dans le maintien de la stabilité des chromosomes lors de la division cellulaire. Le lien potentiel entre son expression et le type de caryotype a

donc été évalué [7, 15]. À cet effet, les échantillons ont été catégorisés selon leur caryotype: non complexe ou complexe (voir tableau V, annexe B). Le groupe avec caryotype non complexe inclut les échantillons de LMA avec un caryotype normal, et les LMA avec un caryotype anormal comprenant 1 ou 2 anomalies cytogénétiques. Le groupe avec caryotype complexe suit la définition de la classification WHO 2008, et inclut les LMA avec trois anomalies cytogénétiques non reliées ou plus dans la même cellule [63].

Tel que montré dans la figure 7 et le tableau IX, l'expression de *USP44* présente une distribution non aléatoire et significativement différente ($p=0.0119$) entre les échantillons de LMA avec caryotype complexe et non complexe. Cette analyse a été effectuée sur 101 échantillons dont les données sur le caryotype étaient disponibles. Il est à noter qu'aucun échantillon de LMA avec caryotype normal (24 cas analysés) n'a démontré de surexpression de *USP44* et seulement 2 échantillons de LMA avec caryotype non complexe sur 47 ont montré une surexpression (4%). Également, la sous-expression de *USP44* est surtout présente dans les échantillons de LMA avec un caryotype non complexe (31 cas sur 47, soit 66%). Par ailleurs, aucune différence statistiquement significative n'a été démontrée suite à une analyse de Student (test *T*) entre l'expression de *USP44* et la présence de mutations *NPM1* ($p=0.8629$) et *FLT3-ITD* ($p=0.0909$) dans les LMA avec caryotype normal.

Tableau IX. Expression relative de *USP44* selon le type de caryotype

RQ	Type de cytogénétique		Total
	Caryo. non complexe*	Caryo. Complexe*	
>5	2	14	16 (16%)
0,5 à 5	14	13	27 (27%)
<0,5	31	27	58 (57%)
Total	47	54	101

* $p=0,0119$, $\alpha<0,05$; valeur obtenue selon le test du Chi² entre les LMA avec caryotype complexe et les autres LMA.
Caryo.: caryotype; RQ :expression relative; USP :“ubiquitin specific peptidase”; LMA: leucémie myéloïde aiguë.

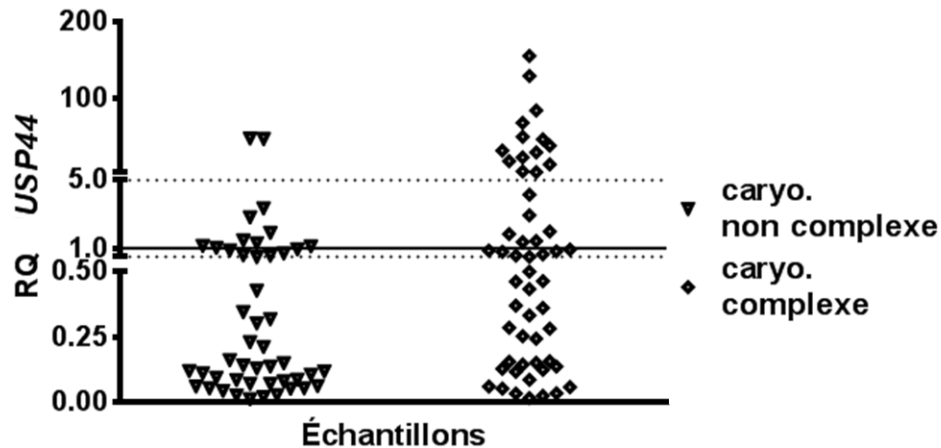


Figure 7. Expression relative (RQ) de *USP44* dans 103 échantillons de LMA par rapport au gène contrôle *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales selon le type de caryotype. Les lignes horizontales pointillées représentent les seuils établis pour une surexpression (RQ=5) et pour une sous-expression (RQ=0,5); la ligne horizontale pleine représente la moyenne des trois moelles normales (RQ=1). USP :« ubiquitin specific peptidase »; Caryo. : caryotype; RQ : expression relative.

Expression de *USP1* dans les échantillons leucémiques étudiés

L'expression de *USP1* a été investiguée dans les LMA en raison de son implication dans l'anémie de Fanconi [7, 15]. Cette maladie est caractérisée par une insuffisance médullaire et une prédisposition à certaines leucémies telles que la LMA. Une série de protéines pouvant être ubiquitinées et déubiquitinées, dont FANCD2, impliquée dans le processus de réparation de l'ADN, sont altérées dans cette maladie [7]. En plus d'être la DUB de FANCD2, *USP1* est la DUB de PCNA permettant de diminuer la synthèse de l'ADN par translésion (« translesion DNA synthesis »). Il est à noter également, que *USP1* est active principalement à la fin de la phase S dans le cycle cellulaire [167].

Dans notre cohorte, *USP1* est sous-exprimée dans 44% (33/75) des LMA et ceci dans les différents types morphologiques de la classification WHO ($p=0.1913$) et les différentes catégories cytogénétiques ($p=0.3961$) étudiés sans différence statistiquement significative (figure 8).

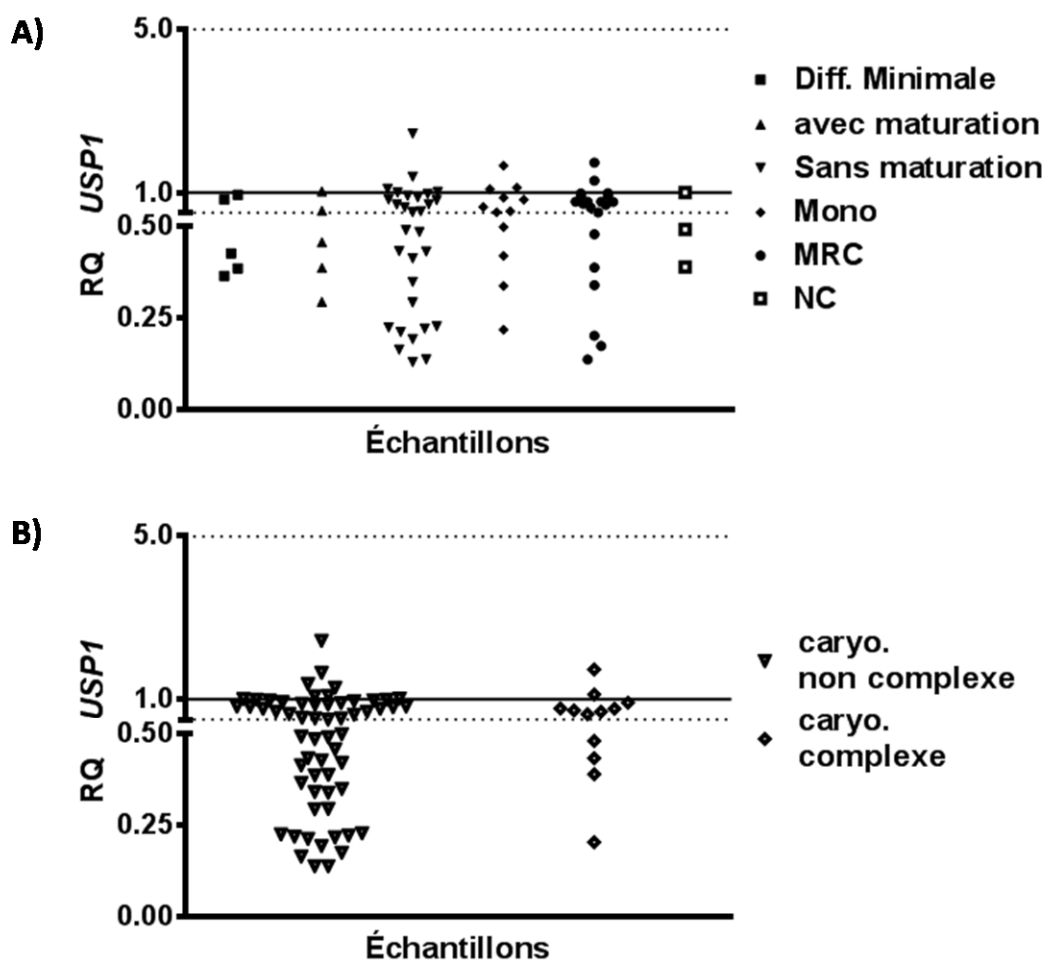


Figure 8. Expression relative (RQ) de *USP1* dans 75 échantillons de LMA par rapport au gène contrôlé *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales. **A)** Classés selon leur groupe morphologique WHO 2008, **(B)** classés selon le type de caryotype. Les lignes horizontales pointillées représentent les seuils établis pour une surexpression (RQ=5) et pour une sous-expression (RQ=0,5); la ligne horizontale pleine représente la moyenne des trois moelles normales (RQ=1). Diff. : différenciation; Mono : monoblastique et monocytaire; MRC: LMA avec changements liés à une myélodysplasie; NC: non classifiable ; USP : « ubiquitin specific peptidase »; Caryo. : caryotype; RQ : expression relative.

Expression de *USP28* dans les échantillons leucémiques étudiés

USP28 a été sélectionnée d'abord pour son rôle de TSG par lequel elle inhibe différents acteurs importants dans la signalisation de la réponse aux DSB. En effet, cette DUB protège les cellules de l'apoptose. Elle possède aussi un rôle oncogénique en inhibant la dégradation d'un oncogène important, *MYC* [167]. Dans cette étude, l'expression génique de *USP28* est diminuée dans 21% (15/72) des échantillons de

LMA. Seulement trois cas présentent une surexpression de cette DUB. Il est à noter que le nombre faible de cas n'a pas permis de valider une association significative avec la morphologie ($p=0.3953$) ou le caryotype ($p=0.7784$) (figure 9).

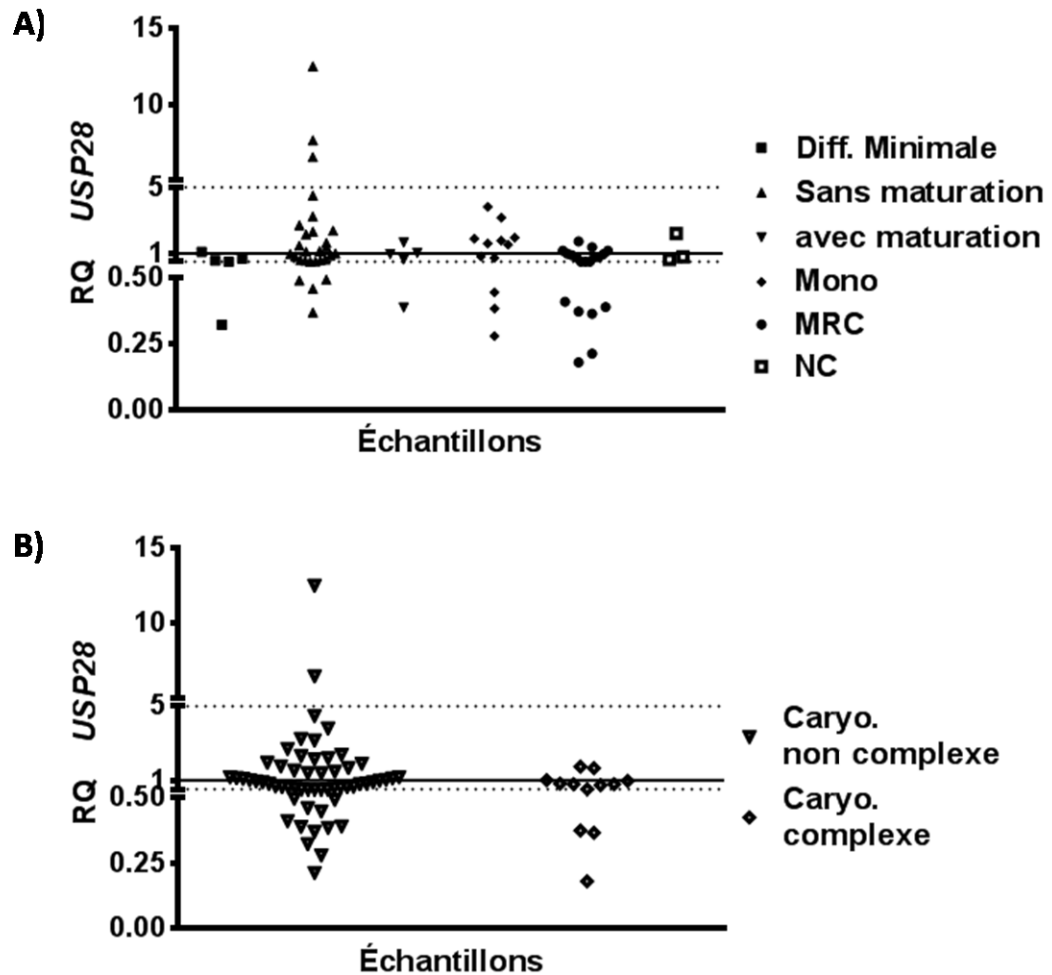


Figure 9. Expression relative (RQ) de *USP28* dans 72 échantillons de LMA par rapport au gène contrôle *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales. **(A)** Classés selon leur groupe morphologique WHO 2008, **(B)** classés selon le type de caryotype. Les lignes horizontales pointillées représentent les seuils établis pour une surexpression (RQ=5) et pour une sous-expression (RQ=0,5); la ligne horizontale pleine représente la moyenne des trois moelles normales (RQ=1). Diff. : différenciation; Mono : monoblastique et monocytaire; MRC: LMA avec changements liés à une myélodysplasie; NC: non classifiable; USP : « ubiquitin specific peptidase »; Caryo. : caryotype; RQ : expression relative.

Expression de *USP44* et de *USP28* dans trois lignées cellulaires de LMA

L'expression génique de *USP44*, de *USP1* et de *USP28* ont été évaluées dans trois lignées cellulaires de LMA. Nos résultats démontrent une altération de l'expression de *USP28* qui est augmentée de manière significative dans ces trois lignées et de *USP44* qui est sous-exprimée dans la lignée OCI-AML3 (tableau X).

Tableau X. Expression génique de *USP44*, *USP1* et *USP28* dans les lignées de LMA

Lignée	Gènes	USP44	USP1	USP28
		RQ ±SEM	RQ ±SEM	RQ ±SEM
OCI-AML3		0,0874 ±0,0140	1,1060 ±0,6080	9,4350 ±0,8345
HL-60		0,5143 ±0,0383	1,1442 ±0,0754	5,8568 ±0,8712
Kasumi-1		3,0877 ±0,2243	1,6201 ±0,1254	8,5130 ±0,9155

USP: "ubiquitin specific peptidase"; LMA: leucémie myéloïde aiguë; RQ : expression relative; SEM : erreur standard de la moyenne.

Expression génique des membres de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* dans les échantillons primaires de LMA étudiés

Tel que noté dans l'introduction, la modulation de l'expression de *TP53* est cruciale dans les cellules cancéreuses afin de contrôler leur résistance aux traitements [110]. Dans cette étude, nous avons analysé plus spécifiquement une des voies de contrôle de *TP53* par l'ubiquitination, soit l'axe *USP7-MDM2-TP53*, ainsi qu'une des cibles principales de *TP53*, soit *CDKN1A*.

Expression génique de *USP7*

L'expression de *USP7* est particulièrement intéressante comme cible thérapeutique [96, 158]. Cette DUB de *TP53* a montré une expression modifiée dans 8% des cas étudiés (9 cas sur 111) (figure 10). Cinq des neuf cas se retrouvent dans la catégorie des LMA avec changements liés à une myélodysplasie, mais ce groupe n'est pas significativement différent des autres ($p=0.056$), possiblement en raison du petit nombre de cas. L'analyse selon le type de caryotype (complexe ou non complexe) n'a pas révélé de différence significative ($p=0.4257$).

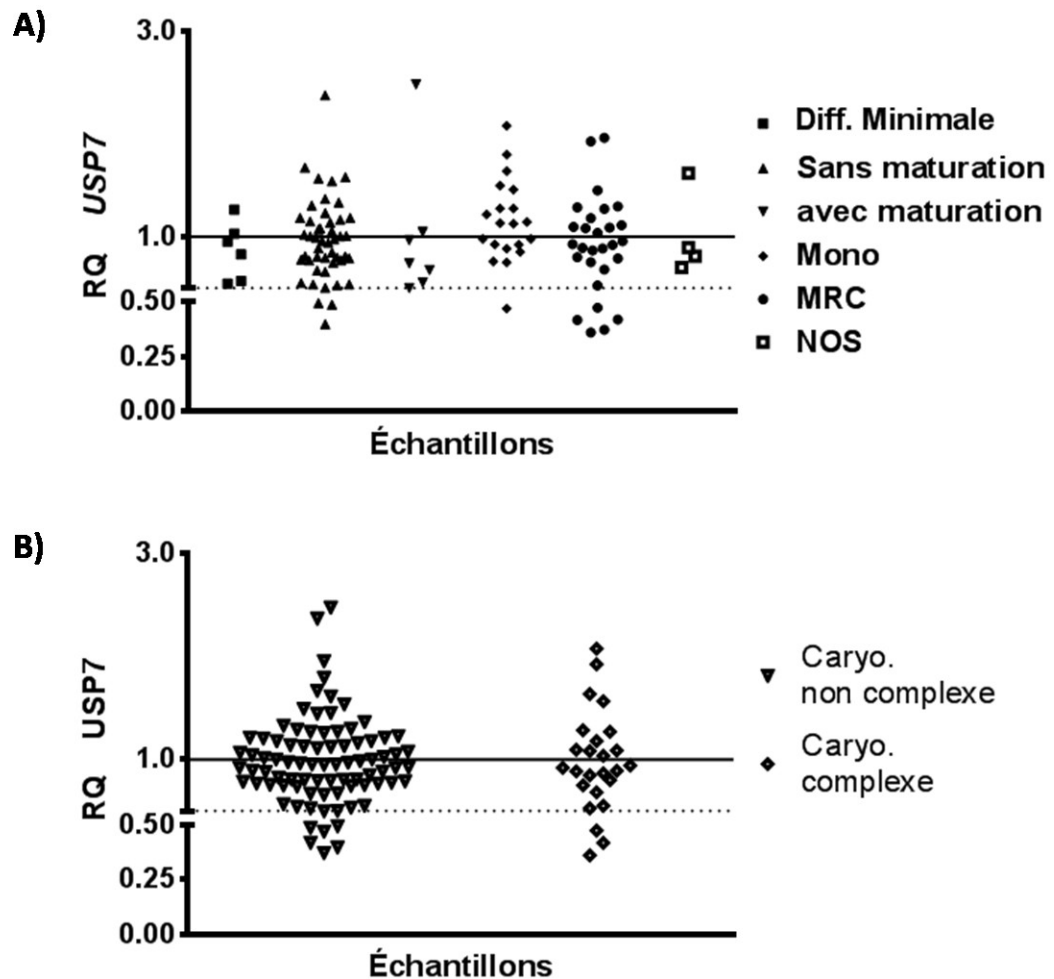


Figure 10. Expression relative (RQ) de *USP7* dans 111 échantillons de LMA par rapport au gène contrôleur *TBP* et par rapport à une moyenne de moelles normales. **(A)** Classés selon leur groupe morphologique WHO 2008, **(B)** classés selon le type de caryotype. Les lignes horizontales pointillées représentent les seuils établis pour une surexpression (RQ=5) et pour une sous-expression (RQ=0,5); la ligne horizontale pleine représente la moyenne des trois moelles normales (RQ=1). Diff.: différenciation; Mono: monoblastique et Monocytaire; MRC: LMA avec changements liés à une myélodysplasie; NC: non classifiable; USP: « ubiquitin specific peptidase »; Caryo.: caryotype; RQ: expression relative.

Expression génique de *MDM2*

MDM2, l'Ub ligase de TP53, est également une cible intéressante afin de contrer la résistance des cellules cancéreuses aux traitements [141, 168]. Étant donné la description de 37 transcrits de *MDM2* dans la base de données Ensembl [139], nous avons analysé l'expression de deux régions de ce gène. Nous avons ciblé une région qui code pour le domaine RING en C-terminal (voir tableau VI, Annexe C, pour les

détails des amorces), présente dans les formes longues de *MDM2*, et une autre région qui code pour le domaine Znf localisée dans la région centrale et présente dans la majorité des formes de *MDM2* (longues et courtes). Nous avons d'abord comparé l'expression selon les deux couples d'amorces, et nous avons obtenu un coefficient de corrélation de 0,94 avec un $p < 0,001$ (figure 11).

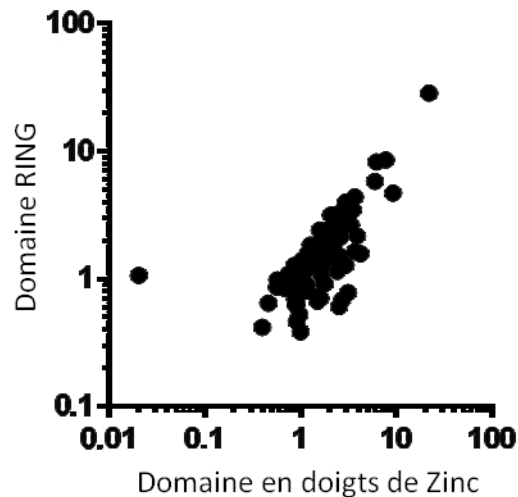


Figure 11. Corrélation entre l'expression génique relative de deux différents groupes de transcrits du gène *MDM2* évalués dans cette étude en ciblant deux domaines différents. L'expression des transcrits contenant le domaine en doigts de Zinc (axe X) ainsi que ceux contenant le domaine RING (axe Y) a été obtenue suite à la méthode $\Delta\Delta Ct$ de l'analyse RT-PCR quantitative effectuée par rapport au gène contrôle *TBP* et à une moyenne de trois moelles normales. L'unité est le RQ (expression relative).

Étant donné l'excellente corrélation entre les deux analyses, les résultats de l'étude d'expression ciblant le domaine ZnF, qui regroupe la majorité des transcrits de *MDM2*, seront détaillés ici. Les résultats démontrent que l'expression de *MDM2* varie dans 10% des cas (8 cas sur 79 étudiés) avec une surexpression dans 3 cas de LMA de type monoblastique et 2 cas de LMA avec changements liés à une myélodysplasie, et une sous-expression dans 3 cas. Selon le test du χ^2 , il y a une distribution significativement différente entre ces groupes ($p=0,0475$; Tableau XI) qui a été confirmée par un test de fisher exact ($p=0,018$). La distribution des cas où l'expression de *MDM2* (domaine ZnF) est dérégulée n'est pas différente selon le type de caryotype.

Tableau XI. Expression relative de *MDM2* selon les groupes WHO 2008

RQ	Groupe WHO 2008							Total
	Diff. min	Sans mat.	Avec mat.	ST*	Mono*	MRC*	NC	
>5	0	0	0	0	3	2	0	5 (6%)
0,5 à 5	1	33	4	38	14	15	4	71 (90%)
<0,5	0	1	0	1	0	2	0	3 (4%)
Total	1	34	4	39	17	19	4	79

* $p=0.0475$; valeur obtenue selon le test du χ^2 comparant les LMA avec composante monoblastique, les LMA-MRC et les trois autres types de LMA (à différenciation minimale, sans maturation et avec maturation).

MDM2: "mouse double minute 2" ; WHO: "World Health Organization; RQ: expression relative; Diff. : différenciation; Min: minimale; Mat.: maturation; ST: sous-total; Mono: monoblastique et monocyttaire; MRC: LMA relié à une myélodysplasie; NC: non classifiable.

Expression génique de *TP53*

Dans notre analyse comprenant 79 échantillons de LMA, 11 cas (14%) ont une diminution d'expression, répartie de manière équivalente entre les différents groupes WHO 2008.

L'analyse selon le type de caryotype révèle que près de la moitié des cas de LMA avec caryotype complexe (8 cas sur 19, soit 42%) ont une diminution de l'expression de *TP53* ($p=0,0011$), comparativement à seulement 7% des LMA avec caryotype non complexe. Il est à noter qu'une surexpression de ce gène n'a été observée dans aucun cas (Tableau XII). Aucune association n'a été démontrée entre les mutations de *NPM1* ou de *FLT3-ITD* et l'expression de *TP53* (données non présentées).

Tableau XII. Expression relative de *TP53* selon le type de caryotype

RQ	Type de cytogénétique		Total
	Caryo. non complexe*	Caryo. Complexe*	
0,5 à 5	53	11	64 (84%)
<0,5	4	8	12 (16%)
Total	57	19	76

* $p=0,0011$; valeur obtenue selon le test du χ^2 entre les LMA avec caryotype complexe et les autres LMA.

Caryo.: caryotype; RQ :expression relative; USP : "ubiquitin specific peptidase". LMA: leucémie myéloïde aiguë.

Expression génique de *CDKN1A*

Le gène *CDKN1A* codant pour la protéine CDKN1A est une cible importante de TP53 et son activité varie selon le contexte cellulaire dans les cancers [144]. L'expression du gène *CDKN1A* est la plus variable dans cette étude par rapport aux autres membres de cet axe. En fait, 42% des cas des LMA testés ont une expression de *CDKN1A* modifiée. En effet, 26 cas sur 78 (33%) ont une surexpression et 7 cas sur 78 (9%) ont une sous-expression. De manière intéressante, les cas de LMA avec surexpression sont plutôt retrouvés dans la catégorie des LMA de type monoblastique (13 cas sur 17; $p < 0,0001$). De plus, la moyenne d'expression de *CDKN1A* pour ce groupe est de plus de 20 fois celle des contrôles ($p = 0,0001$, test student T) (Tableau XIII).

Tableau XIII. Expression relative de *CDKN1A* selon les groupes WHO 2008

RQ	Groupe WHO 2008							Total
	Diff. min	Sans mat.	Avec mat.	ST*	Mono*	MRC*	NC	
>5	0	6	0	6	13	6	1	26 (33%)
0,5 à 5	1	23	4	28	4	11	2	45 (58%)
<0,5	0	4	0	4	0	2	1	7 (9%)
Total	1	33	4	38	17	19	4	78

* $p < 0,0001$; valeur obtenue selon le test du Chi² comparant les LMA avec composante monoblastique, les LMA-MRC et les trois autres types de LMA (à différenciation minimale, sans maturation et avec maturation).

CDKN1A: "cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)"; WHO: "World Health Organization; RQ: expression relative; Diff.: différenciation; Min: minimale; Mat.: maturation; ST: sous-total; Mono: monoblastique et monocytaire; MRC: LMA relié à une myélodysplasie; NC: non classifiable.

À noter que l'analyse par rapport au type de caryotype et à la présence des mutations *FLT3-ITD* et *NPM1* dans les caryotypes normaux n'a pas révélé d'association statistique significative avec la dérégulation de l'expression de ce gène.

Expression génique des membres de l'axe dans les lignées cellulaires de LMA

L'expression des membres de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* a aussi été étudiée dans trois lignées leucémiques, OCI-AML3, HL-60 et Kasumi-1. Le tableau XIV démontre la valeur RQ obtenue pour chacun des gènes de l'axe dans ces trois lignées. On note que l'expression de *USP7* est diminuée dans les trois lignées, et ce particulièrement dans la lignée Kasumi-1. L'expression de *MDM2* n'est pas altérée

dans ces lignées alors que celle de *TP53* est absente dans la lignée HL-60 et diminuée dans la lignée Kasumi1. Enfin, *CDKN1A* est fortement sous-exprimé dans les lignées HL-60 et Kasumi-1.

Tableau XIV. Expression des gènes *USP7*, *MDM2*, *TP53* et *CDKN1A* dans les lignées LMA

Lignée	Gènes	USP7	MDM2 ¹	TP53	CDKN1A
		RQ ± SEM	RQ ± SEM	RQ ± SEM	RQ ± SEM
OCI-AML3		0,4249 ± 0,0170	1,4097 ± 0,1170	0,8703 ± 0,0302	0,9385 ± 0,0346
HL-60		0,4472 ± 0,0142	0,7707 ± 0,0412	0,0000 ± 0,0000	0,2100 ± 0,0580
Kasumi-1		0,2983 ± 0,0154	0,7704 ± 0,0684	0,4307 ± 0,0286	0,0303 ± 0,0016

¹Domaine ZnF: cible la plupart des transcrits

LMA: leucémie myéloïde aiguë; RQ: expression relative; SEM: erreur standard de la moyenne; ZnF : en doigts de zinc.

La dérégulation de l'expression de *USP1* et *USP28* est associée à une modification de la survie des patients avec LMA *de novo* dans la cohorte étudiée

Nous avons ensuite effectué une analyse de la relation potentielle entre l'expression des USP étudiées et la survie des patients de cette cohorte et deux variables ont été étudiées soit la survie sans maladie et la survie globale. Elles se sont montrées équivalentes et seulement les courbes de survie globale sont présentées dans les figures 11 et 12. Nous ne présentons dans ce mémoire que les courbes de survie où un minimum de 8 patients ont été étudiés. Étant donné cette limite, nous avons dû isoler un certain type d'expression d'intérêt versus les « autres cas ». Par exemple, pour *USP28*, nous avons comparé les échantillons ayant une surexpression versus les « autres cas » regroupant les échantillons avec une expression normale ou diminuée de *USP28*. Lorsque possible, nous avons séparé les patients selon leur âge au diagnostic comme c'est couramment le cas dans les études de LMA où l'âge (inférieur ou supérieur à 60 ans) est un facteur pronostique bien établi pour la survie [169].

On observe que l'expression de *USP44* ne semble pas influencer la survie globale, et ce pour les patients âgés de moins de 60 ans ($p=0,6223$), et ceux de plus de 60 ans ($p=0,4349$). La sous-expression génique de *USP1* est associée dans notre cohorte à une meilleure survie ($p=0,0427$). De manière intéressante 13 des 15 cas qui présentent une

sous-expression de *USP1* se retrouvent dans le groupe d'âge inférieur à 60 ans. Cette distribution est non aléatoire ($p=0,0065$). L'analyse des courbes dans ce groupe de patients montre une valeur significative encore plus forte ($p=0,0018$). La sous-expression de *USP28* est associée à une survie moins bonne dans le groupe de patients âgés de 18 à 59 ans, mais cette différence s'estompe lorsque nous analysons seulement les patients de 60 ans et plus ($p=0,2231$). Cependant dans ce graphique, les courbes semblent également montrer une moins bonne survie du groupe présentant une sous-expression, mais le test n'est pas significatif probablement car le nombre de cas est trop petit. Lorsque tous les patients sont mis dans la même analyse, peu importe leur âge, les courbes restent différentes statistiquement ($p=0,0028$).

Évaluation de l'impact de la sous-expression de *TP53* et la surexpression de *CDKN1A* sur la survie globale des patients avec LMA *de novo* dans la cohorte étudiée

La figure 13 représente les courbes de survie selon le statut d'expression des différents membres de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A*, pour lesquels l'analyse est possible. En raison du nombre très limité de cas ayant une dérégulation de *MDM2* ($n=2$) et de *USP7* ($n=5$) et respectant nos critères d'analyses, les courbes ne peuvent être présentées pour ces deux gènes. Enfin, pour *TP53* et *CDKN1A*, les courbes semblent indiquer que la sous-expression de *TP53* ($p=0,1701$) et la surexpression de *CDKN1A* ($p=0,1076$) semblent associées à une survie globale défavorable. Toutefois ceci n'est pas significatif, probablement en raison du petit nombre de cas étudiés.

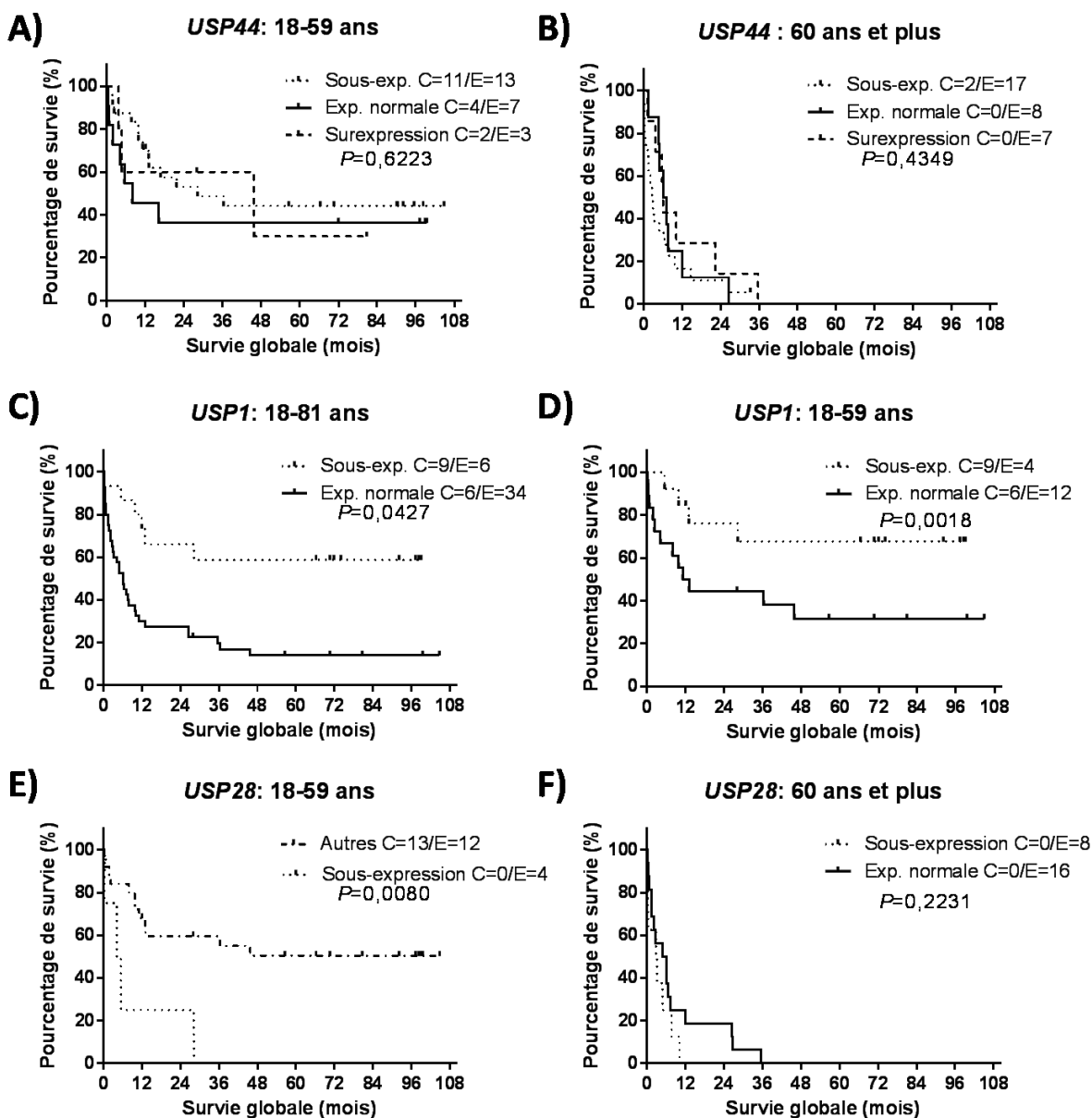


Figure 12. Courbes de survie globale des patients atteints de LMA *de novo* selon l'expression génique des USP indiquées. Courbes de survie globale présentées sous forme de pourcentage (%) de survie des patients atteints d'une LMA *de novo* ayant reçu une thérapie standard. Les sous-groupes de patients pour chaque graphique sont séparés selon leur statut d'expression du gène indiqué (*USP44* (A-B), *USP1* (C-D), *USP28* (E-F)) suite à une analyse de RT-qPCR, et selon le groupe d'âge au diagnostic. USP : « ubiquitin specific peptidase »; C : nombre de patients censurés; E : nombre de patients ayant eu l'événement (décès).

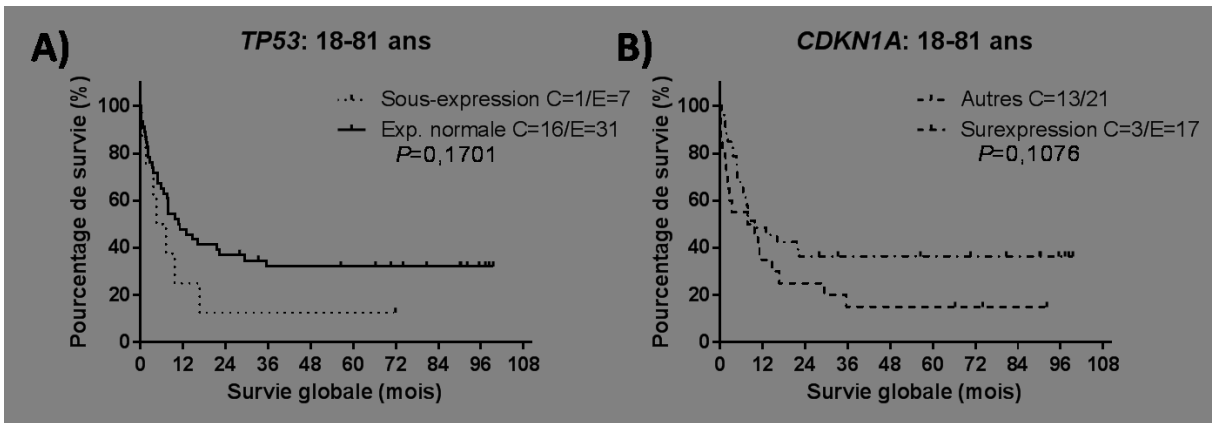


Figure 13. Courbes de survie globale des patients atteints d'une LMA *de novo* selon l'expression des gènes de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A*. Courbes de survie globale présentées sous forme de pourcentage (%) de survie des patients atteints d'une LMA *de novo* ayant reçu une thérapie standard. Les sous-groupes de patients pour chaque graphique sont séparés selon leur statut d'expression du gène indiqué (*TP53* (A) et *CDKN1A* (B)) suite à une analyse de RT-qPCR. C : nombre de patients censurés; E : nombre de patients ayant eu l'événement (décès).

L'expression protéique des membres de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* varie dans les lignées de LMA étudiées

L'expression génique n'est pas nécessairement liée à l'expression protéique, car il y a plusieurs étapes de contrôle subséquentes, telles que la transcription et le contrôle de la dégradation protéique. Nous avons donc analysé l'expression des protéines de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* à l'aide de la technique de Western Blot. Ceci a été effectué seulement en utilisant des lignées cellulaires de LMA étant donné la quantité importante de cellules requises pour ces études.

Nous avons d'abord analysé l'expression protéique de *USP7* avec l'Anticorps (Ac) H-200 (sc-30164) (tableau II) dans différentes lignées leucémiques. Tel que démontré dans la figure 14, l'expression de *USP7* est variable dans ces lignées. En effet, dans la lignée HL-60 où le gène *TP53* est délété, l'expression de *USP7* est augmentée comparativement aux autres lignées étudiées. Nous pouvons également observer que l'expression de cette protéine semble augmentée dans la lignée REH. Malheureusement la variation du contrôle de chargement utilisé, la tubuline, nous empêche de conclure pour la lignée K-562. De plus, nous avons observé que

l'expression de USP7 est augmentée dans la lignée de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (données non présentées).

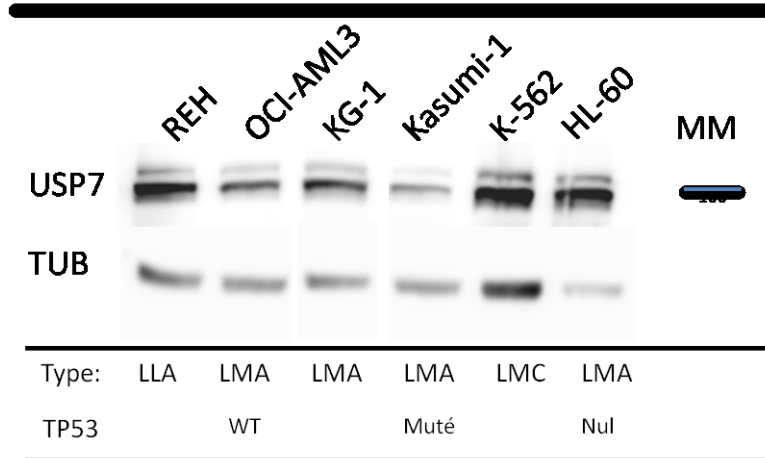


Figure 14. Expression protéique de USP7 dans différentes lignées cellulaires leucémiques, étudiée par Western Blot avec l'anticorps H-200 sur un gel SDS-PAGE de 8%. La bande principale de USP7 est évaluée à 100 kDa. La tubuline a été utilisée comme contrôle de chargement. Le statut de *TP53* de la lignée (si connu) est indiqué au bas de la figure. TUB : tubuline; LMA: leucémie myéloïde aiguë; LLA: leucémie lymphoblastique aiguë; LMC: leucémie myéloïde chronique; WT : «wild-type»; Nul : délétion totale; MM : marqueur de poids moléculaire.

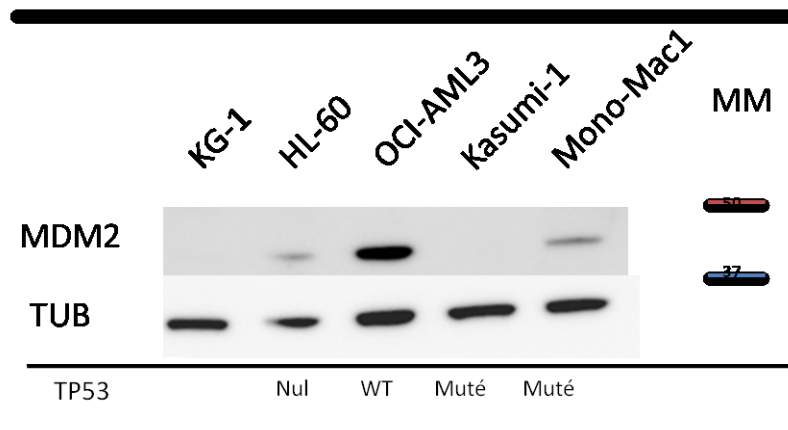


Figure 15. Expression protéique de MDM2 dans différentes lignées de LMA, étudiée par Western Blot avec l'anticorps SMP14 sur un gel SDS-PAGE de 8%. La bande de MDM2 a un poids moléculaire évalué à 45 kDa. La tubuline a été utilisée comme contrôle de chargement. Le statut de *TP53* de la lignée (si connu) est indiqué au bas de la figure. TUB :tubuline; Nul : délétion totale; WT : « wild type »; MM : marqueur de poids moléculaire.

Ensuite, nous avons étudié l'Ub ligase MDM2 avec l'Ac SMP14 (sc-965) ciblant la partie centrale de la protéine. Dans la figure 15, nous observons l'expression d'une

protéine de poids moléculaire d'environ 45 kDa principalement dans la lignée OCI-AML3 et plus faiblement dans les lignées HL-60 et Mono-Mac1. Il est à noter que dans les lignées REH et MCF-7 nous avons observé l'expression d'une forme migrant à 75 kDa avec cet Ac (donnée non présentée pour la lignée REH et présentée à la figure 16 pour la lignée MCF-7). Cette forme n'est pas présente dans aucune des lignées de LMA testées.

Nous avons aussi utilisé un deuxième Ac (C-18, sc-812) afin de cibler la protéine MDM2 dans son domaine fonctionnel RING en C-terminal, domaine important pour ses fonctions par rapport à TP53. Ce deuxième Ac nous a permis de détecter plusieurs isoformes de différents poids moléculaires, soit deux au-dessus de 50 kDa, deux autour de 39 kDa et une évaluée à 35 kDa (figure 16). La proportion de ces différentes isoformes varie d'une lignée à l'autre.

L'expression protéique de TP53 a aussi été étudiée dans ces lignées. Tel que démontré dans la figure 17, l'expression n'est pas détectable dans les lignées KG-1 et HL-60, tandis qu'elle est faible dans OCI-AML3 et augmentée dans les lignées Kasumi-1 et Mono-Mac1. Dans ces deux dernières lignées, des bandes de plus petit poids moléculaire sont aussi détectées par l'Ac DO-1 (sc-126). Les différences morphologiques entre les lignées cellulaires utilisées pourraient possiblement être une des causes de la variation de l'expression de la tubuline, en plus des causes d'ordre technique. Des ajustements dans le chargement des protéines sur gel devront être effectués afin d'obtenir des contrôles de chargement optimaux. Dans cette figure, une surexpression de TP53 est observée dans les lignées Kasumi-1 et Mono-Mac1, malgré un contrôle de charge sous-optimal. Il est à noter que la viabilité cellulaire des différentes lignées était vérifiée avant l'extraction protéique.

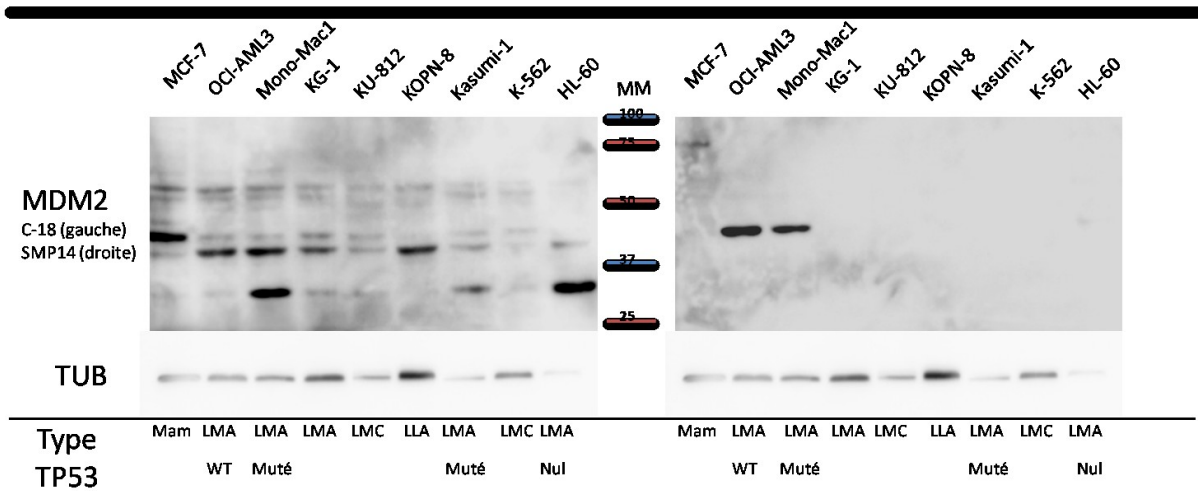


Figure 16. Expression protéique des différentes isoformes de MDM2 dans des lignées leucémiques et dans la lignée MCF-7, étudiée par Western Blot avec les anticorps C-18 et SMP14 sur un gel SDS-PAGE de 8%. Les différentes isoformes détectées par l'Ac C-18 ont un poids moléculaire évalué à 60, 53, 47, 39 et 35 kDa. Les isoformes détectées par l'Ac SMP14 ont des poids moléculaires évalués à 75 et 45 kDa. Le statut de *TP53* de la lignée (si connu) est indiqué au bas de la figure. MM : marqueur de poids moléculaire; TUB : tubuline; Mam : cellules cancéreuses mammaires; LMA: leucémie myéloïde aiguë; LLA : leucémie lymphoblastique aiguë; LMC: leucémie myéloïde chronique.

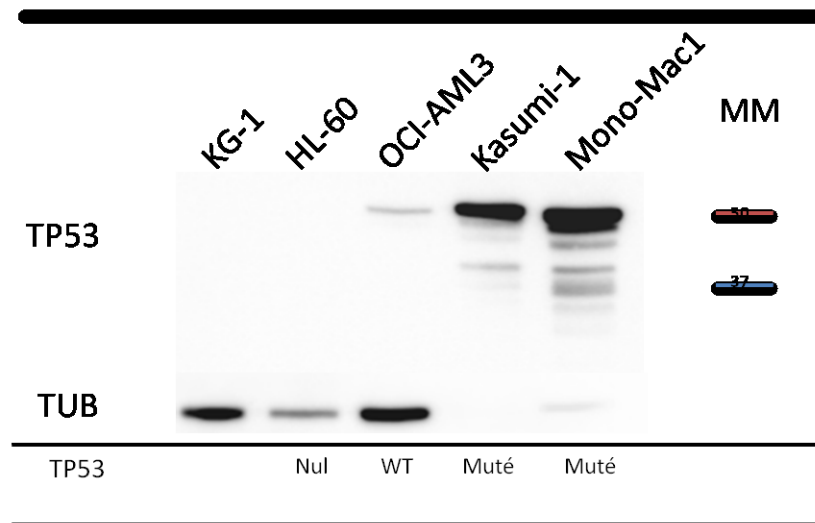


Figure 17. Expression protéique basale de TP53 dans des lignées de LMA, étudiée par Western Blot avec l'anticorps DO-1 sur un gel SDS-PAGE de 15%. Le poids moléculaire de la première bande de TP53 est évalué à 50 kDa. La tubuline a été utilisée comme contrôle de chargement. Le statut de *TP53* de la lignée (si connu) est indiqué au bas de la figure. TUB : tubuline; WT : « wild type »; Nul : délétion totale; MM : marqueur de poids moléculaire.

Finalemment, l'expression protéique de CDKN1A a été étudiée avec l'Ac F-5 (sc-6246) (Figure 18) [144]. Nous avons utilisé la lignée MCF-7 comme témoin positif d'expression pour cette étude, car une expression basale de CDKN1A a été décrite dans cette lignée. Aucune des lignées hématologiques étudiées n'exprimait cette protéine. Il est à noter que l'expression protéique de CDKN1A a été contrôlée dans la lignée HL-60 étant donné un contrôle sous-optimal (tubuline) et cette expérience a confirmé l'absence d'expression de CDKN1A dans cette lignée (donnée non présentée).

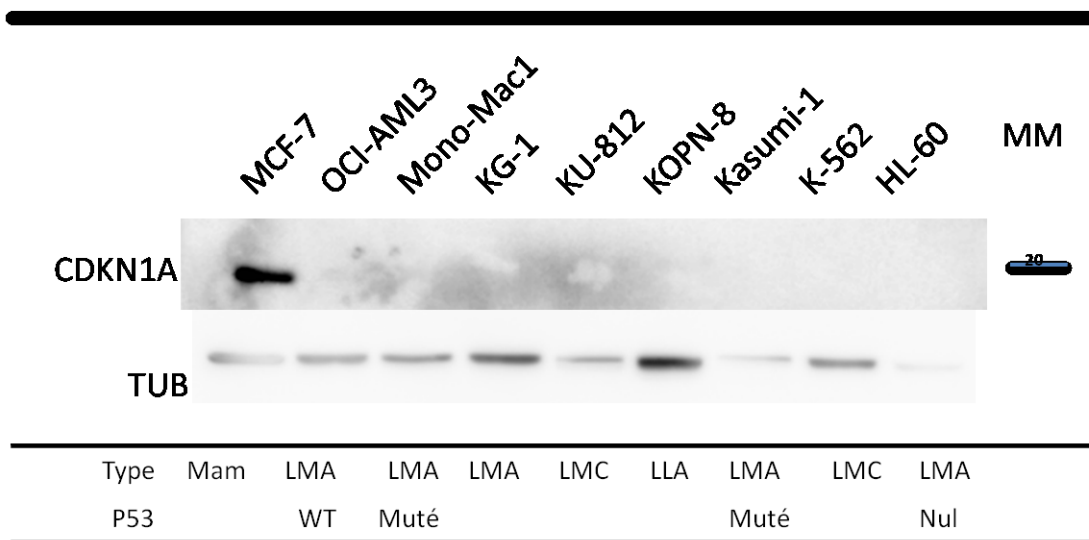


Figure 18. Expression protéique de CDKN1A dans différentes lignées cellulaires, étudiée par Western Blot avec l'anticorps F-5 (sc-6246) sur un gel SDS-PAGE de 15%. Le poids moléculaire de CDKN1A est évalué à 20 kDa. La tubuline a été utilisée comme contrôle de chargement. Le statut de *TP53* de la lignée (si connu) est indiqué au bas de la figure. TUB : tubuline; Mam : cellules cancéreuses mammaires; LMA: leucémie myéloïde aiguë; LLA: leucémie lymphoblastique aiguë; LMC: leucémie myéloïde chronique; WT, « wild type »; Nul, délétion totale; MM : marqueur de poids moléculaire.

Mise au point d'un système *in vitro* vérifiant si l'expression basale de *CDKN1A* dans des cellules de LMA module la réponse au traitement à la doxorubicine et/ou au nutlin 3

L'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* représente une opportunité de traitement intéressante dans les LMA [96, 123, 144, 158, 170-172]. En effet, cibler cet axe semble pouvoir moduler l'apoptose et ainsi potentiellement améliorer les traitements

anticancéreux, tels que les anthracyclines. Dans notre étude, nous avons observé une variation de l'expression basale de *CDKN1A* en aval de *TP53*. Nous avons donc élaborer un système de traitement *in vitro* afin d'évaluer différentes hypothèses quant à l'effet de la variation de l'expression de *CDKN1A* sur la réponse aux traitements avec les anthracyclines ou les modulateurs de *MDM2-TP53*. Deux molécules chimiques ont été choisies pour cette étude : le nutlin 3, un inhibiteur de l'interaction *MDM2-TP53* menant à la stabilisation de *TP53*, et la doxorubicine, une anthracycline couramment utilisée en laboratoire et appartenant à la même famille que la daunorubicine utilisée en clinique pour le traitement de la LMA. Ces anthracyclines activent *TP53* suite à un stress à l'ADN. Les doses des composés chimiques utilisés pour nos expériences ont été sélectionnées dans la littérature afin de couvrir les doses thérapeutiques utilisées chez l'humain. En effet, des doses allant de 1 à 60 μM pour le nutlin 3 et de 10 à 100 nM pour la doxorubicine ont été utilisées [112, 173]. Un contrôle avec le DMSO seul a été effectué pour chaque expérience, avec une concentration ne dépassant pas 0,1%, dose à laquelle le DMSO peut commencer à induire en agent seul une toxicité et l'apoptose.

Ce système a été élaboré à l'aide de lignées cellulaires en raison du nombre significatif de cellules nécessaires pour ces expériences. Notre système a d'abord été élaboré et validé en traitant des cellules de la lignée OCI-AML3 (*TP53* WT) et HL-60 (délétion biallélique de *TP53*) qui serviront respectivement de contrôle positif et négatif pour le gène *TP53*. Ensuite, notre système a été testé une fois avec des cellules primaires de LMA, soit l'échantillon 05H094 contenant 94% de blastes. Cet échantillon est une LMA de type monoblastique et monocytaire (FAB M5) présentant un caryotype normal avec présence d'une mutation *NPM1* sans mutation *FLT3-ITD*. À noter que l'expression de chacun des membres de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* est comparable à celle des moelles normales dans cet échantillon leucémique.

Mise au point de l'analyse de l'effet cytotatique et cytotoxique du traitement à la doxorubicine et/ou au nutlin 3 dans le système *in vitro*

Afin d'analyser l'effet cytotatique et cytotoxique du traitement, trois paramètres ont été évalués, soit le décompte cellulaire à l'aide d'un compteur de cellules automatisé, la viabilité cellulaire par exclusion au bleu de trypan et la survie cellulaire relative au contrôle négatif (DMSO seul) analysée par cytométrie en flux par la méthode d'annexine V/PI.

Les résultats des décomptes cellulaires obtenus dans ces expériences sont détaillés dans la figure 19. Ce décompte cellulaire inclut les cellules mortes, mais encore relativement sphériques, et les cellules vivantes. Pour la lignée OCI-AML3 (figure 19 (A-B)), en absence de traitement et pour les faibles doses de composés, soit 1 et 5 μM pour le nutlin 3 ou 10 nM pour la doxorubicine, on note une prolifération cellulaire puisque le nombre total de cellules augmente dans le temps. Cette différence diminue au fur et à mesure que la dose des deux composés augmente, montrant un effet cytotatique sur cette lignée cellulaire, et ce, pour les deux types de traitement. Il est à noter que nous avons effectué ces expériences avec les lignées cellulaires en triplicata. Toutefois le nombre de spécimens testés étant très limité, nous n'avons pas effectué d'analyse statistique. Pour la lignée HL-60 (figure 19 (C-D)), la différence de croissance entre 24 et 48 heures ne semble pas liée ni à la dose de nutlin 3 ni à celle de la doxorubicine, puisqu'aucun effet dose dépendant n'est observé. En fait, l'écart entre les deux courbes temps semble non différent d'une dose à l'autre. Pour l'échantillon leucémique primaire (figure 19 (E-F)), nous n'avons fait qu'une seule fois l'expérience. Les résultats sont donc très préliminaires. Cette expérience servait principalement à vérifier que les cellules primaires leucémiques pouvaient se maintenir adéquatement en culture jusqu'à 48 heures dans ces conditions.

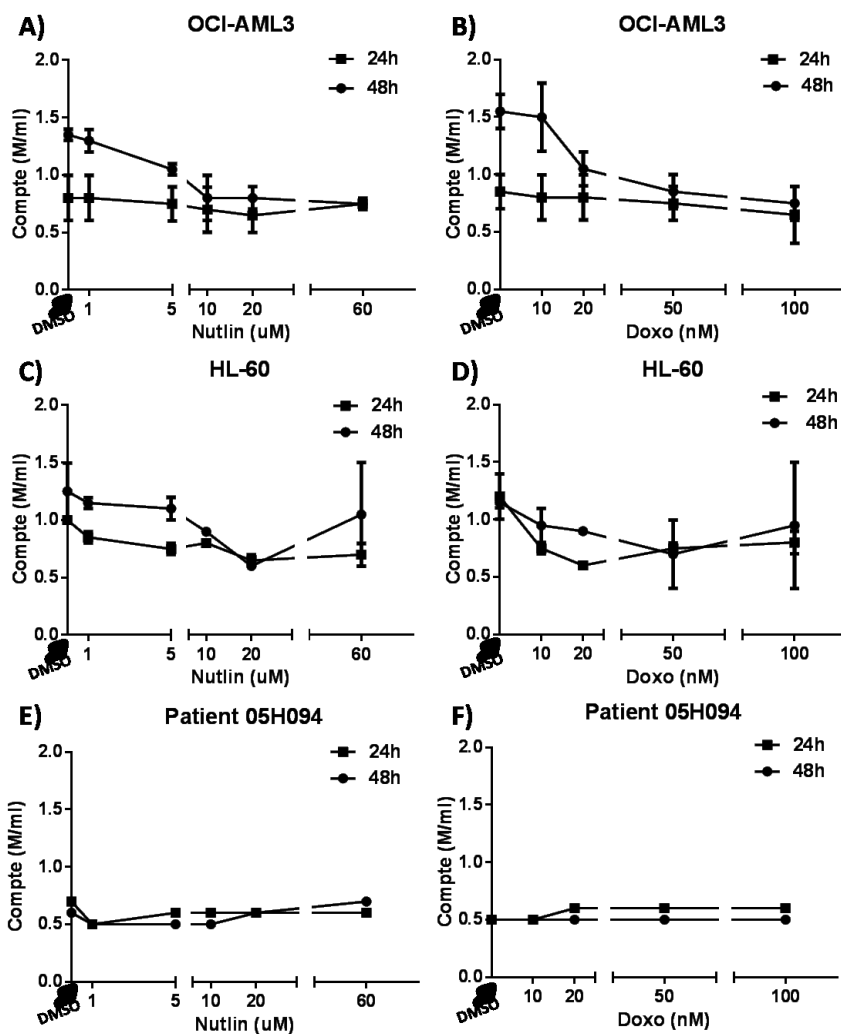


Figure 19. Analyse du décompte cellulaire suite à un traitement *in vitro* au nutlin 3 ou à la doxorubicine. Les cellules des lignées OCI-AML3 et HL-60 (concentration cellulaire initiale de 0,7 M/mL) et d'un échantillon leucémique primaire 05H094 (concentration cellulaire initiale de 0,5 M/mL) ont été mises en culture en présence des composés chimiques selon la concentration indiquée pour 24 et 48 h. Le décompte cellulaire (M/mL) a été effectué à l'aide d'un compteur de cellules automatisé. Le traitement a été effectué avec le nutlin 3 (A-C-E) ou la doxorubicine (B-D-F) solubilisés dans le DMSO. Pour les figures A à D, 3 expériences indépendantes ont été effectuées et les données sont présentées en moyenne ± SEM. Pour les figures E-F, 1 seule expérience a été effectuée. Le DMSO seul (concentration maximale <0,1%) sert de contrôle négatif. Doxo : doxorubicine; DMSO : diméthylsulfoxyde ; SEM : erreur standard de la moyenne.

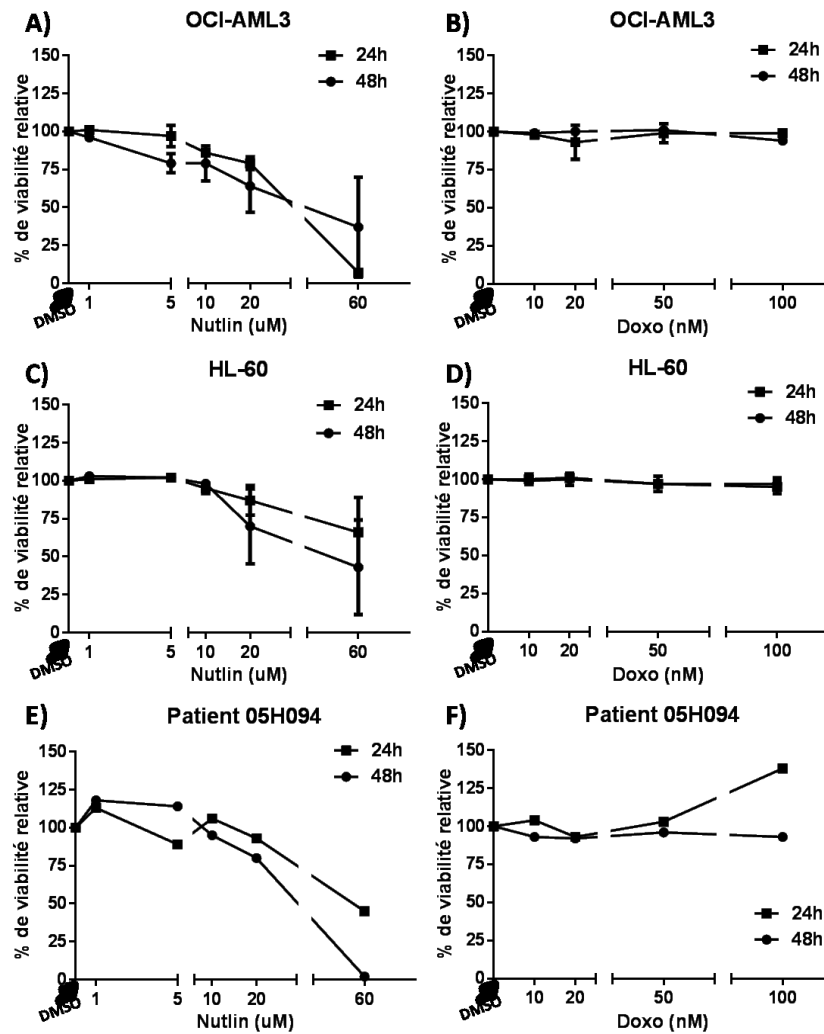


Figure 20. Analyse de la viabilité cellulaire suite à un traitement *in vitro* au nutlin 3 ou à la doxorubicine. Les cellules de lignées (OCI-AML3 ou HL-60) et d'un échantillon leucémique primaire 05H094 ont été mises en culture en présence des composés chimiques selon la concentration indiquée pour 24 et 48 h. La viabilité cellulaire a été calculée suite à un test d'exclusion au bleu de trypan en % relatif au contrôle négatif (DMSO seul, concentration maximale <0,1%). Le traitement a été effectué avec le nutlin 3 (A-C-E) ou la doxorubicine solubilisés dans le DMSO (B-D-F). Pour les figures A à D, 3 expériences indépendantes ont été effectuées et les données sont présentées en moyenne \pm SEM. Pour les figures E-F, 1 seule expérience a été effectuée. Le DMSO seul (concentration maximale <0,1%) sert de contrôle négatif. Doxo : doxorubicine; DMSO : diméthylsulfoxyde ; SEM : erreur standard de la moyenne.

Un test de viabilité cellulaire par exclusion au bleu de trypan a ensuite été effectué (figure 20). La viabilité y est présentée par rapport à celle de l'échantillon non traité par la molécule chimique (contrôle contenant du DMSO seul) et ce pour chaque temps

étudié. On note que la présence de nutlin 3 diminue la viabilité cellulaire pour les trois types de cellules leucémiques à partir de la dose de 10 μ M, de manière qui semble dose dépendante. Étant donné la plus grande variabilité de ce type de résultat, nous ne pouvons discerner un effet en raison du temps (24 versus 48 heures). Le spectre de doses utilisé pour la doxorubicine ne semble pas induire de diminution de viabilité observable par cette technique dans ces deux lignées et dans l'échantillon primaire de LMA.

Finalement, afin d'évaluer de manière plus précise la survie cellulaire, une analyse en cytométrie de flux a été effectuée en utilisant l'annexine V et le PI. D'abord, nous avons éliminé les globules rouges de notre analyse. Les cellules vivantes (quadrant inférieur gauche, signaux Annexine V et PI négatifs) ont ensuite été calculées. La figure 21 montre ces résultats sous forme de pourcentage de survie relative par rapport au contrôle négatif (DMSO seul). On note un patron de réponse similaire à celui de la viabilité par exclusion au bleu de trypan, quoique plus précis. Malheureusement, une seule expérience a pu être effectuée pour la lignée HL-60 suite à une incubation de 24 heures. De plus, dans cette expérience la donnée pour la dose la plus élevée de 60 μ M semble aberrante.

De plus en plus de données fondamentales et cliniques sur les inhibiteurs de l'interaction MDM2-TP53, suggèrent qu'ils seraient potentiellement plus efficaces en combinaison avec une chimiothérapie [112, 124, 174]. Nous avons donc exploré plusieurs combinaisons de doses de nutlin 3 avec la doxorubicine. Dans la figure 22, les résultats de la survie relative obtenus en cytométrie en flux sont présentés pour certaines des combinaisons intéressantes. Cette figure démontre dans la lignée OCI-AML3, une synergie entre les deux molécules avec une diminution plus importante de la survie cellulaire lors du traitement combiné. Pour les deux autres échantillons leucémiques, il ne semble pas y avoir de synergie. En effet, l'ajout simultané des deux molécules ne modifie pas le décompte ni la viabilité cellulaire. Il est à noter que pour la lignée HL-60 seuls les résultats à 24h sont présentés, les expériences à 48 heures n'ayant pas été finalisées.

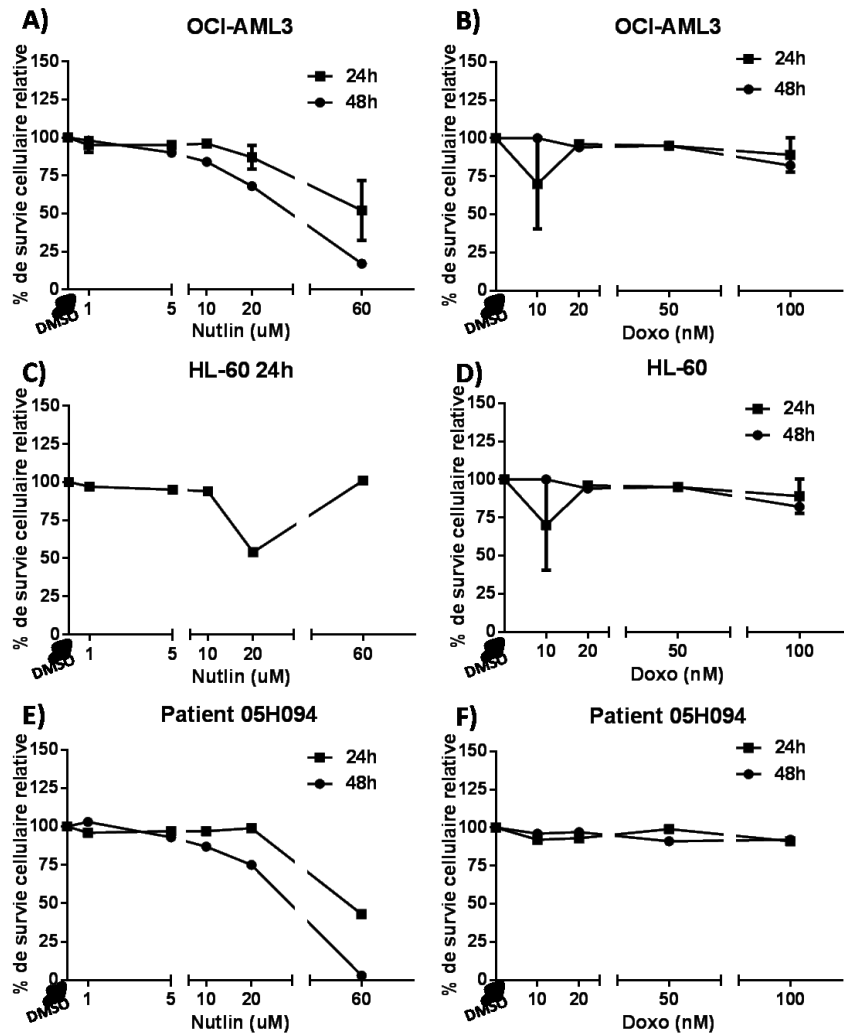


Figure 21. Analyse de la survie cellulaire relative par la méthode Annexine V-PI suite à un traitement *in vitro* au nutlin 3 ou à la doxorubicine. Les cellules de lignées (OCI-AML3 ou HL-60) et d'un échantillon leucémique primaire 05H094 ont été mises en culture en présence des composés chimiques selon la concentration indiquée pour 24 et 48 h. Leur survie cellulaire a été calculée en % relatif au contrôle négatif (DMSO seul, concentration maximale <0,1%) suite à une coloration à l'Annexine V et au PI et étude en cytométrie de flux. Le traitement a été effectué avec le nutlin 3 (A-C-E) ou avec de la doxorubicine solubilisés dans le DMSO (B-D-F). Pour les figures A à D, 3 expériences indépendantes ont été effectuées et les données sont présentées en moyenne ± SEM. Pour les figures E-F, 1 seule expérience a été effectuée. Le DMSO seul (concentration maximale <0,1%) sert de contrôle négatif. Doxo : doxorubicine; DMSO : diméthylsulfoxyde ; SEM : erreur standard de la moyenne.

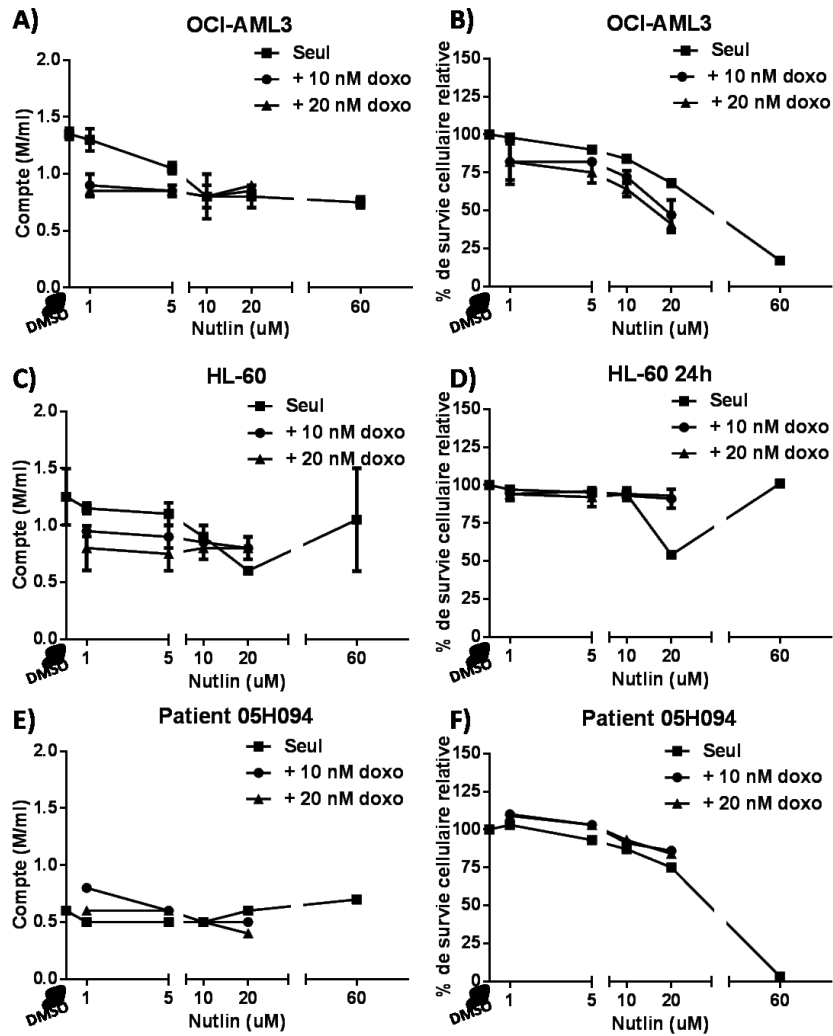


Figure 22. Analyse du décompte cellulaire et de la survie cellulaire relative suite à un traitement *in vitro* combinant la doxorubicine avec le nutlin 3 à 48h. Les cellules de lignées (OCI-AML3 ou HL-60, concentration initiale de 0,7 M/mL) et d'un échantillon leucémique primaire 05H094 (concentration initiale de 0,5 M/mL) ont été mises en culture en présence des composés chimiques selon la concentration indiquée pour 48 h (sauf pour la lignée HL-60 où les données pour 24h sont présentées). Le décompte cellulaire (A-C-E) et la survie cellulaire relative au contrôle négatif contenant le DMSO seul (concentration maximale <0,1%) (B-D-F) sont représentés. Pour les figures A à D, 3 expériences indépendantes ont été effectuées et les données sont présentées en moyenne \pm SEM. Pour les figures E-F, 1 seule expérience a été effectuée. Le DMSO seul (concentration maximale <0,1%) sert de contrôle négatif. Doxo : doxorubicine; DMSO : diméthylsulfoxyde ; SEM : erreur standard de la moyenne.

Mise au point de l'analyse des modifications protéiques des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A dans le système *in vitro*

Afin d'évaluer l'effet d'une surexpression de *CDKN1A* sur la réponse des cellules leucémiques à un traitement génotoxique, il est intéressant d'évaluer la variation de l'expression protéique de *CDKN1A* ainsi que celle de TP53, MDM2 et USP7. Nous avons donc élaboré notre modèle *in vitro* de manière à pouvoir observer les changements protéiques tant au point de vue de la quantité que de la localisation cytoplasmique/nucléaire pour les membres de cet axe à l'aide d'une analyse par Western Blot. De plus, l'ajout d'une molécule modulant l'axe, soit le nutlin 3, a également été utilisée afin de mieux comprendre l'impact de l'expression génique initiale de *CDKN1A* sur l'effet de cette thérapie.

Les cellules ont donc été traitées *in vitro* dans les mêmes conditions que pour les expériences précédentes et nous avons ensuite procédé à une extraction des protéines en fractions nucléaires et cytoplasmiques. Nous présentons dans cette dernière section du mémoire, les résultats obtenus lors des expériences préliminaires effectuées pour cet objectif (figure 23 et 24). Dans ces expériences, la tubuline (contrôle de charge) devrait être détectée de manière comparable dans les différents extraits cytoplasmiques des cellules et l'histone H2A (contrôle de charge) de manière équivalente dans les différents extraits nucléaires. Les résultats initiaux obtenus avec les extraits protéiques de la lignée OCI-AML3 démontrent que la charge des gels n'était pas adéquate (Figure 23 A et B). La technique d'extraction a été améliorée au cours des expériences suivantes afin d'optimiser la quantité absolue de protéine recueillie et leur pureté. Les deux dernières extractions de protéines effectuées avec les cellules leucémiques primaires 05H049 suite au traitement avec le nutlin 3 (figure 24 C et D) présentent de meilleurs contrôles de chargement quoique encore sous-optimaux.

De plus, la quantité de protéines *CDKN1A* détectée dans le contrôle positif (la lignée MCF-7) n'est pas constante. C'est pourquoi nous avons comparé la détection de cette protéine directement après une extraction totale ou en fractions et suite à une ou deux congélations. Ces essais ont démontré qu'un extrait protéique total de MCF-7 congelé-

décongelé au maximum une seule fois doit être utilisé afin de détecter adéquatement cette protéine.

Les résultats initiaux obtenus démontrent une activation de TP53 suivant l'augmentation de la dose de la doxorubicine à 24h et avec le traitement au nutlin 3 à 24 et 48h dans les cellules de la lignée OCI-AML3 (figure 23). De plus, il semble y avoir une augmentation de la protéine CDKN1A nucléaire. Dans les cellules leucémiques de l'échantillon 05H049, on note une activation nucléaire de TP53 à 48h de traitement avec la doxorubicine et dès 24h pour le nutlin 3 (figure 24). L'activation principalement nucléaire de CDKN1A semble être présente au temps 24h avec le traitement au nutlin 3. Un contrôle inadéquat de l'expression de CDKN1A dans les cellules de la lignée MCF-7 non traitée (contrôle positif) relié aux congélations-décongelations répétées rend impossible une évaluation finale de l'expression de cette protéine dans les cellules leucémiques primaires étudiées (figure 24).

Ces expériences devront être poursuivies pour obtenir des résultats de qualité adéquate pour interprétation. Ce système pourrait permettre éventuellement d'évaluer la réponse *in vitro* de différents échantillons primaires de LMA ayant des niveaux variables d'expression de *CDKN1A*, à la doxorubicine et au nutlin 3. Ceci sera discuté dans la section des perspectives.

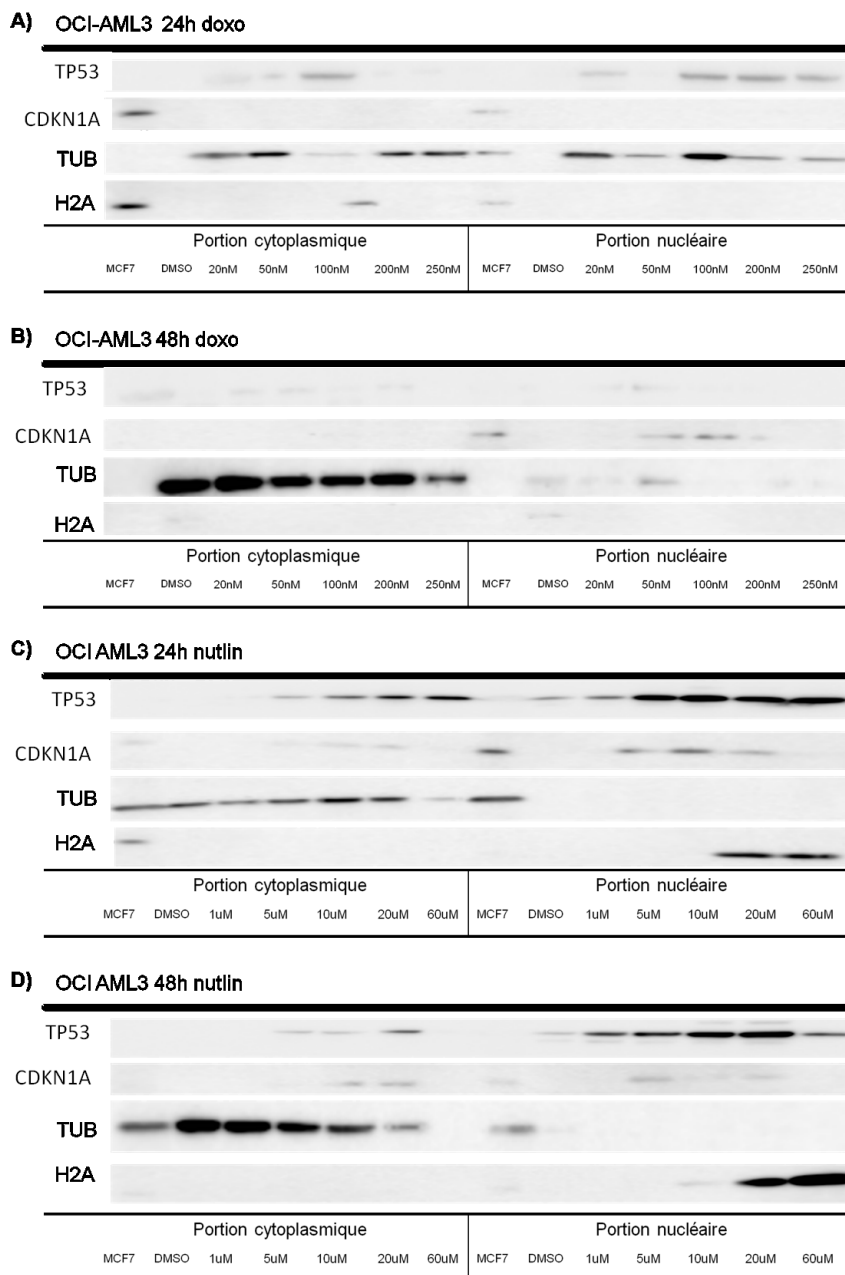


Figure 23. Expression protéique cytoplasmique et nucléaire des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A suite à un traitement *in vitro* des cellules de la lignée cellulaire OCI-AML3 au nutlin 3 ou à la doxorubicine durant 24 et 48h. Les cellules OCI-AML3 ont été mises en culture à une concentration initiale de 0,7 M/mL en présence de DMSO seul (contrôle), de nutlin 3 ou de doxorubicine à différentes concentrations tel qu'indiqué pour 24 à 48 h. La lignée MCF-7 a été utilisée comme contrôle positif pour l'expression de CDKN1A. Une extraction protéique en fractions cytoplasmiques et nucléaires a été effectuée afin de visualiser l'expression protéique de TP53 et CDKN1A suite à une technique de Western Blot. La concentration du DMSO (contrôle négatif) ne dépasse pas 0,1%. TUB : tubuline (contrôle de charge cytoplasmique); H2A : histone 2A (contrôle de charge nucléaire). Doxo : doxorubicine; DMSO : diméthylsulfoxyde.

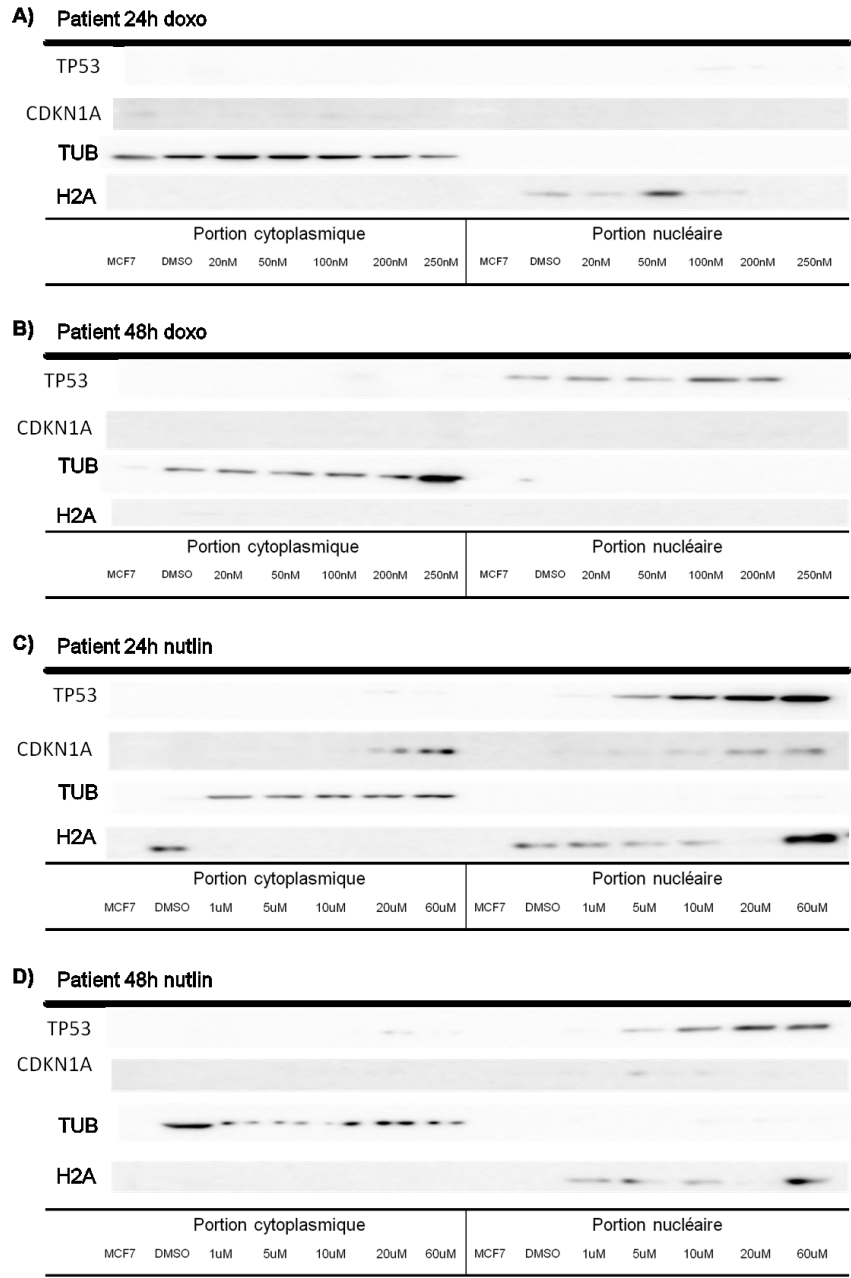


Figure 24. Expression protéique cytoplasmique et nucléaire des membres de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A suite à un traitement *in vitro* des cellules leucémiques primaires au nutlin 3 ou à la doxorubicine durant 24 et 48h. Les cellules primaires leucémiques de l'échantillon 05H094 ont été mises en culture à une concentration initiale de 0,5 M/mL en présence de DMSO seul (contrôle), de nutlin 3 ou de doxorubicine à différentes concentrations tel qu'indiqué pour 24 et 48 h. La lignée MCF-7 a été utilisée comme contrôle positif pour l'expression de CDKN1A. Une extraction protéique en fractions cytoplasmiques et nucléaires a été effectuée afin de visualiser l'expression protéique de TP53 et CDKN1A suite à une technique de Western Blot. La concentration du DMSO (contrôle négatif) ne dépasse pas 0,1%. TUB : tubuline (contrôle de charge cytoplasmique); H2A : histone 2A (contrôle de charge nucléaire); Doxo : doxorubicine; DMSO : diméthylsulfoxyde.

Discussion

L'expression de certaines USP est dérégulée dans notre cohorte de leucémies myéloïdes aiguës

Les connaissances sur les USP démontrent que plusieurs d'entre elles, dont les 21 sélectionnées dans cette étude, possèdent des fonctions intéressantes d'un point de vue de la cancérogenèse [13]. Toutefois, seulement quatre d'entre elles ont montré des modifications d'expression génique dans notre cohorte de LMA par rapport à l'expression détectée dans les moelles normales, soit *USP44*, *USP1*, *USP28* et *USP7*. L'absence de modifications d'expression génique relative des autres USP testées ne signifie pas qu'elles ne sont pas impliquées dans la LMA, puisque d'autres aspects tels que leur expression protéique, leur localisation cellulaire ainsi que leurs PTM pourraient aussi moduler leur rôle dans les cellules leucémiques. De plus, la technique de quantification par RT-qPCR utilisée dans ce projet possède plusieurs limites.

Premièrement, les échantillons de moelle osseuse de donneur normal ne sont pas des contrôles parfaits, étant donné l'hétérogénéité de ces cellules qui ne correspond pas nécessairement à celle des LMA. Cependant, cela reste un tissu normal accessible et est adéquat pour une étude d'expression génique en cancers hématologiques. Les cellules CD34 positives purifiées à partir de sang de cordon ombilical normal ou de moelle osseuse normale auraient pu aussi être utilisées. Toutefois le nombre important de cellules nécessaire pour ces expériences et leur disponibilité limitée au moment de notre étude ne permettaient pas leur utilisation.

Certaines techniques plus récentes, telles que l'analyse du transcriptome complet, possèdent plusieurs avantages par rapport à la technique de RT-qPCR quantitative pour étudier l'expression des gènes. Entre autres, cette technique ne nécessite pas de connaître les séquences, ni les gènes à étudier, puisqu'il y a analyse de tous les transcrits exprimés. Depuis le début de ce travail, les techniques de séquençage de nouvelle génération pour analyser le transcriptome complet ont grandement évolué et

sont devenues beaucoup plus accessibles. Ces techniques ont d'ailleurs participé à la découverte d'un grand nombre de nouveaux micro ARN [175]. De plus, le séquençage de nouvelle génération permet de détecter les réarrangements chromosomiques et les mutations. Ces données sont fort intéressantes dans le cas des LMA pour qui ces réarrangements sont des étapes clés de la tumorigenèse [43]. Toutefois ces techniques sont limitées par la longueur des séquences détectées et par le taux d'erreur du séquençage dû à l'étape d'amplification [176]. Des techniques telles que le système de détection d'expression NanoString ne possèdent pas l'étape d'amplification réduisant ainsi les erreurs, mais cette technique est limitée aux transcrits connus, tout comme les micropuces d'expression [177]. Bref, les techniques de séquençage du transcriptome complet nous permettraient d'analyser toutes les USP d'un échantillon leucémique en une seule expérience. De plus cette technique a le potentiel d'identifier de nouveaux transcrits alternatifs des USP, des transcrits de fusion impliquant les USP ainsi que des mutations de ces gènes.

Deuxièmement, notre étude a été effectuée à partir d'échantillons leucémiques de moelle ou de sang non purifiés. Il est bien connu que ces échantillons sont très hétérogènes [53], malgré un pourcentage de blastes élevé et la séparation des cellules mononuclées par un gradient de Ficoll avant la cryopréservation. L'utilisation de cellules plus immatures purifiées, telle que la fraction $CD34^+CD38^-$, pourrait être utilisée mais le nombre de cellules nécessaire aux études effectuées dans ce projet ne nous permettait pas une telle approche.

Pour les quatre USP dont l'expression génique est dérégulée, cette donnée n'est qu'un indice de leur implication potentielle dans les LMA. Des études fonctionnelles, telles que des études par interférence à l'ARN (ou RNAi), seront nécessaires afin d'affirmer que ces gènes sont impliqués ou non dans la leucémogénèse.

De plus, ces données ont été obtenues sur un nombre restreint d'échantillons possédant des caractéristiques précises. En effet, il faut tenir compte du biais de sélection qui a

enrichi notre cohorte principalement en LMA de type M1 (haut pourcentage de blastes) et exclut les LMA à translocations récurrentes, dont la pathogénèse est mieux étudiée.

Le choix des limites de significativité dans ce travail, soit inférieure à 0,5 pour une sous-expression et supérieure à 5 pour une surexpression a été établi de manière à diminuer les faux positifs et à détecter les changements significatifs dans l'expression génique dans des échantillons non purifiés. Ceci pourrait potentiellement expliquer pourquoi nous avons trouvé un petit nombre d'USP dont l'expression est modifiée dans notre cohorte de LMA. Parmi les USP étudiées, *USP44* est celle qui a démontré la plus grande variabilité d'expression.

Modification de l'expression de *USP44*

Le cycle cellulaire est essentiel pour la division des cellules tumorales. Plusieurs gènes impliqués dans les points de contrôle de ce système sont importants dans la tumorigénèse et la résistance aux traitements [178]. Le SAC assure l'attachement des chromosomes aux fuseaux mitotiques et leur bon alignement avant leur séparation lors de l'anaphase, stabilisant ainsi le génome. Dans ce point de contrôle, *USP44* joue un rôle au niveau du centrosome en débiquitinant CDC20, un régulateur négatif de l'APC/C. Cette DUB permet donc de mettre fin à ce point de contrôle. Elle a principalement été impliquée comme TSG dans les cancers du poumon [179]. Dans notre étude, une grande variabilité de son expression semble montrer son implication potentielle dans les LMA étudiées.

Dans la littérature, une sous-expression de ce gène a été observée entre autres, dans des adénocarcinomes pulmonaires. En effet, les souris *Usp44*^{-/-} présentent une augmentation du nombre de cancers de cinq fois, et ce particulièrement au niveau pulmonaire [180]. Dans notre étude, la sous-expression de *USP44* est surtout présente dans les leucémies monoblastiques et monocytaires aiguës et dans les LMA-MRC. De plus, une sous-expression de *USP44* est surtout associée aux LMA avec un caryotype normal : 79% (19/24) de ces cas montrent en effet une diminution significative de

l'expression de *USP44*. Une des trois lignées leucémiques étudiées, OCI-AML3, a aussi montré une sous-expression de ce gène. Ces données concordent avec le rôle de TSG connu de *USP44* [179, 180].

Nous avons également détecté une surexpression de *USP44* telle que déjà été notée dans des échantillons humains de leucémies à cellules T [181]. Dans notre étude, cette surexpression est associée aux LMA à différenciation minimale, sans maturation et avec maturation. Ce profil d'expression selon le type morphologique de leucémie observé dans notre cohorte de LMA, soulève l'hypothèse que des cellules myéloïdes moins différenciées (présentes particulièrement dans les échantillons de LMA à différenciation minimale, ainsi que les LMA sans maturation) pourraient mieux survivre et proliférer en présence du retard dans la division cellulaire dû à la présence accrue de cette USP [181]. Par ailleurs, les cellules myéloïdes plus différenciées qui seraient présentes dans les spécimens de LMA-MRC et de LMA à composante monocyttaire pourraient mieux survivre et proliférer malgré les erreurs de ségrégation des chromosomes associées à l'absence de cette DUB [179].

Nous pouvons également émettre l'hypothèse que les cellules ayant un plus grand nombre d'anomalies chromosomiques sont associées à une surexpression de *USP44*. Supportant cette idée, aucun des 24 échantillons de LMA à caryotype normal n'a montré une surexpression de *USP44*. De plus, une surexpression de ce gène a été détectée dans seulement 2 cas de LMA avec un caryotype non complexe sur 47 (4%) alors qu'elle était présente dans 26% des LMA avec un caryotype complexe (14/54) ($p=0,0119$). Dans cette étude limitée, il y a donc une corrélation significative entre l'augmentation de l'expression génique de *USP44* et le nombre d'anomalies au caryotype, tel que rapporté dans les leucémies de type T [181]. Ceci demeure à confirmer dans une plus grande cohorte de LMA.

Bref, ces résultats préliminaires suggèrent que la variation de l'expression de *USP44* dans les LMA étudiées pourrait faire partie d'un ensemble de modifications du cycle cellulaire reliées à la stabilité du génome tumoral. Si ce rôle est confirmé dans des

études fonctionnelles, une inhibition de cette enzyme dans le cadre d'une approche thérapeutique (dans les cas où elle est surexprimée), pourrait potentiellement mener à un plus grand nombre d'erreurs mitotiques suite à une ségrégation des chromosomes trop rapide, entraînant ultérieurement l'apoptose par catastrophe mitotique.

Sous-expression de *USP1*

Le système de réparation de l'ADN est très important pour le maintien de l'information génétique. Ce système est souvent altéré dans les cellules tumorales. De plus, la voie FANC/BRCA impliquée dans l'anémie de Fanconi en fait partie. *USP1* participe à cette voie en débiquitinant FANCD2, en plus de son rôle dans la diminution de la réparation de l'ADN par « translesion ».

Nous avons observé au sein de notre cohorte, une diminution de l'expression de *USP1* dans 44% (33/75) des cas. Cette diminution pourrait potentiellement entraîner l'augmentation de la réparation de l'ADN par « translesion », un processus menant à de nombreuses mutations ponctuelles. De plus, la diminution de *USP1* nuit probablement à la réparation de l'ADN par la voie de l'anémie de Fanconi qui répare principalement les liaisons inter-brins d'ADN. D'ailleurs, un phénotype de Fanconi ainsi que l'instabilité génomique sont présents suite à l'inactivation de *Usp1* murin [182]. Il est à noter qu'une sous-expression de *USP1* a déjà été rapportée dans des cas de leucémies [183].

Dans plusieurs autres types de cancer, une surexpression de ce gène a été détectée, entre autres dans les sarcomes, le mélanome et les cancers cervicaux et gastriques. Il a été suggéré d'inhiber cette voie dans le but de sensibiliser les cellules néoplasiques à la chimiothérapie. En effet, l'inhibition de USP1 dans certains types de cancer du poumon a montré qu'elle pouvait permettre de contrer la résistance de ces cellules au cisplatine [183]. En plus de cibler son activité débiquitinase, il est possible d'envisager de cibler cette enzyme en ciblant son interaction avec le «U2 small nuclear

ribonucleoparticule auxiliary factor 1 », un cofacteur important pour son activité catalytique [183, 184].

Une autre des cibles stabilisées par USP1 est le ID1 (« inhibitor of DNA-binding 1 »), un oncogène membre de la famille des protéines hélice-boucle-hélice ayant entre autres un rôle dans la prolifération cellulaire et dans le maintien des propriétés « souches » des cellules cancéreuses. ID1 est surexprimée dans certains cancers dont les cancers pancréatiques, et semble également être impliquée dans la leucémogénèse. D'ailleurs, des inhibiteurs d'USP1 ont été investigués afin de cibler ID1 dans des cellules leucémiques (quelques lignées et trois échantillons primaires) [185]. Cette étude de Mistry *et al.* a montré que USP1 était une bonne cible thérapeutique pour inhiber ID1. Il serait donc important de considérer l'expression basale de *USP1*, puisque la présence d'une sous-expression, tel qu'observée ici, pourrait affecter la réponse au traitement.

Le rôle potentiel d'une sous-expression de ce gène dans la tumorigénèse demeure à élucider. En fait, le stress à l'ADN fait partie des caractéristiques du cancer [35] et se présente souvent sous forme d'instabilité génétique. Il a été suggéré que cette caractéristique soit importante surtout au début du développement du cancer, permettant l'évolution rapide des différents clones [41]. De plus, l'utilisation accrue de la réparation par translesion pourrait permettre aux cellules de mieux tolérer ce stress en surpassant les dommages à l'ADN [13]. La surexpression quant à elle semble associée dans d'autres types de cancer, à la résistance aux agents créant des liens inter-brins d'ADN, tel que le cisplatine. Finalement, cette surexpression semble également reliée à un blocage de la différenciation, entre autres dans les ostéosarcomes, pouvant expliquer son rôle dans le développement tumoral [183].

Sous-expression de *USP28*

USP28 est une candidate intéressante comme cible thérapeutique dans différents cancers dont le cancer du sein et du côlon. Dans ces cancers, *USP28* possède un rôle oncogénique [57]. Toutefois, USP28 a également été proposée comme suppresseur de

tumeur puisque son absence bloque l'apoptose suite à un DSB par son action dans la voie CHEK2-TP53 [186]. Cette dichotomie est souvent présente pour les acteurs de la tumorigenèse, soulevant l'importance du contexte cellulaire, tel que noté aussi dans ce travail pour *USP44* et *CDKN1A*.

Dans notre analyse, nous avons trouvé une diminution de l'expression de *USP28* dans 21% (15/72) des cas, en plus de trois cas ayant une surexpression, en accord avec ces rôles opposés. D'une part, une sous-expression de *USP28* pourrait avoir comme conséquence des problèmes dans l'induction de l'apoptose favorisant la survie des cellules cancéreuses. En fait, il est important de comprendre que *USP28* possède plusieurs rôles régulateurs dans les différentes voies de contrôle de l'apoptose et que dans ces cellules, la balance des signaux pro- et anti-apoptotiques penche probablement pour un rôle global de suppresseur de tumeur, tel qu'il a été observé dans les cellules de cancer du poumon [186].

Cela est pertinent d'un point de vue thérapeutique puisque ces cellules ayant perdu l'induction de l'apoptose suite à un DSB pourraient être résistantes aux thérapies induisant ce type de dommages, tels que les radiations ionisantes et les agents s'intercalant entre les bases de l'ADN (anthracyclines). De façon intéressante dans notre cohorte, une moins bonne survie globale des patients a été observée dans les cas ayant une sous-expression de *USP28* ($p=0.0028$, $E=11$, $C=1$). Une analyse du taux de CR ainsi que de l'incidence de rechute selon l'expression de *USP28* pourrait être effectuée afin de nous indiquer plus précisément son impact sur la réponse au traitement. De plus, comme l'ubiquitination est une PTM qui est réversible, nous pouvons proposer la notion qu'une thérapie ciblant l'Ub ligase complémentaire à *USP28* pourrait peut-être favoriser la mort cellulaire.

D'autre part, une surexpression de *USP28* pourrait possiblement participer à la stabilisation de *MYC*, un oncogène important dans les premières étapes de la carcinogenèse [187]. Dans les cancers hématologiques, ce gène est impliqué entre autres, dans la t(8;14) détectée dans certains lymphomes non-hodgkiniens (en

particulier le lymphome de Burkitt) et les leucémies aiguës lymphoblastiques matures de type B [188]. Il est intéressant de constater que dans les trois lignées cellulaires leucémiques étudiées, il y a une surexpression de cette USP suggérant que la stabilisation de *MYC* pourrait être importante dans le maintien de ces lignées hématologiques. Cela reste à confirmer par des études fonctionnelles.

Dans les cas de cancer où *USP28* joue le rôle d'un oncogène, il serait intéressant de cibler cette enzyme par une petite molécule et ainsi déstabiliser *MYC*. Ce concept pourrait être bénéfique dans les cas de cancers où la surexpression de *MYC* (soit par translocation ou par amplification) est importante dans la tumorigenèse. Cependant, il faudrait s'assurer de la dépendance de ces cellules envers *USP28* et/ou *MYC*. Afin de vérifier leur rôle dans ces cellules, il serait intéressant d'analyser si l'inactivation de *MYC* et/ou de *USP28*, par exemple par un ARNi, mènerait à une perte de division ou de croissance cellulaire.

***TP53* et les principaux responsables de son statut d'ubiquitination, *USP7* et *MDM2*, sont peu modulés dans notre cohorte de LMA**

TP53

Dans les cancers hématologiques, la perte de fonction de *TP53* est fortement associée à une résistance à la chimiothérapie et à un pronostic défavorable des patients. Dans l'ensemble des LMA les anomalies de ce gène sont plus rares que dans les tumeurs solides et sont détectées dans environ 10% des cas selon les études. Toutefois la fréquence des altérations de ce gène dans le groupe génétique de LMA avec caryotype complexe s'élève à 70% [83, 84].

Les cellules cancéreuses possèdent d'autres altérations que la délétion et les mutations de *TP53* qui peuvent entraîner un dysfonctionnement de la voie *TP53* [71]. Le contrôle de *TP53* au niveau protéique est alors crucial, et le système de l'ubiquitine-protéasome est un acteur principal dans ce contrôle [107]. Le deuxième aspect de ce projet, porte sur l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A*. En effet, nous nous sommes intéressés aux

contrôles de TP53 par son ubiquitination (par MDM2) et sa déubiquitination (par USP7). De plus, nous avons sélectionné l'une de ces cibles transcriptionnelles principales, soit *CDKN1A*.

Dans les cas de leucémies où aucune mutation de *TP53* n'est détectée, plusieurs hypothèses peuvent expliquer un mauvais fonctionnement de cette voie. D'abord, il est possible que des mutations ne soient pas détectées, puisqu'elles sont à l'extérieur des régions normalement analysées. En effet, dans plusieurs des études publiées le séquençage du gène complet (y compris les régions non codantes régulatrices) n'a pas été effectué. Les exons les plus souvent analysés incluent les exons 4 à 10 correspondant en grande partie au domaine de liaison à l'ADN [84]. Avec les nouvelles technologies de séquençage et d'analyse du transcriptome et du génome complets, la fréquence des mutations de *TP53* dans les LMA pourrait être plus élevée.

Dans notre étude, nous avons détecté une sous-expression de *TP53* dans certains échantillons de LMA. Ceci peut être relié à des mutations ou à une altération des facteurs de transcription qui régulent la transcription de *TP53*. Ces cas se retrouvent particulièrement dans le groupe des LMA-MRC et des LMA avec un caryotype complexe, ce qui concorde avec la littérature associant les anomalies de *TP53* et ces types de leucémies [42]. L'analyse des mutations de *TP53* par séquençage et la recherche de délétions de ce gène par FISH n'ont pas été effectuées de routine pour caractériser ces échantillons. Cependant, notre étude documente des cas de LMA avec une sous-expression de *TP53*, contrairement à ce que rapporte Seliger *et al.* [111].

Il est à noter que la différence entre les positions des amorces ne semble pas expliquer cette discordance de résultats. En effet, la région analysée dans l'étude de Seliger *et al.* couvrait les exons 5 à 8 [111], tandis que nos amorces ciblaient les exons 10 et 11. En théorie, nos amorces nous permettaient de détecter les trois variants α , β et γ résultant d'épissages alternatifs à la fin du 9^{ième} exon, ainsi que les formes tronquées en N-term ($\Delta 40$, $\Delta 133$ et $\Delta 160$). La position de la première amorce dans l'étude de Seliger *et al.* ne permettait toutefois pas de détecter les formes $\Delta 133$ qui ont été décrites dans

certains cancers dont le cancer du sein [189]. Cette discordance de résultats pourrait par contre être expliquée par l'utilisation de techniques différentes. En effet, dans l'étude de Seliger *et al.*, une RT-PCR multiplex avec quantification des bandes sur gel d'agarose a été utilisée alors que nous avons utilisé une analyse de qPCR en temps réel. Notre technique est plus précise, car l'étape de quantification ne se fait pas seulement après l'atteinte du plateau d'amplification de la PCR.

Il est possible que la diminution de l'expression *TP53* que nous avons observée dans notre cohorte explique, du moins en partie, la mauvaise réponse au traitement, puisque la cellule n'est pas outillée correctement pour induire l'apoptose *TP53*-dépendante. Toutefois, malgré une expression basale plus faible, la cellule pourrait induire correctement *TP53* suite à un traitement anti-néoplasique. C'est l'une des raisons pour laquelle nous avons développé dans ce travail un modèle *in vitro* permettant d'observer au niveau protéique la stabilisation et l'induction de la protéine *TP53* suite à un traitement. Une moins bonne survie a été observée dans ce groupe de patients ayant une sous-expression de *TP53*. Toutefois seulement un petit nombre de cas (8 échantillons de LMA avec une sous-expression) a été inclus dans cette analyse, menant à une valeur *p* non significative ($p=0,3015$). Un nombre plus élevé de cas sera nécessaire pour confirmer ces résultats, qui vont toutefois dans le même sens que la littérature soutenant que les altérations de *TP53* sont associées à un moins bon pronostic dans les LMA [42, 84].

De manière intéressante, dans les deux lignées leucémiques analysées, où il y a présence de mutations de *TP53* (Kasumi-1 et Mono-Mac1 [190]), nous avons détecté une forte expression protéique de *TP53*, mais sans surexpression génique, rappelant que l'expression génique n'est pas toujours corrélée avec l'expression protéique, surtout pour les gènes comme celui-ci qui ont un temps de demi-vie très court, soit de moins de 30 minutes [191].

D'autre part, dans les cas de LMA où l'expression génique de *TP53* reste normale, sa fonction pourrait être altérée [71]. Dans ces cas, *TP53* pourrait ne pas effectuer ses

fonctions normalement, soit en raison d'une localisation aberrante, soit en raison d'une liaison anormale avec ses partenaires ou encore en raison d'une dégradation trop précoce. Nous avons donc investigué deux membres importants qui contrôlent l'expression protéique de TP53, c'est-à-dire l'Ub ligase de TP53 (*MDM2*) et sa DUB principale (*USP7*).

USP7

Dans notre cohorte, nous avons observé une diminution de l'expression de *USP7* dans 8% des cas (9 cas sur 111). Toutefois la diminution relative n'était pas sous la valeur de 0,25. Cela concorde avec l'hypothèse qu'une diminution partielle plutôt qu'une absence d'expression de ce gène favorise la tumorigenèse. En fait, une diminution trop importante, tout comme une surexpression, mène à la stabilisation de TP53 [96]. Nous n'avons pu établir le lien entre l'expression de *USP7* et la survie étant donné le faible nombre de cas avec une dérégulation de ce gène dans notre cohorte. Pour les cas ayant une sous-expression de *USP7*, il serait pertinent d'évaluer si cela est associé avec une diminution de son expression protéique ainsi qu'avec une déstabilisation de TP53.

Il serait intéressant de vérifier si l'expression et les fonctions de TP53 seraient rétablies par un inhibiteur de *USP7* dans des cellules de LMA. En effet, plusieurs études ont démontré dans les dernières années, qu'un inhibiteur ciblant *USP7* pourrait être bénéfique pour le traitement de différents cancers [96, 123, 133, 136]. Ceci sera discuté plus en détails dans une section ultérieure sur les perspectives thérapeutiques. Pour ce, une analyse de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et du cycle cellulaire pourrait être effectuée suite à un traitement des cellules leucémiques *in vitro* avec un inhibiteur de *USP7* comme cela a été effectué avec des cellules d'ostéosarcome et de cancer du colon par Reverdy *et al.* [133].

De manière intéressante, l'analyse de l'expression de *USP7* a montré une forte expression dans la lignée HL-60, une lignée déficiente pour le gène *TP53*. Ce résultat rappelle que *USP7* possède différents rôles oncogéniques indépendants de sa cible

TP53. Un inhibiteur de USP7 pourrait également être bénéfique malgré la présence de délétions ou de mutations de TP53, car il a été suggéré que les inhibiteurs de USP7 pourraient avoir un effet anti-tumoral indépendant de TP53 [96, 136].

MDM2

Dans notre cohorte nous avons observé que 10% des cas étudiés (8 cas sur 79) présente une altération de l'expression de *MDM2*. Lorsqu'une surexpression de *MDM2* est détectée nous pouvons suggérer qu'elle participe à la déstabilisation de TP53 et donc au blocage de ses fonctions, tel que proposé dans la littérature [96]. Plusieurs cas de cancers ayant une surexpression de *MDM2* ont été répertoriés, incluant des cas d'amplification génique dans les sarcomes et les cancers du sein [137]. Dans les LMA, une amplification de ce gène est rare, mais des cas avec une surexpression génique ont été décrits, pouvant aller jusqu'à 53% des spécimens selon les publications [111, 192, 193]. Dans notre étude, le critère de positivité établi pour une surexpression était plus élevé que ceux utilisés dans ces études, où un ratio MDM2/actine de 20% était suffisant, alors que les ratios des contrôles normaux utilisés variaient jusqu'à 16% [193] ou même jusqu'à 20% [192]. Malheureusement, dans l'étude de Seliger *et al.* la limite de significativité n'est pas mentionnée [111]. De plus, la technique de quantification dans ces trois études diffère de la nôtre puisqu'il s'agissait de RT-PCR multiplex avec quantification des bandes sur gel d'agarose. Nous avons utilisé la technique de quantification en temps réel qui est plus précise.. Toutefois, ces études concordent avec le fait qu'une surexpression de *MDM2* est présente dans un certain pourcentage de LMA. Cette surexpression pourrait contribuer au dysfonctionnement de TP53 dans les LMA.

Il ne faut toutefois pas négliger les autres rôles de MDM2 qui sont indépendants de TP53. Par exemple, MDM2 contribue aussi à la dégradation de RB1, ce qui peut faciliter l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire [194]. Il est fort probable que la surexpression de MDM2 participe à la tumorigenèse par différentes voies cellulaires.

C'est pourquoi il est intéressant de cibler ce type d'enzymes pour la thérapie des cancers.

Dans notre étude, nous avons également détecté trois cas avec une sous-expression de *MDM2* parmi 79 échantillons. Dans ces cas, il est possible qu'il y ait une mutation de *TP53*. En effet, en présence d'une mutation de *TP53*, *MDM2* joue un rôle de TSG puisque *TP53* muté est instable et a besoin d'être stabilisé par *MDM2* pour réaliser pleinement son potentiel oncogénique [195]. Afin de valider cette hypothèse, un séquençage de *TP53* pourrait être effectué sur ces spécimens.

Les données d'expression protéique dans les lignées cellulaires leucémiques testées concordent avec ces hypothèses. En effet, dans la lignée OCI-AML3, où *TP53* est WT, *MDM2* est fortement détectée par l'Ac ciblant sa partie centrale (SMP14, voir figure 25) comparativement aux autres lignées testées, dont HL-60 où *TP53* est absent (délétion biallélique) et Kasumi-1 qui possède la mutation c.743G>A [190]. Toutefois, la protéine détectée par cet Ac ne possède pas le poids moléculaire théorique attendu de 90 kDa. Selon une analyse des isoformes les plus courantes de *MDM2* [196], peu d'entre elles peuvent être reconnues par l'Ac SMP14 ciblant la région de la protéine contenant les signaux de localisation cellulaire. La protéine de 45 kDa détectée dans notre étude n'a pas été reconnue par l'Ac C-18 qui cible la région C-term de *MDM2* (voir figure 25). En effet, lors de la superposition des deux images provenant de la même membrane, la bande de 45 kDa détectée par l'Ac SMP14 se retrouve entre les deux bandes détectées par l'Ac C-18. Il est donc possible que cette protéine soit une forme tronquée due à un codon stop ou à un clivage enzymatique. Il est à noter que l'isoforme de 75 kDa détectée dans la lignée MCF-7 avec l'Ac SMP14 dans notre étude, semble correspondre à la forme tronquée en N-term décrite dans la littérature [140]. Cependant, elle aurait dû être détectée par l'Ac ciblant la partie C-term, suggérant que ce serait peut-être également une forme tronquée en C-term comme cela semble être le cas pour l'isoforme de 45 kDa.

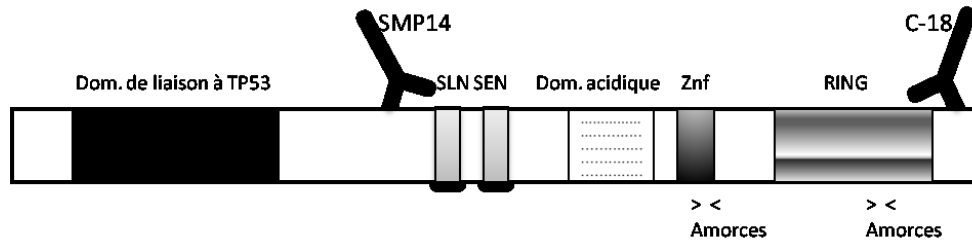


Figure 25. Représentation schématique de MDM2 ainsi que des anticorps et des amorces utilisés. Cette schématisation présente les différents domaines de la protéine complète de MDM2. Les "Y" inversés représentent la région ciblée par les deux anticorps utilisés dans ce travail (SMP14 et C-18). Les "> <" représente la position des amorces utilisées pour la RT-qPCR. À noter que cette image n'est pas à l'échelle. Dom.: domaine; SLN: signal de localisation nucléaire; SEN: signal d'exclusion nucléaire; Znf: " Zinc finger "; RING: " really interesting new gene" (domaine ubiquitine ligase).

L'utilisation de l'Ac C-18 ciblant la partie C-term (voir figure 25) de la protéine détecte un plus grand nombre d'isoformes, dont certaines sous forme de doublet suggérant la présence d'ubiquitination de l'isoforme de MDM2 autour de 50 kDa et de 40 kDa. Finalement, cet Ac détecte également une protéine ayant un poids autour de 35 kDa. L'isoforme de 50 kDa a déjà été associée à la stabilisation de CDKN1A et à un rôle oncogénique de MDM2 [197], alors que les plus petites isoformes détectées par l'Ac ciblant la partie C-term peuvent correspondre aux multiples transcrits auxquels il manque la partie centrale de la protéine suite à un épissage alternatif et/ou anormal [196]. Ces isoformes qui n'ont souvent pas le domaine complet de liaison à TP53, ni les signaux de localisation nucléaire et cytoplasmique, ont des effets peu connus sur la tumorigenèse des LMA. Elles ont été associées dans certains cancers dont les cancers ovariens, à un état avancé de la maladie. De plus, ces isoformes semblent avoir un potentiel transformant [198-200]. Finalement, les fonctions de ces isoformes et leur répercussion par rapport aux effets des inhibiteurs de MDM2 dans les cellules néoplasiques sont encore mal compris.

Dans notre analyse RT-qPCR, nous avons tenté de déceler différents profils d'expression de *MDM2* en ciblant deux régions géniques différentes (voir figure 25). Notre étude a démontré que l'expression était très similaire entre les deux groupes de données, menant à un coefficient de corrélation de 0,94 ($p < 0,001$). Les amorces ont été sélectionnées pour déceler une variation entre les formes longues (détectées par le

couple d'amorces en C-term) et les formes tronquées en C-term. Il aurait été intéressant de cibler la région centrale de la protéine souvent manquante dans les isoformes associées au cancer. Cependant, ces régions contiennent des domaines communs, tels qu'un domaine acide ou des domaines de localisation cellulaire, diminuant la spécificité des amorces. De plus, en N-term, le domaine de liaison à l'ADN ne nous permettait pas d'obtenir des amorces spécifiques étant donné le grand nombre de partenaires de TP53 ayant un domaine similaire.

Une analyse exhaustive des différents transcrits de *MDM2* pourrait contribuer à démontrer des associations potentielles entre certaines isoformes et les différents sous-types de LMA, le pronostic ou la réponse thérapeutique aux inhibiteurs de MDM2. Ces données seraient particulièrement intéressantes puisque ces isoformes pourraient mener à une résistance à ces molécules thérapeutiques [199].

En bref, les modulations de l'expression génique de *MDM2* sont peu fréquentes dans notre cohorte, et ce avec les deux paires d'amorces utilisées, tout comme pour *TP53* et *USP7*. Toutefois, ces gènes demeurent des cibles intéressantes d'un point de vue thérapeutique. *USP7* et *MDM2* possèdent plusieurs autres cibles importantes en dehors de l'axe étudié, ce qui confère un effet plus global à la thérapie en permettant de cibler plusieurs voies en même temps [96, 123, 158, 170]. Il sera question de leur potentiel en tant que cible thérapeutique dans la section sur les perspectives thérapeutiques. Dans notre cohorte, c'est l'expression de *CDKN1A*, en aval de *TP53*, qui est le plus modulée dans les échantillons primaires de LMA étudiés.

***CDKN1A* est le gène de l'axe *USP7-MDM2-TP53-CDKN1A* le plus modulé dans notre cohorte de LMA**

Tel que discuté dans l'introduction, *CDKN1A*, tout comme les autres membres de l'axe étudié, possède des rôles opposés dans les cancers selon le contexte cellulaire [144, 145]. Notre cohorte représente bien cette dualité puisque 33% des cas étudiés (26 cas sur 78) sont surexprimés et 9% sont sous-exprimés (7 sur 78). La surexpression était

présente particulièrement dans les LMA de type monoblastique et monocyttaire, concordant avec la littérature où une association avec les LMA de la classification FAB M4 et M5 a été démontrée [201]. Dans cette étude, les auteurs ont également observé que la localisation de CDKN1A était plutôt cytoplasmique dans ces blastes et qu'elle interagissait entre autre avec ASK1, une kinase impliquée dans l'apoptose, soutenant un rôle oncogénique de CDKN1A cytoplasmique [201]. Ce rôle oncogénique a également été décrit dans des cellules de cancer de la prostate et du sein [144].

Dans notre étude, la surexpression semble associée à une moins bonne survie, mais le faible nombre de cas étudiés ne nous permet pas d'émettre une conclusion finale. Il est à noter que *CDKN1A* est aussi surexprimé dans les leucémies avec translocations réarrangeant les gènes codant pour les « core binding factors » (CBF). Dans ces leucémies à meilleur pronostic, *CDKN1A* est induit par ces fusions et joue un rôle de suppresseur de tumeur. D'ailleurs en son absence, dans les cellules *Cdkn1a*^{-/-} de souris, la fusion RUNX1- RUNX1T1 est transformante [144]. Cependant, ce groupe de LMA n'a pas été inclus dans notre étude. Les rôles potentiellement différents de *CDKN1A* dans les LMA pourraient être reliés au contexte cellulaire ou à la localisation cellulaire de la protéine, ce qui devra être étudié lors d'études fonctionnelles. L'expression cytoplasmique a surtout été associée à un effet oncogénique, tandis que l'expression nucléaire de CDKN1A est le plus souvent associée à son effet anti-tumoral [145]. Il serait donc intéressant de voir si l'expression de la protéine est localisée différemment dans les cellules de LMA avec réarrangements des CBF et avec d'autres types d'anomalies génétiques. En lien avec ceci, nous avons donc élaboré un système *in vitro* pour étudier l'expression protéique de CDKN1A dans les cellules leucémiques suite à une séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires. De plus, la demi-vie de la protéine CDKN1A étant très courte [145], une surexpression génique n'est pas forcément associée à une surexpression protéique. C'est pourquoi une analyse au niveau protéique est primordiale pour ce gène. À noter qu'aucune des lignées leucémiques testées n'a démontré une expression protéique de CDKN1A. Il est possible que dans ces lignées, le rôle de suppresseur de tumeur de CDKN1A avec arrêt de la croissance cellulaire soit un frein important pour l'établissement de la lignée

cellulaire. L'induction de l'expression de *CDKN1A* par transfection du gène dans ces cellules avec une étude du cycle cellulaire pourrait contribuer à confirmer ou infirmer ceci.

Dans l'hypothèse où une sous-expression de *TP53* et une surexpression de *CDKN1A* seraient associées à une survie moins favorable de façon significative dans une grande cohorte de LMA, cela pourrait sembler contradictoire puisque *CDKN1A* est une des cibles principales de TP53. Toutefois, la surexpression de *CDKN1A* telle que notée dans notre étude n'est pas le produit d'une activation de TP53 suite à une réponse au stress comme dans les cellules saines suite à un dommage à l'ADN [144, 145]. Nous avons plutôt étudié l'expression basale de *CDKN1A*, pouvant être induite par différents facteurs de transcription et/ou par différents oncogènes dont ceux de la famille MECOM [144, 161].

Lors d'un traitement anti-néoplasique, l'apoptose TP53-dépendante est très importante pour le succès de la thérapie. Par ailleurs, *CDKN1A* activée par TP53 peut protéger les cellules de l'effet de la thérapie par son effet cytostatique. Normalement cette activation est balancée avec celle des autres cibles de TP53 et lorsque le dommage persiste, la balance des messages de TP53 active le processus de mort cellulaire [144]. Cependant, quelles seront les conséquences d'une thérapie dans les cellules qui ont une expression basale élevée de *CDKN1A*? Afin d'adresser cette question, nous avons élaboré un système de traitement *in vitro* des cellules leucémiques qui est présenté dans la section suivante.

Le modèle expérimental développé permettra d'évaluer *in vitro* si le niveau basal d'expression de *CDKN1A* a un impact sur la réponse des cellules leucémiques à la thérapie

Dans le but d'évaluer l'implication de l'axe USP7-MDM2-TP53-*CDKN1A* dans les LMA et plus spécifiquement dans la réponse des cellules leucémiques à la thérapie, nous avons élaboré un modèle expérimental permettant d'évaluer la capacité des

cellules de LMA de stabiliser TP53, d'induire CDKN1A et d'entraîner une réponse apoptotique suite à un traitement *in vitro* à la doxorubicine, une anthracycline, et/ou au nutlin 3, un stabilisateur non génotoxique de TP53. De plus, nous avons comme objectif d'évaluer l'altération de cette réponse aux molécules chimiques en présence d'une surexpression de *CDKN1A*. Étant donné que CDKN1A est une protéine instable et dont la localisation cytoplasmique et/ou nucléaire est importante dans la pathogenèse des cancers, nous avons aussi comme but d'étudier l'expression protéique en tenant compte de la localisation cytoplasmique et nucléaire de CDKN1A.

Analyse de l'effet cytostatique et cytotoxique

Le premier objectif de ces expériences était d'analyser l'effet cytostatique et cytotoxique des composés chimiques sur les cellules leucémiques *in vitro*. Le décompte cellulaire nous permet principalement d'observer s'il y a ou non croissance cellulaire. Dans les expériences avec les lignées cellulaires (OCI-AML3 : *TP53* WT, et HL-60 : délétion bi-allélique du gène *TP53*), nous avons sélectionné différentes doses de traitement des cellules avec la doxorubicine et le nutlin 3. Nos données présentées dans la figure 19, démontrent qu'en présence de faibles doses de ces composés, les cellules de lignées ont été capables de se diviser et de croître en 48 heures. Cependant, cela ne semble pas être le cas avec de plus fortes doses, montrant un effet cytostatique dose dépendant pour la lignée OCI-AML3, mais pas pour la lignée HL-60. Cette dernière démontre en effet, une croissance cellulaire entre 24h et 48h, et ne semble pas affectée par la dose des composés. Il est à noter qu'aucun test statistique n'a été effectué pour confirmer ces différences. Nous aurions pu effectuer un test d'analyse de variance à un facteur répété (facteur temps) et un facteur inter-sujet (facteur dose). Nous pouvons proposer qu'une lignée semble sensible et l'autre lignée semble résistante d'un point de vue de l'effet cytostatique observé pour ces deux molécules.

De manière intéressante, il semble que ces deux lignées aient répondu par la mort cellulaire au traitement *in vitro* avec le nutlin 3, puisque la figure 20 présente de belles courbes de diminution de la viabilité cellulaire analysée avec le bleu de trypan et

démontrant un effet dose dépendant. Cependant, nous n'avons pas vu un effet dose dépendant pour la doxorubicine. Ceci suggère soit que les doses utilisées dans cette étude ne sont pas suffisantes, soit que les deux lignées y sont résistantes. Le fait qu'OCI-AML3 possède une version non mutée de *TP53* ne veut pas nécessairement dire qu'elle sera sensible à ce type de traitement. En fait, les lignées ont de multiples altérations génétiques pouvant être associées à divers types de résistance aux agents anticancéreux [202]. De plus, nous avons observé un effet cytostatique dose dépendant pour la doxorubicine, suggérant que l'étendue des doses utilisées est adéquate. Les doses de doxorubicine couvrent aussi les doses pouvant être atteintes *in vivo* [112].

Nous nous attendions à une absence de réponse des cellules HL-60 au traitement avec le nutlin 3 en raison de la délétion biallélique de *TP53* dans cette lignée. Selon nos résultats préliminaires, il est intéressant de voir que même en l'absence de *TP53*, il semble y avoir une réponse par apoptose. Le nombre d'expériences devra être augmenté à un minimum de 3 avant de conclure sur la sensibilité de ces cellules au nutlin 3. Plusieurs articles ont proposé des voies d'induction de l'apoptose indépendantes de *TP53*. Par exemple, dans les cellules de carcinome hépatique, le nutlin 3 induit l'apoptose par TP73 (« tumor protein 73 ») [118]. Par ailleurs, dans les cellules de cancer du colon, l'induction de l'apoptose par le nutlin 3, indépendamment de la présence de *TP53*, se produit par l'induction de *TP73* et *E2F1* qui activent *BBC3* (anciennement *PUMA*) et *SIVA1* (facteur inducteur de l'apoptose). Il serait donc intéressant, si cette sensibilité au nutlin 3 se confirme, d'investiguer par quel mécanisme le nutlin 3 induit l'apoptose dans cette lignée cellulaire. Une analyse protéique du clivage de la caspase-9, de l'induction de TP73 et de SIVA1 pourrait d'abord être faite par Western Blot afin d'investiguer ces hypothèses [173].

Afin de mieux quantifier l'apoptose, nous avons effectué une analyse en cytométrie de flux suite à un marquage des cellules à l'annexine V et au PI (figure 21). Nous n'avons malheureusement pas pu effectuer un minimum de trois expériences pour chaque temps et pour chacune des deux lignées et une analyse statistique n'a donc pas été complétée pour cette partie du travail. Nos résultats préliminaires suggèrent que le

même type de réponse est observé dans les deux lignées, malgré une donnée aberrante pour la dose de 60 μM de nutlin 3 avec les cellules de la lignée HL-60. Ceci est probablement dû à une erreur de manipulation, rappelant l'importance du nombre d'expériences à effectuer pour valider un résultat.

De plus en plus de données sur les modulateurs de TP53, comme l'inhibiteur de MDM2 utilisé ici, montre que le traitement lorsqu'utilisé en agent seul n'est pas efficace à long terme. Il doit donc être combiné aux thérapies standards comme les anthracyclines [118, 147, 163, 174]. C'est pourquoi nous avons évalué différentes combinaisons de doses des deux composés. La figure 22 présente la combinaison des doses atteignables *in vivo* pour la doxorubicine avec différentes doses de nutlin 3. On note un effet de synergie sur la survie cellulaire pour OCI-AML3, mais pas pour la lignée HL-60 ni les cellules primaires de LMA testées. Cette différence de réponse pour les deux lignées concorde avec la littérature qui soutient que la présence de TP53 non muté est nécessaire pour cette synergie [112, 119]. Le nombre d'expériences étant trop faible, nous n'avons pu effectuer un test statistique le confirmant. Les données concernant OCI-AML3 semblent indiquer que nous devrions choisir l'une des combinaisons suivantes, soit 10 ou 20 μM de nutlin 3 avec 10 ou 20 nM de doxorubicine dans de futures expériences. Un test statistique nous permettra de choisir la combinaison de doses pour laquelle l'impact serait le plus élevé et le plus statistiquement significatif.

Analyse de l'induction protéique de TP53 et de CDKN1A

Le deuxième objectif de ces expériences est l'analyse de l'expression et de la localisation des protéines TP53 et CDKN1A. D'une part, la localisation cytoplasmique de la protéine CDKN1A a été associée dans la littérature à une moins bonne réponse aux traitements anti-cancéreux [145]. Or l'impact d'une présence déjà accrue de cette protéine, tant au niveau cytoplasmique que nucléaire, n'est pas connu sur la réponse aux traitements anti-néoplasiques dans les LMA. Les modèles de souris ont montré que l'absence de Cdkn1a bloque le développement spontané de lymphomes dans les

modèles *Atm* $-/-$ ou *Tp53* $-/-$ soutenant son rôle oncogénique potentiel dans ce type de cancer [144]. Par contre, il a été observé que les inhibiteurs du protéasome induisent l'apoptose en partie grâce à l'accumulation de *CDKN1A* dans les LMA, lui conférant un rôle suppresseur de tumeur [143]. Finalement, Zhang *et al.* ont montré que dans 100 échantillons de LMA, une surexpression protéique de *CDKN1A* était détectée dans 17 cas et qu'elle était associée à une moins bonne réponse au traitement anticancéreux [203]. Par contre dans cette dernière étude, la localisation cellulaire de la protéine n'a pas été analysée.

Pour la lignée OCI-AML3, nous avons observé, tel qu'attendu, une stabilisation de TP53 dès le temps 24 heures et une augmentation de *CDKN1A* nucléaire détectée à 48 heures suite au traitement à la doxorubicine (figure 23). Pour le nutlin 3, l'activation de TP53 et de *CDKN1A* est détectable dès 24 heures. Ces données supportent le choix des différentes doses pour ces deux molécules et démontrent que le système développé dans cette étude est réalisable pour évaluer *in vitro* la réponse des cellules leucémiques à ces composés.

Notre système a également été testé avec un échantillon primaire de LMA. Pour ces échantillons, nous devons diluer un peu plus les cellules au temps zéro puisque nous avons un nombre limité de cellules. Nous avons toutefois réussi à obtenir suffisamment de cellules pour chaque condition afin d'effectuer les différentes étapes y compris l'extraction protéique en fractions.

Ces expériences pourront contribuer à répondre à plusieurs hypothèses. Mais, tout d'abord, l'association entre la surexpression de *CDKN1A* et un pronostic défavorable doit être évaluée dans une plus grande cohorte de LMA. Il est possible que cette association soit réelle, puisqu'il a déjà été démontré que l'expression protéique de *CDKN1A* dans les LMA était associée avec une moins bonne réponse au traitement et avec un pronostic diminué [203]. De plus, il est possible que sa localisation protéique soit surtout cytoplasmique dans les échantillons primaires, étant donné l'association

entre cette localisation et ses fonctions oncogéniques, entre autres par ses interactions avec ASK1 [145, 201].

De plus, la stabilisation de TP53 par un agent, tel que le nutlin 3, seul ou en combinaison avec une anthracycline pourrait rétablir l'équilibre des cibles de TP53 et permettre la mort cellulaire malgré une présence accrue de CDKN1A. En fait, une étude de Xia *et al.* sur sept lignées cellulaires de cancers solides variés a montré que CDKN1A ne semblait pas protéger les cellules de l'apoptose induite par un agent non génotoxique, tel que le nutlin 3 [204]. Cette étude contraste avec les travaux précédents qui utilisaient un stress génotoxique (tel que celui induit par les anthracyclines) pour étudier l'impact de la surexpression de CDKN1A.

Il sera intéressant d'observer si la réponse au traitement causant une activation de TP53 suite à un dommage à l'ADN, comme c'est le cas avec les anthracyclines, ou suite à une stabilisation de TP53 par le nutlin 3 sera comparable. En effet, selon la voie d'activation de TP53, la cinétique et la nature de l'activation peuvent varier. De plus, lors de la combinaison des deux molécules, la localisation de CDKN1A pourrait être altérée. Étant donné que sa localisation et ses PTM en plus du contexte cellulaire dans lequel cette protéine agit semblent varier selon le type d'induction de TP53 [204], il est possible qu'un traitement stabilisant directement TP53, tel que le nutlin 3, facilite l'apoptose induite par un traitement ciblant TP53 suite à un dommage à l'ADN. En bref, il est possible que la stabilisation supplémentaire de TP53 par la présence du nutlin 3 mène à un déplacement de CDKN1A au noyau et à une mort cellulaire plus efficace.

Afin d'adresser ces hypothèses, il faudra d'abord vérifier l'expression protéique de plusieurs échantillons de LMA ayant une surexpression de *CDKN1A*. En absence de surexpression protéique, il est tout de même possible que la réponse au traitement soit altérée. S'il y a surexpression protéique de CDKN1A, il serait alors intéressant d'observer sa localisation protéique et de vérifier si elle est modifiée au cours des traitements avec une anthracycline et avec le nutlin 3. Nous anticipons une bonne

réponse au traitement si la protéine est localisée au noyau avant le traitement ou suite aux traitements, puisque cette localisation est associée à l'induction de l'apoptose [205]. Inversement, nous attendons une moins bonne réponse aux traitements si CDKN1A est localisée dans le cytoplasme, puisque cette localisation a été observée dans différents cancers dont celui du sein et est associée avec l'agressivité du cancer et sa résistance aux thérapies standards [144]. Il est aussi possible que peu importe sa localisation, la surexpression de CDKN1A ait un effet sur la réponse aux traitements.

Un des objectifs de ce projet était de mettre au point les différentes techniques pour développer un modèle expérimental de traitement des cellules leucémiques avec des composés chimiques afin d'analyser *in vitro* la réponse à ces molécules. Nous avons obtenu une technique d'extraction en fractions cytoplasmiques et nucléaires efficace et nous avons optimisé les étapes de migration protéique et de transfert sur membrane pour les protéines incluant celles de faible poids moléculaire, telles que CDKN1A. Finalement, nous avons sélectionné des doses et des temps de traitement pour les deux composés chimiques étudiés permettant d'observer l'activation de TP53.

Perspectives thérapeutiques

Potentiel thérapeutique des USP

Notre étude demeure très préliminaire et donne des pistes quant à l'implication de certaines USP dont USP44, USP28 et USP1. Une analyse du transcriptome complet dans un grand nombre de leucémies telle que présentement effectuée dans le projet Leucegene en partenariat avec l'IRIC, donnera une information plus juste quant à l'altération de l'expression génique de ces USP dans les LMA. Des études fonctionnelles devront, par la suite, être effectuées afin de confirmer leurs rôles dans la leucémogénèse ou dans la modulation de la réponse aux traitements. Une meilleure compréhension de leurs interactions pourra également permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Par exemple, si la sous-expression d'USP28 est bien

impliquée dans le développement tumoral, l'Ub ligase complémentaire ou certaines de ces cibles pourraient devenir de bonnes cibles thérapeutiques.

Potentiel thérapeutique de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A

Ce travail ainsi que plusieurs études portant sur le fonctionnement de la réponse apoptotique et sur ce qui l'influence ont comme principal objectif d'offrir éventuellement de nouveaux traitements aux patients atteints de LMA ou de mieux sélectionner quel patient bénéficierait de tel ou tel traitement. Tel que déjà mentionné, l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A offre une multitude de possibilités afin d'améliorer le traitement des cancers incluant les LMA.

Premièrement, USP7 est une cible particulièrement intéressante. En 2006, Cheon *et al.* écrivaient qu'elle était une des cibles prometteuses pour le traitement des cancers hématologiques [123]. Tout comme pour MDM2, le fait de cibler des enzymes régulant l'ubiquitination nous permet d'agir sur plusieurs voies cellulaires en même temps. Rappelons que USP7 possède plusieurs cibles impliquées en cancer dont PTEN et FOXO4. Il a été montré que l'inhibition de USP7 mène à une modulation des cibles autres que TP53, permettant aussi d'atteindre les cellules cancéreuses [96]. En plus, l'inhibition de USP7 a aussi l'effet d'un inhibiteur de MDM2 puisque cette Ub ligase s'auto-ubiquitine et est dégradé en absence de déubiquitination [158].

A notre connaissance, aucune étude clinique n'est en cours à ce jour pour les inhibiteurs d'USP7 [206]. Cependant diverses molécules qui ont été découvertes dans les dernières années sont en étude préclinique, telles que le HBX 41,108, le HBX 19,818 et la série P5091 [133, 135]. Un des avantages de cibler USP7 par rapport aux autres Cys protéases, est que cette enzyme a besoin d'un changement conformationnel unique pour son activation, nous permettant de trouver des inhibiteurs qui lui sont spécifiques [134].

Deuxièmement, MDM2 offre des possibilités tant dépendantes de TP53 qu'indépendantes. Plusieurs stratégies d'inhibition de MDM2 ont été proposées. D'abord, il y a celle ciblant l'interaction MDM2-TP53 qui est exploitée par le nutlin 3. Tel que déjà mentionné, cette molécule lie MDM2 et l'empêche d'interagir avec TP53. Plus récemment, la famille de molécules ciblant les interactions MDM2-TP53 et MDMX-TP53 (molécule RO-5963) est sous investigation. Ensuite, une autre stratégie est de bloquer son activité ligase. Dans cette catégorie on retrouve les molécules comme HLI98, la série MPD, MEL23 et MEL24 [119, 137].

Le fait de cibler MDM2 a plusieurs avantages indépendamment de TP53. Dernièrement, RB1, un autre TSG très important, a été identifié au centre d'un axe USP7-MDM2-RB1. Dans les cellules normales, USP7 protège RB1 de sa dégradation par MDM2, mais cette interaction est perdue dans les cellules cancéreuses gliales. Bhattacharya *et al.* suggèrent donc que cibler MDM2 agirait favorablement par un effet stabilisant sur RB1 [207]. De plus, les inhibiteurs de MDM2 semblent aussi bloquer la voie de signalisation NFκB, impliquée dans différents cancers [141].

Cependant, plusieurs limites sont associées avec le fait de cibler MDM2. Dans les cas où TP53 est mutée et oncogénique, la stabilisation de MDM2 et de cette forme de TP53 pourrait avoir des effets non désirés nuisant aux traitements du patient [137]. De plus, étant donné le rôle que joue MDM2 dans le maintien des CSH, le cibler pourrait entraîner l'extinction de ces cellules. Finalement, des études plus récentes ont montré un rôle de MDM2 dans la guérison des plaies et dans l'inflammation. Un traitement inhibant MDM2 pourrait donc empêcher la bonne guérison des tissus ou la réponse inflammatoire contre des agents pathogènes. Il est aussi possible que ce type de traitement, en diminuant la réponse inflammatoire, diminue la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses [141].

Certaines autres molécules ont été testées dans des études cliniques, dont le composé JNJ-26854165 en étude de phase I (NCT00676910) de 2008 à 2010 chez des patients atteints de cancers solides [206]. Cette étude a montré que la molécule était

relativement bien tolérée [119]. Différentes études cliniques de phase I et II ont été effectuées avec une molécule orale le RO5045337, alias RG7112. L'une d'elle (NCT00623870) a été effectuée de 2008 à 2012 chez des patients atteints de cancers hématologiques. De plus, l'étude récente NCT01635296 portant plus précisément sur la LMA analysait une combinaison de cette molécule avec la cytarabine. Les résultats finaux de cette étude ne sont pas encore disponibles [206]. Une nouvelle molécule antagoniste de MDM2, le composé RG7388 est aussi en étude de phase I/Ib dans la LMA et semble bien toléré en agent seul et en combinaison avec de la cytarabine chez les patients âgés de plus de 60 ans [208].

Troisièmement, TP53 reste un acteur majeur dans la décision d'apoptose tant dans les cancers sans mutation de *TP53* que dans les cancers où il est muté. Diverses stratégies pharmacologiques ciblant TP53 existent. D'une part, s'il n'est pas muté, le stabiliser reste l'approche la plus explorée et passe surtout par le contrôle de MDM2 et d'USP7, tel que discuté précédemment. Nous pouvons aussi cibler l'interaction MDM2-TP53 en ciblant directement TP53, comme c'est le cas du RITA. L'avantage de cette stratégie est que cela libère MDM2 de TP53 et lui permet d'effectuer ses autres fonctions. Cette molécule a également montré qu'elle permettait à TP53 de moduler la transcription de différents signaux pro- et anti-apoptotiques, favorisant la balance vers l'apoptose [209].

D'autre part, s'il est muté, les stratégies visent principalement à modifier la conformation 3D de la protéine afin de lui permettre de retrouver ses fonctions normales. En effet, la molécule nommée CP-31398 permet cet effet, en plus de stabiliser la forme non mutée en limitant son ubiquitination. Plusieurs études pré-cliniques ont montré un effet potentiellement anti-cancéreux *in vitro* et *in vivo*. Deux autres molécules, l'ellipticine et PRIMA-1, permettent à TP53 mutée de retrouver ses fonctions de transcription de l'ADN et de l'induction de l'apoptose [209]. D'ailleurs, le PRIMA-1 a montré son efficacité à éliminer les cellules tumorales de LMA et son analogue APR-246 a été testé en étude clinique de phase I (NCT00900614) de 2009 à 2011 dans les cancers hématologiques et prostatiques réfractaires. Une étude de phase II est présentement en cours avec cette molécule pour la thérapie des cancers

ovariens avec mutations de TP53 en combinaison avec la chimiothérapie standard [206].

Or dans les LMA, tout comme dans les autres cancers où il n'y a pas de mutation de TP53, des altérations des voies en aval peuvent être acquises dans les cellules cancéreuses, soulevant l'intérêt de cibler directement ces voies plutôt qu'en amont. Quatrièmement, CDKN1A offre dans ce contexte des opportunités thérapeutiques intéressantes. Plusieurs traitements déjà utilisés en clinique ou en étude ont montré que CDKN1A était importante dans la réponse aux traitements. Par exemple, dans les lignées cellulaires leucémiques avec délétions de *TP53*, CDKN1A est induite et participe à l'activation de l'apoptose par les inhibiteurs du protéasome, tels que le Velcade® [143]. Cependant, dans ce mémoire la surexpression semble plutôt être reliée à une moins bonne réponse au traitement. Dans ce cas, cette protéine devient une cible intéressante.

Les rôles contradictoires de cet acteur compliquent l'approche thérapeutique. En fait, l'idéal serait de bloquer les propriétés oncogéniques de CDKN1A, tout en conservant celles nuisant aux cellules cancéreuses. C'est-à-dire qu'il faudrait bloquer l'induction de la sénescence qui permet une résistance aux radiations ionisantes et à différents agents chimiothérapeutiques, tout en conservant son rôle dans l'induction de l'apoptose et son inhibition de CDK1 et CDK2. Une molécule capable d'inhiber spécifiquement son activité anti-apoptotique pourrait être très efficace, surtout lorsque combinée avec les molécules l'activant telles que les agents ciblant l'ADN. Cependant une meilleure connaissance des partenaires de CDKN1A et une meilleure compréhension de ses modifications tant dans le noyau que dans le cytoplasme est nécessaire [144, 145].

Le principal obstacle à ces thérapies est que les voies de l'apoptose sont très dépendantes du contexte cellulaire. D'un tissu à l'autre certaines molécules peuvent avoir des effets très différents [209]. Avant de pouvoir utiliser de façon optimale ces traitements modulant l'axe MDM2-USP7-TP53-CDKN1A dans la LMA, plusieurs questions devront être adressées dont celles-ci : (1) Quel est l'impact de la stabilisation

de TP53 dans les cellules hématopoïétiques normales? (2) Quelle est la toxicité à long terme d'une exposition aux inhibiteurs de MDM2? (3) Dans quelles mesures les cellules leucémiques peuvent surmonter l'activation de TP53? (4) La présence d'une protéine TP53 non mutée est-elle toujours requise pour la thérapie [210]?

Conclusion

Dans ce travail le premier objectif était d'évaluer le rôle potentiel des USP dans les LMA. Nous avons découvert une altération de l'expression génique de quatre USP soit *USP44*, *USP1*, *USP28* et *USP7* dans la série de LMA étudiée. Ces DUB possèdent des rôles intéressants dans la tumorigenèse et potentiellement dans la résistance au traitement. À notre connaissance, une altération de *USP44* n'a pas été décrite à ce jour dans les LMA. Toutefois, une surexpression de cette USP a été observée dans les leucémies à cellules T [181]. Dans ces leucémies, la surexpression de *USP44* a été associée à une aneuploïdie, un phénomène impliqué dans les leucémies lymphoblastiques, et potentiellement dans les LMA. Nous avons observé à la fois une surexpression et une sous-expression de ce gène dans différents échantillons de notre cohorte. Ceci rappelle le fait que nous devons d'abord mieux comprendre l'effet du contexte cellulaire, particulièrement dans un cancer très hétérogène au niveau morphologique et génétique comme les LMA. Par exemple, cibler cette USP par un inhibiteur dans un sous-type particulier de LMA où elle serait un TSG, pourrait nuire aux traitements du patient.

Le nombre limité de cas étudiés dans cette étude ne nous a pas permis de confirmer une association statistiquement significative entre l'expression de certaines *USP* et la survie des patients atteints de LMA. Toutefois une sous-expression de *USP1* semble associée à une meilleure survie dans notre cohorte, un résultat qui doit être validé dans une série de LMA indépendante. Il est à noter que dans d'autres types de cancer, une surexpression de *USP1* a été observée. C'est pourquoi il a été suggéré d'inhiber cette DUB afin de sensibiliser les cellules à la chimiothérapie [183].

Dans notre analyse, nous avons principalement noté une sous-expression de *USP28*, concordant avec son rôle de TSG, relié à l'induction de l'apoptose. Dans d'autres cancers, son rôle d'oncogène est important, et il a été proposé d'inhiber cette DUB. Cependant dans les cas de LMA ayant une sous-expression de ce gène, une réactivation de *USP28* semblerait plus avantageuse. Étant donné que cela est plus difficile

chimiquement, une meilleure compréhension de l'axe USP28-CHEK2-TP53 pourrait permettre d'identifier d'autres cibles intéressantes, comme par exemple l'Ub ligase complémentaire à USP28 [186].

Une des causes importantes de résistance à la thérapie dans les LMA est la présence d'un dysfonctionnement de la voie TP53 pouvant être relié ou non à la présence de mutations de ce gène. Notre deuxième objectif consistait donc à évaluer le rôle potentiel de USP7 et MDM2, qui sont impliqués dans l'ubiquitination de TP53, ainsi qu'une de ces cibles importantes, *CDKN1A*, en débutant par une étude de leur profil d'expression dans les LMA. Notre travail démontre une altération de l'expression génique de *CDKN1A* dans la cohorte de LMA étudiée. Il sera donc important d'investiguer l'impact de ces altérations sur l'efficacité du traitement anti-leucémique.

C'est dans ce but que la dernière partie de ce projet a été effectuée et consistait à élaborer un modèle expérimental afin d'évaluer la réponse des cellules de LMA *in vitro* à un traitement avec la doxorubicine et/ou le nutlin 3 selon le statut initial de l'expression de *CDKN1A*. Ce système pourra permettre de mieux comprendre la résistance aux traitements dans les LMA afin de développer des traitements pouvant surpasser cette résistance.

En conclusion, cette étude préliminaire met en lumière l'intérêt de certains membres de la famille des USP et de l'axe USP7-MDM2-TP53-CDKN1A dans le traitement de la LMA. La découverte du contrôle cellulaire par l'ubiquitination révèle de nouvelles cibles thérapeutiques, pouvant agir sur plusieurs voies simultanément, un net avantage lorsqu'il s'agit de cellules néoplasiques instables et hétérogènes. Enfin, la dérégulation fréquente de *CDKN1A* dans notre cohorte de LMA suggère qu'un traitement ciblant ce gène pourrait potentiellement être utile dans cette leucémie. Cependant, la dualité de ses rôles en oncologie doit être mieux comprise afin d'optimiser l'effet des thérapies potentielles.

Bibliographie

1. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochimica et Biophysica Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.
2. Komander, D., *The emerging complexity of protein ubiquitination*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 5): p. 937-53.
3. Perica, T. and C. Chothia, *Ubiquitin--molecular mechanisms for recognition of different structures*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(3): p. 367-76.
4. Hoeller, D., C.M. Hecker, and I. Dikic, *Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 776-88.
5. Jadhav, T. and M.W. Wooten, *Defining an Embedded Code for Protein Ubiquitination*. J Proteomics Bioinform, 2009. **2**: p. 316.
6. Komander, D. and M. Rape, *The ubiquitin code*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 203-29.
7. Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe, *Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 550-63.
8. Shen, M., et al., *Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(9): p. 1091-108.
9. Zhang, W. and S.S. Sidhu, *Development of inhibitors in the ubiquitination cascade*. FEBS Lett, 2014. **588**(2): p. 356-67.
10. Micel, L.N., et al., *Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies*. J Clin Oncol, 2013. **31**(9): p. 1231-8.
11. Crawford, L.J. and A.E. Irvine, *Targeting the ubiquitin proteasome system in haematological malignancies*. Blood Rev, 2013. **27**(6): p. 297-304.
12. Nijman, S.M., et al., *A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes*. Cell, 2005. **123**(5): p. 773-86.
13. Fraile, J.M., et al., *Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options*. Oncogene, 2012. **31**(19): p. 2373-88.
14. Sowa, M.E., et al., *Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape*. Cell, 2009. **138**(2): p. 389-403.
15. Reyes-Turcu, F.E., K.H. Ventii, and K.D. Wilkinson, *Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes*. Annual Review of Biochemistry, 2009. **78**: p. 363-97.
16. Ramakrishna, S., B. Suresh, and K.H. Baek, *The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(1): p. 15-26.
17. Chen, D. and Q.P. Dou, *The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention*. Curr Protein Pept Sci, 2010. **11**(6): p. 459-70.
18. Murata, S., H. Yashiroda, and K. Tanaka, *Molecular mechanisms of proteasome assembly*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 104-15.
19. Suh, K.S., et al., *The role of the ubiquitin proteasome system in lymphoma*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **87**(3): p. 306-22.

20. Chen, Y.J., et al., *Power and promise of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37 as a target of cancer therapy*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(4): p. 2173-9.
21. D'Arcy, P. and S. Linder, *Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(11): p. 1729-38.
22. Feng, X., et al., *Proapoptotic effects of the novel proteasome inhibitor b-AP15 on multiple myeloma cells and natural killer cells*. Exp Hematol, 2014. **42**(3): p. 172-82.
23. Tian, Z., 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): p. 706-16.
24. Tyson, J.J. and B. Novak, *Temporal organization of the cell cycle*. Curr Biol, 2008. **18**(17): p. R759-R768.
25. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(3): p. 153-66.
26. Craney, A. and M. Rape, *Dynamic regulation of ubiquitin-dependent cell cycle control*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(6): p. 704-10.
27. Nakayama, K.I. and K. Nakayama, *Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 369-81.
28. Ceccarelli, D.F., et al., *An allosteric inhibitor of the human Cdc34 ubiquitin-conjugating enzyme*. Cell, 2011. **145**(7): p. 1075-87.
29. Lord, C.J. and A. Ashworth, *The DNA damage response and cancer therapy*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 287-94.
30. Skladanowski, A., P. Bozko, and M. Sabisz, *DNA structure and integrity checkpoints during the cell cycle and their role in drug targeting and sensitivity of tumor cells to anticancer treatment*. Chem Rev, 2009. **109**(7): p. 2951-73.
31. Quesada, V., et al., *Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **314**(1): p. 54-62.
32. Komander, D., *Mechanism, specificity and structure of the deubiquitinases*. Subcell Biochem, 2010. **54**: p. 69-87.
33. Société canadienne du cancer and Institut national du cancer du Canada. Comité consultatif des enregistrements et des registres, *Statistiques canadiennes sur le cancer*, 2014, Société canadienne du cancer.: Toronto, Ont. p. v.
34. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
35. Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge, *Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction*. Cell, 2009. **136**(5): p. 823-37.
36. Floor, S.L., et al., *Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time?* Trends Mol Med, 2012. **18**(9): p. 509-15.
37. O'Connor, M.L., et al., *Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward*. Cancer Lett, 2014. **344**(2): p. 180-7.
38. Marjanovic, N.D., R.A. Weinberg, and C.L. Chaffer, *Cell plasticity and heterogeneity in cancer*. Clin Chem, 2013. **59**(1): p. 168-79.
39. Kreso, A. and J.E. Dick, *Evolution of the cancer stem cell model*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(3): p. 275-91.

40. Visvader, J.E. and G.J. Lindeman, *Cancer stem cells: current status and evolving complexities*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 717-28.
41. Fröhling, S. and H. Dohner, *Chromosomal abnormalities in cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(7): p. 722-34.
42. Haferlach, C., et al., *Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype*. Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1539-41.
43. Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens, *The impact of translocations and gene fusions on cancer causation*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 233-45.
44. Nussenzweig, A. and M.C. Nussenzweig, *Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer*. Cell, 2010. **141**(1): p. 27-38.
45. Schmitt, C.A., *Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 286-95.
46. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nature Medicine, 2004. **10**(8): p. 789-99.
47. Manfredi, J.J., *The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor*. Genes Dev, 2010. **24**(15): p. 1580-9.
48. Bailon-Moscoso, N., J.C. Romero-Benavides, and P. Ostrosky-Wegman, *Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells*. Tumour Biol, 2014. **35**(5): p. 3981-95.
49. Holohan, C., et al., *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(10): p. 714-26.
50. Ho, M.M., D.E. Hogge, and V. Ling, *MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia*. Exp Hematol, 2008. **36**(4): p. 433-42.
51. Kaelin, W.G., Jr., *The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 689-98.
52. Dick, J.E., *Stem cell concepts renew cancer research*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4793-807.
53. Ding, L., et al., *Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 506-10.
54. Corces-Zimmerman, M.R., et al., *Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(7): p. 2548-53.
55. Shlush, L.I., et al., *Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia*. Nature, 2014. **506**(7488): p. 328-33.
56. Jin, L., et al., *Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1167-74.
57. Hoeller, D. and I. Dikic, *Targeting the ubiquitin system in cancer therapy*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 438-44.
58. Soucy, T.A., et al., *An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 732-6.
59. Deshaies, R.J., *Drug discovery: Fresh target for cancer therapy*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 709-10.

60. Kitagawa, K., Y. Kotake, and M. Kitagawa, *Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(8): p. 1374-81.
61. Colland, F., *The therapeutic potential of deubiquitinating enzyme inhibitors*. *Biochem Soc Trans*, 2010. **38**(Pt 1): p. 137-43.
62. Swerdlow, S.H., et al., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*. Vol. 2. 2008. 439.
63. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 937-51.
64. SEER. *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program - Turning Cancer Data into Discovery*. [En ligne] 2014 (Dernier accès juin 2014)]; Available from: <http://seer.cancer.gov/>.
65. Renneville, A., et al., *Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature*. *Leukemia*, 2008. **22**(5): p. 915-31.
66. Hoffman, R., et al., *Hematology: Basic Principles and Practice, Expert Consult Premium Edition*. 6th ed. 2013: Elsevier Science Health Science Division.
67. American Cancer Society. *The official sponsor of birthdays*. [En ligne] 2014 (Dernier accès en Juin 2014)]; Available from: <http://www.cancer.org/>.
68. Song, W.J., et al., *Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia*. *Nat Genet*, 1999. **23**(2): p. 166-75.
69. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2010. **2**(6): p. 640-53.
70. Challen, G.A., et al., *Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis*. *Cytometry A*, 2009. **75**(1): p. 14-24.
71. Pant, V., A. Quintas-Cardama, and G. Lozano, *The p53 pathway in hematopoiesis: lessons from mouse models, implications for humans*. *Blood*, 2012. **120**(26): p. 5118-27.
72. Sarry, J.E., et al., *Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgamma-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(1): p. 384-95.
73. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nat Med*, 1997. **3**(7): p. 730-7.
74. Horton, S.J. and B.J. Huntly, *Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology*. *Haematologica*, 2012. **97**(7): p. 966-74.
75. O'Brien, J.A. and D.A. Rizzieri, *Leukemic stem cells: a review*. *Cancer Invest*, 2013. **31**(4): p. 215-20.
76. Ferrara, F., S. Palmieri, and F. Leoni, *Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2008. **66**(3): p. 181-93.
77. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. *Blood*, 2010. **115**(3): p. 453-74.
78. Grimwade, D., et al., *Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal*

- abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials.* Blood, 2010. **116**(3): p. 354-65.
79. Mrozek, K., et al., *Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia.* J Clin Oncol, 2012. **30**(36): p. 4515-23.
 80. Middeke, J.M., et al., *Outcome of high-risk acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation: negative impact of *abnl(17p)* and *-5/5q*.* Blood, 2012. **120**(12): p. 2521-8.
 81. Mohr, B., et al., *Impact of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with *abnl(17p)* acute myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2013. **161**(2): p. 237-44.
 82. Seifert, H., et al., *The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2009. **23**(4): p. 656-63.
 83. Grossmann, V., et al., *A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations.* Blood, 2012. **120**(15): p. 2963-72.
 84. Rucker, F.G., et al., *TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome.* Blood, 2012. **119**(9): p. 2114-21.
 85. Assouline, S., E. Cocolakis, and K.L. Borden, *The Development of Novel Therapies for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML).* Cancers (Basel), 2012. **4**(4): p. 1161-79.
 86. Byrd, J.C., et al., *Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461).* Blood, 2002. **100**(13): p. 4325-36.
 87. Lowenberg, B., et al., *High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2009. **361**(13): p. 1235-48.
 88. Fernandez, H.F., et al., *Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2009. **361**(13): p. 1249-59.
 89. Baccarani, M., et al., *European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013.* Blood, 2013. **122**(6): p. 872-84.
 90. Grimwade, D. and S.D. Freeman, *Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"?* Blood, 2014. **124**(23): p. 3345-55.
 91. Frankfurt, O., J.D. Licht, and M.S. Tallman, *Molecular characterization of acute myeloid leukemia and its impact on treatment.* Current Opinion in Oncology, 2007. **19**(6): p. 635-49.
 92. Rowe, J.M. and B. Lowenberg, *Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: a remarkable saga about an active drug.* Blood, 2013. **121**(24): p. 4838-41.
 93. Laszlo, G.S., E.H. Estey, and R.B. Walter, *The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia.* Blood Rev, 2014. **28**(4): p. 143-53.
 94. Larkin, K. and W. Blum, *Novel therapies in AML: reason for hope or just hype?* Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. e341-51.
 95. Rufini, A. and G. Melino, *Cell death pathology: the war against cancer.* Biochem Biophys Res Commun, 2011. **414**(3): p. 445-50.

96. Nicholson, B. and K.G. Suresh Kumar, *The multifaceted roles of USP7: new therapeutic opportunities*. Cell Biochem Biophys, 2011. **60**(1-2): p. 61-8.
97. Samudio, I., et al., *Apoptosis in leukemias: regulation and therapeutic targeting*. Cancer Treat Res, 2010. **145**: p. 197-217.
98. McKenzie, M. and M.T. Ryan, *Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease*. IUBMB Life, 2010. **62**(7): p. 497-502.
99. Chaabane, W., et al., *Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. **61**(1): p. 43-58.
100. Baker, S.J., et al., *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas*. Science, 1989. **244**(4901): p. 217-21.
101. Finlay, C.A., P.W. Hinds, and A.J. Levine, *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation*. Cell, 1989. **57**(7): p. 1083-93.
102. Hinds, P., C. Finlay, and A.J. Levine, *Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation*. J Virol, 1989. **63**(2): p. 739-46.
103. Slee, E.A., D.J. O'Connor, and X. Lu, *To die or not to die: how does p53 decide?* Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2809-18.
104. Reinhardt, H.C. and B. Schumacher, *The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer*. Trends Genet, 2012. **28**(3): p. 128-36.
105. Lee, J.T. and W. Gu, *The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination*. Cell Death Differ, 2009. **17**(1): p. 86-92.
106. Sen, N., Y.K. Satija, and S. Das, *p53 and metabolism: old player in a new game*. Transcription, 2012. **3**(3): p. 119-23.
107. Hock, A.K. and K.H. Vousden, *The role of ubiquitin modification in the regulation of p53*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 137-49.
108. Elias, J., et al., *The p53 protein and its molecular network: modelling a missing link between DNA damage and cell fate*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1844**(1 Pt B): p. 232-47.
109. Maclaine, N.J. and T.R. Hupp, *The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway*. Aging (Albany NY), 2009. **1**(5): p. 490-502.
110. Saha, M.N., L. Qiu, and H. Chang, *Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies*. J Hematol Oncol, 2013. **6**: p. 23.
111. Seliger, B., et al., *Analysis of the p53 and MDM-2 gene in acute myeloid leukemia*. Eur J Haematol, 1996. **57**(3): p. 230-40.
112. Kojima, K., et al., *MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3150-9.
113. Imamura, J., I. Miyoshi, and H.P. Koeffler, *p53 in hematologic malignancies*. Blood, 1994. **84**(8): p. 2412-21.
114. Eischen, C.M. and G. Lozano, *p53 and MDM2: antagonists or partners in crime?* Cancer Cell, 2009. **15**(3): p. 161-2.
115. Devine, T. and M.S. Dai, *Targeting the ubiquitin-mediated proteasome degradation of p53 for cancer therapy*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(18): p. 3248-62.
116. van Leeuwen, I.M., et al., *Mechanism-specific signatures for small-molecule p53 activators*. Cell Cycle, 2011. **10**(10): p. 1590-8.

117. Kamal, A., A.A. Mohammed, and T.B. Shaik, *p53-Mdm2 inhibitors: patent review (2009 - 2010)*. Expert Opin Ther Pat, 2012. **22**(2): p. 95-105.
118. Zheng, T., et al., *Nutlin-3 cooperates with doxorubicin to induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells through p53 or p73 signaling pathways*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(10): p. 1597-604.
119. Yuan, Y., et al., *Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 16.
120. Long, J., et al., *Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia*. Blood, 2010. **116**(1): p. 71-80.
121. Wang, S., et al., *SAR405838: An Optimized Inhibitor of MDM2-p53 Interaction That Induces Complete and Durable Tumor Regression*. Cancer Res, 2014. **74**(20): p. 5855-65.
122. Kojima, K., et al., *Prognostic impact and targeting of CRMI in acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **121**(20): p. 4166-74.
123. Cheon, K.W. and K.H. Baek, *HAUSP as a therapeutic target for hematopoietic tumors (review)*. International Journal of Oncology, 2006. **28**(5): p. 1209-15.
124. Carter, B.Z., et al., *Simultaneous activation of p53 and inhibition of XIAP enhance the activation of apoptosis signaling pathways in AML*. Blood, 2010. **115**(2): p. 306-14.
125. Khoronenkova, S.V. and G.L. Dianov, *Regulation of USP7/HAUSP in response to DNA damage: yet another role for ATM*. Cell Cycle, 2012. **11**(13): p. 2409-10.
126. Lee, H.J., et al., *HAUSP, a deubiquitinating enzyme for p53, is polyubiquitinated, polyneddylated, and dimerized*. FEBS Lett, 2005. **579**(21): p. 4867-72.
127. Khoronenkova, S.V., et al., *USP7/HAUSP stimulates repair of oxidative DNA lesions*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(7): p. 2604-9.
128. Jagannathan, M., et al., *A role for USP7 in DNA replication*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(1): p. 132-45.
129. Huang, Z., et al., *Deubiquitylase HAUSP stabilizes REST and promotes maintenance of neural progenitor cells*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 142-52.
130. Huang, Z., W. Zhou, and S. Bao, *Role of deubiquitylase HAUSP in stem cell maintenance*. Cell Cycle, 2011. **10**(8): p. 1182-3.
131. Li, M., et al., *A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway*. Mol Cell, 2004. **13**(6): p. 879-86.
132. Kessler, B.M., *Selective and reversible inhibitors of ubiquitin-specific protease 7: a patent evaluation (WO2013030218)*. Expert Opin Ther Pat, 2014. **24**(5): p. 597-602.
133. Reverdy, C., et al., *Discovery of specific inhibitors of human USP7/HAUSP deubiquitinating enzyme*. Chem Biol, 2012. **19**(4): p. 467-77.
134. Menard, R. and T. Sulea, *Selective inhibition of USP7*. Chem Biol, 2012. **19**(4): p. 437-8.
135. Colland, F., et al., *Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(8): p. 2286-95.
136. Chauhan, D., et al., *A small molecule inhibitor of ubiquitin-specific protease-7 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance*. Cancer Cell, 2012. **22**(3): p. 345-58.

137. Zhao, Y., H. Yu, and W. Hu, *The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(3): p. 180-9.
138. Gannon, H.S. and S.N. Jones, *Using Mouse Models to Explore MDM-p53 Signaling in Development, Cell Growth, and Tumorigenesis*. Genes Cancer, 2012. **3**(3-4): p. 209-18.
139. Flicek, P., et al., *Ensembl 2014*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D749-55.
140. Cheng, T.H. and S.N. Cohen, *Human MDM2 isoforms translated differentially on constitutive versus p53-regulated transcripts have distinct functions in the p53/MDM2 and TSG101/MDM2 feedback control loops*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(1): p. 111-9.
141. Thomasova, D., et al., *p53-independent roles of MDM2 in NF-kappaB signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases*. Neoplasia, 2012. **14**(12): p. 1097-101.
142. Abbas, H.A., et al., *Mdm2 is required for survival of hematopoietic stem cells/progenitors via dampening of ROS-induced p53 activity*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 606-17.
143. Liu, S., W.R. Bishop, and M. Liu, *Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy*. Drug Resist Updat, 2003. **6**(4): p. 183-95.
144. Abbas, T. and A. Dutta, *p21 in cancer: intricate networks and multiple activities*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(6): p. 400-14.
145. Warfel, N.A. and W.S. El-Deiry, *p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(1): p. 52-8.
146. Mirzayans, R., et al., *New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 170325.
147. Ivanovska, I., et al., *MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(7): p. 2167-74.
148. Millard, M., et al., *Small-molecule inhibitors of p53-MDM2 interaction: the 2006-2010 update*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(6): p. 536-59.
149. De Braekeleer, E., C. Ferec, and M. De Braekeleer, *RUNX1 translocations in malignant hemopathies*. Anticancer Res, 2009. **29**(4): p. 1031-7.
150. Paulsson, K., et al., *A novel and cytogenetically cryptic t(7;21)(p22;q22) in acute myeloid leukemia results in fusion of RUNX1 with the ubiquitin-specific protease gene USP42*. Leukemia, 2006. **20**(2): p. 224-9.
151. Giguere, A. and J. Hebert, *Microhomologies and topoisomerase II consensus sequences identified near the breakpoint junctions of the recurrent t(7;21)(p22;q22) translocation in acute myeloid leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2011. **50**(4): p. 228-38.
152. Foster, N., et al., *Molecular characterisation of a recurrent, semi-cryptic RUNX1 translocation t(7;21) in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2010. **148**(6): p. 938-43.
153. Jeandidier, E., et al., *A cytogenetic study of 397 consecutive acute myeloid leukemia cases identified three with a t(7;21) associated with 5q abnormalities and exhibiting*

- similar clinical and biological features, suggesting a new, rare acute myeloid leukemia entity.* Cancer Genet, 2012. **205**(7-8): p. 365-72.
154. Panagopoulos, I., et al., *Myeloid leukemia with t(7;21)(p22;q22) and 5q deletion.* Oncol Rep, 2013. **30**(4): p. 1549-52.
155. Gelsi-Boyer, V., et al., *Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes.* BMC Cancer, 2008. **8**: p. 299.
156. Sebaa, A., et al., *Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion.* Genes Chromosomes Cancer, 2012. **51**(12): p. 1086-92.
157. Zhang, M.F., et al., *Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma.* J Transl Med, 2009. **7**: p. 110.
158. Brooks, C.L. and W. Gu, *Targeting HAUSP: Killing Two Birds with One Stone in Modulation of Protein Stability in Cancer Therapy*, S.N. York, Editor. 2009. p. 31-43.
159. Li, W., et al., *Overexpression of p21(waf1) decreases G2-M arrest and apoptosis induced by paclitaxel in human sarcoma cells lacking both p53 and functional Rb protein.* Mol Pharmacol, 1999. **55**(6): p. 1088-93.
160. Verbeke, S., et al., *Overexpression of p75(NTR) increases survival of breast cancer cells through p21(waf1).* Cell Signal, 2010. **22**(12): p. 1864-73.
161. Rommer, A., et al., *EVII inhibits apoptosis induced by antileukemic drugs via upregulation of CDKN1A/p21/WAF in human myeloid cells.* PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56308.
162. Schlesinger, J., et al., *Evaluation of the LightCycler 1536 Instrument for high-throughput quantitative real-time PCR.* Methods, 2010. **50**(4): p. S19-22.
163. Kojima, K., et al., *Concomitant inhibition of Mdm2-p53 interaction and Aurora kinases activates the p53-dependent postmitotic checkpoints and synergistically induces p53-mediated mitochondrial apoptosis along with reduced endoreduplication in acute myelogenous leukemia.* Blood, 2008. **112**(7): p. 2886-95.
164. Schwickart, M., et al., *Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival.* Nature, 2009. **463**(7277): p. 103-7.
165. Yuan, J., et al., *USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53.* Cell, 2010. **140**(3): p. 384-96.
166. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis.* Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 619-26.
167. Zhang, Y., X. Zhou, and P. Huang, *Fanconi anemia and ubiquitination.* J Genet Genomics, 2007. **34**(7): p. 573-80.
168. Zhang, X., et al., *Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells.* Cancer Res, 2010.
169. Rollig, C., et al., *Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system.* J Clin Oncol, 2011. **29**(20): p. 2758-65.
170. Rayburn, E.R., S.J. Ezell, and R. Zhang, *Recent advances in validating MDM2 as a cancer target.* Anticancer Agents Med Chem, 2009. **9**(8): p. 882-903.

171. Barboule, N., et al., *Involvement of p21 in mitotic exit after paclitaxel treatment in MCF-7 breast adenocarcinoma cell line*. *Oncogene*, 1997. **15**(23): p. 2867-75.
172. Park, S.H., et al., *High throughput screening of a small molecule one-bead-one-compound combinatorial library to identify attenuators of p21 as chemotherapy sensitizers*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(12): p. 2015-22.
173. Ray, R.M., S. Bhattacharya, and L.R. Johnson, *Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1*. *Apoptosis*, 2011. **16**(1): p. 35-44.
174. Kojima, K., et al., *Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2006. **108**(3): p. 993-1000.
175. Murakami, Y., et al., *Comparison of hepatocellular carcinoma miRNA expression profiling as evaluated by next generation sequencing and microarray*. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e106314.
176. Morozova, O., M. Hirst, and M.A. Marra, *Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2009. **10**: p. 135-51.
177. Geiss, G.K., et al., *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(3): p. 317-25.
178. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
179. Zhang, Y., et al., *USP44 regulates centrosome positioning to prevent aneuploidy and suppress tumorigenesis*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(12): p. 4362-74.
180. Holland, A.J. and D.W. Cleveland, *The deubiquitinase USP44 is a tumor suppressor that protects against chromosome missegregation*. *J Clin Invest*, 2013. **122**(12): p. 4325-8.
181. Zhang, Y., J. van Deursen, and P.J. Galardy, *Overexpression of ubiquitin specific protease 44 (USP44) induces chromosomal instability and is frequently observed in human T-cell leukemia*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23389.
182. Kim, J.M., et al., *Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype*. *Dev Cell*, 2009. **16**(2): p. 314-20.
183. Garcia-Santisteban, I., et al., *USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy*. *Mol Cancer*, 2013. **12**: p. 91.
184. Jacquemont, C. and T. Taniguchi, *The Fanconi anemia pathway and ubiquitin*. *BMC Biochem*, 2007. **8 Suppl 1**: p. S10.
185. Mistry, H., et al., *Small-molecule inhibitors of USP1 target ID1 degradation in leukemic cells*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(12): p. 2651-62.
186. Zhang, D., et al., *A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response*. *Cell*, 2006. **126**(3): p. 529-42.
187. Popov, N., et al., *The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(7): p. 765-74.
188. Boerma, E.G., et al., *Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge*. *Leukemia*, 2009. **23**(2): p. 225-34.

189. Marcel, V., et al., *Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models*. Cell Death Differ, 2011. **18**(12): p. 1815-24.
190. American Type Culture Collection. *Leukemia p53 hotspot mutation cell panel*. The essentials of life science research globally delivered™ [En ligne] 2013 (Dernier accès en ligne le 27 octobre 2014)]; Available from: <http://www.atcc.org/~media/A971B3FE2AD24B7DA0C5028EFDC98898.ashx>.
191. Moll, U.M. and O. Petrenko, *The MDM2-p53 interaction*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 1001-8.
192. Wojcik, I., et al., *Abnormalities of the P53, MDM2, BCL2 and BAX genes in acute leukemias*. Neoplasma, 2005. **52**(4): p. 318-24.
193. Bueso-Ramos, C.E., et al., *The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias*. Blood, 1993. **82**(9): p. 2617-23.
194. Fahraeus, R. and V. Olivares-Illana, *MDM2's social network*. Oncogene, 2013.
195. Terzian, T., et al., *The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1337-44.
196. Bartel, F., et al., *MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(1): p. 29-35.
197. Kovacevic, Z., et al., *The metastasis suppressor, N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), upregulates p21 via p53-independent mechanisms*. Carcinogenesis, 2011. **32**(5): p. 732-40.
198. Bartel, F., H. Taubert, and L.C. Harris, *Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(1): p. 9-15.
199. Harris, L.C., *MDM2 splice variants and their therapeutic implications*. Curr Cancer Drug Targets, 2005. **5**(1): p. 21-6.
200. Sigalas, I., et al., *Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 912-7.
201. Schepers, H., et al., *Constitutive cytoplasmic localization of p21(Waf1/Cip1) affects the apoptotic process in monocytic leukaemia*. Leukemia, 2003. **17**(11): p. 2113-21.
202. Maqsood, M.I., et al., *Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment*. Cell Biol Int, 2013. **37**(10): p. 1038-45.
203. Zhang, W., et al., *High levels of constitutive WAF1/Cip1 protein are associated with chemoresistance in acute myelogenous leukemia*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(9): p. 1051-7.
204. Xia, M., D. Knezevic, and L.T. Vassilev, *p21 does not protect cancer cells from apoptosis induced by nongenotoxic p53 activation*. Oncogene, 2010.
205. Piccolo, M.T. and S. Crispi, *The Dual Role Played by p21 May Influence the Apoptotic or Anti-Apoptotic Fate in Cancer*. J Can Res Updates, 2012. **1**(2): p. 189-202.
206. U.S. National Institutes of Health. *ClinicalTrials.gov*. [En ligne] 2014 (Dernier accès en ligne le 31 décembre 2014)]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/>.
207. Bhattacharya, S. and M.K. Ghosh, *HAUSP, a novel deubiquitinase for Rb - MDM2 the critical regulator*. FEBS J, 2014. **281**(13): p. 3061-78.
208. Yee, K., et al., *Phase 1/1b Study of RG7388, a Potent MDM2 Antagonist, in Acute Myelogenous Leukemia (AML) Patients (Pts)*. Vol. 124. 2014. 116-116.

209. Athar, M., C.A. Elmets, and L. Kopelovich, *Pharmacological activation of p53 in cancer cells*. *Curr Pharm Des*, 2011. **17**(6): p. 631-9.
210. Nag, S., et al., *The MDM2-p53 pathway revisited*. *J Biomed Res*, 2013. **27**(4): p. 254-71.

Annexe A

Tableau I. Exemples de quelques classes de molécules en étude clinique dans les leucémies myéloïdes aiguës

Type d'inhibiteur	Molécules
inh. Tyrosine Kinases (FLT3)	SU5416 PKC412 (Midostaurin) AC220 (Quizartinib) CEP-701 (lestaurtinib)
inh. Tyrosine Kinases (KIT)	dasatinib (Sprycel)
inh. HDAC	acide Valproïque acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA; Vorinostat) SNDX-275/MS-275 (entinostat)
inh. méthylation de l'ADN	azacitidine (vidaza) decitabine (dacogen)
inh. voie PI3K-AKT1-mTOR	RAD001 AP23573
inh. voie Hedgehog	PF-04449913 NVP-LDE-225 (Erismodegib/Sonidegib)
inh. voie WNT1	PRI-724 CWP232291
inh. voie RAS	Tipifarnib (Zarnestra)
inh. MDM2	RO6839921 RO5045337 JNJ-26854165

LMA: Leucémie myéloïde aiguë; inh. : inhibiteur.; FLT3: "Fms-related tyrosine kinase 3, internal tandem duplication"; HDAC: histone déacétylase; PI3K: "Phosphatidylinositol-3-kinase"; AKT1: "v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1"; mTOR: "mechanistic target of rapamycin (serine >threonine kinase)"; WNT1: "wingless-type MMTV integration site family, member 1"; RAS : "rat sarcoma viral oncogene homolog"; MDM2: "mouse double minute 2".

Annexe B

Tableau V. Caractéristiques cliniques et biologiques des échantillons primaires de LMA utilisés dans l'étude RT-qPCR

BCLQ	Âge	Diagnostic WHO 2008 ¹	Classif. FAB ²	Caryotype ³	Tissu étudié	% Blastos	statut au prélèvement
02H003	57	LMA avec diff. minimale	LMA-M0	N comp.	moelle	98	Diagnostic
02H009	21	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	82	Diagnostic
02H025	60	LMA-MRC	LMA-M1	N comp.	sang	70	Rechute
02H053	60	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	96	Diagnostic
03H024	60	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	78	Diagnostic
03H030	81	LMA-MRC	LMA-M0	Comp.	sang	60	Diagnostic
03H031	72	Leucémie monoblastique et monocyttaire aiguë	LMA-M5	ND	sang	75	Diagnostic
03H033	47	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	95	Rechute
03H052	57	Leucémie monoblastique et monocyttaire aiguë	LMA-M5B	N comp.	moelle	62	Diagnostic
03H081	31	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	91	Diagnostic
03H094	56	LMA-MRC	LMA-M1	Comp.	sang	90	Rechute
03H119	68	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	92	Diagnostic
04H001	63	LMA-MRC	LMA-M1	N comp.	sang	91	Diagnostic
04H006	58	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	80	Rechute
04H024	45	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	76	Diagnostic
04H025	69	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	69	Diagnostic
04H048	55	LMA-MRC	LMA-M1	N comp.	moelle	60	Diagnostic
04H055	72	LMA-MRC	LMA-M1	N comp.	sang	95	Diagnostic
04H096	72	LMA-MRC	LMA-M0	N comp.	moelle	92	Diagnostic
04H103	64	LMA-MRC	LMA-M1	N comp.	sang	80	Diagnostic
04H108	70	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	94	Diagnostic
04H111	77	LMA-MRC	LMA-M5A	Comp.	sang	80	Diagnostic
04H112	64	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	91	Diagnostic
04H115	71	LMA-MRC	LMA-M5A	Comp.	moelle	86	Diagnostic
04H118	79	Leucémie monoblastique et monocyttaire aiguë	LMA-M5A	N comp.	moelle	81	Diagnostic
04H127	81	LMA-MRC	LMA-M1	Comp.	moelle	90	Diagnostic
04H135	78	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	91	Diagnostic

05H008	26	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	96	Diagnostic
05H013	66	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5B	N comp.	sang	67	Diagnostic
05H022	74	LMA Non spécifiée autrement	NC	N comp.	moelle	78	Diagnostic
05H030	55	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	84	Diagnostic
05H033	74	LMA avec maturation	LMA-M2	N comp.	moelle	85	Diagnostic
05H034	47	LMA-MRC	LMA-M1	N comp.	moelle	73	Diagnostic
05H039	69	LMA avec maturation	LMA-M2	N comp.	moelle	88	Diagnostic
05H078	52	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	66	Diagnostic
05H094	35	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5B	N comp.	moelle	94	Diagnostic
05H111	56	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	83	Diagnostic
05H128	29	LMA-MRC	LMA-M5A	Comp.	moelle	78	Rechute
05H149	55	NC	NC	N comp.	sang	80	Rechute
05H160	48	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	87	Diagnostic
05H186	73	LMA Non spécifiée autrement	NC	N comp.	moelle	85	Diagnostic
05H192	46	LMA avec diff. minimale	LMA-M0	N comp.	moelle	84	Diagnostic
05H195	43	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	95	Diagnostic
06H026	56	LMA avec maturation	LMA-M2	N comp.	moelle	66	Diagnostic
06H028	70	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	95	Diagnostic
06H029	20	LMA-MRC	LMA-M1	Comp.	moelle	91	Diagnostic
06H040	39	Leucémie myélomonocytaire aiguë	LMA-M4	N comp.	moelle	72	Diagnostic
06H045	30	LMA avec maturation	LMA-M2	N comp.	moelle	70	Diagnostic
06H061	24	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5A	N comp.	moelle	81	Diagnostic
06H073	51	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5A	N comp.	moelle	89	Diagnostic
06H077	36	LMA Non spécifiée autrement	NC	N comp.	moelle	88	Diagnostic
06H135	65	LMA-MRC	LMA-M0	Comp.	sang	90	Diagnostic
06H146	45	LMA avec maturation	LMA-M2	N comp.	sang	85	Diagnostic
07H005	46	LMA-MRC	NC	N comp.	moelle	90	Diagnostic
07H020	54	LMA avec maturation	LMA-M2	N comp.	sang	95	Diagnostic
07H042	23	LMA Non spécifiée autrement	NC	N comp.	sang	83	Diagnostic
07H055	65	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5B	N comp.	moelle	95	Diagnostic

07H061	69	LMA-MRC	LMA-M0	Comp.	sang	85	Diagnostic
07H062	58	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	90	Diagnostic
07H069	55	LMA Non spécifiée autrement	NC	N comp.	sang	85	Diagnostic
07H083	34	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	72	Diagnostic
07H098	31	LMA-MRC	NC	N comp.	sang	73	Diagnostic
07H107	62	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	85	Diagnostic
07H125	66	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	61	Diagnostic
07H133	37	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	82	Rechute
07H134	64	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5	N comp.	sang	81	Diagnostic
07H143	67	LMA reliée à la thérapie	LMA-M1	ND	sang	81	Diagnostic
07H151	54	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	80	Diagnostic
07H156	62	LMA-MRC	LMA-M2	Comp.	moelle	44	Diagnostic
07H158	67	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	92	Diagnostic
07H160	67	LMA-MRC	LMA-M1	N comp.	moelle	91	Diagnostic
08H004	59	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5B	ND	sang	87	Diagnostic
08H011	41	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5A	N comp.	moelle	87	Diagnostic
08H012	63	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	98	Réfractaire
08H036	29	LMA sans maturation	LMA-M1	ND	moelle	84	Diagnostic
08H049	69	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5B	N comp.	moelle	80	Diagnostic
08H053	76	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	95	Diagnostic
08H054	53	LMA-MRC	NC	Comp.	sang	67	Diagnostic
08H056	38	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	94	Rechute
08H063	76	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5A	N comp.	moelle	83	Diagnostic
08H065	27	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	93	Diagnostic
08H082	43	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	95	Diagnostic
08H087	46	LMA avec maturation	LMA-M2	N comp.	moelle	60	Diagnostic
08H089	68	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5	N comp.	moelle	81	Diagnostic
08H108	72	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5A	N comp.	moelle	75	Diagnostic
08H112	52	LMA-MRC	NC	N comp.	sang	85	Diagnostic
08H113	53	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	88	Diagnostic

08H118	73	LMA-MRC	LMA-M0	Comp.	moelle	67	Diagnostic
08H138	72	LMA-MRC	LMA-M4	N comp.	moelle	82	Diagnostic
09H002	60	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	78	Diagnostic
09H008	67	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5A	N comp.	moelle	70	Diagnostic
09H013	50	LMA-MRC	LMA-M4	N comp.	moelle	60	Diagnostic
09H024	47	LMA reliée à la thérapie	LMA-M5A	N comp.	sang	81	Diagnostic
09H026	73	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	96	Diagnostic
09H031	54	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	85	Diagnostic
09H042	52	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5B	N comp.	moelle	75	Diagnostic
09H043	53	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	80	Diagnostic
09H045	59	LMA-MRC	LMA-M1	Comp.	sang	88	Rechute
09H054	54	LMA-MRC	NC	Comp.	sang	63	Diagnostic
09H057	62	LMA-MRC	NC	Comp.	moelle	38	Diagnostic
09H058	71	LMA avec maturation	LMA-M2	N comp.	sang	74	Diagnostic
09H070	72	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	sang	88	Diagnostic
09H085	72	LMA-MRC	LMA-M7	Comp.	sang	65	Diagnostic
09H106	74	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5B	N comp.	sang	81	Diagnostic
10H014	77	LMA-MRC	LMA-M0	Comp.	moelle	72	Diagnostic
10H026	56	Leucémie monoblastique et monocytaire aiguë	LMA-M5	N comp.	moelle	85	Diagnostic
10H038	67	LMA avec diff. minimale	LMA-M0	N comp.	sang	91	Diagnostic
10H070	63	LMA sans maturation	LMA-M1	Comp.	sang	95	Rechute
10H087	73	LMA-MRC	NC	Comp.	sang	60	Diagnostic
10H092	69	LMA sans maturation	LMA-M1	N comp.	moelle	90	Diagnostic
10H130	56	LMA-MRC	NC	Comp.	sang	61	Diagnostic
Étendue	20-82	-	-	-	-	38-98	-
Moy.	57	-	-	-	-	81	-
Méd.	59	-	-	-	-	84	-

¹Veuillez vous référer au Tableau II en introduction pour les critères de ces groupes

²Veuillez vous référer au Tableau III en introduction pour les définitions de ces groupes

³Veuillez vous référer au Tableau XV en annexe D pour la formule chromosomique complète

RT-qPCR: réaction de polymérisation en chaîne quantitative suite à une transcription inverse; BCLQ: Banque de cellules leucémiques du Québec; Classif.: classification; WHO: World Health Organization; FAB: French-American-British; LMA: leucémie myéloïde aiguë; Diff.: différenciation; MRC: LMA reliée à une myélodysplasie; NOS: "not otherwise specified"; NC: non classifiable; Comp.: complexe; N comp.: non complexe; Moy.: moyenne; Méd.: médiane

Annexe C

Tableau VI. Liste des gènes sélectionnés et séquences des amorces utilisées pour l'étude RT-qPCR

Gène	Séquence ciblée	Amorce A	Amorce B	Efficacité
<i>CDKN1A</i>	NM_000389.3, NM_078467.1	tcaactgtctgtacccttgtgc	ggcgtttggagtggtagaaa	0,94
<i>MDM2</i>	domaine Znf	tctgtgaaagagcacaggaaaat	acagatgtacctgagtcgatg	0,99
<i>MDM2</i>	Domaine RING	agatgttgggcccttcgtgagaat	agccctctcagcttgtgtgagt	0,94
<i>TP53</i>	NM_000546.5	aggccttggaaactcaaggat	cccttttggacttcagggtg	1,04
<i>USP1</i>	NM_001301414.1, NM_146144.4, NM_001017416.1	gtgctttgctgctagtggttt	gagggtgcaataaaggagtgtga	1,05
<i>USP11</i>	NM_004651.3	gtgcattgagctcttcacca	tgcaaggaagggcagctacc	0,95
<i>USP12</i>	NM_182488.3	ggaaggatcaagcactgatt	gtgtgcaaagtgtgctactgc	0,95
<i>USP13</i>	NM_003940.2	tccggtgaaatctgaactcat	agagatcccgttctgctgtg	1,04
<i>USP14</i>	NM_005151.3, NM_001037334.1	catgggtgaaaaggaacaag	gaacgtaagcgatgaccagt	0,90
<i>USP16</i>	NM_001032410.1, NM_001001992.1, NM_006447.2	gctcctcctgttcttactctca	tgtgtttgtaactttgcgtagg	0,93
<i>USP18</i>	NM_017414.3	tcccagctggaactcag	caggcacgatggaatctctc	0,90
<i>USP2</i>	NM_004205.4, NM_171997.2	cgaaaccttgggaacacg	gcaggctccgcatgtaga	1,01
<i>USP20</i>	NM_006676.7, NM_001008563.4, NM_001110303.3	tcaagttggtcaaccaatg	caggcagcgaaggaactct	0,91
<i>USP21</i>	NM_012475.4, NM_001014443.2	gacagagccccctgcttc	gcccagaaggagtgtgtgat	0,95
<i>USP22</i>	NM_015276.1	acgtcacctgccaagtctg	ggggagatccaagctgatg	1,02
<i>USP28</i>	NM_020886.3	ttgaaaatccctcaaatgg	cccatgagaagaggctactga	0,98
<i>USP3</i>	NM_006537.3	ccagagtccttattttatgttgtttg	ccaaaaggtagcgcgatgaat	0,98
<i>USP31</i>	NM_020718.3	ggactctgcctgatgtgctt	gaagtttcatgcccctgtc	0,95
<i>USP4</i>	NM_003363.3, NM_199443.2	ggagctgaaggatgccaat	cacagaatcattcctcaacctg	0,96
<i>USP42</i>	NM_032172.2	tgcttgaatggcagcaataa	ggtatcctccaaatatctgacaaac	1,01
<i>USP44</i>	NM_032147.4, NM_001042403.2	ccctcagaccagaatgcttta	cattgcagtgtaccagaacc	0,95
<i>USP5</i>	NM_001098536.1, NM_003481.2	tcactacgtctgccacatcaa	ggaggcacacactttctggt	0,89
<i>USP6</i>	NM_004505.2	atcgatatggagccaagca	cgggttatactccgaataggc	0,82
<i>USP7</i>	NM_003470.2	aggctcagaagcgggaagg	aaactggtcctctgcgactatc	1,09
<i>USP9X</i>	NM_001039591.2, NM_001039590.2	ggatttcacacaagaaagtagtcc	ggagaatacacaatgcatcatacc	1,03

RT-qPCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative suite à une transcription inverse; USP : "ubiquitin specific peptidase"; Znf: domaine en doigt de zinc; RING : "really interesting new gene".

Annexe D

Tableau XV. Caryotype des échantillons primaires de LMA utilisés dans l'étude RT-qPCR

BCLQ	Caryotype
02H003	46,XX,del(2)(q31),add(8)(p21)[17]/46,XX[1]
02H009	46,XX[21]
02H025	46,XX,t(2;16)(p11.2;q24)[8]/46,XX,del(12)(p13),der(17)?t(17;22)(q25;q11.2)[4]/ 46,XX[11]
02H053	46,XY[20]
03H024	47,XY,+8[18]/48,XY,+8,+8[3]/46,XY[1]
03H030	44~48,XX,add(1)(p3?2),del(5)(q13),del(6)(p23),+8,add(18)(p11.3),+21[cp22]
03H031	46,XY
03H033	46,XX[21]
03H052	46,XY[20]
03H081	47,XX,+8[21]
03H094	45,XY,-3,del(3)(q12),-4,der(5)t(3;5)(p12;q11.2),del(6)(q21q25), t(9;10)(p13;q26),add(11)(p15),der(12)?del(12)(q22), der(12)t(4;12)(q32;q22),-15,der(16)?add(16)(p11.2),-17, der(17)add(17)(p11.2)?del(17)(q12q22),der(18)add(18)(p11.2)t(17;18)(q12;q23), +del(22)(q13),+2mar[19]
03H119	46,XY[20]
04H001	47,XY,+13[13]/49,XY,+9,+13,+13[7]/46,XY[1]
04H006	46,XY[20]
04H024	46,XX[21]
04H025	46,XY[21]
04H048	46,XY,del(9)(q22q33)[19]/46,XY[1]
04H055	46,XY,del(20)(q11.2)[19]/46,XY[1]
04H096	45,XY,-7[3]/46,XY[18]
04H103	46,XY,t(4;12)(q11-q12;p13)[21]
04H108	46,XX[20]
04H111	47~49,XY,+8,+8,-12,-21,+mar[cp35]
04H112	46,XX[21]
04H115	42~46,XY,-4,-5,-6,del(7)(q22),-10,-11,-13,-15,-17,?i(17)(q10),add(18)(q11.2),-18,-20, -21,-22,+1~9mar,min[cp17]

04H118 47,XY,+8[1]/49,XY,+8,+8,+20[20]
 04H127 42-50,XX,-3,del(5)(q13q33),del(7)(q22),-8,add(10)(p11.2),-10,
 -11,del(11)(q23),add(12)(p11.2),+?13,-16,-17,-20,-21,-22,+1~10mar[cp19]

 04H135 47,XY,+11[18]/48,XY,+11,+14[2]/46,XY[1]
 05H008 46,XX[20]
 05H013 47,XY,i(8)(q10),+i(8)(q10),del(12)(p11.2)[20]
 05H022 46,XY[20]
 05H030 46,XX[22]
 05H033 46,XY[22]
 05H034 47,XY,del(5)(q?31),+mar[21]
 05H039 46,XX[20]
 05H078 46,XY[20]
 05H094 46,XY[23]
 05H111 46,XY[21]
 05H128 45~46,XX,add(1)(p?13),der(1)t(1;11)(q12;q23)inv(11)(q23q13?3),add(2)(p?11.2),
 t(5;6)(q35;p21.1),+6,del(6)(q?13),add(7)(q22),der(10)?ins(10;11)(p1?2;q23q25),
 -11,der(12;13)(q10;q10),-13,add(16)(p11.2),del(16)(q22),
 del(19)(q13?3),add(22)(q1?3),+1~2mar,inc[cp20]/46,XX[1]

 05H149 46,XY[20]
 05H160 46,XY[22]
 05H186 46,XY[22]
 05H192 46,XY[18]
 05H195 46,XX[20]
 06H026 47,XX,+21[11]/46,XX[10]
 06H028 46,XX[20]
 06H029 46~48,X,del(X)(p22.1),del(2)(p21),add(4)(p11),+7,+der(7)add(7)(p22),-8,
 del(9)(p13),del(12)(p11.2),-14,-15,add(22)(p13),+1~6mar,inc[cp19]/46,XX[1]

 06H040 45,X,-Y[19]/46,XY[2]
 06H045 46,XX,4~46dmin[22]
 06H061 46,XX[20]
 06H073 46,XY,del(1)(p13)[21]
 06H077 47,XX,+8[21]/46,XX[1]

06H135 35~42,XY,-5,-8,-9,add(10)(p11),add(11)(q22),-13,?der(13)add(13)(q34),-14,
add(15)(p11),-16,-17,-17,-18,+19,-20,-21,+r,+1~3mar[cp10]/77~83,-X,-Y,-5,-5,-8,-8,-9,
-9,?der(9)add(9)(q34),?der(9)add(9)(q34)x2,add(10)(p11),add(10)(p11)x2,
-11,add(11)(q22),add(11)(q22)x2,-13,-13,-14,-14,add(15)(p11)x2,-16,-16,-17,-17,-20,
-20,-21,-21,+mar1x2,+mar2x2,+mar2x3,inc[cp13]

06H146 46,XY[19]

07H005 46,XX[22]

07H020 46,XY[22]

07H042 46,XY[20]

07H055 46,XY[20]

07H061 46~48,X,add(X)(p11),-3,-5,add(6)(p21),add(9)(p13),del(12)(p11),-17,+6mar[cp19]/
46,XX[1]

07H062 46,XY[20]

07H069 46,XY,inv(7)(q22q36)[20]

07H083 46,XX[20]

07H098 46,XY,del(9)(q13q22),t(10;11)(q24;p15)[21]

07H107 46,XX[20]

07H125 46,XX[20]

07H133 46,XX,t(13;6;17)(q14;p21;q21)[18]/46,XX[4]

07H134 46,XY[21]

07H143 Absence de métaphase.

07H151 47,XY,+13[2]/46,XY[20]

07H156 45~48,XY,+3,dic(3;11)(q11;p15),der(5)t(5;17)(q31;q12),+6,-11,dic(11;?)(p15;?)X2,+13,
-17,-20,+22,+mar[cp20]

07H158 46,XY[20]

07H160 45,XX,-7[19]/46,XX[1]_FISH MLL positif

08H004 Nombre insuffisant de métaphases.

08H011 47,XY,+8[8]/46,XY[2]

08H012 47,XX,+11[21]

08H036 Absence de métaphases.

08H049 46,XY[18]

08H053 46,XX[21]

08H054 42~44,XY,?t(2;3)(q21;q2?2),add(3)(p11),-5,-7,-12,+1~5mar[cp20]

08H056 46,XX,?t(10;21)(p11.2;q22)[5]/46,XX[18]

08H063 47,XY,+8[7]/46,XY[5]

08H065 46,XY,add(7)(q36)[6]/46,XY[14]
 08H082 46,XX[21]
 08H087 46,XX[25]
 08H089 46,XY[22]
 08H108 47,XY,+8[2]/48,XY,+8,+8[17]/46,XY[1]
 08H112 46,XY[20]
 08H113 46,XY[23]
 08H118 43~45,X,-X,t(3;16;6)(q26.2;q22;q25),del(5)(q15q33),add(7)(q22),-14,-17,-17,-20,
 -22,+1~4mar[cp20]
 08H138 46,XY[20]
 09H002 46,XX[23]
 09H008 46,XY[20]
 09H013 46,XY[22]
 09H024 48,XY,+8,+8,add(21)(p12),inc[4]
 09H026 46,XY[20]
 09H031 46,XX[20]
 09H042 46,XX[22]
 09H043 46,XY[21]
 09H045 43~44,XX,-2,del(3)(p21),-4,-7,del(10)(p13),-16,del(17)(p11.2),+mar[cp20]
 09H054 46~49,XX,add(5)(q3?5),-6,+8,+9,der(11)t(11;12)(q21;q?15),-12,-14,-16,-18,-20,
 -21,+1~8mar,2min[cp22]
 09H057 48~50,XY,+8,+12,?del(12)(p12),+13,i(17)(q10),+19[cp20]
 09H058 46,XX[20]
 09H070 46,XY[20]
 09H085 47~48,XX,del(5)(q13q33),del(7)(q34),+8,+9,del(13)(q14)[cp21]
 09H106 46,XY[22]
 10H014 75~78,XXYY,+1,inv(3)(?p14p24),-4,del(4)(?q21q25),-5,+8,
 -9,i(11)(q10),+i(11)(q10),+14,+15,-16,-17,
 -18,+19,+20,+21,+22,+1~4mar[cp17]/46,XY,inv(3)(?p14p24)[3]
 10H026 46,XX[23]
 10H038 46,XX[20]
 10H070 49~51,XX,+5,+5,+6,+8,der(11)t(11;17)(p15;q21),+13,+15,-17,-18,+1~4mar[cp22]
 10H087 47~48,XY,-5,-8,-11,+1~3r,+1~6mar[cp23]/46,XY[1]
 10H092 46,XX[21]

10H130 45~59,XY,+Y,add(1)(p3?5),del(5)(q32),-6,add(6)(p21),+8,+11,
-12,der(12)t(12;?;12)(p13;?;?q13),+13,+15,+17,+19,
-20,+22,+mar1,+mar1x2,+mar2x2,+mar2x3,+mar2x4[cp21]

RT-qPCR: réaction de polymérisation en chaîne quantitative suite à une transcription inverse ; BCLQ: Banque de cellules leucémiques du Québec; LMA: leucémie myéloïde aiguë.