

Université de Montréal

***Régulation du complexe suppresseur de tumeurs
BAP1/ASXL2 par ubiquitination***

Par Oumaima AHMED

Programmes de biologie moléculaire, Faculté de médecine

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maitrise
en « Biologie moléculaire »*

Octobre 2017

© *Oumaima AHMED, 2017*

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

***Régulation du complexe suppresseur de tumeurs
BAP1/ASXL2 par ubiquitination***

Présenté par :

Oumaima AHMED

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Un président rapporteur

Un directeur de recherche

Un membre de jury

RÉSUMÉ

Introduction:

La monoubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 119 (H2AK119ub) est une modification épigénomique, catalysée par le complexe Polycomb PRC1 par le biais de l'ubiquitine ligase Ring1B /BMI1. Cette modification joue un rôle important dans la régulation de l'expression génique, et est ainsi requise pour le contrôle de plusieurs processus cellulaires associés au développement et à la prolifération cellulaire. Cette modification est reversée par la déubiquitinase (DUB) BAP1, un suppresseur de tumeurs qui constitue la DUB la plus fréquemment mutée dans les cancers humains. Chez la drosophile, la déubiquitination de H2AK118ub, l'analogue de H2AK119ub, est catalysée par la protéine du groupe Polycomb Calypso, l'orthologue de BAP1, qui se trouve associée à son partenaire ASX, et forme ce qu'on appelle le complexe répresseur Polycomb (PR-DUB).

Nous avons précédemment montré que BAP1 forme, chez les mammifères, deux complexes mutuellement exclusifs avec des facteurs de la famille des protéines du groupe Polycomb, ASXL1 et ASXL2 (ASXL1/2), qui sont deux orthologues d'ASX. L'association de BAP1 avec ASXL1/2 stimule son activité DUB et ceci est nécessaire pour une coordination harmonieuse du cycle cellulaire. Mais comment BAP1 agit en tant que suppresseur de tumeurs et comment ces protéines associées sont régulées au niveau moléculaire demeurent des questions importantes. De manière très intéressante, nous avons identifié une monoubiquitination constitutive qui apparaît sur ASXL1/2 seulement en présence de BAP1, et nous avons émis l'hypothèse que cet événement de monoubiquitination joue un rôle essentiel dans la stabilité protéique du complexe BAP1/ASXL1/2 et la coordination de la fonction DUB de ce dernier.

Méthodes et résultats:

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au régulateur transcriptionnel ASXL2, qui interagit, via son domaine ASXM2, avec le domaine C-terminal (CTD) de BAP1. Cette interaction engendre une monoubiquitination qui se produit sur la lysine 370 du domaine ASXM2 et qui régule la fonction du complexe BAP1/ASXL2. De manière intéressante, la monoubiquitination de la lysine K370 stabilise ASXL2, mais peut aussi amorcer sa

polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome. De plus, nous avons démontré que la monoubiquitination d'ASXL2 stimule l'activité DUB de BAP1 envers H2AK119ub.

En conduisant un criblage siRNA des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et des DUBs du génome humain, nous avons démontré que la monoubiquitination d'ASXL2 est directement catalysé par les membres de la famille UBE2E (UBE2E1, UBE2E2 et UBE2E3) et est reversée par la déubiquitinase protéasomale PSMD14.

Au niveau cellulaire, nous avons observé que l'expression d'une forme mutée d'ASXL2 sur son site d'ubiquitination, K370R, retarde la prolifération cellulaire. Un délai de prolifération cellulaire est aussi observé suite à la déplétion d'UBE2E3 par l'approche CRISPR/Cas9.

Enfin, nous avons identifié des mutations de BAP1, retrouvés dans certains cancers, qui abolissent la monoubiquitination d'ASXL2 et ceci est observé lorsque ces formes mutées de BAP1 sont exprimées dans des cellules humaines suggérant ainsi l'importance de cette modification post-traductionnelle dans la suppression tumorale.

Conclusion et pertinence:

Nos résultats indiquent que BAP1 et ASXL2 sont intimement co-régulés par l'ubiquitination de ce dernier. Cela permet au complexe BAP1/ASXL2 de réguler son activité DUB et permettre une prolifération normale des cellules, empêchant ainsi la transformation maligne. Comprendre comment le complexe BAP1 est régulé par ces cofacteurs ASXL1/2 nous permettra de mieux établir son rôle suppresseur de tumeurs, et ainsi conduire au développement de nouvelles thérapies contre le cancer.

MOTS CLÉS :

BAP1, ASXL2, ubiquitination, déubiquitination, H2AK119ub, cancer.

ABSTRACT

Introduction:

Monoubiquitination of histone H2A on lysine 119 (H2AK119ub) is an epigenomic modification catalyzed by the Polycomb complex PRC1 via its ubiquitin ligase Ring1B/BMI1. This modification plays an important role in the regulation of gene expression, and is required for the control of several cellular processes associated with cell development and proliferation. This modification is reversed by the deubiquitinase (DUB) BAP1, a tumor suppressor considered as the most frequently mutated DUB in human cancers. In *Drosophila*, the deubiquitination of H2AK118ub, the analog of H2AK119ub, is catalyzed by the Polycomb protein Calypso, the ortholog of BAP1, which is associated with its partner ASX, and forms the Polycomb repressor complex (PR-DUB).

We have previously shown that BAP1 forms, in mammals, two mutually exclusive complexes with two factors of the Polycomb proteins family, ASXL1 and ASXL2 (ASXL1/2), which are two ASX orthologs. The association of BAP1 with ASXL1/2 stimulates its DUB activity and is necessary for the normal coordination of the cell cycle. But how BAP1 acts as a tumor suppressor, and how these associated proteins are regulated at the molecular level remain important questions to be addressed. Interestingly, we identified a constitutive monoubiquitination that appears on ASXL1/2 only in the presence of BAP1, and we hypothesized that this monoubiquitination event plays an essential role in the protein stability of the BAP1/ASXL1/2 complex and the coordination of its DUB function.

Methods and results:

In our study, we were interested in the ASXL2 transcriptional regulator, which interacts, via its ASXM2 domain, with the C-terminal domain (CTD) of BAP1. This interaction results in a monoubiquitination event on lysine 370 of the ASXM2 domain and this regulates the function of the BAP1/ASXL2 complex. Interestingly, monoubiquitination of lysine K370 stabilizes ASXL2, but can also initiate polyubiquitination and degradation by the proteasome. In addition, we demonstrated that monoubiquitination of ASXL2 stimulates DUB activity of BAP1 on H2AK119ub.

By conducting siRNA screening of ubiquitin conjugating enzymes (E2) and DUBs of all the human genome, we demonstrated that monoubiquitination of ASXM2 is directly catalyzed by members of the UBE2E family (UBE2E1, UBE2E2 and UBE2E3) and is reversed by the proteasomal DUB PSMD14.

At the cellular level, we have observed that the expression of a mutated form of ASXL2 on its ubiquitination site, K370R, delays cell proliferation. The same delay of cell proliferation is also observed following the depletion of UBE2E3 by the CRISPR/Cas9 approach.

Finally, we have identified cancer mutations of BAP1, which abolish the monoubiquitination of ASXM2 when expressed in human cells, suggesting the importance of this post-translational modification for tumor suppression.

Conclusion and relevance:

Our results indicate that BAP1 and ASXL2 are tightly co-regulated by ubiquitination. This allows the BAP1/ASXL2 complex to control its DUB activity and function, promoting normal cell proliferation and preventing malignant transformation. In conclusion, understanding how the BAP1 complex is regulated by ASXL1/2 cofactors will allow us to better establish its tumor suppressor role, and this might help in the development of new therapies against cancer.

KEYWORDS :

BAP1, ASXL2, ubiquitination, deubiquitination, H2AK119ub, cancer.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	III
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
DÉDICACE	XIV
REMERCIEMENTS	XV
I- REVUE DE LITTÉRATURE	1
1- Le système protéasome et l'ubiquitination des protéines	1
2- La réaction d'ubiquitination	2
a- <i>L'enzyme activatrice d'ubiquitine (E1)</i>	3
b- <i>Les enzymes conjuguatrices de l'ubiquitine (E2)</i>	3
c- <i>Les ubiquitine ligases (E3)</i>	4
d- <i>Les (E4) :</i>	6
e- <i>Les exceptions à la cascade classique</i>	6
f- <i>Destin des protéines ciblées</i>	6
3- La déubiquitination	7
a- <i>Les deubiquitinasés et leurs familles</i>	8
b- <i>Mécanismes de régulations des déubiquitinasés</i>	10
c- <i>Les déubiquitinasés et le cancer</i>	11
4- La deubiquitinase et le suppresseur de tumeurs BAP1	12
a- <i>Définition</i>	12
b- <i>Découverte de BAP1</i>	13
c- <i>BAP1 est un suppresseur de tumeurs</i>	13
d- <i>Le complexe multi protéique multi-protéique BAP1</i>	15
5- La marque épigénomique H2AK119ub :	18
a- <i>Définition</i>	18
b- <i>Régulateurs enzymatiques de H2AK119ub</i>	19

c-	<i>Caractérisation du complexe BAP1-ASXL1/ASXL2 et son rôle régulateur de H2AK119ub..</i>	21
6-	<i>Fonctions du complexe BAP1</i>	22
a-	<i>BAP1 et l'expression des gènes :</i>	22
b-	<i>BAP1 et la réplication d'ADN :</i>	24
c-	<i>BAP1 dans la réponse aux dommages à l'ADN :</i>	25
d-	<i>Autres fonctions :</i>	26
II-	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	29
III-	RÉSULTATS ET DISCUSSION	30
1-	<i>ASXL2 est monoubiquitiné sur sa lysine K370 de manière dépendante de BAP1</i>	30
1-	<i>La monoubiquitination d'ASXL2 sur la lysine 370 stabilise le complexe BAP1/ASXL2</i>	32
2-	<i>La monoubiquitination d'ASXL2 stimule l'activité catalytique de BAP1 envers H2AK119ub...</i>	35
3-	<i>La monoubiquitination d'ASXL2 est importante pour la prolifération cellulaire</i>	37
4-	<i>La monoubiquitination d'ASXL2 est régulée par UBE2E3 et PSMD14</i>	39
5-	<i>La monoubiquitination d'ASXL2 est perturbée en présence de mutants de cancer de BAP1</i>	45
IV-	DISCUSSION GÉNÉRALE	47
	<i>Un rôle central de l'ubiquitination du domaine ASXL2 dans la coordination de l'activité DUB du complexe BAP1/ASXL2 et dans la prolifération cellulaire:</i>	47
	<i>Rôle de l'enzyme de conjugaison UBE2E3 et de la deubiquitinase PSMD14 dans la régulation de la stabilité protéique d'ASXL2:</i>	49
	<i>La monoubiquitination d'ASXL2 K370 est perturbée dans des cancers de BAP1</i>	51
	<i>Les voies de signalisation liées au mécanisme de régulation de BAP1 par ubiquitination d'ASXL2</i>	51
V-	MATÉRIELS ET MÉTHODES	53
	<i>Lignées cellulaires</i>	53
	<i>Plasmides et constructions</i>	53
	<i>Transfection transitoire des cellules:</i>	54
	<i>Infection virale des cellules</i>	54
	<i>Immunobuvardage</i>	55
	<i>Immunoprécipitation</i>	55
	<i>Étude de la stabilité des protéines suite aux traitements au MG132 et CHX</i>	56

<i>Essai de formation des colonies (CFA)</i>	56
<i>Immunofluorescence</i>	57
<i>Synchronisation et analyse du cycle cellulaire par FACS</i>	57
<i>Déplétion par CRISPR-Cas9 gRNA knockout</i>	58
VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	59
VII- RÉFÉRENCES	i

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique des étapes de la protéolyse et de la cascade enzymatique de la réaction d'ubiquitination.

Figure 2 : Les familles des E3 ligases et leurs complexes protéiques.

Figure 3 : Les différents types d'ubiquitination des protéines.

Figure 4 : Les sites catalytiques des deux superfamilles de deubiquitinases.

Figure 5 : Schéma représentant la structure protéique de BAP1.

Figure 6 : Le complexe multi-protéique BAP1.

Figure 7 : Le complexe PR-DUB chez la drosophile et chez l'humain.

Figure 8 : ASXL2 est modifiée par ubiquitination et sa co-expression avec BAP1 augmente son niveau d'ubiquitination.

Figure 9 : La monoubiquitination d'ASXL2 est catalysée sur la lysine 370 de son domaine d'interaction avec BAP1, ASXM2.

Figure 10 : Étude de la stabilité protéique d'ASXL2 monoubiquitinée *versus* ASXL2 non monoubiquitinée.

Figure 11 : Représentation schématique expliquant les différents cas de figure découlant de la monoubiquitination d'ASXL2.

Figure 12 : Comparaison des niveaux d'ubiquitination de H2AK119 entre des cellules exprimants ASXL2 ou ASXL2 K370R en présence de BAP1.

Figure 13 : Étude de la prolifération cellulaire suite à l'expression de la forme sauvage ou la forme mutée (K370R) d'ASXL2.

Figure 14 : Régulation de la monoubiquitination d'ASXL2 par la deubiquitinase PSMD14.

Figure 15 : Identification de l'enzyme conjuguatrice (E2) qui catalyse la monoubiquitination de la lysine 370 d'ASXL2.

Figure 16 : La déplétion d'UBE2E3 par CRISPR-Cas9 retarde la prolifération cellulaire.

Figure 17 : Des mutations de BAP1, retrouvés dans certains cancers, inhibent la monoubiquitination de son partenaire ASXL2 et par conséquent, son activité catalytique.

Figure 18 : Schéma représentatif du nouveau mécanisme de régulation proposé du complexe BAP1/ASXL2 par ubiquitination.

Tableau 1 : Tableau descriptif de: (1) la composition du complexe multi-protéiques BAP1, (2) des domaines fonctionnels de chaque partenaire du complexe BAP1 et (3) de l'association de leurs orthologues à des complexes chez la drosophile.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa : Acides aminés

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP: Adénosine monophosphate

ARN : Acide ribonucléique

ASXL1/2 : Régulateurs de transcription du groupe Polycomb (*Additional Sex Combs Like 1/2*)

ATP : Adénosine triphosphate

BAP1 : Protéine associée à BRCA1 (*BRCA1-Associated Protein 1*)

BRCA1 : Gène du cancer du sein 1 (*breast cancer gene 1*)

BTB: (*Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac*)

C- terminal: Extrémité carboxy-terminale

CFA: Essai de formation de colonies (*Colony forming assay*)

CHIP: Méthode d'Immunoprecipitation de chromatine (*Chromatin immunoprecipitation*)

CHIP-seq: (*chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing*)

CHX: Cycloheximide

CTD : Domaine C-terminale (*C-Terminal domain*)

CUBI : Interface intramoléculaire entre BAP1 et ASXL1/2 favorisant la liaison à l'ubiquitine (*composite ubiquitin binding interface*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole

DDR: Réparation de dommages à l'ADN (*DNA damage repair*)

DMEM: (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DUB : Deubiquitinase

E1 : Enzyme activatrice de l'ubiquitine

E2 : Enzyme conjugatrice de l'ubiquitine

E3 : Ubiquitine ligase

E4 : Enzyme d'élongation de chaînes d'ubiquitine

Ets : (*Erythroblast transformation specific*)

FACS : Tri cellulaire activé par fluorescence (*fluorescence-activated cell sorting*): Cytométrie en flux

FANCD2: (*Fanconi Anemia Complementation Group D2*)

FBS: sérum de veau fœtal (*Fetal bovine serum*)

FOXK1/2: (*Forkhead Box K1*)

gRNA: ARN guide (*Guide RNA*)

HBM: (*HCF-binding motif*)

HCF1: (*Host Cell Factor-1*)

HPV: Un virus à ADN faisant partie de la famille des Papillomaviridae (*Human papillomavirus*)

HR: Recombinaison homologue (*Homologous recombination*)

INO80 : Complexe de remodelage de la chromatine INO80

iPOND: Technique de purification de protéines (*Purification of proteins on newly synthesized DNA*)

IR: Rayonnement ionisant

JAMM: Une famille de métallopeptidases (JAB1/MPN+/MOV34)

K: Lysine

LB: (*Laemmli Sample Buffer*)

LSD2: Déméthylase d'histones (*Lysine-Specific Histone Demethylase 1B*)

min: Minute

MINDY: Une famille de deubiquitinasés (*The motif interacting with ubiquitin (MIU)-containing novel DUB family*)

MJD: Une famille de deubiquitinasés (*Machado-Joseph Domain Proteases*)

ml: Millilitre (1e-3 litre)

mM: Millimolaire (1e-3 mol)

MNase : Exonucléase micrococcalle (*Micrococcal nuclease*)

MYSM1 : Deubiquitinasé de la famille JAMM (*Myb Like, SWIRM And MPN Domains 1*)

ng: Nanogramme (1e-9 gramme)

NHEJ: Recombinaison non holologue (*Non homologous end joining*)

NLS: Signal de localisation nucléaire (*Nuclear localisation signal*)

N-terminal: Extrémité amino-terminale

PcG: Protéine du groupe Polycomb (*Polycomb group proteins*)

PCR: Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (*Polymerase chain reaction*)

PEI: Agent de transfection de cellules (*polyethylenimine*)

PHD: (*Plant homeodomain*)

pmol: picomol (1e-12 mol)

PR-DUB : Complexe Polycomb répresséur DUB (*Polycomb repressive deubiquitinase complex*)

RING: Domaine à doigts de zinc (*Really Interesting New Gene*)

RNAi: ARN interférence (*RNA interference*)

rpm: Rotation par minute (*Rotation per minute*)

RWD: (*RING* finger-containing proteins, *WD-repeat-containing proteins*, and yeast *DEAD (DEXD)-like helicases*)

SDS_PAGE: (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SET: (*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax*)

siRNA: petits ARN interférents (*Small interfering RNA*)

SWIRM: (*SWI3, RSC8 and MOIRA*)

TAP: Chromatographie d'affinité en tandem (*Tandem affinity purification*)

TNFR: (*Tumor necrosis factor receptor*)

TPR: (*Tetratricopeptide repeat*)

Ub : Ubiquitine

UBC: Domaine de conjugaison à l'ubiquitine (*Ubiquitin-conjugating domain*)

UBE2E : Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2E*)

UBE2O : Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2O*)

Ubl : (*ubiquitine-like protein*)

UbPr : Système ubiquitine/protéasome

UCH: C-terminale hydrolases de l'ubiquitine (*Ubiquitin C-terminal hydrolase*)

USP : Une famille de protéases spécifiques à l'ubiquitine (*The ubiquitin-Specific Proteases*)

WHD: (*winged helix domain*)

YY1: Yin Yang 1

µg: Microgramme (1e-6 gramme)

µl: Microlitre (1e-6 litre)

µM: Micromolaire

DÉDICACE

*Hommage aux âmes des personnes que j'ai perdu pendant ce parcours,
mes deux chères grands-mères,
reposez en paix...*

REMERCIEMENTS

Les mots ne suffiront jamais pour exprimer mon plus grand remerciement, à la personne à qui je dois tout ce que je suis, et tout ce que je serais, mon directeur de recherche Dr El Bachir AFFAR. Ma carrière en recherche vient de s'amorcer grâce à toi. Merci infiniment Bachir.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de jury d'évaluation d'avoir accepté de donner un peu de leur temps précieux pour évaluer mon mémoire. Je remercie aussi le directeur du programme de biologie moléculaire Dr Richard BERTRAND pour son aide, sa patience, sa gentillesse et ses suggestions qui ont contribué à la réalisation de mon parcours.

Je remercie également tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyé durant ces deux belles années, et qui sont devenus mes amis et ma famille. Leur aide est immense, et leur soutien est sans égale. Merci de me faire surmonter la distance de ma famille. Bachir, Diana, Salima, Haithem, Louis, Nadine, Saad, Achraf, Pascale et Maxime, Je vous aime sans exception!

Petit bambou, merci pour ton soutien, ton encouragement, et surtout merci pour les glaces!

Je remercie infiniment mon père, qui a toujours veillé à ce que je sois forte, que je m'accomplisse, et que je continue jusqu'au bout pour réaliser mes rêves! Je t'aime papoune!

Ma mère, ton amour infini, et ta sagesse, font de moi la femme que je suis aujourd'hui. Tu es toujours dans mon cœur.

Ahmed, Amel et Ons, l'amour que je tiens à vous est immense, merci de faire partie de ma vie.

Pour tout le reste de ma famille, surtout ma tante Thouraya, vous êtes ma source de force. Merci d'être là, à mon côté, pendant tous les moments de ma vie.

*REVUE DE
LITTÉRATURE*

I- REVUE DE LITTÉRATURE

1- *Le système protéasome et l'ubiquitination des protéines*

Les modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitination, jouent un rôle primordial dans la régulation fine des fonctions des protéines en modulant leurs localisations subcellulaires, leurs activités enzymatiques et leurs interactions avec d'autres partenaires ¹. Le système ubiquitine/protéasome (UbPr), mettant en jeu la réaction d'ubiquitination, constitue un modulateur cellulaire très critique dans la régulation de la protéolyse intracellulaire et la fonction des protéines ². En effet, le UbPr est un système de signalisation très sophistiqué essentiel pour de nombreux processus cellulaires comme, la prolifération, l'apoptose, la différenciation ou encore la réponse immunitaire. Le protéasome, un complexe multi-protéique hautement conservé au cours de l'évolution, exerce un rôle central dans la dégradation contrôlée des protéines.

Depuis la première mise en évidence de l'existence d'une dégradation des protéines cellulaires, il y a maintenant plus de 30 ans, l'ubiquitination des protéines est devenue parmi les sujets les plus actifs en recherche biomédicale, et l'importance physiologique de ce système a mérité le prix Nobel de chimie en 2004.

L'ubiquitination des protéines est une réaction enzymatique qui se produit dans toutes les cellules de notre corps, et qui aboutit à la liaison covalente de l'ubiquitine, une petite protéine de 8 kDa, sur une ou plusieurs lysines acceptrices d'une protéine substrat. Ce processus d'« étiquetage » cible toutes les protéines mal formées, surnuméraires ou non nécessaires pour la cellule afin qu'elles soient dégradées par le protéasome. Tenant compte de la multitude de substrats et des processus impliquant l'ubiquitination, il n'est pas surprenant que des dysfonctionnements du système UbPr soient impliqués dans de nombreuses pathologies, comme le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies auto-immunes et certaines infections virales ³. En effet, la possibilité de manipuler la machinerie protéolytique au sein du système UbPr, avec de petites molécules activatrices ou inhibitrices, afin de contrôler la stabilité et la fonction de certaines protéines cibles pourrait représenter une plateforme importante pour la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2- *La réaction d'ubiquitination*

L'ubiquitination des protéines requiert l'activité séquentielle de trois types d'enzymes ⁴. Cette réaction qui nécessite l'ATP, est tout d'abord déclenché par la formation d'une liaison thioester entre l'ubiquitine et une enzyme d'activation (ubiquitin-activating enzyme ou E1). Il s'agit d'une adénylation entre la glycine 76 (G76) de l'Ub et la cystéine 632 (C632) de l'enzyme E1. L'ubiquitine est ensuite transférée, en formant une autre liaison thioester entre la G76 de l'ubiquitine et la cystéine du site catalytique de l'enzyme conjugatrice de l'ubiquitine, la E2 (ubiquitin-conjugating enzymes ou E2). Les E2 confèrent un premier niveau de spécificité dans la reconnaissance des substrats. Certaines d'entre elles peuvent transférer directement l'ubiquitine sur des protéines cibles. Cependant, dans l'immense majorité des cas, une troisième classe d'enzymes, appelée ubiquitine ligase ou E3 est nécessaire et joue le rôle principal dans la reconnaissance des substrats. Enfin, un dernier type d'enzyme, dit E4, a récemment été identifié et jouerait un rôle dans l'élongation de certaines chaînes d'ubiquitine (Figure 1B).

Dans la plupart des cas, la polyubiquitination des substrats, est associée à la dégradation protéasomale par le protéasome 26S. Le protéasome 26S est un complexe protéolytique d'environ 2,5 MDa formé par l'association du protéasome 20S (le cœur protéolytique du complexe) et du complexe régulateur 19S qui assure la reconnaissance des protéines ubiquitinées ainsi que l'enlèvement des chaînes de polyubiquitine des protéines modifiées avant que celles-ci ne rentrent à l'intérieur de la cavité interne du protéasome. Ce processus permet le recyclage de l'ubiquitine. Plusieurs activités enzymatiques du protéasome, de spécificité différente, assurent la dégradation de la protéine cible en peptides de quelques acides aminés. Ces derniers seront, par la suite, digérés par des peptidases cytosoliques afin de libérer les acides-aminés qui seront réutilisés par la cellule (Figure 1A). Cependant, l'ubiquitination n'entraîne pas toujours la dégradation des protéines cibles. En effet, il a été démontré que, de manière similaire à d'autres modifications post-traductionnelles, l'ubiquitination peut aussi réguler la fonction des protéines de manière indépendante de la protéolyse ⁵.

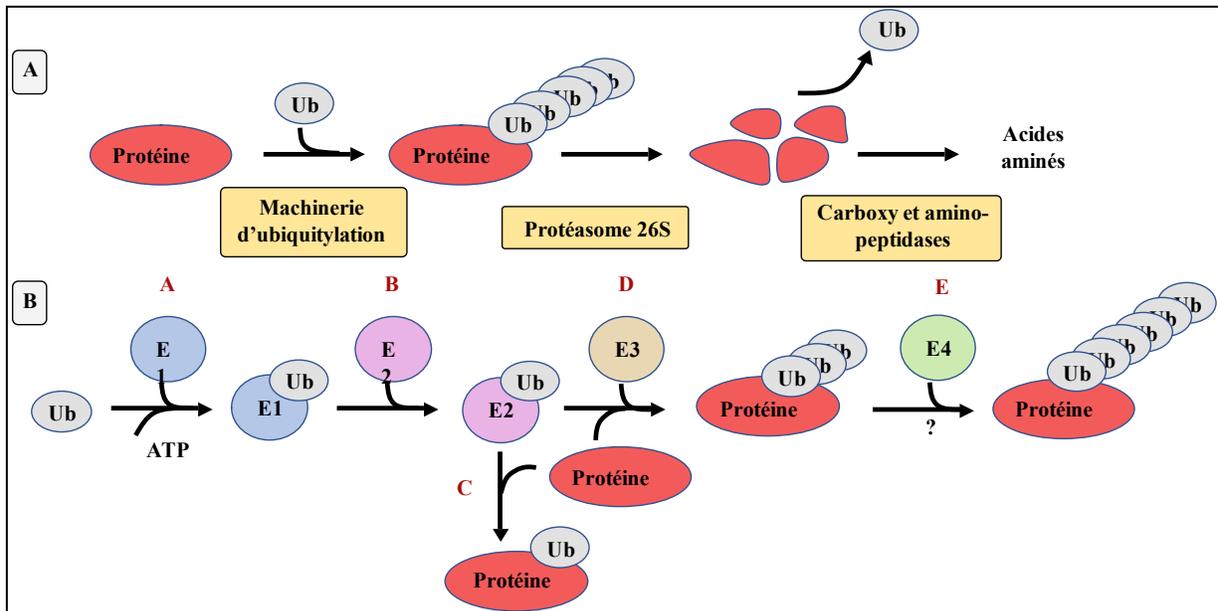


Figure 1 : Représentation schématique des étapes de la protéolyse (A) et de la cascade enzymatique de la réaction d'ubiquitination (B).

a- L'enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1)

L'enzyme activatrice de l'ubiquitine (UBA1) ou E1, réagit avec l'ubiquitine pour former un intermédiaire, l'adénylate d'ubiquitine (c'est une liaison à haute énergie entre l'extrémité carboxy-terminale de l'ubiquitine et l'AMP)⁶. L'ubiquitine est par la suite transférée sur une cystéine dans le domaine catalytique d'UBA1 pour former le complexe ubiquitine/UBA1 activé. Une seconde molécule d'ubiquitine est convertie en adénylate d'ubiquitine et se lie de manière non-covalente au domaine d'adénylation. Le complexe E1 doublement chargé est alors reconnu par une enzyme de conjugaison E2, qui reçoit l'ubiquitine pour former un complexe E2 chargé d'ubiquitine⁷.

b- Les enzymes conjugatrices de l'ubiquitine (E2)

Le génome humain code pour ~ 40 enzymes E2 différentes, caractérisées par un domaine central UBC conservé d'environ 150 acides aminés contenant le résidu cystéine nécessaire à leur activité catalytique. Beaucoup de ces enzymes E2 ont également des extensions

N- ou C-terminales, dont les rôles ne sont pas très bien compris ⁸. En effet, l'extension N-terminale des enzymes de conjugaison d'ubiquitine appartenant à la famille UBE2E limite l'assemblage de chaînes d'ubiquitines ⁹, assurant uniquement la monoubiquitination des substrats.

Les E2s présentent différentes spécificités au niveau de leur habilité à catalyser différentes chaînes d'ubiquitines. À ce jour, il est connu que la plupart des E2s permettent la formation d'extension de chaînes d'ubiquitines en fonction des liens isopeptidiques spécifiques qu'elles favorisent entre les molécules d'ubiquitines. Comme par exemple Cdc34, qui permet la formation de chaînes de polyubiquitines liées par la lysine 48 de l'ubiquitine elle-même. La polyubiquitination en chaînes K63 peut être catalysée par le complexe E2, Mms2-Ubc13.

c- Les ubiquitine ligases (E3)

Les ubiquitines E3 ligases constituent les enzymes les plus nombreuses du système UbPr, on en compte plus de 600 enzymes dans le génome humain. Les E3 ligases se répartissent en deux grandes catégories : Les E3 ligases qui forment une liaison thioester avec l'Ub et participent directement au transfert de l'ubiquitine sur le substrat (on parle dans ce cas des E3s de la famille des HECT), et celles qui agissent comme un adaptateur entre les E2 et les substrats afin de promouvoir le transfert de l'ubiquitine (il s'agit des E3s de la famille des RING ou les E3s avec les domaines U-box). La spécificité de la réaction d'ubiquitination est principalement attribuée à l'action des E3s ligases.

La première catégorie se limite aux E3 de la famille HECT (au moins une vingtaine de membres chez l'humain), qui ont été caractérisées initialement par homologie avec le domaine carboxy-terminal de l'E3 E6-AP. Le domaine catalytique HECT (environ 40 kDa) est situé dans la région carboxy-terminale, alors que la reconnaissance des substrats est assurée par les domaines retrouvés dans la région amino-terminale (Figure 2A). Les cibles physiologiques d'E6-AP sont encore peu connues. Néanmoins, dans les cellules infectées par les formes oncogéniques HPV-16 et HPV-18 du virus du papillome humain, E6-AP est recrutée par une protéine virale, E6, pour provoquer l'ubiquitination et la dégradation du suppresseur de tumeurs p53 ¹⁰. Outre E6-AP, la protéine HECT la mieux caractérisée est RSP5/Nedd4, qui est impliquée dans de nombreux processus biologiques, notamment l'internalisation suivie par la dégradation

de protéines associées à la membrane plasmique ¹¹, et la destruction de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II chez la levure ¹².

La majorité des E3 caractérisées, forment la catégorie des E3 contenant un domaine en doigt de zinc RING (*Really Interesting New Gene*). Ce domaine est formé de résidus histidine et cystéines qui sont espacés de manière distinctive et coordonnés par un ion Zn²⁺ (Figure 2B). Dans cette classe d'enzymes, on trouve des E3 ligases monomériques contenant à la fois le domaine de reconnaissance du substrat et le domaine Ring finger responsable de la conjugaison de l'ubiquitine. D'autre part, on y trouve aussi les E3 ligases multimériques qui contiennent de nombreuses sousunités, chacune responsable d'une fonction spécifique dans la régulation de la E3 ligase. Notamment, on trouve trois types de complexes supramoléculaires (SCF, CBC et APC/C) qui sont maintenant bien caractérisés et présentent des similitudes architecturales et fonctionnelles frappantes (Figure 2).

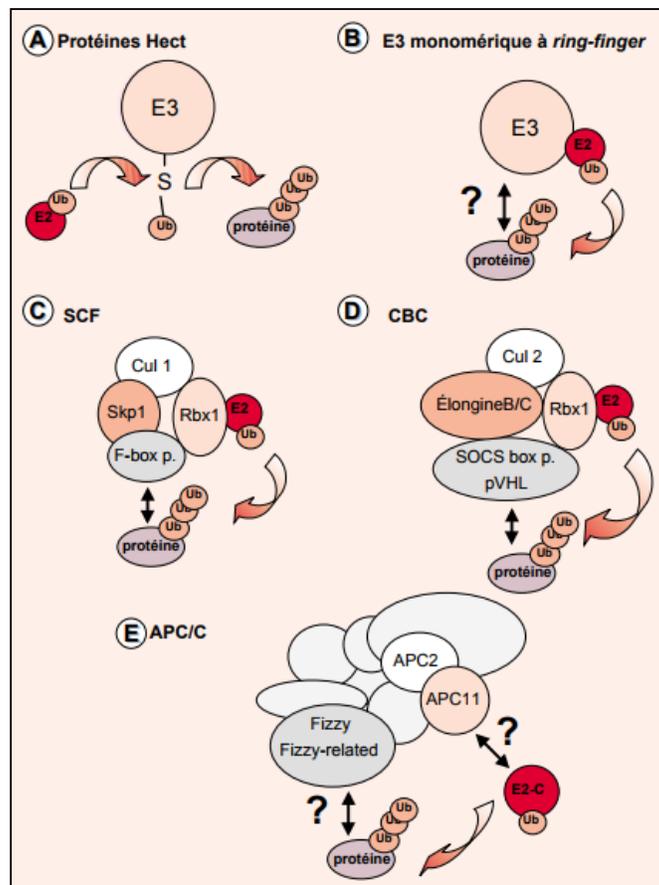


Figure 2 : Les familles des E3 ligases et leurs complexes protéiques.

(Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. Coux O ; Piechaczyk M, Med Sci (Paris), 2000, Vol. 16, N° 5; p.623-9)

d- Les (E4) :

Pour de nombreuses protéines, la chaîne de polyubiquitine est formée par une série de cycles identiques impliquant successivement les enzymes E1, E2 et E3, jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de molécules d'ubiquitine pour permettre la dégradation du substrat par le protéasome. En revanche, pour d'autres protéines, la formation de la chaîne d'ubiquitine implique, en plus de E1/E2/E3, l'intervention d'une autre famille d'enzymes, appelées enzymes d'élongation ou E4, comme l'enzyme de type U-box UFD2a, la première caractérisée chez la souris¹³. Chez l'humain on compte deux E4 identifiées, CHIP et p300¹⁴.

Cependant, cette famille d'enzymes reste récente et des études ultérieures nous aideront à mieux comprendre son mécanisme d'action.

e- Les exceptions à la cascade classique

Dans une cellule, les E2 existent principalement sous la forme chargée par l'ubiquitine (E2-Ub) et sont donc prêtes à réagir avec une E3 spécifique à un substrat. Les E2-Ub ont de faibles taux de transfert d'ubiquitine en l'absence d'une ligase E3, probablement pour éviter les cycles d'ubiquitination non spécifiques. Cependant, il existe des E2 avec un taux de réactivité intrinsèque élevé qui sont capables de catalyser l'ubiquitination d'un substrat sans impliquer une E3 ligase. Par exemple, la famille d'enzymes UBE2E qui a fait l'objet de mes travaux de recherches présentés dans ce mémoire, possède une activité E3 ligase. Ceci constitue une exception à la cascade classique d'ubiquitination et rajoute de la complexité dans le réseau d'interactions entre les enzymes du système ubiquitine.

f- Destin des protéines ciblées

L'ubiquitine peut être liée à sa cible de multiples façons. Dans le cas le plus simple, une seule molécule d'ubiquitine est attachée sur une lysine, il s'agit de la mono-ubiquitination qui représente la forme de modification la plus abondante dans les cellules. D'autre part, plusieurs résidus lysine de la même protéine peuvent porter une seule molécule d'ubiquitine par résidu, il s'agit de la multi-monoubiquitination. Par ailleurs, chacun des sept résidus lysine de l'ubiquitine

elle-même (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) peut être impliqué dans la formation de chaînes d'ubiquitine sur une lysine du substrat, il s'agit alors de polyubiquitination.

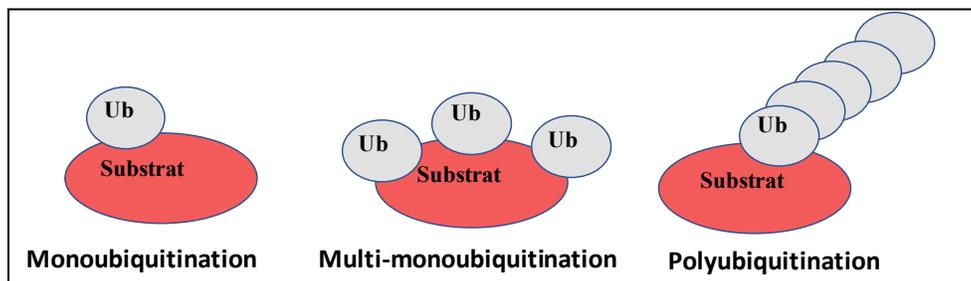


Figure3 : Les différents types d'ubiquitination d'un substrat.

Le sort d'une protéine modifiée par des molécules d'ubiquitine dépend en partie de la nature de l'ubiquitination, ou de la longueur et du type des chaînes d'ubiquitine formées ¹⁵. On sait que l'ubiquitination des protéines peut aussi conduire à des effets indépendants de la protéolyse. Par exemple, l'ajout d'une seule ubiquitine sur un ou plusieurs résidus lysine d'une protéine cible peut modifier sa localisation cellulaire, sa conformation, son activité, ou ses interactions avec d'autres protéines ¹⁶.

Les polymères d'ubiquitines les mieux caractérisés à ce jour sont les chaînes de type K48 et K63 dans lesquelles les ubiquitines sont liées via leurs lysines 48 ou 63 respectivement. Les chaînes K48 induisent la dégradation de la protéine ciblée, par le protéasome ^{2,17}. Par contre, l'attachement de chaînes K63 a un rôle dans l'activation de protéines, impliquées dans différents processus cellulaires comme la réparation de l'ADN ¹⁸, l'endocytose ¹⁹ ou la signalisation intracellulaire ²⁰. Les chaînes K63 jouent aussi un rôle particulièrement important dans la régulation de l'activation de protéines impliquées dans les voies de signalisation NF- κ B (Nuclear factor kappa B) ²¹. Enfin, l'ajout de chaînes K29 semble conduire les protéines ciblées vers une dégradation lysosomale ²².

3- La déubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle très dynamique et complexe. En fait, que ce soit pour ses rôles liés à la protéolyse, la localisation ou la fonction de certaines protéines, l'ubiquitination doit être extrêmement contrôlée pour éviter des effets délétères ²³.

Comme toutes les réactions post-traductionnelles, l'ubiquitination est une réaction réversible et la réaction inverse est la déubiquitination.

a- Les deubiquitinases et leurs familles

Les enzymes qui enlèvent l'ubiquitine des protéines sont appelées les déubiquitinases (DUBs) ²³. Les DUBs ont pour rôle d'assurer un équilibre dynamique du système ubiquitine. Ainsi, les DUBs agissent pour contrecarrer l'action des ubiquitines ligases et ce en catalysant l'enlèvement d'une monoubiquitination ou une polyubiquitination. Par leur spécificité envers leurs substrats, les DUBs assurent différentes fonctions dans la régulation de la signalisation de l'ubiquitine. En effet, l'enzyme USP5/IsoT permet la maturation de l'ubiquitine à partir de précurseurs d'ubiquitines ou de monomères d'ubiquitines fusionnées aux protéines ribosomales. Les DUBs associées au protéasome, comme PSMD14, UCH37 et USP14 permettent le recyclage de molécules d'ubiquitines en clivant des chaînes de polyubiquitine, K48, lors de la dégradation protéasomale. D'autre part, certaines DUBs peuvent catalyser le remplacement d'une chaîne de polyubiquitine. Comme c'est le cas de la DUB A20 qui permet de renverser des chaînes K63 par des chaînes K48. Il en existe plusieurs familles de DUBs qui jouent un rôle déterminant dans la coordination de la machinerie d'ubiquitination ^{24,25}. En effet, le génome humain code pour environ 100 DUBs regroupées en 2 superfamilles, basées sur leurs séquences et la structure de leurs domaines catalytiques. Six familles de DUBs de structures distinctes sont définies à nos jours. On y trouve les cystéine-protéases et les métalloprotéases ²⁴. Les **cystéine-protéases** comportent cinq familles de DUBs : les *Ubiquitin-Specific Proteases* (USP, 54 membres), les *Ubiquitin C-terminal Hydrolases* (UCH, 4 membres), les *Ovarian tumor domain proteases* (OTU, 16 membres), les *Machado-Joseph Domain Proteases* (MJD, 4 membres) et la famille de DUBs nouvellement identifiée, *the motif interacting with ubiquitin (MIU)-containing novel DUB family* (MINDY, 4 membres). Par contre, une seule famille de DUB de **métalloprotéases** existe : la famille des JAB1/MPN+/MOV34 (JAMM, 16 membres). Par définition, l'activité enzymatique des cystéine-protéases est assurée par un groupement thiol d'une cystéine du site actif qui est assistée par un résidu histidine adjacent. Ce dernier est polarisé par un résidu aspartate. Ces trois résidus forment ce qu'on appelle la triade catalytique. Par

contre, les métalloprotéases utilisent généralement un ion Zn^{2+} pour la catalyse, et leur triade catalytique est formée par un aspartate et deux histidines ²⁶.

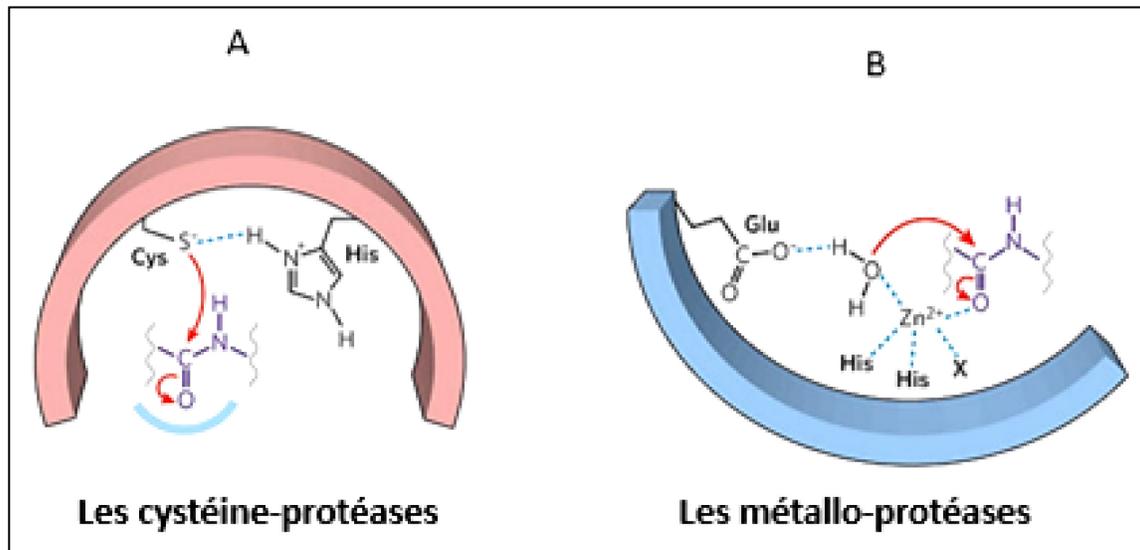


Figure 4 : Les sites catalytiques des deux superfamilles de deubiquitinases.

(Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. JJ Neitzel. (2010) Nature Education 3(9):21)

De manière intéressante, beaucoup de DUBs sont localisées au niveau de compartiments, structures cellulaires particulières ou au sein des complexes multi-protéiques. De ce fait, les DUBs possèdent une spécificité particulière soit pour les monomères d'ubiquitine ou les chaînes de polyubiquitines et ce grâce à leurs domaines de liaison à l'ubiquitine (UBD). Les DUBs BAP1 et UCH37 appartenant à la famille UCH ainsi que USP16 appartenant à la famille des USP, catalysent l'enlèvement de la monoubiquitination des substrats. D'autres DUBs ont une haute spécificité et peuvent déubiquitiner un nombre très limité de substrats. C'est le cas notamment de l'enzyme HAUSP/USP7, qui est une protéase à cystéine appartenant à la famille des USP ²⁷. Cette isopeptidase interagit avec l'ubiquitine ligase MDM2 et est capable de la déubiquitiner *in vitro* et *in vivo*, ce qui influence le niveau d'expression de MDM2. Cette dernière est responsable de l'ubiquitination et la dégradation du suppresseur de tumeurs et facteur de transcription p53, permettant de garder des niveaux très bas de cette protéine en

absence de stress ²⁸. D'autre part, BRCC36 et AMSH possèdent une spécificité très élevée envers les chaînes K63 ^{29, 30}.

b- Mécanismes de régulations des déubiquitinases

La plupart des DUBs peuvent être potentiellement actives dès leur synthèse, contrairement à d'autres protéases qui sont produites sous forme de précurseurs inactifs ³¹. Les DUBs sont sujettes à divers mécanismes de régulation qui peuvent être regroupés en deux catégories : (i) régulation de la localisation et l'abondance et (ii) régulation de l'activité catalytique. En effet, les structures cristallographiques d'USP7 et UCHL3 ont montré que bien qu'ayant très peu d'homologies dans leurs séquences, les sites catalytiques des UCHs et des USPs sont parfaitement superposables ^{32, 33, 34}. Un second point remarquable est que les sites catalytiques de ces deux types d'enzymes, dans leur forme libre, ne sont pas dans une conformation active. Par conséquent, les DUBs doivent subir un réarrangement, en présence de l'ubiquitine, permettant le bon positionnement des résidus catalytiques. L'avantage de ce changement de conformation est que ces enzymes sont catalytiquement inertes face à la plupart des protéines cellulaires et spécifiques de l'ubiquitine ou de certaines protéines *ubiquitine-like* (Ubl). En plus de leur poche catalytique, les DUBs contiennent des domaines d'interaction protéiques qui induisent des changements conformationnels régulant leur activité en ciblant des substrats particuliers et répondant à divers modes de régulation ²⁵.

L'intégration des DUBs dans des complexes multi-protéiques est un autre mode de régulation de ces dernières qui peut déterminer leur spécificité et contrôler leur activité catalytique envers leurs substrats. Par exemple, RPN11 présente une activité DUB, uniquement quand elle est associée au complexe régulateur 19S du protéasome ³⁵.

Il existe également des cofacteurs qui modulent l'activité des DUBs. C'est le cas de Bre5, un cofacteur de la déubiquitinase Ubp3, qui est nécessaire pour stimuler son activité protéase chez la levure ³⁶. Or, l'homologue humain de Bre5, G3BP1, inhibe l'activité de USP10 *in vitro* ³⁷, indiquant que les cofacteurs peuvent réguler les DUBs en activant ou en inhibant leur activité.

Les DUBs sont aussi étroitement régulées par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'ubiquitination, ^{38, 39, 40}. En effet, la phosphorylation de la DUB

CYLD, suite à une stimulation du récepteur TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) par la cytokine TNF α , est nécessaire pour promouvoir cette voie de signalisation. Cette phosphorylation permet d'inhiber l'activité DUB de CYLD afin de permettre l'accumulation de son substrat TRAF2 polyubiquitiné via les chaînes d'ubiquitine K63 ⁴¹⁻⁴³

D'autres mécanismes comme le contrôle de l'expression génique et la régulation par les microARN s'ajoutent aussi pour assurer une régulation hautement fine des DUBs durant le cycle cellulaire ou en réponse à différents stimuli. Par exemple l'expression génique de USP1 est induite vers la fin de la phase S. USP1 déubiquitine son substrat FANCD2 (*Fanconi anemia (FA) protein*) dont la monoubiquitination, qui est requise pour le bon déroulement de la phase S, doit être éliminée à la fin de cette phase pour permettre la poursuite du cycle cellulaire ⁴⁴.

c- Les déubiquitinases et le cancer

Les DUBs contrôlent la majorité des processus cellulaires, tels que la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la transcription des gènes, la réplication et la réparation de l'ADN. Les DUBs (100 gènes dans le génome humain) jouent des rôles considérables dans le contrôle de plusieurs voies de signalisation importantes et sont ainsi des cibles potentielles pouvant être dérégulées de manière pathologique. En effet, il n'est pas surprenant que des changements des niveaux d'expression, ou des mutations de gènes codants pour les DUBs, soient associées à une multitude de maladies, dont le cancer ⁴⁵. Dans ce contexte nous pouvons citer les dérégulations de la voie p53 via la DUB USP7.

p53 est un suppresseur de tumeurs majeur qui, en cas de stress, initie l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose ⁴⁶. p53 est hautement régulé par les actions opposées ou collaboratives de l'ubiquitination et de la déubiquitination qui contrôlent sa dégradation par le protéasome ⁴⁶. Dans les conditions normales, le niveau de p53 est maintenu bas par l'action de la ligase E3 MDM2, qui catalyse sa polyubiquitination menant à sa dégradation. Un contrôle dynamique de cette voie p53-MDM2 est assuré par la déubiquitination de MDM2 par la DUB USP7/HAUSP. Dans plusieurs cancers, l'augmentation de l'expression de MDM2 a été observée suite à un mauvais fonctionnement de USP7 ⁴⁷. MDM2 empêche l'accumulation de p53 et par conséquent les cellules échappent aux mécanismes de surveillance assurés par ce dernier, promouvant ainsi le développement de cancers.

Comprendre au niveau moléculaire comment la dérégulation des DUBs mène à la tumorigenèse est important, voire nécessaire, pour développer de nouvelles méthodes de diagnostic et des stratégies thérapeutiques. Effectivement, plusieurs preuves de concept démontrent la faisabilité d'inhibition sélective de voies de signalisation en ciblant le système UbPr. Le succès des inhibiteurs du protéasome confirme notamment que cibler le système UbPr représente une plateforme permettant des traitements efficaces contre le cancer^{48, 49}. Toutefois, certains problèmes, comme le développement de résistance et les effets non spécifiques de ces inhibiteurs restent à être étudiés. Cibler les DUBs pour développer des thérapies anti cancéreuses est une approche relativement récente comparé aux interventions ciblant le protéasome ou les ligases E3. Par un criblage à haut débit, Chauhan et al., ont pu identifier la molécule inhibitrice de USP7, nommée P5091⁵⁰. Cet inhibiteur bloque l'activité d'USP7, résultant ainsi en la polyubiquitination de MDM2, ce qui cause ensuite sa dégradation et par conséquent la stabilisation de p53. De manière significative, P5091 induit l'apoptose même dans les mélanomes résistants à la thérapie au bortezomib, un fameux inhibiteur de protéasome. Les DUBs sont donc de nouvelles cibles contre le cancer qui présentent un grand potentiel thérapeutique.

4- La deubiquitinase et le suppresseur de tumeurs BAP1

a- Définition

BAP1 (*BRCAl-associated protein1*) est un membre de la famille des UCHs des cystéines protéases, dont fait partie UCH-L1, UCH-L3 et UCH-L5. Cependant, BAP1 se distingue par un long domaine C-terminal, absent chez les autres membres de la famille des UCHs. Ce domaine s'affiche comme un élément crucial dans la modulation de l'activité de BAP1. Il permet des associations sélectives avec d'autres protéines et il est le siège de modifications post-traductionnelles qui régulent cette DUB. On retrouve aussi dans le domaine C-terminal un signal de localisation nucléaire, NLS, qui régule la localisation subcellulaire de BAP1⁵¹ (Figure 5).

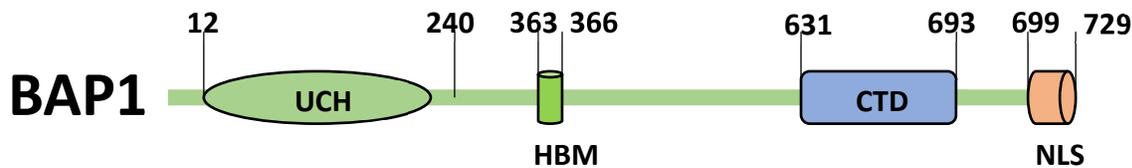


Figure 5 : schéma représentant la structure protéique de BAP1.

UCH: *Ubiquitin Carboxyl hydrolase*, HBM: *HCF-1 binding motif*, CTD: *C-terminal domain*, NLS: *Nuclear localization signal*

b- Découverte de BAP1

BAP1 a été isolée pour la première fois comme étant une déubiquitinase nucléaire qui interagit avec le suppresseur de tumeurs BRCA1 (*Breast cancer-associated protein 1*). Dans cette étude, Jensen et al., ont trouvé que BAP1 interagissait physiquement avec BRCA1. De plus, la surexpression de BAP1 augmentait l'inhibition de la prolifération des cellules du cancer du sein médiée par BRCA1⁵². Dans ce même sens, la surexpression de BAP1 dans les cellules de cancer du sein, MCF7, accentuait la fonction suppressive de tumeurs de BRCA1 et ce en inhibant la prolifération cellulaire⁵³. Jensen et al., ont également trouvé des mutations homozygotes de BAP1 dans la lignée cellulaire de cancer du poumon H226. Ainsi, ils ont proposé pour la première fois que BAP1 serait un nouveau gène suppresseur de tumeurs.

BAP1 agit aussi d'une manière indépendante de BRCA1. En effet, sa surexpression dans des cellules déficientes en BRCA1 inhibe la prolifération cellulaire et la croissance tumorale⁵⁴. Ainsi, le lien entre BAP1 et BRCA1 est resté énigmatique. Aussi, très peu est connu sur les fonctions cellulaires de BAP1 et encore moins sur son mécanisme d'action.

c- BAP1 est un suppresseur de tumeurs

Les résultats obtenus à ce jour montrent clairement que BAP1 est un suppresseur de tumeur. À cet égard, plusieurs évidences viennent appuyer cette conclusion :

i) Des expériences utilisant des xénogreffes montrent que l'expression de BAP1 inhibe considérablement la croissance tumorale, et ce, grâce à son activité déubiquitinase⁵⁴. En effet,

une des propriétés importantes d'un suppresseur de tumeurs est sa capacité de supprimer la tumorigénèse *in-vivo*. Les cellules NCI-H226 sont tumorigènes quand injectées dans des souris nudes. Dans cette étude, ce dernier modèle de souris a été utilisé pour des injections de cellules NCI-H226 qui expriment, soit la forme sauvage de BAP1, soit la forme catalytiquement inactive C91S. Les résultats montrent que seule, l'expression de la forme sauvage de BAP1 inhibe la formation de tumeurs chez ces souris, suggérant que l'activité deubiquitinase de BAP1 est nécessaire pour la suppression de tumeurs.

- ii) Le locus du gène de BAP1 au niveau du chromosome 3p21.3 est fréquemment déleté et remanié au niveau des cellules cancéreuses ⁵⁵.
- iii) BAP1 est muté d'une manière homozygote dans de nombreux cancers ⁵².
- iv) Une perte d'hétérozygotie du gène BAP1 est observée dans de nombreux cancers ⁵⁶.
- v) BAP1 confère un potentiel anti-métastatique. Des résultats récents suggèrent un rôle de BAP1 dans l'inhibition transcriptionnelle des voies qui activent la métastase des mélanomes de l'œil "*Uveal melanoma*". En effet, BAP1 a été trouvée mutée dans 84% de tumeurs métastatiques analysées. De plus, la déplétion de BAP1 par siRNA dans des cellules tumorales du mélanome de l'œil de grade I semble changer la signature transcriptionnelle des cellules vers le grade II, à potentiel métastatique. D'après les conclusions de cette étude, la perte de BAP1 serait donc impliquée, de manière causale, dans la métastase de ces mélanomes ⁵².
- vi) L'ablation de BAP1 chez la souris entraîne la formation de tumeurs. En effet, BAP1 est requis pour la viabilité et le développement embryonnaire des souris. Cependant, la délétion de BAP1, après la naissance, induit la formation de cancers hématologiques ⁵⁷. De plus, les souris hétérozygotes BAP1^{+/-} sont plus susceptibles que les souris de type sauvage au développement du mésothéliome malin induit par les particules d'amiante ⁵⁸.

Des études récentes montrent que la déplétion du suppresseur de tumeurs BAP1 par l'approche d'ARN interférent affecte négativement la prolifération cellulaire et non pas l'inverse ^{59, 60, 61}. Cela suggère que le dosage de BAP1 est important pour le contrôle de la prolifération cellulaire. Il semble donc que la suppression de tumeurs médiée par BAP1 dépend de son niveau d'expression dans la cellule qui doit être bien dosé. Par contre, une diminution de la prolifération cellulaire suite à la déplétion de ce suppresseur de tumeurs, peut suggérer également que ce dernier peut agir comme un oncogène dans certains contextes cellulaires. En effet, une étude

récente de Qin et al., a souligné ce point à travers ses travaux sur le facteur de transcription KLF5 ⁶². Ce dernier est fortement exprimé dans le cancer du sein de type basal, et favorise la prolifération, la survie, la migration et la croissance tumorale du cancer du sein. Les résultats publiés par ce dernier groupe montrent que BAP1 ubiquitine KLF5 et ceci afin de le stabiliser. Ceci suggère que cette DUB peut exercer une activité oncogénique à travers KLF5. Ceci n'est pas surprenant, car il existe d'autres protéines dans le génome humain possédant une activité suppresseur de tumeurs et qui, peuvent aussi jouer un rôle d'oncogène comme, l'histone méthyltransférase EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*). En effet, EZH2, membre du complexe « *polycomb repressive complex* » 2 (PRC2), est associée à une répression de la transcription via la méthylation de l'histone H3 sur sa lysine 27. L'expression forte de EZH2 a été corrélée avec les cancers de la prostate métastatiques et non les cancers localisés ⁶³ ainsi qu'une prolifération cellulaire accentuée. Le caractère de candidat oncogène d'EZH2 a été renforcé par la démonstration d'une surexpression de cette protéine dans d'autres cancers comme le mélanome. Par contre, deux articles récents montrent que EZH2 pourrait se comporter, non comme un oncogène, mais comme un gène suppresseur de tumeurs dans des hémopathies myéloïdes ⁶⁴. BAP1, faisant partie d'un autre complexe Polycomb, semble aussi agir comme oncogène ou suppresseur de tumeurs.

d- Le complexe multi-protéique BAP1

Plusieurs études, incluant un travail de notre laboratoire, ont identifié les partenaires protéiques formant le complexe BAP1. Grâce à des expériences de purification par chromatographie d'affinité en tandem (TAP) et des analyses de spectrométrie de masse faites sur des cellules HeLa qui expriment Flag-HA BAP1, nous avons montré que BAP1 forme des complexes multi-protéiques ⁶⁵, majoritairement constitués par des facteurs et des cofacteurs de transcription ⁶⁵. De plus, des expériences de filtration sur gel et de sédimentation sur des gradients de glycérol sur des extraits nucléaires des cellules HeLa ont montré que BAP1 forme des complexes de haut poids moléculaire, aux alentours de 1,6 MDa.

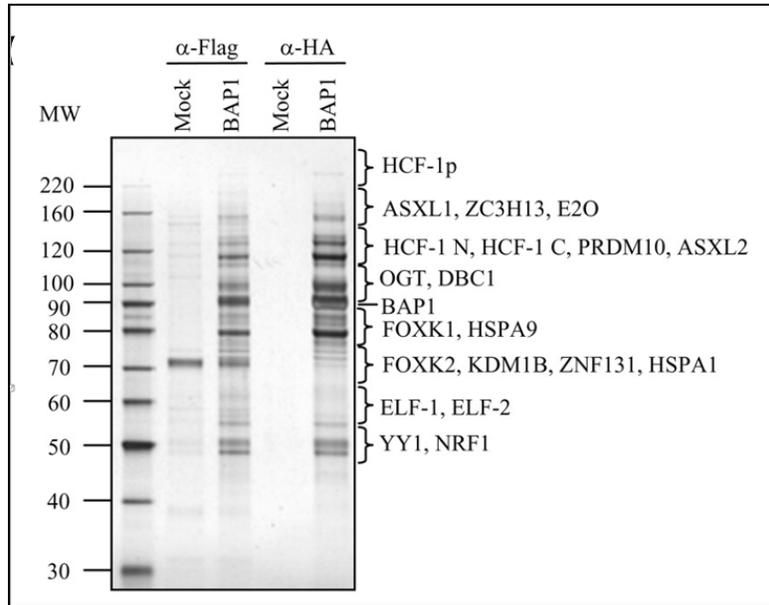


Figure 6 : Le complexe BAP1 ⁶⁵. Des cellules HeLa ont été utilisées pour une purification par chromatographie d'affinité en tandem (TAP). D'abord les extraits nucléaires ont été utilisés pour une purification avec un anticorps anti-Flag suivi d'une élution avec le peptide Flag, puis une purification avec un anticorps anti-HA suivi d'une élution avec le peptide HA. Par la suite, les complexes purifiés ont été migrés sur un gel SDS-PAGE et les protéines ont été détectées avec une coloration à l'argent. De nombreuses protéines ont été co-purifiées avec BAP1 et identifiées par spectrométrie de masse, suggérant la présence des complexes multi-protéiques.

Un lien fonctionnel entre BAP1, HCF-1 et YY1 a été ainsi élucidé en 2010 dans une étude publiée par notre laboratoire ⁶⁵. La protéine HCF-1 (*herpes simplex virus (HSV) Host Cell Factor 1*) a été initialement décrite pour son rôle dans l'induction des gènes immédiats précoces (*Immediate early genes, IE*) du virus de l'herpès par son association avec la protéine VP16 ⁶⁶. HCF-1 est une protéine abondante, associée à la chromatine, et qui joue un rôle critique dans la prolifération cellulaire ^{67, 68}. Son association avec des complexes de remodelage de la chromatine et plusieurs facteurs de transcription permettent la régulation d'un large spectre de gènes cibles, notamment les gènes IE.

Sur le plan mécanistique, HCF-1, interagit avec ses partenaires, ayant un motif constitué de quatre résidus (D/EHXY) appelé le motif HBM (*HCF-1 Binding Motif*), via un domaine compris dans son extrémité N-terminale, nommé le domaine « *Kelch* ». Le motif HBM, qui contient une séquence consensus, [E/D]-H-X-Y, est présent dans différentes protéines virales et cellulaires comme des facteurs et cofacteurs transcriptionnels ⁶⁹. Par exemple, HCF-1 interagit

avec BAP1 au niveau de son motif HBM qui est situé au milieu de la protéine dans une région non structurée, et cette interaction régule la prolifération cellulaire ^{59, 60}.

Le facteur de transcription Yin Yang 1 (YY1) est une protéine à doigt de zinc qui est aussi connu pour être une protéine du groupe Polycomb. YY1 possède une dualité fonctionnelle dans la régulation transcriptionnelle dépendamment de son interaction avec des coactivateurs ou des corépresseurs au niveau des promoteurs de gènes spécifiques ^{70, 71}. BAP1 interagit directement avec YY1 et HCF-1 formant ainsi un complexe ternaire. De plus, YY1 recrute BAP1 et HCF-1 sur les promoteurs de gènes spécifiques comme *cox7c* pour activer leur expression ⁶⁵.

D'autres protéines associées à BAP1 ont été également identifiées suggérant une grande complexité dans la fonction et la régulation de cette DUB. En effet, les facteurs de transcription FOXK1 et FOXK2, dont des expériences actuelles par notre laboratoire suggèrent qu'ils forment deux complexes mutuellement exclusifs avec BAP1, sont capables de recruter ce dernier à l'ADN ⁷². Ceci pourra constituer un moyen de régulation de la fonction épigénétique de cette DUB envers H2AK119ub. On trouve aussi une autre famille de facteurs de transcriptions, nommés ETS, représentée par ELF1, ELF2 et ELF3 dans le complexe BAP1. Les membres de cette dernière sont surtout exprimés au niveau des cellules endothéliales et de manière moins importante dans les cellules épithéliales. Ces facteurs semblent réguler plusieurs voies de signalisation pour permettre l'expression de gènes spécifiques à ces types cellulaires ^{73,74}. Ces observations suggèrent que le complexe BAP1, à travers ses partenaires, peut exécuter différentes fonctions dépendamment du type cellulaire.

On trouve également dans le complexe BAP1, l'histone acétyltransférase HAT1, les protéines du groupe Polycomb ASXL1 et ASXL2 qui forment des complexes mutuellement exclusifs avec BAP1, la lysine déméthylase LSD2 (KDM1B) et l'enzyme conjugatrice de l'ubiquitine (E2) UBE2O. Cette dernière joue un rôle important dans l'ubiquitination du domaine CTD de BAP1 en induisant sa séquestration cytoplasmique ⁵¹.

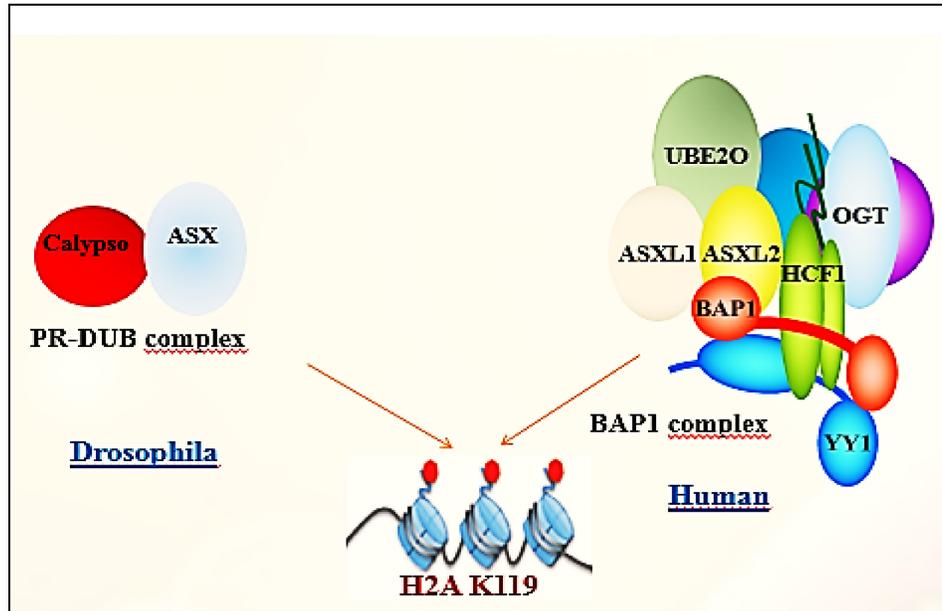


Figure 7 : le complexe PR-DUB chez la drosophile et chez l’humain. Le complexe PR-DUB de la drosophile est principalement formé de dBAP1/Calypso et ASX. Le complexe BAP1 humain est formé de nombreuses protéines dont ASXL1 et ASXL2 qui interagissent avec BAP1 de manière mutuellement exclusive. On trouve aussi les cofacteurs HCF-1, OGT, UBE2O et autres facteurs de transcription.

De manière intéressante, la protéine Polycomb Calypso de la drosophile a été identifiée comme l'orthologue de BAP1. Calypso s'associe à ASX pour former le complexe PR-DUB qui déubiquitine l'histone H2AK118ub⁷⁵ permettant la dérégulation des gènes Hox. Cependant, le nombre et la nature des protéines associées à BAP1 chez l’humain ajoutent une complexité importante dans la fonction et la régulation et cette DUB (Figure 7).

5- La marque épigénomique H2AK119ub :

a- Définition

La compréhension des rôles biologiques des modifications covalentes des histones, y compris la monoubiquitination de l'histone H2A sur sa lysine 119 (H2AK119ub), et les mécanismes moléculaires par lesquels ces modifications régulent des programmes de

transcription spécifiques demeure un sujet d'importance majeure. En fait, H2A est le premier exemple d'une protéine ubiquitinée décrit dans la littérature ⁷⁶. Environ 5-15% de l'histone H2A est monoubiquitinée dans des cellules de mammifères ⁷⁷. Elle se présente majoritairement monoubiquitinée. Néanmoins, une petite portion de polyubiquitination de H2A a été également révélée ⁷⁸. L'ubiquitination de H2A est proposée comme ayant un rôle dans la spermatogenèse, la réponse au stress, la formation de l'hétérochromatine, ainsi que dans la régulation de la transcription et la réparation de l'ADN ⁷⁹. La monoubiquitination de H2A sur la lysine 119 (H2AK119ub) est enrichie dans la chromatine condensée et est liée à une répression d'expression des gènes médiée par les complexes Polycomb ⁸⁰. En effet, la monoubiquitination de H2A inhibe l'initiation de la transcription et l'élongation de l'ARN polymérase II. H2A monoubiquitinée empêche l'éviction des dimères de H2A-H2B à partir des nucléosomes, inhibant également l'élongation ⁸¹, aussi cette modification est liée à l'inactivation du chromosome X ⁸².

b- Régulateurs enzymatiques de H2AK119ub

Chez les mammifères, la protéine du groupe Polycomb RING1B, appartenant au complexe PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1), est la première ubiquitine ligase, contenant un domaine Ring (E3) identifiée responsable de la monoubiquitination de H2A sur la lysine 119 chez les mammifères (H2AK119ub) ou la lysine 118 chez la drosophile (H2AK118ub) ^{83, 84}. En effet, la perte de RING1B diminue de manière spectaculaire la monoubiquitination de H2AK119 à l'échelle globale et aux promoteurs de gènes spécifiques ^{84, 85}. Deux autres protéines contenant le domaine RING dans le même complexe PRC1, RING1A et BMI1, sont nécessaires pour stimuler fortement l'activité E3 ubiquitine ligase de RING1B ⁸⁶.

Plusieurs études ont tenté d'identifier et caractériser des DUBs de H2AK119ub. Zhu et al. ont identifié MYSM1 / KIAA1915 (appartenant à la famille JAMM/MPN + de métalloprotéase) dans un criblage pour les facteurs régulant l'expression des gènes contrôlés par les androgènes ⁸⁷. Les auteurs soutiennent que MYSM1 est une DUB spécifique à H2AK119ub sur la base d'une baisse des niveaux de H2AK119ub après une surexpression de MYSM1 dans des cellules de reins embryonnaires humains HEK293T, et l'accumulation des niveaux de cette

modification suite à la déplétion de MYSM1. Cependant ces résultats n'ont pas été validés dans d'autres études et le mécanisme de déubiquitination reste inconnu.

Deux membres de la famille USP ont été proposés comme étant des DUBs de H2AK119ub. Nicassio et al. ont isolé des fractions enrichies en chromatine afin de conduire une purification par affinité sur une résine d'ubiquitine-agarose ⁸⁸. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier USP3 et USP5/isopeptidase T comme étant responsable de cette déubiquitination. USP3 humaine présente des homologies avec Ubp8 de *Saccharomyces cerevisiae*, et cette dernière a déjà été reconnu pour favoriser la déubiquitination de H2B ⁸⁹. La surexpression d'USP3 dans les cellules HeLa réduit les niveaux de H2AK119ub, alors que la déplétion d'USP3 produit l'effet inverse. Dans une autre étude, Joo et al. ont entrepris une purification de l'activité DUB de H2AK119ub, à partir d'extraits de cellules HeLa, en utilisant un test de déubiquitination au niveau des mononucléosomes ⁹⁰. Une bande colorée à l'argent identifiée comme USP16/Ubp-M a été corrélée avec l'activité DUB suite à la procédure de purification impliquant six étapes de chromatographie sur colonne. Joo et al. ont également montré que la déplétion médiée par l'ARN interférant d'USP16 dans les cellules HeLa conduit à l'accumulation de H2AK119ub ⁹⁰. La surexpression d'USP16 dans des cellules HEK293T induit la déubiquitination H2AK119ub ⁹¹. Cependant, ces études nécessitent d'autres évidences pour validation, et il sera pertinent de déterminer par la suite comment ces DUBs agissent sur H2A.

Un criblage d'ARN interférents ciblant toutes les DUBs du génome humain a été réalisé dans notre laboratoire et a montré que BAP1 est la DUB majeure qui cible H2AK119ub ^{75, 92}. BAP1 effectue cette activité en formant avec ASXL1 ou ASXL2 le complexe PR-DUB humain qui élimine l'ubiquitine de H2AK119ub chez les mammifères ⁷⁵. L'activité catalytique de BAP1 sur H2AK119ub est considérée parmi ses fonctions les plus importantes en tant que suppresseur de tumeurs ^{92,93}. Cependant, des évidences sur le lien direct entre la suppression de tumeurs médiée par BAP1 et la déubiquitination de H2AK119ub restent à établir ⁹⁴.

c- Caractérisation du complexe BAP1-ASXL1/ASXL2 et son rôle régulateur de H2AK119ub

La déubiquitineuse et le suppresseur de tumeurs BAP1 catalyse l'élimination de l'ubiquitination de l'histone H2AK119ub via son association à ses partenaires, et coordonne ainsi l'expression de gènes. Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel les partenaires de BAP1 modulent sa fonction reste mal compris. Dans une étude publiée par notre groupe⁹², nous avons montré que BAP1 forme deux complexes mutuellement exclusifs avec les régulateurs transcriptionnels ASXL1 et ASXL2, qui sont nécessaires pour maintenir le niveau de protéines approprié de cette DUB dans la cellule.

ASXL1 et ASXL2 utilisent leurs domaines ASXM pour interagir avec le domaine C-terminal (CTD) de BAP1 et ces interactions sont nécessaires pour la liaison à l'ubiquitine et la déubiquitination de H2AK119ub. Ceci nécessite également des réarrangements intramoléculaires entre les domaines catalytiques et non catalytiques de BAP1 qui génèrent une interface composite de liaison à l'ubiquitine qu'on appelle CUBI (*Composite Ubiquitin Binding Interface*). De manière significative, nous avons trouvé une mutation de cancer de BAP1 qui touche le CTD, et inhibe son interaction avec ASXL1/2, ce qui inactive son activité DUB et par conséquent, dérégule la prolifération cellulaire. De plus, la perte de l'expression de BAP1 dans certains cancers entraîne une déstabilisation d'ASXL2 et donc une perte de sa fonction.

En conclusion, notre travail met en évidence que l'inactivation de l'axe d'interaction BAP1/ASXL1/2 inhibe l'activité catalytique de cette DUB envers H2AK119ub, et contribue ainsi au développement du cancer.

6- *Fonctions du complexe BAP1*

a- BAP1 et l'expression des gènes :

Tenant compte du grand nombre de facteurs de transcription et de régulateurs de la fonction de la chromatine dans le complexe BAP1, il n'est pas surprenant que le complexe BAP1 exerce un impact direct sur la transcription des gènes. Dans notre laboratoire, il a été possible d'élucider une partie du rôle de BAP1 comme régulateur transcriptionnel. En effet, la fonction

de BAP1 dans la régulation de l'expression génique a d'abord été mise en évidence par l'identification du complexe ternaire BAP1/HCF1/YY1 sur le promoteur du gène mitochondrial *Cox7c*⁶⁵. De plus, le traitement de la chromatine à la nucléase micrococcale (MNase) libère rapidement le complexe BAP1/HCF-1/YY1, ce qui suggère son association avec des régions activement transcrites. D'autre part, afin de définir le profil d'expression génique régulé par BAP1, une analyse de l'expression des ARNm par micropuces à ADN en présence et en absence de BAP1 dans les cellules U2OS et HeLa a été réalisée. Cette étude a révélé une dérégulation importante d'un nombre élevé de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la prolifération cellulaire suite à la déplétion de BAP1 par RNAi⁶⁵.

L'analyse par ChIP-seq des sites de liaison de BAP1 en utilisant des macrophages dérivés de la moelle osseuse a révélé que 65% des pics de séquençage reflétant l'abondance de BAP1 sont retrouvés dans les régions promotrices des gènes proches (+/- 2kb) du site d'initiation de la transcription⁵⁷.

D'autre part, le complexe BAP1 contient d'autres facteurs de transcription comme FOXK1 et FOXK2, NRF-1 et les facteurs de transcription de la famille ETS, Elf-1, Elf-2 et Elf-3. Ces facteurs transcriptionnels possèdent des séquences spécifiques de liaison à l'ADN permettant ainsi un recrutement finement régulé du complexe BAP1 sur des régions particulières du génome. Les régulateurs transcriptionnels FOXK1 et FOXK2 (FOXK1/2) appartiennent à la famille '*Forkhead box transcription factor*', contiennent un domaine de liaison à l'ADN également connu sous le nom '*winged helix domain*' (WHD) ou domaine Forkhead. FOXK1/2 contiennent aussi un domaine phospho-thréonine connue sous le nom de domaine FHA. Ce domaine joue un rôle important dans les interactions protéines-protéines et la signalisation cellulaire. Fait important, la structure cristalline du domaine FHA, a une ressemblance frappante avec celle de l'histone H1⁹⁵. La capacité de H1 à lier la chromatine condensée suggère la forte possibilité que FOXK1/2 puissent avoir une activité de facteurs de transcription pionniers. Ces derniers ont la capacité d'interagir au niveau de la chromatine condensée, où les gènes sont réprimés afin d'ouvrir la chromatine et conduire à l'expression génique en favorisant le recrutement de la machinerie de transcription. Cette propriété potentielle, de facteur de transcription pionnier, de FOXK1/2 pourrait probablement permettre le recrutement du complexe BAP1 à la chromatine condensée afin de déubiquitiner H2AK119ub et moduler la transcription en réponse à des stimuli spécifiques. Cependant, plus récemment,

BAP1 a été montré pour être recruté à la chromatine via son partenaire FOXK2, un événement qui semble réprimer les gènes cibles de FOXK2 ⁹⁶.

Bien que les mécanismes ne soient pas bien connus, ces résultats suggèrent que les partenaires de BAP1 jouent des rôles critiques dans son recrutement à la chromatine pour assurer sa fonction enzymatique sur H2AK119ub, et également moduler l'expression des gènes ciblés ⁹⁷.

b- BAP1 et la réplication d'ADN :

La contribution de BAP1 dans le maintien de l'intégrité cellulaire n'est pas encore bien connue. Des évidences récentes ont suggéré que BAP1 pourrait être impliqué dans la progression de la fourche de réplication d'ADN. Grâce à l'utilisation de la technique « *Isolation of Proteins on Nascent DNA (iPOND)* » ⁹⁸, une étude récente a montré que BAP1 interagit avec, déubiquitine et stabilise l'ATPase INO80 au niveau de la fourche de réplication. INO80 fait partie d'un complexe multi-protéique de remodelage de la chromatine qui régule la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN ce qui permet de maintenir la stabilité génomique ^{99 100 101}. Une colocalisation d'INO80 et BAP1 au niveau de la fourche de réplication de l'ADN semble promouvoir la progression de cette dernière de manière dépendante de l'activité ATPase. BAP1 semble stabiliser INO80 et permet son ancrage à la chromatine en interagissant avec H2AK119ub ¹⁰². BAP1 pourra donc être nécessaire au bon fonctionnement du complexe de la machinerie de réplication assurant ainsi une stabilité génomique. En effet, la composition exacte du complexe BAP1 au niveau de la fourche de réplication n'a pas été mise en évidence. De plus, il sera pertinent de déterminer l'identité du partenaire de BAP1 capable de réguler le recrutement de ce dernier au niveau de la fourche de réplication afin de stabiliser INO80. Également, des mutations de BAP1 ont été identifiées induisant une déstabilisation d'INO80 et une progression anormale de la fourche de réplication de l'ADN. Il serait important de déterminer si ces mutations peuvent affecter l'interaction de BAP1 avec quelques partenaires de son complexe. Les auteurs de cette dernière étude ont spéculé que des mutations de BAP1 pourraient, via une déstabilisation de la fourche de réplication, être à l'origine de l'apparition d'aberrations chromosomiques et ainsi le développement et la progression du cancer ¹⁰².

En résumé, BAP1 semble jouer un rôle critique dans la progression harmonieuse du cycle cellulaire contrôlant la machinerie de réplication. Ceci est soutenu par des données

montrant que les cellules déficientes en BAP1 sont caractérisées par de nombreuses aberrations chromosomiques et une aneuploïdie ^{103, 93}, soulignant à nouveau l'importance de l'activité de BAP1 dans le bon déroulement de la réplication d'ADN.

c- BAP1 dans la réponse aux dommages à l'ADN :

Un rôle de BAP1 dans la réponse aux dommages d'ADN (DDR) a récemment été identifié dans le contexte d'un stress génotoxique induit par les rayonnements ionisants ⁹⁴. Également, des cellules cancéreuses portant des mutations inactivantes de *BAP1* sont très sensibles aux dommages induits par les radiations ionisantes (IR) ^{94, 61}. De même, en utilisant des lignées cellulaires de lymphome B de poulet, DT40, déficientes en BAP1, il a été observé que BAP1 est haplo-insuffisant ⁹³. Les cellules BAP1^{+/-} présentent une quantité non négligeable d'aberrations chromosomiques et sont très sensibles au rayonnement IR.

D'autres études ont indiqué que la déplétion de BAP1 dans des cellules du carcinome rénal ou le mésothéliome montre une dérégulation de l'expression des gènes liées au DDR ^{97, 65}. D'autre part, des évidences récentes ont montré que BAP1 joue, de manière directe, au niveau du site de dommages. BAP1 favorise la recombinaison homologue (HR) en permettant le recrutement de BRCA1 et de RAD51 au niveau du site de dommages ⁹³. De manière intéressante, BAP1 ne semble pas jouer un rôle important dans la recombinaison non homologue (NHEJ). D'autre part, il a été également révélé que BAP1, conjointement avec BRCA1 et RAD51, est progressivement recruté au site du dommage. Il est à noter que les extraits totaux de chromatine n'ont montré aucune fluctuation mesurable des niveaux globaux de H2AK119ub pendant la réparation des cassures double brin de l'ADN. En revanche, les expériences de précipitation de la chromatine (ChIP) ont indiqué que le recrutement de BAP1 est inversement proportionnel aux niveaux de H2AK119ub détectées dans des régions situées à proximité ou loin du site de dommages ⁹³. BAP1 est très probablement ciblé spécifiquement au niveau des sites endommagés pour permettre la déubiquitination locale de H2AK119ub afin de permettre la décondensation de la chromatine et favoriser le recrutement de la machinerie de réparation, mais ce mécanisme reste à mettre en évidence.

d- Autres fonctions :

Hormis son substrat principal, H2AK119ub, BAP1 a été reconnu pouvoir débubiquitiner d'autres substrats tels que HCF-1⁵⁹, OGT, INO80¹⁰², γ -tubulin¹⁰³, et BAP1 lui-même⁵¹, indiquant que cette DUB peut exercer d'autres fonctions importantes. Par exemple, la localisation subcellulaire de BAP1 est coordonnée par UBE2O, une enzyme hybride conjugatrice/ligase (E2/E3). Cette ligase atypique ubiquitine le domaine C-terminal de BAP1 au niveau de son signal de localisation nucléaire et favorise sa séquestration cytoplasmique⁵¹. BAP1 permet de maintenir sa localisation nucléaire grâce à son activité d'autodébubiquitination. Dans le cytoplasme, il a été trouvé que BAP1 interagit avec le récepteur IP3R au niveau du réticulum endoplasmique afin de favoriser la signalisation Ca²⁺ et par conséquent l'apoptose en réponse au stress¹⁰⁴.

<i>(1) Le complexe BAP1 chez l'humain*</i>	<i>(2) Domaines fonctionnels de la protéine*</i>	<i>(3) Son orthologue chez la drosophile*</i>	<i>(3) Complexe chez la drosophile*</i>
BAP1	- UCH (<i>ubiquitin C-terminal hydrolase domain</i>)	Calypso	<i>PR-DUB Complex</i>
ASXL1	- PHD (<i>Plant homeodomain</i>)	ASX	<i>PR-DUB Complex</i>
ASXL2	- PHD (<i>Plant homeodomain</i>)	ASX	<i>PR-DUB Complex</i>
HCF1	- <i>Kelch domain</i>	HCF	<i>Ada2/Gcn5/Ada3 Transcription Activator Complex</i> <i>MLL1/2 Complex</i> <i>MLL3/4 Complex</i> <i>Set1C/COMPASS Complex</i>
ZC3H13	- <i>Zinc fingers de type CCCH</i>	CG7358	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile
UBE2O	- <i>RWD (RING finger-containing proteins, WD-repeat-containing proteins, and yeast DEAD (DEXD)-like helicases)</i>	CG10254	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile

PRDM10	- <i>SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax)</i> - <i>Zinc fingers de type C2H2</i>	CG4707	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile
OGT	- <i>TPR (Tetratricopeptide repeat)</i>	SXC	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile
DBC1	- <i>NUDIX hydrolase domain</i>	- Pas d'orthologue	- Pas d'orthologue chez la drosophile
FOXK1	- <i>Forkhead boxes</i>	FOXK	<i>Transcription Factor Complex</i>
FOXK2	- <i>Forkhead boxes</i>	FOXK	<i>Transcription Factor Complex</i>
KDM1B	- <i>SWIRM (SWI3, RSC8 and MOIRA)</i> - <i>Zinc fingers de type CW</i>	CG6034	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile
ZNF131	- <i>Zinc fingers de type C2H2</i> - <i>BTB (Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac, also known as the POZ domain (POxvirus and Zinc finger))</i>	CG1647, CkIIalpha-i1, ovo, CG43347 et autres ...	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile

ELF1	- <i>Ets (Erythroblast transformation specific)</i>	Eip74EF	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile
ELF2	- <i>Ets (Erythroblast transformation specific)</i>	Eip74EF	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile
ELF3	- <i>Ets (Erythroblast transformation specific)</i>	Eip74EF	Pas d'association identifiée à un complexe chez la drosophile
RNF1	- <i>Ring finger</i>	Sce	<i>PRC1 Complex</i> <i>Cohesin Complex</i>
YY1	- <i>Zinc fingers de type C2H2</i>	pho	<i>Ino80 Complex</i>

Tableau 1 : Tableau descriptif de: (1) la composition du complexe multi-protéiques BAP1, (2) des domaines fonctionnels de chaque partenaire du complexe BAP1 et (3) de l'association de leurs orthologues à des complexes chez la drosophile.

**Les informations fournies dans ce tableau ont été récupérées à partir de Yu et al.,⁶⁵, et des bases de données telles que BioGRID3.4, DIOPT et UniProt.*

À noter : Seule l'interaction entre BAP1 et ASXL1-2 chez l'humain est conservée chez la drosophile sous la forme du complexe PR-DUB formé de Calypso et ASX.

Hypothèse et objectifs

II- HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Les facteurs de remodelage et de modifications de la chromatine assurent une coordination exquise des processus cellulaires découlant de l'ADN comme la transcription, la réplication et la réparation. Néanmoins, les mécanismes qui orchestrent la fonction de la chromatine et les processus de dérégulation associés, contribuant au cancer, restent mal compris. La compréhension des mécanismes de régulation épigénétique est essentielle pour révéler les faiblesses des cellules tumorales, pouvant ainsi contribuer à un meilleur diagnostic du cancer, une stratification moléculaire des tumeurs ainsi qu'à l'établissement de nouvelles thérapies innovantes.

Dans notre étude, on investigate les mécanismes moléculaires qui orchestrent la fonction et la régulation du suppresseur de tumeurs BAP1. BAP1 est localisé principalement dans le noyau où cette DUB interagit avec plusieurs protéines associées à la chromatine en assemblant de grands complexes multi-protéiques permettant ainsi son recrutement au niveau de la chromatine pour l'activation de l'expression de gènes cibles, notamment ceux impliqués dans la prolifération cellulaire. Ce qui est d'intérêt à notre présente étude est l'interaction de BAP1 avec le facteur transcriptionnel ASXL2 qui est indispensable pour promouvoir l'activité catalytique de BAP1 et ainsi réguler la fonction de cette DUB en tant que suppresseur de tumeurs. Cependant, les mécanismes par lesquels des voies de signalisation coordonnent la fonction des complexes BAP1/ASXL1/2 restent très peu connus. Dans nos récents travaux de recherche, nous avons trouvé qu'ASXL2 est ubiquitinée.

De ce fait nous avons émis l'hypothèse suivante :

L'ubiquitination d'ASXL2 joue un rôle important dans la régulation de l'activité enzymatique de BAP1 et la fonction biologique du complexe suppresseur de tumeurs BAP1/ASXL2.

Nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

1. Caractériser l'impact fonctionnel de l'ubiquitination d'ASXL2 sur l'activité enzymatique de BAP1 et la prolifération cellulaire.
2. Identifier les principaux acteurs enzymatiques qui régulent l'ubiquitination d'ASXL2.

Résultats et discussion

(Les résultats montrés dans ce mémoire font partie d'un grand projet du laboratoire porté sur le complexe BAP1- ASXLs.

J'ai effectué toutes les expériences illustrées dans les figures 9, 12 A, 13, 16 et 17.

Par contre ma contribution était mineure dans les figures 8, 10, 14 et 15.)

III- RESULTATS ET DISCUSSION

1- *ASXL2* est monoubiquitiné sur sa lysine K370 de manière dépendante de *BAP1*

Des travaux précédents ont montré que le niveau protéique d'ASXL1 est régulé par ubiquitination au niveau de son domaine ASXM (ASXM1)¹⁰⁵. Les auteurs ont démontré que cette ubiquitination maintient un niveau protéique très faible d'ASXL1 dû à sa dégradation par le protéasome et cette modification n'est pas reversée par l'action de BAP1. D'autre part, notre équipe de recherche a déjà démontré que toute la quantité protéique d'ASXL2 est complexée à BAP1. De plus, il a été démontré que les niveaux protéiques d'ASXL2 sont étroitement régulés par BAP1. Néanmoins, le mécanisme de régulation des facteurs ASXLs par ubiquitination reste mal compris⁹². De ce fait, nous avons entrepris des expériences d'immunoprécipitation pour évaluer le degré d'ubiquitination des protéines ASXLs.

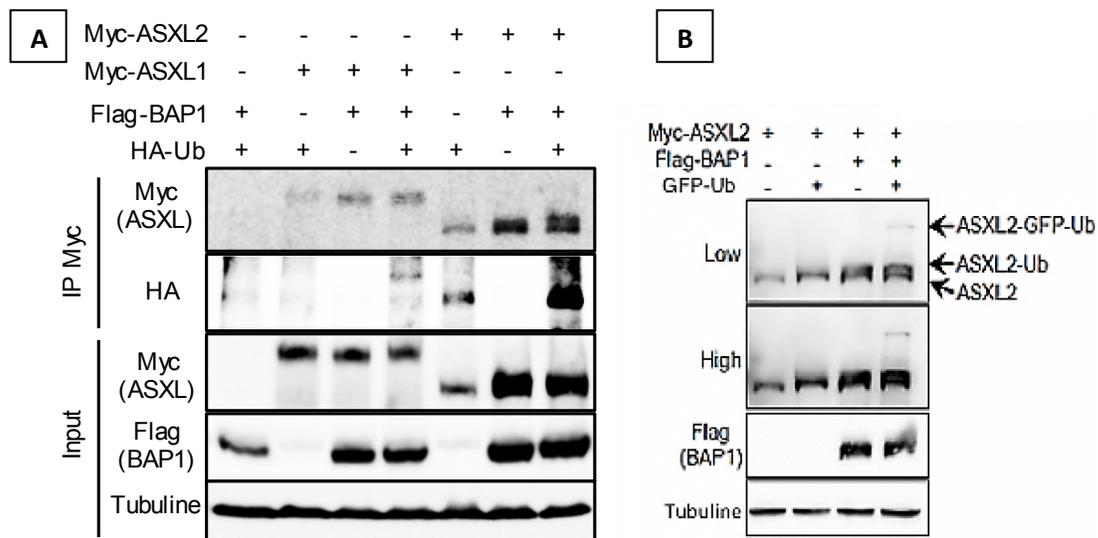


Figure 8 : ASXL2 est modifiée par ubiquitination, et sa co-expression avec BAP1 augmente son niveau d'ubiquitination. **A :** Immunoprécipitation dénaturante de Myc-ASXL2 exprimée en présence ou pas de Flag-BAP1 et HA-Ub dans des cellules HEK293T. **B :** Validation de la dépendance de la monoubiquitination d'ASXL2 de son partenaire BAP1 par la surexpression de Myc-ASXL2, en présence ou pas de Flag-BAP1 et GFP-Ub dans des cellules HEK293T.

Tout d'abord, nous avons co-transfecté un plasmide exprimant une forme étiquetée Myc d'ASXL1 ou ASXL2 dans des cellules HEK293T, avec et sans Flag-BAP1, et en présence ou en absence de HA-Ubiquitine (HA-Ub). Une immunoprécipitation en condition dénaturante d'ASXL1 et ASXL2 en utilisant l'anticorps dirigé contre Myc a été réalisé afin d'analyser leur état d'ubiquitination. L'analyse par immunobuvardage des protéines immunoprécipitées en utilisant un anticorps anti-HA révèle la présence de bandes bien distinctes à la taille d'ASXL1 et ASXL2 lorsque celles-ci sont co-exprimées avec HA-Ub. Ce résultat suggère qu'ASXL1 et ASXL2 sont monoubiquitinées en présence de BAP1. Aussi, le signal détecté pour ASXL2 se trouve accentué en présence de BAP1 (Figure 8A).

Pour valider davantage que cette monoubiquitination se réalise en présence de BAP1, nous avons surexprimé Myc-ASXL2 en présence et en absence de Flag-BAP1 en utilisant cette fois-ci une ubiquitine fusionnée à la GFP (GFP-Ub) permettant donc une ample séparation d'ASXL2 de sa forme monoubiquitinée. Dans ce cas, nous avons pu conclure qu'ASXL2 est monoubiquitinée avec la GFP-Ub et ceci d'une manière dépendante de BAP1. (Figure 8B). De plus, nous avons pu confirmer que BAP1 joue un rôle dans le maintien du niveau protéique d'ASXL2⁹², vu que le niveau global de cette dernière augmente considérablement en présence de BAP1 (Figure 8B).

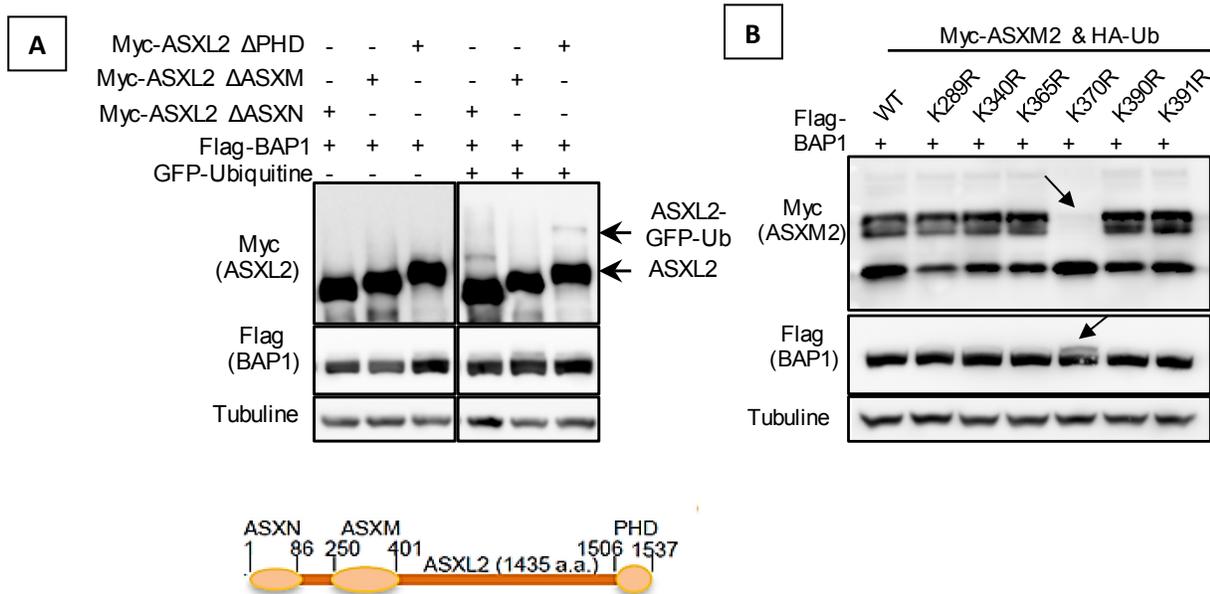


Figure 9 : La monoubiquitination d'ASXL2 est catalysée sur la lysine 370 de son domaine d'interaction avec BAP1, ASXM2. **A** : Expression de différentes délétions de domaines d'ASXL2 dans les cellules HEK293T en présence de Flag-BAP1 et de GFP-Ub afin d'identifier le domaine responsable de la

monoubiquitination d'ASXL2. **B** : Expression des mutants de lysine d'ASXM2 générés par mutagenèse dirigée. Les formes mutées d'ASXL2 sont co-exprimés dans les cellules HEK293T, en présence de Flag-BAP1 et HA-Ub, afin d'identifier la lysine modifiée par la monoubiquitination.

Afin de caractériser le rôle biologique de la monoubiquitination d'ASXL2, il était important d'identifier le site de modification. Pour ce faire, nous avons d'abord voulu identifier le domaine de ASXL2 impliqué dans cette modification. Ainsi, nous avons généré des mutants correspondant à des délétions d'ASXL2 manquant les domaines critiques, ASXN, ASXM (ASXM2 pour ASXL2) ou PHD. L'expression de ces mutants dans les cellules HEK293T, en présence de Flag-BAP1 et GFP-Ub, montre clairement que la monoubiquitination se fait exclusivement dans le domaine ASXM2. Ce résultat est intrigant car ASXM2 constitue le domaine requis pour l'interaction entre ASXL2 et BAP1 ⁹² (Figure 9A). Il devient donc très intéressant de caractériser le mécanisme de régulation impliqué. De cet effet, nous avons d'abord muté des lysines en arginines au niveau du domaine ASXM2 et nous avons pu démontrer que cette modification se fait sur la lysine 370 (Figure 9B). Une observation intéressante est que la mutation de la lysine 370 engendre non seulement la perte de la monoubiquitination d'ASXL2, mais aussi un retard de migration de BAP1, suggérant une modification post-traductionnelle de ce dernier. En investiguant davantage par spectrométrie de masse, nous avons trouvé qu'il s'agit d'une monoubiquitination qui se produit sur la lysine 127 de BAP1 au niveau de son domaine UCH, en présence d'ASXL2 mutée au niveau de la lysine 370.

1- La monoubiquitination d'ASXL2 sur la lysine 370 stabilise le complexe BAP1/ASXL2

Nous avons précédemment démontré que la stabilité protéique d'ASXL2 est dépendante de BAP1. En effet, (i) la déplétion de BAP1 par siRNA déstabilise ASXL2, (ii) ASXL2 est déstabilisée dans deux types de cellules cancéreuses déplétées en BAP1 à savoir les cellules H28 de mésothéliome et H226 du cancer du poumon et (iii) par immunodéplétion, nous avons démontré que tout ASXL2 est complexé à BAP1. Tous ces résultats suggèrent qu'il est important de maintenir un complexe BAP1/ASXL2 stable dans les cellules. Nous avons donc émis l'hypothèse que la monoubiquitination d'ASXL2 joue un rôle important dans la régulation

de la stabilité de BAP1/ASXL2. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des cellules U2OS exprimant de façon stable des formes exogènes de GFP-ASXM2 (forme sauvage, ou mutée K370R) et Flag-HA-BAP1 que nous avons traité soit par un inhibiteur du protéasome, MG132 ou un inhibiteur de synthèse protéique, cyclohexymide (CHX). L'utilisation de la CHX nous permet d'inhiber la synthèse de nouvelles protéines et de cette façon suivre la demi-vie des protéines d'intérêt. En parallèle, l'utilisation du MG132 nous permet de suivre la vitesse d'accumulation des protéines. Ces deux expériences nous ont renseignés sur l'effet de l'ubiquitination de la lysine 370 sur la stabilité du domaine ASXM2.

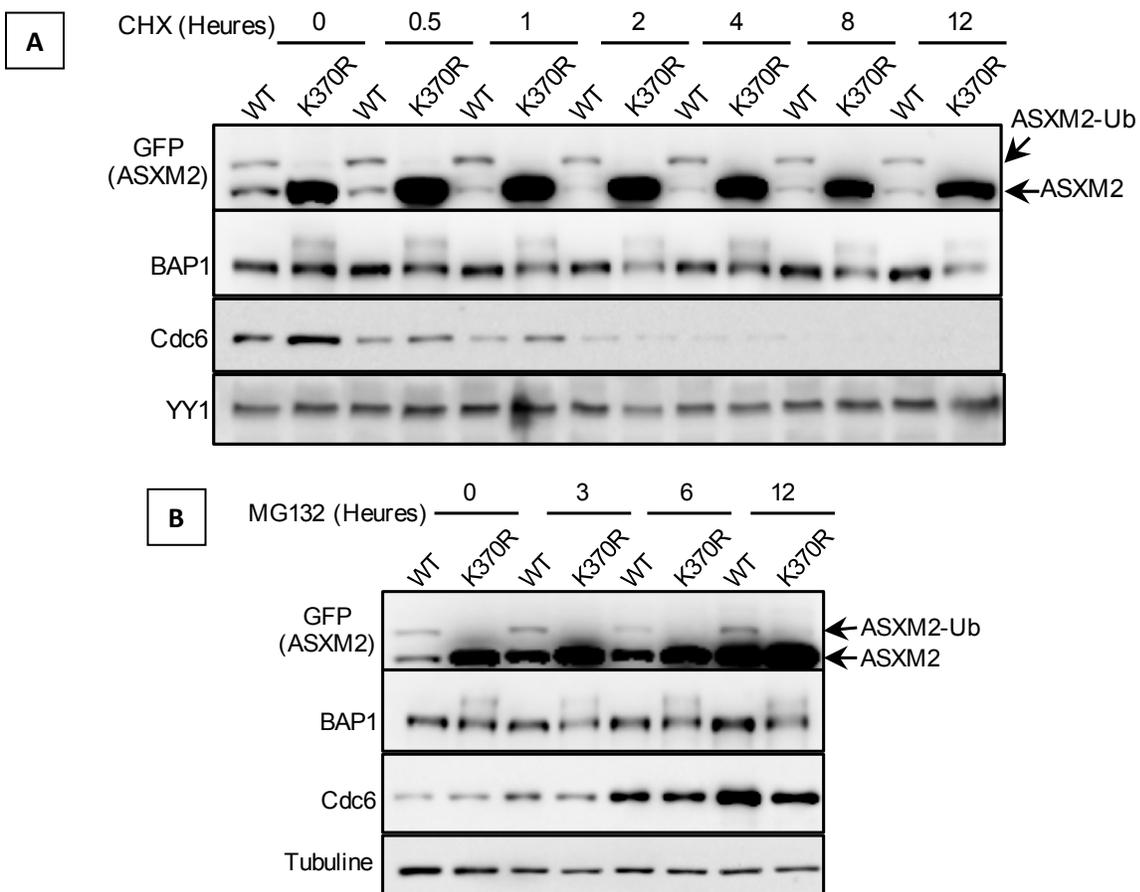


Figure 10 : Étude de la stabilité protéique d'ASXL2 monoubiquitinée *Versus* ASXL2 non ubiquitinée. Des cellules U2OS exprimant ASXM2 sauvage (WT) ou ASXM2 mutée (K370R) en présence de BAP1 sont traitées soit au cycloheximide (CHX) (A), soit au MG132 (B) puis collectées dans des laps de temps bien déterminés pour une analyse par immunobuvardage.

En effet, nous avons remarqué qu'à la suite du traitement des cellules par la CHX, la forme monoubiquitinée d'ASXM2 ainsi que ASXM2 K370R restent stables et ce jusqu'à 12

heures de traitement. Cependant, ASXM2 non modifiée présente une demi-vie très courte reflétée par sa dégradation presque totale après 1 heure de traitement (Figure 10A). D'autre part, nous avons observé qu'ASXM2 non modifiée s'accumule de manière très significative après traitement au MG132 (Figure 10B). Ces résultats nous amène à suggérer que la monoubiquitination de la lysine 370 initie une élongation de chaînes d'ubiquitines afin de promouvoir la dégradation d'ASXL2 par le protéasome.

Tenant compte de nos résultats présents et ceux précédemment décrits par notre groupe de recherche sur la stabilité protéique d'ASXL2⁹², nous pouvons conclure que : (i) la lysine 370 d'ASXL2 se fait monoubiquitinée en présence de BAP1 (ii) cette monoubiquitination est requise pour maintenir la stabilité du complexe BAP1/ASXL2 (iii) la monoubiquitination d'ASXL2 est le siège d'une extension de chaînes de polyubiquitines afin de promouvoir la dégradation d'ASXL2 non complexée à BAP1. Il sera donc intéressant dans des travaux ultérieurs de comprendre le mécanisme par lequel la monoubiquitination de ASXL2 sur la lysine 370 se transforme en polyubiquitination et déterminer les acteurs impliqués dans cette transition.

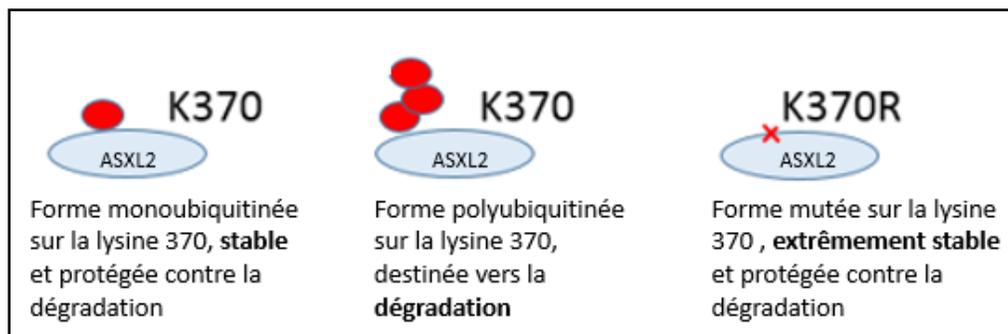


Figure 11 : Représentation schématique expliquant les différents cas de figure possibles régulant la stabilité d'ASXL2 à travers sa lysine 370.

2- La monoubiquitination d'ASXL2 stimule l'activité catalytique de BAP1 envers H2AK119ub

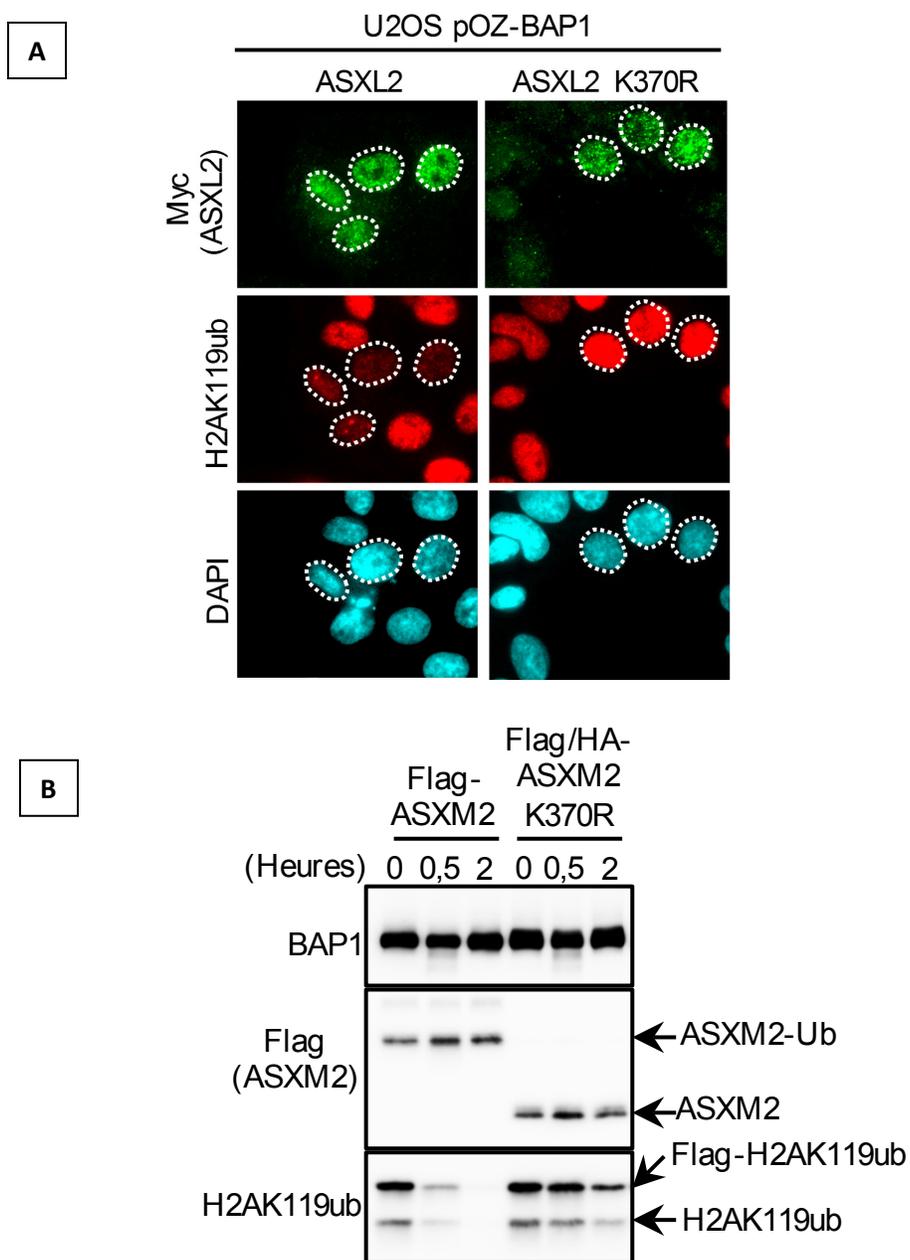


Figure 12 : Comparaison du pouvoir deubiquitinant de BAP1 envers H2AK119ub en présence de ASXL2 ou ASXL2 K370R. **(A)** Détection des niveaux de H2A monoubiquitinée sur la lysine 119 (H2AK119ub) par immunofluorescence. **(B)** Essais de déubiquitination in vitro sur des nucléosomes.

Puisque : (i) ASXM2 est requis pour induire l'activité catalytique de BAP1⁹², et (ii) la monoubiquitination d'ASXL2 se produit au niveau de ce même domaine afin de stabiliser le complexe BAP1/ASXL2, on s'est intéressé à caractériser si cette modification avait un impact

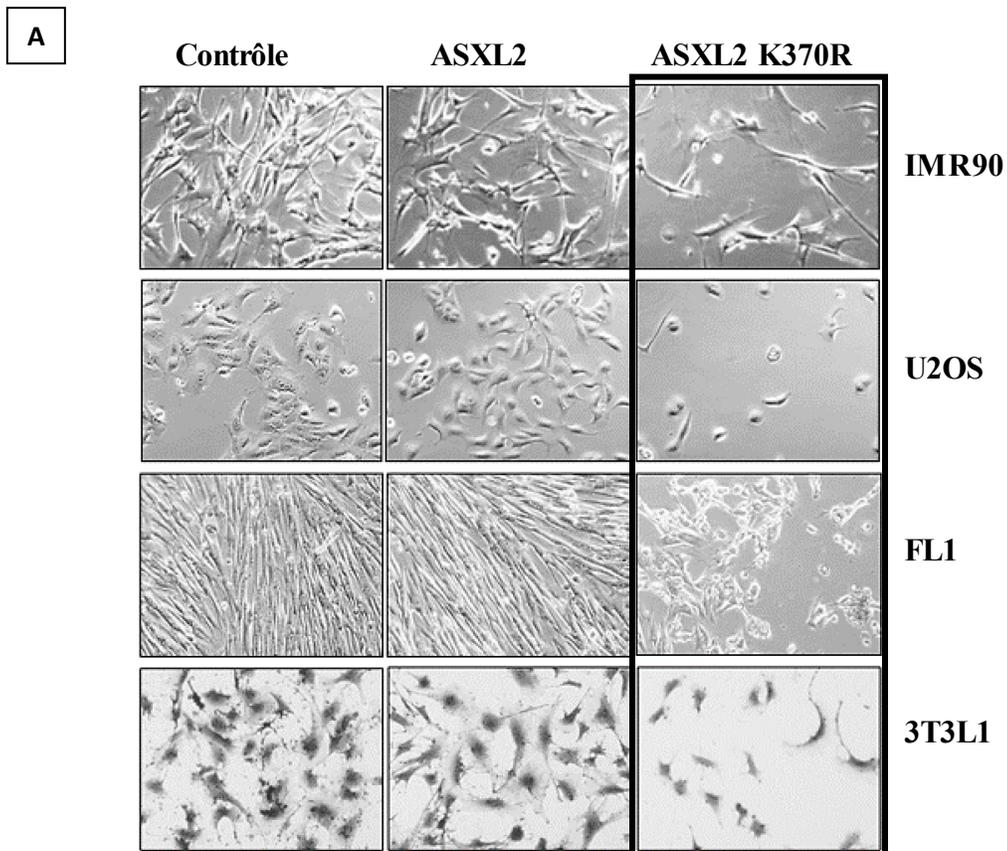
sur l'activité DUB de BAP1. Pour ce faire, nous avons généré par infection virale des cellules U2OS exprimant de manière stable Myc-ASXL2 et Myc-ASXL2 K370R. Le recours à l'infection virale nous permet d'exprimer des niveaux protéiques proches de ceux des protéines endogènes. Nous avons par la suite analysé par immunofluorescence les niveaux de H2A monoubiquitinée sur la lysine 119 (H2AK119ub) dans ces cellules grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique (Figure 12A). Nous avons trouvé que la co-expression de BAP1 avec ASXL2, et non avec ASXL2 K370R, résulte en une diminution globale de H2AK119ub. Afin de renforcer nos résultats, nous avons, comme deuxième stratégie d'investigation, testé l'effet de la monoubiquitination d'ASXM2 sur l'activité DUB de BAP1 *in vitro*. En effet, le domaine ASXM2 est suffisant à lui seul pour stimuler l'activité catalytique de BAP1 *in vitro* et *in vivo*⁹². Nous avons donc purifié, à partir de cellules 293T, la forme monoubiquitinée et la forme non-ubiquitinée d'ASXM2, les deux en complexe avec BAP1. Des essais de déubiquitination *in vitro* ont été réalisés sur des nucléosomes natifs, ubiquitinés sur la lysine 119 de H2A, purifiés à partir de cellules HEK293T (Figure 12B). Nous avons observé que la forme monoubiquitinée d'ASXM2 stimule de manière plus efficace la déubiquitination de H2A par BAP1, par rapport à ASXM2 non modifié.

En conclusion, nos résultats suggèrent fortement que la monoubiquitination d'ASXL2 stimule l'activité catalytique de BAP1 (Figure 12).

L'inactivation de BAP1 associé à ASXM2 K370R, peut être expliquée par le fait que cette DUB devient modifiée en présence de la forme mutée d'ASXM2. La différence de migration de la bande observée sur BAP1 en présence d'ASXM2 K370R, suggère fortement une monoubiquitination de BAP1 (Figure 9B). Ainsi, il est plausible d'émettre comme hypothèse que c'est la monoubiquitination au niveau de BAP1 qui inhibe son activité catalytique (Figure 9B). Afin de valider notre hypothèse, nous avons purifié BAP1 en présence d'ASXM2 K370R et analysé par spectrométrie de masse la présence de sites d'ubiquitinations. Nous avons ainsi pu déterminer, conjointement avec des expériences de mutagenèse (dont les résultats ne sont pas présentés dans ce rapport) que BAP1 est monoubiquitiné en présence d'ASXM2 K370R sur son domaine catalytique UCH et précisément au niveau de la lysine 127. Dans ce cas, on peut imaginer que la poche catalytique de BAP1 est bloquée par cette monoubiquitination et c'est pourquoi elle reste inactive envers son substrat H2AK119ub. Il est important de signaler que la monoubiquitination de BAP1 sur la lysine 127 a été déjà reporté dans des études de

protéomiques ¹⁰⁶. Ainsi cette modification se fait dans un contexte cellulaire normal en absence de l'expression d'ASXM2 K370R. Nous pouvons donc penser que la monoubiquitination de BAP1 et ASXL2 sur la K127 et la K370 respectivement est un mécanisme de régulation de la fonction suppresseur de tumeurs de BAP1 surtout que ces deux lysines sont conservées chez la drosophile. En effet, le déplacement de la monoubiquitination entre BAP1 et ASXL2 peut être perçu comme un processus de contrôle de qualité afin d'empêcher une activité excessive de BAP1 dans la cellule.

3- La monoubiquitination d'ASXL2 est importante pour la prolifération cellulaire



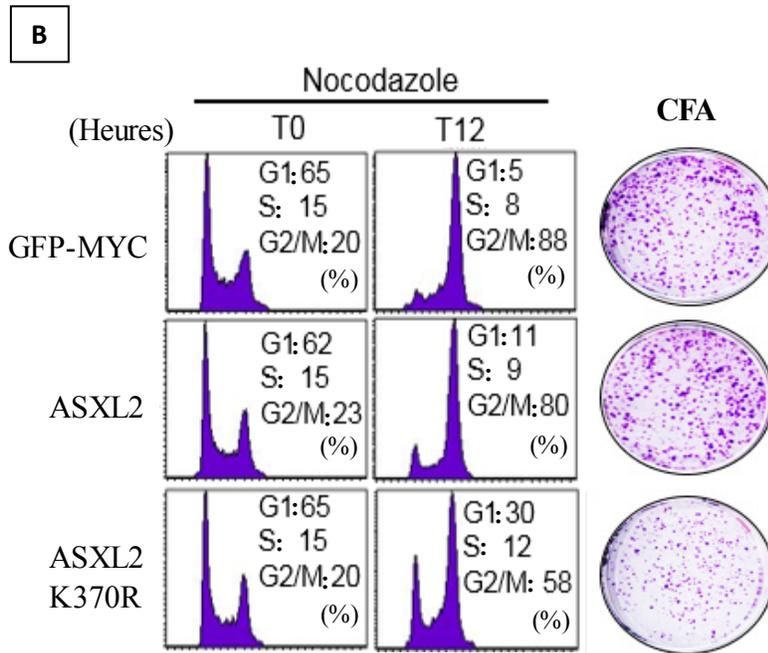


Figure 13 : Étude de la prolifération des cellules exprimant la forme sauvage ou la forme mutée (K370R) d'ASXL2 **A** : Photos microscopie en contraste de phase des différents types cellulaires exprimant, par transduction virale, les deux formes d'ASXL2. **B** : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux (FACS), en mesurant la quantité d'ADN marqué à l'iodure de propidium, des cellules U2OS exprimant les deux formes d'ASXL2. Ces mêmes cellules ont été utilisées pour un essai de formation de colonies (CFA), qui consiste à ensemercer dans des plaques un nombre fixe de cellules pour chaque condition et les laisser pousser pendant 10 jours. Les colonies survivantes seront ensuite colorées avec 0.2 % de cristal (Voir photos à droite).

Vu l'importance de la monoubiquitination d'ASXL2 dans la coordination de l'activité catalytique de BAP1, nous avons voulu investiguer sa fonction biologique. Étant donné que le complexe BAP1/ASXL2 régule la prolifération cellulaire⁹², nous avons étudié l'impact de la monoubiquitination d'ASXL2 dans ce processus. Nous avons exprimé ASXL2 et ASXL2 K370R dans plusieurs types cellulaires tels que, les fibroblastes humains primaires (FL1, IMR90), des cellules cancéreuses d'ostéosarcome (U2OS) et des cellules pré-adipocytes de souris (3T3L1). En effet, nous avons observé que l'expression de la forme mutée d'ASXL2 (K370R) perturbe la prolifération normale de toutes les cellules utilisées (Figure 13A). Ces résultats ont été confirmés par des analyses de cytométrie en flux. En effet, les cellules ont été traitées pendant 12 heures par le nocodazole, un inhibiteur de polymérisation des microtubules, afin de bloquer les cellules dans la phase M et donc prévenir la reprise du cycle cellulaire. Cela

nous a permis de bien visualiser la progression des cellules de la phase G1 à la phase M. La majorité des cellules qui expriment la forme sauvage monoubiquitinée d'ASXL2 (80%) ont progressé normalement vers la phase M du cycle cellulaire. En revanche, une proportion significative des cellules exprimant ASXL2 K370R, ont été retardée dans le cycle cellulaire et seulement 58% des cellules ont atteint la phase M (Figure 13B). Ceci est également observé par les expériences de formation de colonies (CFA) représentées par les images au niveau de la figure 13B.

Nos données suggèrent fortement alors que la monoubiquitination d'ASXL2 sur la lysine 370 est importante pour une prolifération cellulaire normale, vu que son absence affecte la prolifération cellulaire.

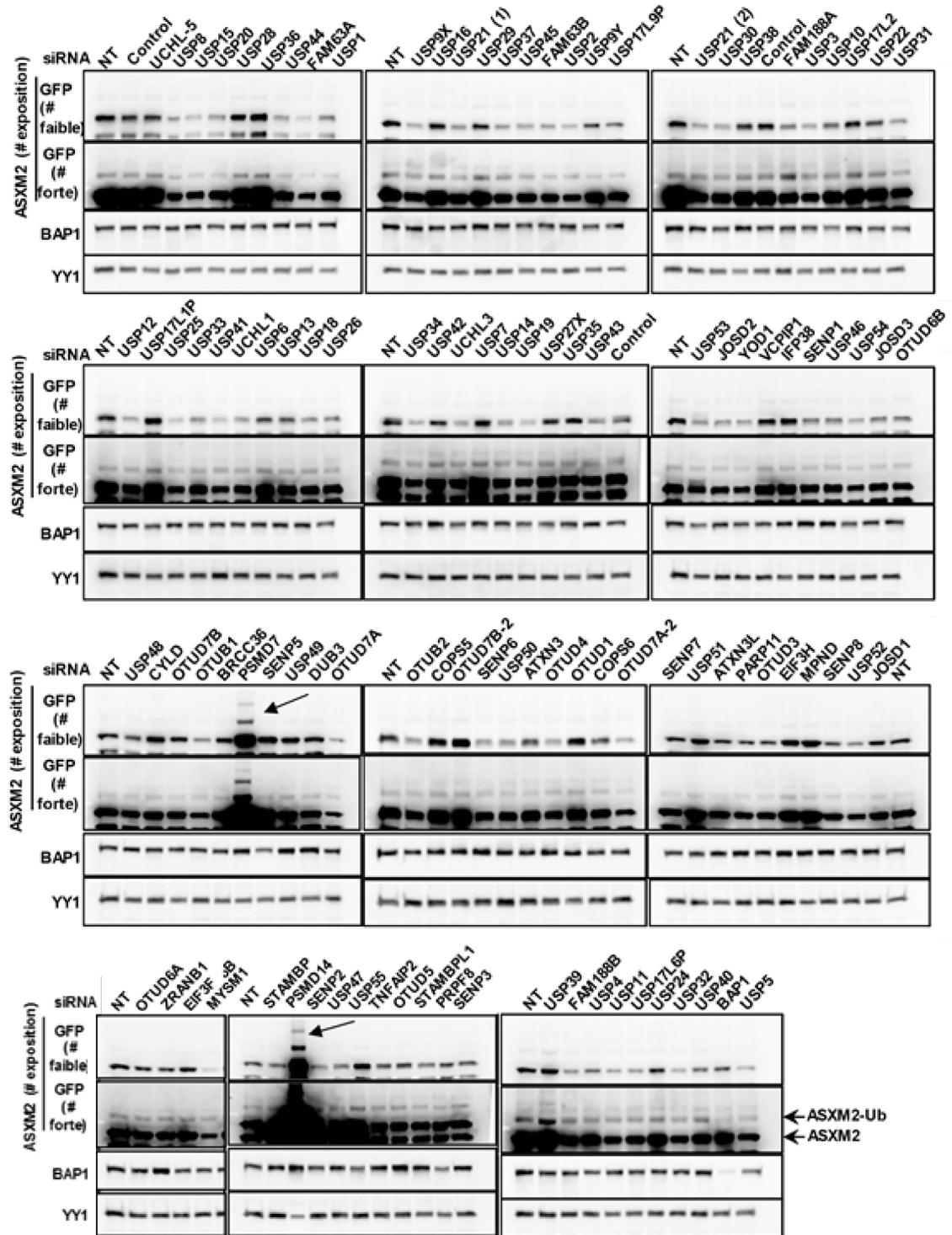
4- La monoubiquitination d'ASXL2 est régulée par UBE2E3 et PSMD14

Ayant déterminé l'importance fonctionnelle de la monoubiquitination d'ASXL2, nous avons voulu identifier les régulateurs enzymatiques de cette modification. En effet, connaître les acteurs clés régulant cette modification nous permettra de mieux comprendre sa fonction biologique ainsi que le mécanisme moléculaire impliqué.

Premièrement, afin d'identifier la déubiquitinase potentielle qui catalyse l'enlèvement de l'ubiquitination (monoubiquitination et polyubiquitination) d'ASXL2 sur la lysine 370, nous avons fait un criblage avec les ARN interférents de toutes les deubiquitinases du génome humain sur des cellules U2OS exprimant Flag-HA-BAP1 et GFP-ASXM2 (Figure 14A). De manière intéressante, suite à la déplétion des déubiquitinases associées au protéasome, PSMD14 et PSMD7, on a observé l'apparition de plusieurs bandes d'ASXM2, suggérant la formation de chaînes de polyubiquitine (Figure 14A). Afin de confirmer que la formation de chaînes polyubiquitine se fait sur la lysine 370 d'ASXL2, une conclusion anticipée suite aux résultats de traitements par CHX et MG132 (figure 10), nous avons déplété PSMD14 dans des cellules qui expriment stablement la forme mutée GFP-ASXM2 K370R en présence de Flag-HA-BAP1 (Figure 14B). Nous avons trouvé que la déplétion de PSMD14 n'induit pas la formation de

chaînes de polyubiquitine sur ASXM2 mutée, ce qui valide davantage nos résultats indiquant que la lysine 370 d'ASXL2 représente le même site pour la mono- et la polyubiquitination.

A



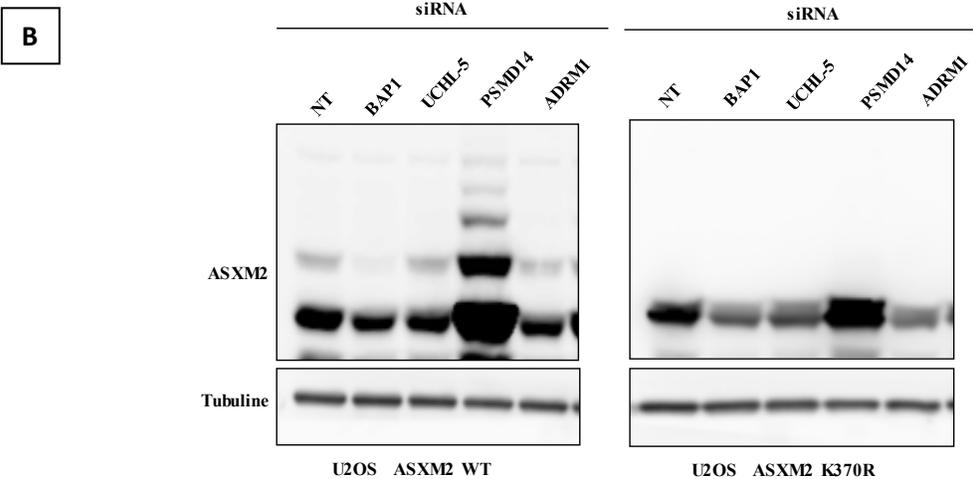


Figure 14 : identification de la déubiquitineuse PSMD14 responsable de la deubiquitination d’ASXL2. **A :** Criblage par des ARN interférents (siRNA) de toutes les deubiquitineuses du génome humain sur des U2OS exprimant de manière stable GFP-ASXM2 en présence de Flag-HA-BAP1. **B :** Déplétion de PSMD14 par siRNA dans des cellules exprimant GFP-ASXM2 ou GFP-ASXM2 K370R en présence de BAP1.

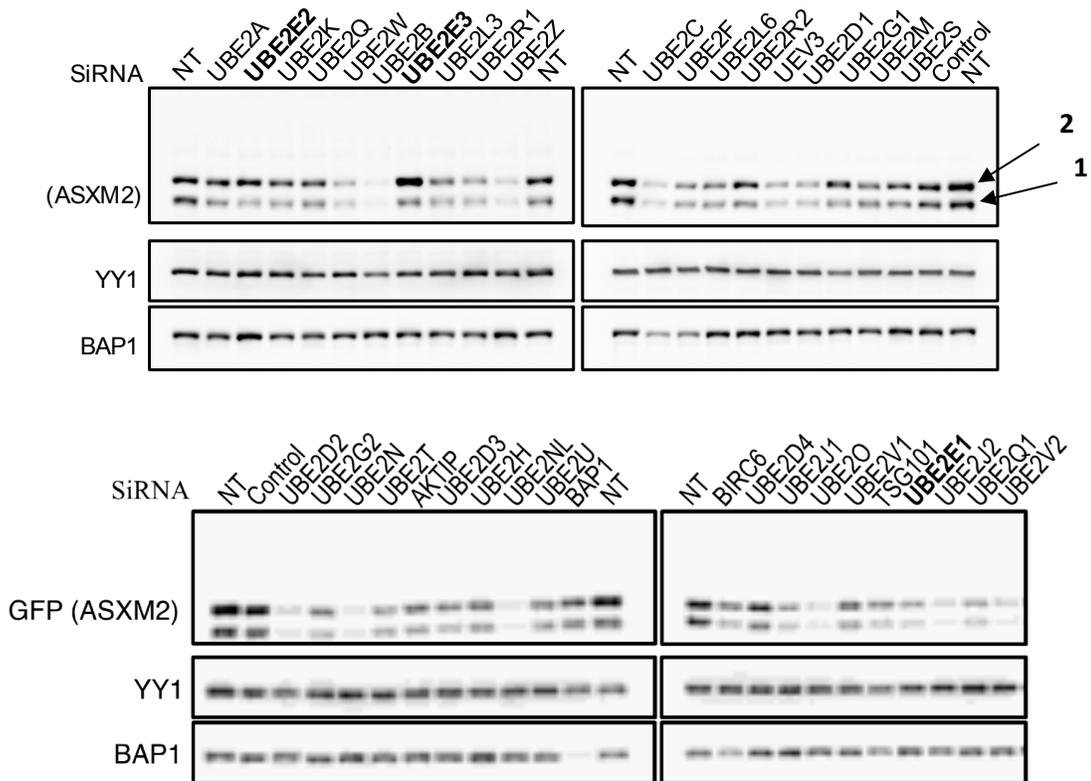
Dans un deuxième lieu, nous avons voulu identifier les enzymes qui participent à l’ajout de l’ubiquitine sur la lysine 370 à savoir la E2 et la E3. Nous avons utilisé deux approches complémentaires: un criblage aux ARN interférents ciblant toutes les E2s du génome humain suivit d’un essai d’ubiquitination *in vitro*.

Du fait que le nombre des E2s dans le génome humain est faible (~40 enzymes), il a été plus facile de cibler d’abord les E2s. En effet, nous avons raisonné que connaître la E2 pourrait nous aider à mieux cerner les E3s impliquées dans la monoubiquitination et l’extension des chaînes de polyubiquitines. Ainsi, le criblage des siRNA des E2s a été fait sur les cellules U2OS exprimant GFP-ASXM2 et Flag-HA-BAP1. L’analyse de l’effet de la déplétion des E2s sur la monoubiquitination d’ASXM2 a été réalisée par immunobuvardage. De ce fait, nous avons identifié plusieurs E2s dont la déplétion déstabilise les niveaux protéiques d’ASXM2. De manière remarquable, nous avons observé une stabilisation d’ASXM2 uniquement suite à la déplétion d’UBE2E3. UBE2E3 appartient à la famille UBE2E qui comprend aussi UBE2E1 et UBE2E2. Ce résultat est très intéressant du fait qu’il a été déjà démontré que les enzymes UBE2Es catalysent directement la monoubiquitination de SETDB1 sans l’implication d’une E3 ligase¹⁰⁷.

Afin de valider que les UBE2Es jouent le rôle de E2/E3 dans la catalyse de la monoubiquitination de ASXM2, des essais *in vitro* d'ubiquitination ont été réalisés en présence des UBE2Es et différentes E2s. Étant donné que BAP1 promouvoit la monoubiquitination de ASXM2, un complexe His-BAP1/MBP-ASXM2 a été purifié à partir des bactéries et mis en présence de 32 E2s recombinantes, de la E1, de l'ubiquitine et de l'ATP. On a ainsi révélé que c'est uniquement la UBE2E1 et UBE2E3 qui catalysent directement la monoubiquitination d'ASXM2.

En résumé, nos résultats de perte de fonction des différentes E2s et des essais d'ubiquitination *in vitro*, démontrent que la famille des UBE2Es joue dans le maintien de la stabilité protéique d'ASXL2 en promouvant sa monoubiquitination.

A Criblage avec 42 siRNA ciblant toutes les E2 du génome humain.



(1: produit de dégradation, 2: ASXM2)

B Essai d'ubiquitination in-vitro avec 32 E2s

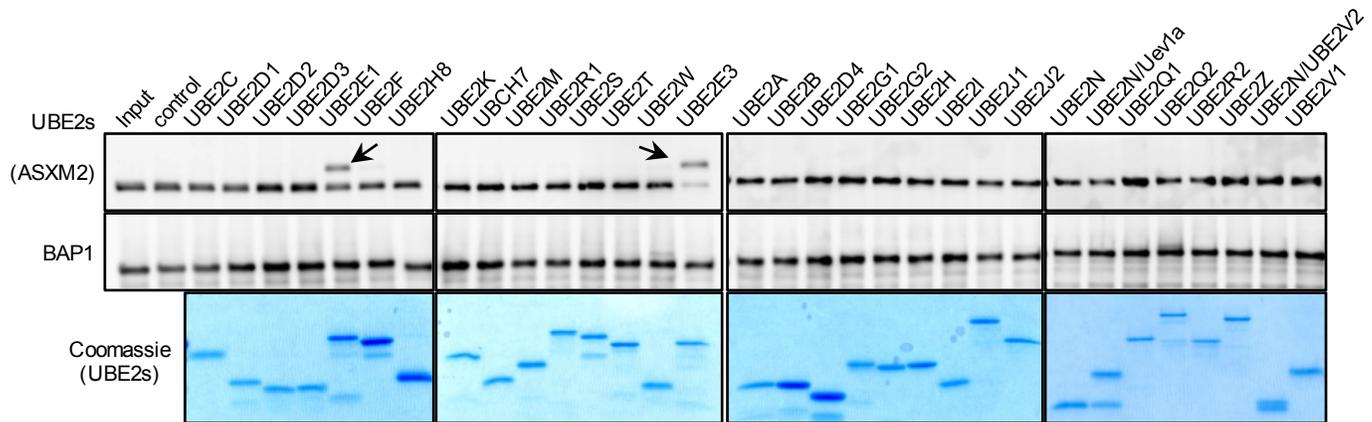
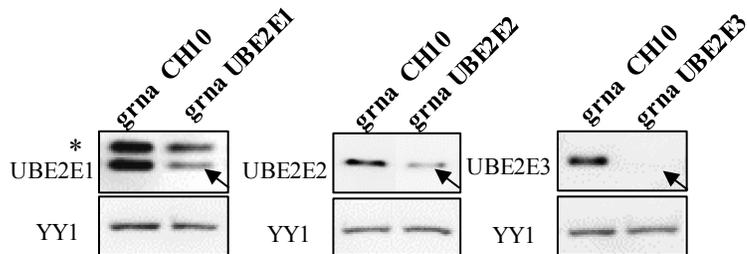
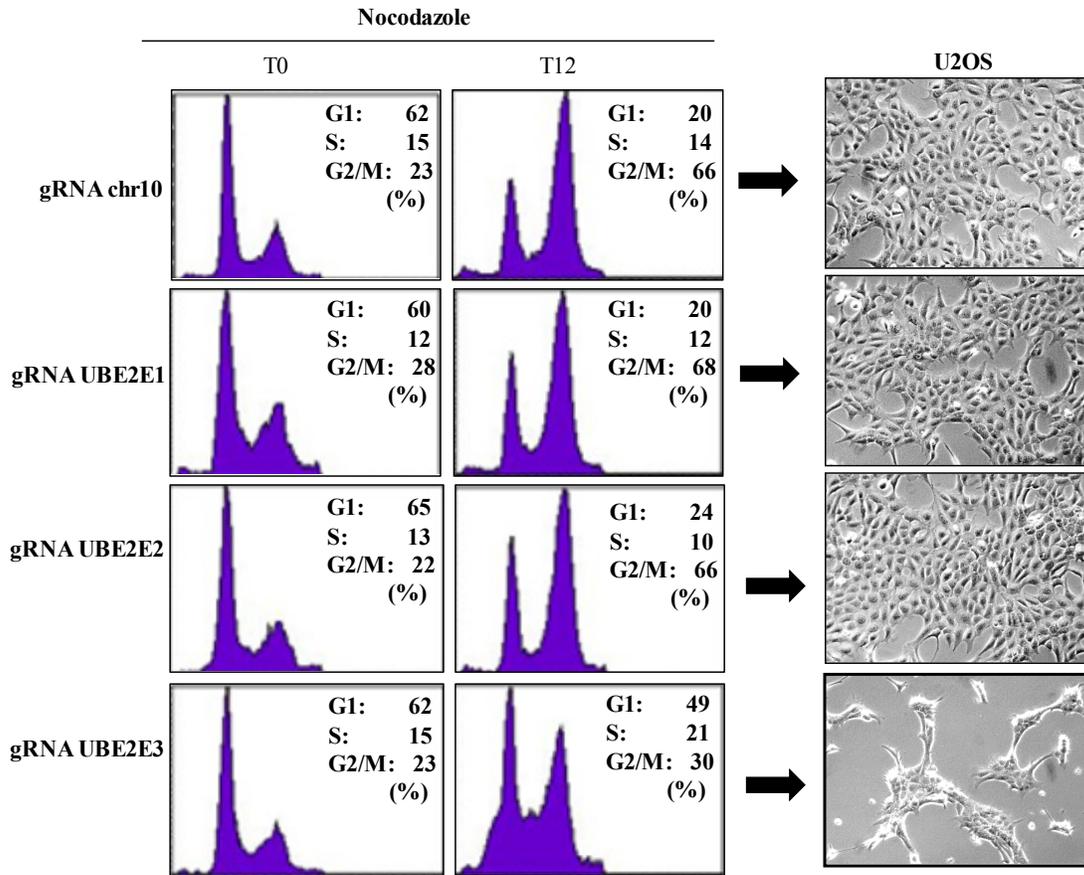


Figure 15 : Identification de l'enzyme de conjugaison (E2) qui catalyse la monoubiquitination de la lysine 370 de ASXL2 par un criblage aux ARN interférents (siRNA) de toutes les E2 du génome humain (A) par un essai d'ubiquitination *in vitro* (B).

Afin d'étudier le rôle des E2s dans la régulation de la fonction d'ASXL2 *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser une approche CRISPR/Cas9 afin de dépléter de manière stable UBE2E1/-E2/-E3 dans les cellules U2OS. Nos résultats précédents montrent que l'expression d'ASXL2 K370R dans ces cellules affecte grandement leur prolifération. Ainsi, l'hypothèse serait que l'inhibition d'expression des E2s devra diminuer les niveaux d'ubiquitination d'ASXL2 et donc récapituler le phénotype observé avec le mutant K370R. De manière surprenante, la déplétion d'UBE2E1 ou UBE2E2 ne change pas de manière dramatique la prolifération cellulaire. En revanche, la déplétion d'UBE2E3 réduit grandement la prolifération telle que déterminée par une diminution du nombre de cellules (photos en contraste de phase) ainsi qu'une perturbation importante de la transition G1-S. Ces résultats suggèrent un rôle important d'UBE2E3 dans la prolifération fort probablement via la modification d'ASXL2 par monoubiquitination.



(*: UBCHL5)

Figure 16 : La déplétion d'UBE2E3 par CRISPR/Cas9 retarde la prolifération cellulaire. Les cellules U2OS ont été infectées par des lentivirus correspondant aux différents E2, après sélection, les cellules ont été utilisé pour analyse FACS ou microscopie.

5- *La monoubiquitination d'ASXL2 est perturbée en présence de mutants de cancer de BAP1 :*

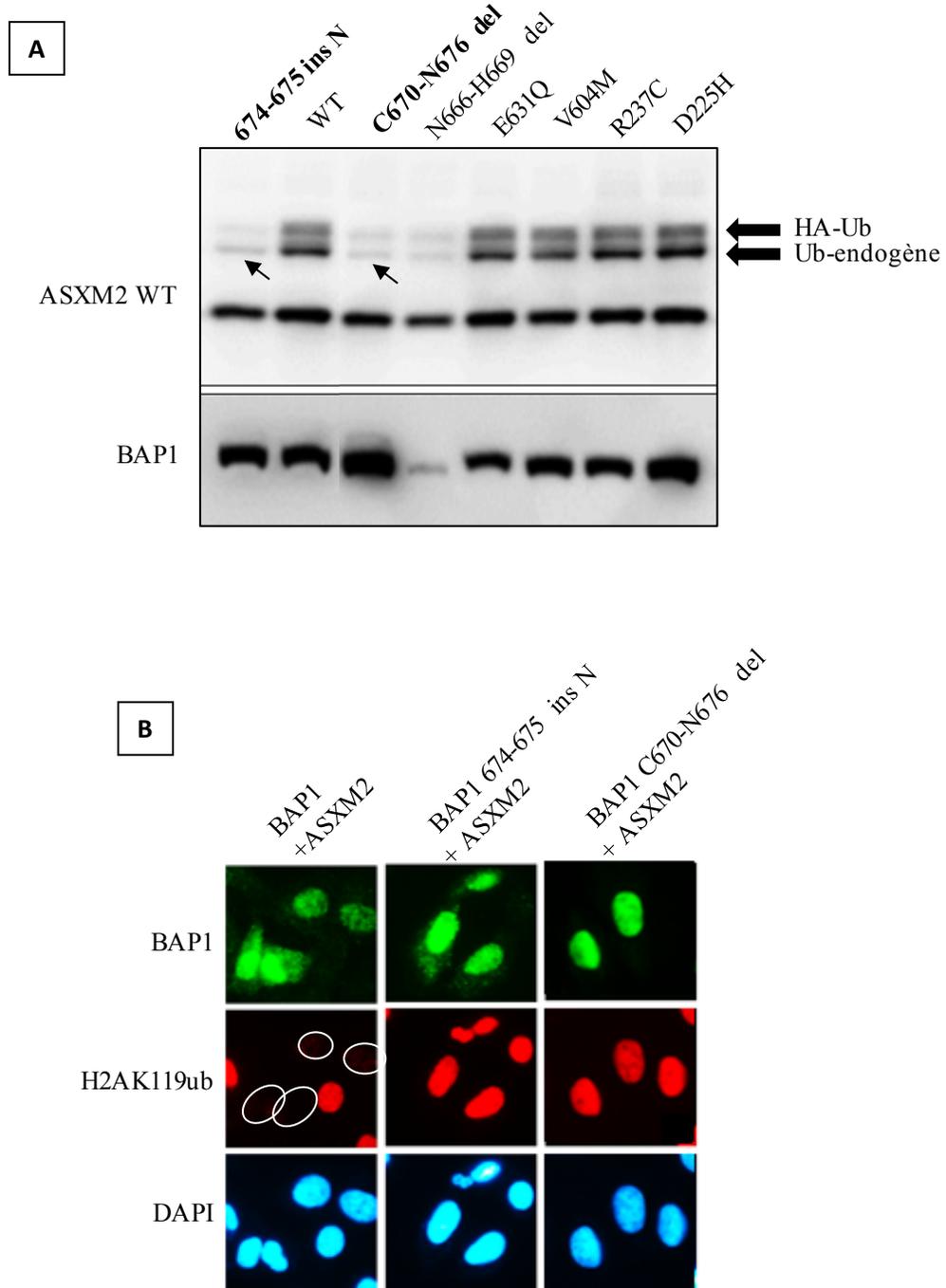


Figure 17 : Des mutations de cancer de BAP1 inhibent la monoubiquitination de son partenaire ASXL2 (A), et par conséquent, son activité catalytique envers H2AK119ub (B).

BAP1 est la déubiquitinase la plus fréquemment mutée dans les cancers. De ce fait, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet des mutations de BAP1 sur la monoubiquitination d'ASXM2. Ceci pourrait nous renseigner davantage sur le rôle de la monoubiquitination d'ASXM2 la suppression de tumeurs par BAP1. Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi dans les bases de données telles que, '*Cosmic database*' des mutations touchant les domaines catalytiques (UCH) et non catalytiques (CC1, CC2, CTD) de BAP1. Par la suite, nous avons exprimé, par transfection transitoire, certains mutants de BAP1 en présence d'ASXM2 dans les cellules HEK293T. De façon remarquable, nous avons trouvé deux mutants qui sont grandement défectueux dans leur abilité de stimuler la monoubiquitination d'ASXM2. Il s'agit de la délétion 670-676 et l'insertion 674-675N dans le domaine C-terminal de BAP1. En effet, ces deux mutants sont trouvés dans le mélanome suggérant l'importance de la monoubiquitination d'ASXL2 dans la suppression tumorale associée à ce cancer.

D'autre part, nous avons remarqué que l'expression de ces mutants dans les HEK293T engendre non seulement l'absence de la monoubiquitination d'ASXM2, mais aussi l'apparition de la monoubiquitination de BAP1 (Figure 11). Ce cas de figure est similaire à la co-expression de BAP1 avec ASXM2 K370R. En effet, nous avons trouvé aussi que ces deux mutants sont catalytiquement inactifs sur H2AK119ub (Figure 17B). De plus, d'autres essais fonctionnels sont en cours de réalisation afin de mieux caractériser ces deux mutants dans le cancer.

En conclusion, on peut penser que la perte de la monoubiquitination d'ASXL2 est la cause la plus probable de la perte de fonction de BAP1 dans ces mélanomes.

*Discussion
générale*

VI- DISCUSSION GÉNÉRALE

Un rôle central de l'ubiquitination du domaine ASXM2 dans la coordination de l'activité DUB du complexe BAP1/ASXL2 et dans la prolifération cellulaire:

Les DUBs doivent être finement régulées afin de maintenir la reconnaissance spécifique des substrats. BAP1, une DUB de la famille UCH, est un suppresseur de tumeurs majeur dont les mécanismes de fonction et de régulation ne sont pas bien définis. BAP1 interagit avec de nombreux facteurs et co-facteurs de transcription qui jouent des rôles importants dans le recrutement de cette DUB à la chromatine et la régulation de sa fonction enzymatique. Parmi ces co-facteurs, on trouve les protéines ASXL1 et ASXL2, qui selon leur fonction biologique se retrouvent entre les protéines du groupe Polycomb et Thrtorax. Les ASXLs sont des cofacteurs obligatoires du complexe nucléaire BAP1, qui utilisent le domaine ASXM pour interagir et stimuler l'activité enzymatique de cette DUB ⁹².

Dans cette étude, nous avons élucidé un nouveau mécanisme de régulation de la fonction suppresseur de tumeurs de BAP1. Il s'agit d'une coopération fonctionnelle entre BAP1 et ASXL2 impliquant le maintien d'une monoubiquitination constitutive, dépendante de BAP1, sur la lysine 370 du domaine ASXM2 d'ASXL2. Nous avons montré que cette monoubiquitination d'ASXL2 régule l'activité catalytique et la fonction de régulation de la prolifération cellulaire de BAP1. En effet, nos résultats dans des cellules humaines indiquent que la monoubiquitination d'ASXL2 promouvait l'activité DUB de BAP1, un effet contraire à celui observé avec ASXL2 K370R. Ceci a été démontré par deux approches différentes: (i) l'expression du complexe BAP1/ASXL2 ou BAP1/ASXL2 K370R suivi d'une détection par immunofluorescence des niveaux de H2AK119ub endogène et (ii) la purification du complexe BAP1/ASXM2 (monoubiquitiné) ou BAP1/ASXM2 K370R suivi d'un essai de débiquitination sur des nucléosomes natifs purifiés. Cependant, afin de valider davantage ces résultats, il sera intéressant d'effectuer des expériences qui nous permettront de reverser l'effet par une forme mutée sur la lysine 370 et déterminer l'impact sur H2AK119ub et autres fonctions de BAP1.

Cela pourra se faire par l'expression de formes ASXL2 résistantes au siRNA et contenant ou non une mutation de la lysine 370. Alternativement, l'approche CRISPR/Cas9 pourra être utilisée pour introduire la mutation de la lysine 370 d'ASXL2.

Il est important de mentionner, qu'une partie de ce projet a été réalisé chez la drosophile. En effet, nous avons voulu investiguer si le mécanisme de régulation du complexe BAP1/ASXL2 par monoubiquitination est conservé chez la drosophile. De même, nous avons retrouvé (résultats non montrés) que ASX est monoubiquitiné de façon dépendante de Calypso et que cette monoubiquitination coordonne également l'activité DUB du complexe Calypso/ASX. Nous avons observé que la forme mutée d'ASX K325R (mutation de la lysine correspondante de la K370 chez ASXL2) exerce un effet de dominant négatif entraînant des niveaux élevés de H2AK119ub. Ainsi, nos résultats soulignent un aspect unique de régulation de l'activité catalytique de BAP1. Un mécanisme qui semble être conservé à travers les espèces afin de coordonner la fonction suppresseur de tumeurs de cette DUB. À notre connaissance, cette découverte constitue le premier exemple d'une régulation fonctionnelle d'une DUB par son cofacteur.

Le complexe multi-protéique BAP1, intègre plusieurs réactions enzymatiques pour une coordination appropriée de la fonction suppresseur de tumeurs de BAP1 et ce grâce à la présence de différents partenaires. En effet, on y retrouve l'ubiquitination (UBE2O), l'acétylation (HAT1), la déméthylation (LSD2) et l'O-GlcNAcylation (OGT). Plus particulièrement nous avons décrit un nouveau mécanisme via la monoubiquitination du domaine ASXM de ASXLs qui pourrait induire des changements conformationnels dans le complexe, afin d'accroître l'affinité de BAP1 pour ces substrats incluant H2AK119ub. Ce mécanisme pourrait aussi coordonner la fonction d'autodéubiquitination de BAP1 qui régule sa localisation nucléaire. En effet, l'ubiquitination de BAP1 par UBE2O sur son NLS permet d'exclure BAP1 du noyau⁵¹. Il sera donc très intéressant de déterminer l'impact de la monoubiquitination d'ASXL2 sur l'activité autodéubiquitinase de BAP1 en incubant le complexe ASXM2/BAP1 (monoubiquitiné) et ASXM2/BAP1 K370R avec UBE2O dans des réactions d'ubiquitination et de déubiquitination *in vitro*.

La monoubiquitination d'ASXL2 pourrait aussi moduler le recrutement du complexe à la chromatine spécifiquement au niveau des nucléosomes portant la marque d'histone H2AK119ub. BAP1 est complexe transcriptionnel composé de plusieurs facteurs et cofacteurs

transcriptionnels (YY1, HCF-1, FOXK1, FOXK2, ZNF131, NRF1, ASXL1 et ASXL2) qui peuvent chacun, selon la reconnaissance de séquences spécifiques au niveau de l'ADN, recruter le complexe BAP1 sur des régions régulatrices différentes au niveau de la chromatine. Le domaine PHD d'ASXL2 pourrait contribuer à ce recrutement étant donné que les domaines PHD reconnaissent des résidus modifiés d'histones. Une étude récente a montré que le domaine PHD d'ASXL2 reconnaît la diméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 4 (H3K4me2)¹⁰⁸. De plus, BAP1 est majoritairement associé à HCF-1, son partenaire majeur. HCF-1 interagit à travers le domaine HBM avec plusieurs complexes de régulation de la chromatine. Ainsi, BAP1 pourrait former des complexes transcriptionnels distincts en s'intégrant avec HCF-1/OGT/TET2, HCF-1/OGT/MLL5, HCF-1/MOF, HCF-1/LSD1, HCF-1/SETD1. De ce fait, une fonction dynamique dans la régulation des gènes cible du complexe BAP1 et divers processus cellulaires, est assistée par une collaboration entre la mise en place et la lecture de plusieurs modifications postraductionnelles au niveau de la chromatine.

L'activité DUB de BAP1 est nécessaire pour une prolifération harmonieuse des cellules, et des défauts dans sa fonction entraînent un retard du cycle cellulaire et une sénescence précoce¹⁰⁹. Ces effets sont également reflétés par l'expression d'ASXL2 K370R, indiquant l'importance de cette modification dans la coordination de l'activité catalytique de BAP1 pour le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Nous avons observé que la monoubiquitination d'ASXL2 est constitutive, elle se fait dans toutes les phases du cycle cellulaire dans les cellules humaines (résultat non montré). De plus, BAP1 est associé à HCF-1 et YY1, deux régulateurs des gènes cibles d'E2F, des gènes mitochondriaux et des enzymes de régulation du métabolisme¹¹⁰. Ainsi, il sera donc intéressant de déterminer l'impact de la monoubiquitination d'ASXL2 sur l'expression des gènes cibles d'E2Fs et la régulation de nombreux autres gènes impliqués dans divers processus incluant la prolifération cellulaire et la coordination du métabolisme.

Rôle de l'enzyme de conjugaison UBE2E3 et de la deubiquitinase PSMD14 dans la régulation de la stabilité protéique d'ASXL2:

Une autre observation importante que nous avons faite, est que la monoubiquitination d'ASXL2 est catalysée directement par l'enzyme de conjugaison (E2), UBE2E3, sans l'implication d'une E3 ligase. En effet, il a été observé récemment que les enzymes de la famille UBE2E peuvent catalyser la monoubiquitination du régulateur transcriptionnel SETDB1 stimulant son activité enzymatique et ceci en l'absence d'une E3 ligase ¹⁰⁷.

Nous avons trouvé que les niveaux protéiques de la forme monoubiquitinée d'ASXM2 sont très stables suite à un traitement au cycloheximide tandis que la forme non modifiée est presque toute dégradée après environ une heure de traitement. De manière frappante, la mutation de la lysine 370 entraîne une augmentation des taux de protéines d'ASXM2 ou ASXL2. En effet, nous avons démontré que la même lysine d'ASXL2 (K370) est utilisée pour assurer une monoubiquitination qui stabilise le complexe, et également pour induire la polyubiquitination et la protéolyse. Ces résultats sont corroborés par nos expériences sur l'effet des DUBs sur ASXM2. L'inhibition de la DUB associé au protéasome PSMD14, ou de son cofacteur PSMD7, entraîne l'apparition de multiples bandes d'ASXM2 pouvant correspondre à une polyubiquitination. De plus, l'expression du mutant d'ASXM2 (K370R), tout en déplaçant PSMD14, nous a permis de conclure qu'il s'agit bien d'une extension de chaînes sur ce résidu. De plus, nous avons trouvé que l'enzyme UBE2E3 qui déclenche la monoubiquitination d'ASXL2 sur K370, conduit à la stabilisation ou la protéolyse de ce facteur. Le degré d'association de BAP1 avec ASXL2 semble jouer un rôle important dans le choix de destinée de ce dernier. BAP1 pourrait limiter la modification d'ASXL2 à la monoubiquitination en le protégeant contre une extension de chaînes d'ubiquitine. Le mécanisme par lequel ASXL2 complexée à BAP1 est maintenue protégée contre la polyubiquitination reste à définir. Par exemple, il sera intéressant de déterminer si l'activité catalytique de BAP1 est requise pour prévenir la formation de chaînes sur ASXL2.

Conformément à nos données indiquant que les enzymes UBE2E catalysent la monoubiquitination d'ASXL2, ces enzymes possèdent une extrémité N-terminale distincte qui bloque l'assemblage de chaînes d'ubiquitines sur les substrats ⁹. Cependant, il est aussi connu que les enzymes UBE2E peuvent s'associer à un large éventail de ligases (E3) typiques pour favoriser l'extension de chaînes d'ubiquitine et par conséquent, la dégradation. Il est aussi possible que le complexe ASXL2/BAP1 soit ciblé par d'autres E2 et E3 ligases qui induisent la dégradation, indépendamment des enzymes UBE2E.

Sur un plan fonctionnel, la signalisation impliquant la mono- et poly-ubiquitination pourraient constituer un mécanisme de contrôle de qualité important pour une régulation fine des niveaux protéiques d'ASXL2 et l'activité DUB de BAP1. De ce fait, il est possible que l'excès de protéines ASXL2 puisse être rapidement monoubiquitiné par les E2 s de la famille des UBE2Es. Cela pourrait servir d'amorce par la suite pour l'action d'une E3 ligase induisant la dégradation d'ASXL2 afin d'éviter les effets indésirables de la forme libre non associée à BAP1. D'autre part, la décision de basculer entre la monoubiquitination et la polyubiquitination pourrait constituer un mécanisme de régulation qui pourra être utilisé pour la dégradation d'ASXL2, en temps voulu, afin de permettre à BAP1 de s'associer à d'autres complexes et réguler la transcription suite à une stimulation particulière. Il sera donc intéressant d'identifier des contextes cellulaires pouvant permettre d'observer une dégradation d'ASXL2 en réponse à un stimulus externe.

La monoubiquitination d'ASXL2 K370 est perturbée dans des cancers de BAP1 :

Vu l'importance de la monoubiquitination d'ASXL2 pour la fonction de BAP1, nous avons investigué si elle est perturbée dans des cancers associés à BAP1. Fait intéressant, nous avons trouvé des mutations au niveau du domaine CC2 de BAP1 qui inhibent la monoubiquitination d'ASXL2 et par conséquent, son activité catalytique sur H2AK119ub. Il sera important de comprendre comment ces mutations du domaine CC2 inhibent la monoubiquitination d'ASXL2. Il est probable que ces mutations induisent un changement conformationnel du complexe défavorable pour la bonne fixation d'UBE2E3. Il est aussi possible que ces mutations inhibent l'interaction entre ASXL2 et BAP1 empêchant donc le maintien de la stabilité de la forme monoubiquitinée d'ASXL2.

Les voies de signalisations liées au mécanisme de régulation de BAP1 par ubiquitination d'ASXL2 :

Une autre question importante, est de savoir quelles sont les voies de signalisation qui peuvent dicter soit la monoubiquitination d'ASXL2 et la stabilité du complexe, soit sa

dégradation. En effet, des sites de phosphorylation sur BAP1 ou ASXL2 ont été déjà reportés dans la littérature ¹¹¹ . Il est donc possible que des kinases particulières, répondant à certains stimuli, puissent réguler ASXL2 et permettre sa stabilisation ou le recrutement d'une E3 ligase déclenchant sa dégradation. Des voies de signalisation impliquant des kinases peuvent fonctionner en concert avec l'ubiquitination pour réguler l'activité et la fonction suppressive de tumeurs du complexe BAP1/ASXL2 et cela constitue une piste de travaux de recherches ultérieures.

*Matériels
et méthodes*

V- MATÉRIELS ET MÉTHODES

Lignées cellulaires

Les cellules embryonnaires de rein humain transformées (HEK293T), les cellules d'ostéosarcome humain (U2OS), les cellules fibroblastes primaires humaines de la peau (LF1), les cellules fibroblastes primaires humaines du poumon (IMR90) et les préadipocytes de souris (3T3L1) sont maintenues en culture dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté par 5 ou 10 % de sérum fœtal bovin (FBS), 1 % de L-glutamine et 1 % de pénicilline / streptomycine à 37°C, 5 % de CO₂.

Plasmides et constructions

Les constructions pENTR D-Topo ASXL2^{ΔASXN}, ASXL2^{ΔASXM2} et pENTR ASXL2^{ΔPHD} ont été générées par PCR en utilisant pDEST-Myc-ASXL2 en tant qu'ADNc puis réintégrées dans pENTR D-Topo ASXL2 par sous clonage.

Les constructions ASXM2 (K289R, K340R, K365R, K370R, K390R, K391R) ont été générées par mutagenèse dirigée sur la construction pENTR D-Topo ASXM2 en utilisant l'ADN polymérase Q5. pENTR ASXL2 K370R a également été généré par mutagenèse dirigée sur la construction pENTR D-Topo ASXL2 en utilisant l'ADN polymérase Q5.

Les mutants de cancer de BAP1, BAP1 E631Q, BAP1 V604M, BAP1 R237C, BAP1 D225H ont été générés par mutagenèse dirigée en utilisant pDEST-Flag-BAP1. Les mutants de cancer de BAP1, BAP1^{ΔR666-H669}, BAP1^{Del670-676} et BAP1^{Ins674-675N} ont été généré par synthèse de gènes (*BioBasic Inc*) puis reclésés dans pENTR D-Topo BAP1.

Les constructions pENTR ASXM2, pENTR ASXM2 K370R, pENTR ASXL2, pENTR ASXL2 K370R, ainsi que pENTR BAP1, ont été introduits par recombinaison à la LR clonase dans un vecteur d'expression pLenti-CMV lentiviral résistant à la puromycine (Addgene # 17452) afin de réaliser des transductions virales dans les cellules U2OS, les fibroblasts ou les

3T3L1. Ces constructions ont été aussi recombinées dans pDEST-Myc ou pDEST-Flag pour réaliser des transfections transitoires dans les cellules HEK293T.

Transfection transitoire des cellules:

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les vecteurs d'expression en utilisant du polyéthylénimine (PEI). Trois jours après la transfection, les cellules ont été récoltées pour immunobuvardage ou immunoprécipitation.

Les cellules U2OS ont été transfectées à l'aide de la Lipofectamine RNAimax (Life technologies) avec 200 pmol des ARN interférents 'siRNA'. Les oligos pour le siRNA contrôle (*ON-TARGET* ou *NON-TARGET*) proviennent de Dharmacon. Les siRNAs provenant de Sigma-Aldrich ciblent toutes les enzymes conjuguatrices E2 (42 E2s) et les deubiquitinasés (102 DUBs) du génome humain. Les siRNA ont été conçues pour cibler des régions différentes du mRNA de chaque E2 ou DUB (des mélanges de deux oligos siRNA ont été utilisés pour les DUBs et trois oligos pour les E2s). Les cellules U2OS co-exprimant de manière stable pOZ-Flag-HA-BAP1 et pLenti-CMV-GFP-ASXM2 ont été transfectées individuellement deux fois dans les 24 heures avec les siRNAs individuelles ciblant les E2s ou DUBs. Les cellules ont été transfectées. Quatre jours après la transfection, les cellules ont été récoltées pour immunobuvardage. L'analyse densitométrique des bandes de protéines a été effectuée et les valeurs obtenues ont été utilisées pour calculer des valeurs relatives aux variations de niveaux protéiques des protéines analysées (ASXM2, ASXM2 ubiquitinée et BAP1) à l'aide du logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Infection virale des cellules

Les cellules HEK293T (5×10^6) ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm, incubées 24 heures, puis transfectées de manière transitoire en utilisant le polyéthylénimine (PEI). Ainsi, 12 µg de constructions pLenti-CMV (permettant l'expression de BAP1 ou ASXL2) et 6 µg de chacune des constructions d'emballage des particules virales, PAX2 et PMD2-G ont été utilisées par condition de transfection. Le milieu de culture a été changé 24 heures après

la transfection. Trois lots de milieux viraux ont été collectés après 48 heures, 60 et 72 heures suite à la transfection. Ils ont ensuite été filtrés à 0.45 µm puis complétés avec 8 µg/ml de polybrène et 10% de FBS pour finalement être ajouté sur des cellules deux fois sur une période de 48 heures.

Les cellules U2OS, LF1, IMR90 ou 3T3L1 ont été infectées avec les particules lentivirales empaquetées avec des vecteurs exprimant soit Myc-GFP, Myc-BAP1, Myc-ASXL2 ou Myc-ASXL2 K370R. Après une sélection de 48 heures (2 µg/ml de puromycine), les cellules ont été ensemencées soit pour les essais de formation de colonies (CFA), d'immunofluorescence ou collectées dans le tampon de lyse SDS afin d'analyser l'expression des protéines par immunobuvardage. Les cellules ont aussi été utilisées pour effectuer des analyses de progression du cycle cellulaire en les synchronisant avec le nocodazole (200 ng/ml) ou avec la méthode du double blocage à la thymidine (2 mM).

Immunobuvardage

Pour l'immunobuvardage, les cellules sont collectées dans le tampon de lyse (50 mM Tris-HCl [pH 7.3], 2 % SDS)). Le dosage de la quantité de protéines se fait par la méthode BCA et les échantillons sont analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes (*SDS-PAGE*). L'immunobuvardage est effectué par la suite selon les procédures standards et en utilisant les anticorps spécifiques pour chaque protéine. La tubuline ou le facteur de transcription Yin Yang 1 (YY1) ont été utilisés comme contrôles de chargement sur gel.

Immunoprécipitation

Des cellules exprimant Myc-ASXL2 en présence de Flag-BAP1 et HA-Ubiquitine ont été récoltées dans un tampon PBS et centrifugées. Le culot cellulaire a été utilisé par la suite pour effectuer une immunoprécipitation en conditions natives. Les cellules obtenues sont brièvement lysées dans un tampon (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 1%

Triton, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 20 mM NEM, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM βGP et un mélange d'inhibiteurs de protéases). Suite à une incubation sur glace de 20 min, les extraits cellulaires sont centrifugés à 13000 rpm/15 min. Les surnageants sont ensuite incubés avec 20 µl d'anticorps anti-Myc toute la nuit à 4 °C, puis avec 30 µl de billes de sépharose couplées à la protéine G pendant 2 heures à 4 °C. Après plusieurs lavages avec le même tampon, les billes sont resuspendues dans 50 µl de LB 2X (Lamelli buffer 2X), et analysées par immunobuvardage.

Étude de la stabilité des protéines suite aux traitements au MG132 et CHX

Des cellules U2OS exprimant de manière stable GFP-ASXM2 ou GFP-ASXM2 K370R en présence de Flag-HA-BAP1 ont été traitées soit avec 20 ng/ml de l'inhibiteur de synthèse protéique cycloheximide (CHX) ou avec 20 µM de l'inhibiteur du protéasome MG132 pour effectuer des essais de stabilité protéiques. Les cellules sont récoltées pour immunobuvardage aux temps indiqués dans les figures.

Essai de formation des colonies (CFA)

Des nombres similaires de cellules U2OS ou 3T3L1 exprimant de manière stable les différentes constructions de BAP1 ou ASXL2 ont été ensemencés dans des plaques et cultivés pendant 10 jours. Les colonies survivantes ont été lavées avec du PBS et fixées avec 3 % de paraformaldéhyde pendant 20 min. Les cellules ont ensuite été lavées une fois avec du PBS et colorées avec 0.2 % de cristal violet pendant 10 minutes. Après plusieurs lavages à l'eau les plaques ont été scannées et digitalisées.

Immunofluorescence

Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées en utilisant les anticorps indiqués dans les figures. Les cellules ont été fixées 20 minutes avec du PBS à 3 % de paraformaldéhyde et perméabilisées à l'aide de PBS à 0,5% NP-40. Après une saturation des sites non-spécifiques avec 10 % de FBS dans du PBS contenant 0,1 % de NP-40, les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-Myc, anti-Flag ou anti-H2AK119ub, pendant trois heures.

Alexa Fluor® 594 anti-souris, Alexa Fluor® 488 anti-souris, Alexa Fluor® 488 anti-lapin ou Alexa Fluor® 594 anti-lapin (Life Technologies) ont été utilisés comme anticorps secondaires conjugués au colorant fluorescent. Les noyaux ont été colorés avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les images ont été obtenues à l'aide du microscope OLYMPUS BX53 UHGLGPS, de la caméra monochrome numérique XM10 et de l'objectif UPlan SApo 60 X / 1,35 Oil. Les images ont été traitées par la suite en utilisant le programme WCIF-ImageJ (NIH).

Synchronisation et analyse du cycle cellulaire par FACS

Les cellules U2OS ont été synchronisées en utilisant: (i) la méthode de double blocage à la thymidine afin de bloquer les cellules entre la phase G1 et la phase S (Blocage G1/S) ou (ii) le nocodazole afin de bloquer les cellules en phase M et prévenir la réentrée dans le cycle cellulaire. Par la suite, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (FACS). Brièvement, les cellules ont été collectées par trypsinisation puis fixées avec 70 % d'éthanol. Après un lavage au PBS, les cellules ont été traitées avec 100 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) pendant 30 min à 37 °C. Les cellules ont été ensuite marquées par 50 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich) et analysées par les machines FACScan ou FACScalibur et les données ont été traitées par le logiciel CellQUEST PRO (Becton Dickinson).

Déplétion par CRISPR-Cas9 gRNA knockout

Le vecteur pLentiCRISPR-V2 contenant des gRNAs de UBE2E1, UBE2E2 ou UBE2E3 a été utilisé pour générer des cellules déficientes comme décrit précédemment avec des

modifications mineures par Sanjana NE et al.,¹¹². Brièvement, des oligos de 21 pb correspondants aux gRNAs, ont été synthétisés (Life Technologies) avec des extrémités appropriées et clonés dans le plasmide pLentiCRISPR-V2. Les clones positifs ont été vérifiés par séquençage et les vecteurs pLentiCRISPR-V2 positifs ont été utilisés pour générer des particules lentivirales dans les cellules HEK293T par transfection avec des vecteurs PAX2 et pMD2-G. Les milieux de culture contenant les particules lentivirales ont ensuite été utilisés pour infecter des cellules au moins deux fois avec un écart de 24 heures, avant de traiter les cellules à la puromycine pour une sélection de 48 heures. L'efficacité d'ablation des gènes a été évaluée par immunobuvardage avant de performer les essais de CFA et de FACS.

*Conclusion
et perspectives*

VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

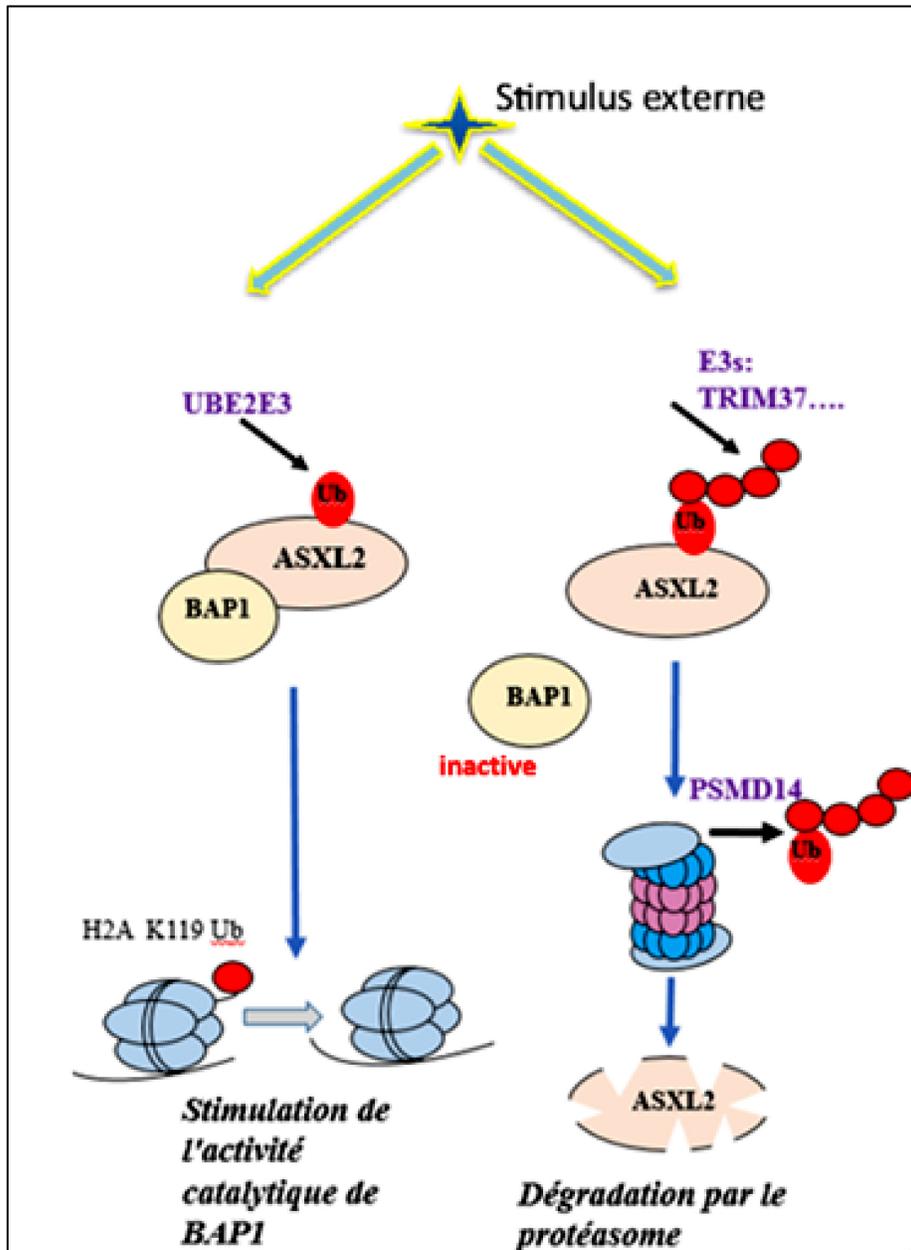


Figure 18 : Schéma représentatif du nouveau mécanisme de régulation proposé du complexe BAP1/ASXL2 par ubiquitination.

L'ubiquitination des protéines est étroitement régulée par l'action concertée des E3 ligases et des déubiquitinases assurant ainsi l'initiation, la propagation ou la terminaison des événements de signalisation cellulaire.

Le suppresseur de tumeurs et la déubiquitinase BAP1 régulent les processus associés à la chromatine et sont fréquemment mutés dans différentes tumeurs malignes. BAP1 accomplit sa fonction via son interaction avec plusieurs partenaires impliqués dans les processus associés à l'ADN. En particulier, BAP1 assemble des complexes stables avec les régulateurs transcriptionnels ASXLs. En effet, cette interaction est hautement conservée étant l'orthologue de BAP1 chez la drosophile, Calypso, interagit avec l'orthologue des ASXLs, ASX. Des travaux antérieurs ont démontré qu'ASX ou les ASXLs stimulent l'activité DUB de Calypso et BAP1 respectivement. Cependant, le mécanisme exact par lequel l'activité DUB de BAP1 est régulée par ces cofacteurs reste peu connu. Dans notre travail, nous avons élucidé un nouveau mécanisme de régulation qui consiste en l'association de BAP1 à ASXL2 favorisant la monoubiquitination de cette dernière sur le domaine d'interaction entre ces deux protéines nommé ASXM2. En effet, il est connu que la fixation de l'ubiquitine sur un substrat peut influencer sa stabilité et sa fonction. Fait intéressant, nous avons trouvé que l'ubiquitination d'ASXL2 sur la lysine 370 favorise sa stabilité, mais peut aussi induire sa dégradation protéasomale.

Nous avons montré que la monoubiquitination d'ASXL2 est directement catalysée par la famille d'enzymes de conjugaison d'ubiquitine (E2) UBE2E ayant une activité E3 ligase, et reversée par la déubiquitinase protéasomale PSMD14. Sur le plan fonctionnel, on a montré que la monoubiquitination d'ASXL2 stimule l'activité DUB de son partenaire, BAP1, et est nécessaire pour la prolifération des cellules de mammifères.

Le modèle que l'on propose est résumé dans la figure 18. En réponse à des stimuli externes de voies de signalisations inconnus pour le moment, BAP1 s'associe à son cofacteur ASXL2. Cette association stimule une enzyme conjugatrice E2 possédant une activité E3 ligase, nommée UBE2E3, pour catalyser directement, sans avoir besoin d'une ligase, la monoubiquitination d'ASXL2 sur la lysine K370. Cette monoubiquitination promouvoit l'activité catalytique de BAP1 envers H2AK119ub afin de réguler les gènes cibles du complexe BAP1 et coordonner sa fonction suppressive de tumeurs. En effet, il a été montré que BAP1 déubiquitine H2AK119ub trouvée dans les promoteurs des gènes de prolifération, ce qui permet

l'activation de leur expression ⁶⁵. On peut donc comprendre pourquoi la monoubiquitination d'ASXL2 associée à BAP1 est importante pour la prolifération cellulaire. Selon notre modèle, un moyen qui peut prévenir une débubiquitination excessive de H2AK119ub par BAP1 est de stimuler la dégradation de son cofacteur ASXL2 via la polyubiquitination de la même lysine 370 de ce dernier. Cependant, il est connu que la famille d'enzymes UBE2E catalyse seulement la monoubiquitination et limite la formation de chaînes d'ubiquitines. Mais, elles sont également connues pour s'associer à un large éventail de ligases (E3) typiques pour favoriser l'extension de la chaîne d'ubiquitine ¹¹³. Selon un criblage préliminaire avec des ARN interférents (résultats non montrés), on a identifié quelques E3 ligases candidates telle que TRIM37 qui pourra probablement intervenir dans le contexte de dégradation d'ASXL2 pour inhiber la fonction catalytique de BAP1.

Il sera donc très pertinent de caractériser davantage les enzymes pouvant promouvoir la dégradation ou la stabilisation d'ASXL2 afin de moduler la fonction de BAP1. Cela permettra d'établir les cascades de signalisation régulant l'activité catalytique de ce suppresseur de tumeurs majeur. De plus, une autre perspective de recherche sera de déterminer comment le complexe ASXL2/BAP1 agit en concert avec les autres composantes du complexe en particulier les facteurs de transcription pouvant assurer le recrutement de cette DUB au niveau des régions régulatrices pour moduler l'expression génique.

Références

VII- RÉFÉRENCES

- 1 Yang, X. J. Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* **24**, 1653-1662 (2005).
- 2 Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* **67**, 425-479, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425 (1998).
- 3 Schwartz, A. L. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annual review of medicine* **50**, 57-74, doi:10.1146/annurev.med.50.1.57 (1999).
- 4 Hershko, A. Early work on the ubiquitin proteasome system, an interview with Avram Hershko. Interview by CDD. *Cell death and differentiation* **12**, 1158-1161, doi:10.1038/sj.cdd.4401709 (2005).
- 5 Muller, J. & Eilers, M. Ubiquitination of Myc: proteasomal degradation and beyond. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 99-113 (2008).
- 6 Sugaya, K., Ishihara, Y., Inoue, S. & Tsuji, H. Characterization of ubiquitin-activating enzyme Uba1 in the nucleus by its mammalian temperature-sensitive mutant. *PloS one* **9**, e96666, doi:10.1371/journal.pone.0096666 (2014).
- 7 Schulman, B. A. & Harper, J. W. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 319-331, doi:10.1038/nrm2673 (2009).
- 8 Pickart, C. M. & Eddins, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**, 55-72 (2004).
- 9 Schumacher, F. R., Wilson, G. & Day, C. L. The N-terminal extension of UBE2E ubiquitin-conjugating enzymes limits chain assembly. *Journal of molecular biology* **425**, 4099-4111, doi:10.1016/j.jmb.2013.06.039 (2013).
- 10 Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505 (1993).
- 11 Hicke, L. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends in cell biology* **9**, 107-112 (1999).
- 12 Beaudenon, S. L., Huacani, M. R., Wang, G., McDonnell, D. P. & Huibregtse, J. M. Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**, 6972-6979 (1999).
- 13 McClellan, A. J., Tam, S., Kaganovich, D. & Frydman, J. Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nature cell biology* **7**, 736-741, doi:10.1038/ncb0805-736 (2005).
- 14 Hoppe, T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends in biochemical sciences* **30**, 183-187, doi:10.1016/j.tibs.2005.02.004 (2005).
- 15 Varadan, R. *et al.* Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *The Journal of biological chemistry* **279**, 7055-7063, doi:10.1074/jbc.M309184200 (2004).
- 16 Haglund, K. & Dikic, I. Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO journal* **24**, 3353-3359 (2005).

- 17 Kaiser, P. & Tagwerker, C. Is this protein ubiquitinated? *Methods in enzymology* **399**, 243-248, doi:10.1016/S0076-6879(05)99016-2 (2005).
- 18 Liu, L. *et al.* CUL4A abrogation augments DNA damage response and protection against skin carcinogenesis. *Molecular cell* **34**, 451-460, doi:10.1016/j.molcel.2009.04.020 (2009).
- 19 Mosesson, Y., Mills, G. B. & Yarden, Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nature reviews. Cancer* **8**, 835-850, doi:10.1038/nrc2521 (2008).
- 20 Chen, X., Hiller, M., Sancak, Y. & Fuller, M. T. Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. *Science* **310**, 869-872, doi:10.1126/science.1118101 (2005).
- 21 Wertz, I. E. & Dixit, V. M. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a003350, doi:10.1101/cshperspect.a003350 (2010).
- 22 Chastagner, P., Israel, A. & Brou, C. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO reports* **7**, 1147-1153, doi:10.1038/sj.embor.7400822 (2006).
- 23 Mevissen, T. E. T. & Komander, D. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annual review of biochemistry* **86**, 159-192, doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044916 (2017).
- 24 Amerik, A. Y. & Hochstrasser, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et biophysica acta* **1695**, 189-207, doi:10.1016/j.bbamcr.2004.10.003 (2004).
- 25 Nijman, S. M. *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**, 773-786 (2005).
- 26 Ambroggio, X. I., Rees, D. C. & Deshaies, R. J. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol* **2**, E2, doi:10.1371/journal.pbio.0020002 (2004).
- 27 Sheng, Y. *et al.* Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nature structural & molecular biology* **13**, 285-291, doi:10.1038/nsmb1067 (2006).
- 28 Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M. & Zhang, R. The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res* **27**, 254-271, doi:10.7555/JBR.27.20130030 (2013).
- 29 Wertz, I. E. *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**, 694-699, doi:10.1038/nature02794 (2004).
- 30 Kee, Y., Lyon, N. & Huibregtse, J. M. The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *The EMBO journal* **24**, 2414-2424, doi:10.1038/sj.emboj.7600710 (2005).
- 31 Chang, H. Y. & Yang, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 821-846 (2000).
- 32 Molland, K., Zhou, Q. & Mesecar, A. D. A 2.2 Å resolution structure of the USP7 catalytic domain in a new space group elaborates upon structural rearrangements resulting from ubiquitin binding. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **70**, 283-287, doi:10.1107/S2053230X14002519 (2014).
- 33 Johnston, S. C., Larsen, C. N., Cook, W. J., Wilkinson, K. D. & Hill, C. P. Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *The EMBO journal* **16**, 3787-3796 (1997).
- 34 Love, K. R., Catic, A., Schlieker, C. & Ploegh, H. L. Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes. *Nature chemical biology* **3**, 697-705, doi:10.1038/nchembio.2007.43 (2007).
- 35 Pathare, G. R. *et al.* Crystal structure of the proteasomal deubiquitylation module Rpn8-Rpn11. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 2984-2989, doi:10.1073/pnas.1400546111 (2014).

- 36 Cohen, M., Stutz, F., Belgareh, N., Haguenaer-Tsapis, R. & Dargemont, C. Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nature cell biology* **5**, 661-667, doi:10.1038/ncb1003 (2003).
- 37 Soncini, C., Berdo, I. & Draetta, G. Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. *Oncogene* **20**, 3869-3879, doi:10.1038/sj.onc.1204553 (2001).
- 38 Komander, D., Clague, M. J. & Urbe, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 550-563 (2009).
- 39 Fraile, J. M., Quesada, V., Rodriguez, D., Freije, J. M. & Lopez-Otin, C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* **31**, 2373-2388, doi:10.1038/onc.2011.443 (2012).
- 40 Wijnhoven, P. *et al.* USP4 Auto-Deubiquitylation Promotes Homologous Recombination. *Molecular cell* **60**, 362-373, doi:10.1016/j.molcel.2015.09.019 (2015).
- 41 Sun, S. C. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell death and differentiation* **17**, 25-34, doi:10.1038/cdd.2009.43 (2010).
- 42 Trompouki, E. *et al.* CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* **424**, 793-796 (2003).
- 43 Schlicher, L. *et al.* SPATA2 promotes CYLD activity and regulates TNF-induced NF-kappaB signaling and cell death. *EMBO reports* **17**, 1485-1497, doi:10.15252/embr.201642592 (2016).
- 44 Nijman, S. M. *et al.* The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell* **17**, 331-339 (2005).
- 45 Satija, Y. K., Bhardwaj, A. & Das, S. A portrayal of E3 ubiquitin ligases and deubiquitylases in cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **133**, 2759-2768, doi:10.1002/ijc.28129 (2013).
- 46 Harris, S. L. & Levine, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899-2908, doi:10.1038/sj.onc.1208615 (2005).
- 47 Wade, M., Li, Y. C. & Wahl, G. M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **13**, 83-96, doi:10.1038/nrc3430 (2013).
- 48 Richardson, P. G. *et al.* A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine* **348**, 2609-2617, doi:10.1056/NEJMoa030288 (2003).
- 49 Richardson, P. G. *et al.* Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine* **352**, 2487-2498, doi:10.1056/NEJMoa043445 (2005).
- 50 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* **22**, 345-358, doi:10.1016/j.ccr.2012.08.007 (2012).
- 51 Mashtalir, N. *et al.* Autodeubiquitination protects the tumor suppressor BAP1 from cytoplasmic sequestration mediated by the atypical ubiquitin ligase UBE2O. *Molecular cell* **54**, 392-406, doi:10.1016/j.molcel.2014.03.002 (2014).
- 52 Jensen, D. E. *et al.* BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* **16**, 1097-1112 (1998).
- 53 Carbone, M. *et al.* BAP1 and cancer. *Nature reviews. Cancer* **13**, 153-159 (2013).
- 54 Ventii, K. H. *et al.* BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer research* **68**, 6953-6962 (2008).
- 55 Martinez, A. *et al.* Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features. *Mol Pathol* **54**, 300-306 (2001).

- 56 Zeiger, M. A., Gnarr, J. R., Zbar, B., Linehan, W. M. & Pass, H. I. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in mesothelioma cell lines and solid tumors. *Genes, chromosomes & cancer* **11**, 15-20 (1994).
- 57 Dey, A. *et al.* Loss of the tumor suppressor BAP1 causes myeloid transformation. *Science* **337**, 1541-1546, doi:science.1221711 [pii] 10.1126/science.1221711 (2012).
- 58 Napolitano, A. *et al.* Minimal asbestos exposure in germline BAP1 heterozygous mice is associated with deregulated inflammatory response and increased risk of mesothelioma. *Oncogene* **35**, 1996-2002, doi:10.1038/onc.2015.243 (2016).
- 59 Machida, Y. J., Machida, Y., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A. & Dutta, A. The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1. *The Journal of biological chemistry* (2009).
- 60 Misaghi, S. *et al.* Association of C-terminal ubiquitin hydrolase BRCA1-associated protein 1 with cell cycle regulator host cell factor 1. *Molecular and cellular biology* **29**, 2181-2192 (2009).
- 61 Nishikawa, H. *et al.* BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer research* **69**, 111-119 (2009).
- 62 Qin, J. *et al.* BAP1 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by deubiquitinating KLF5. *Nature communications* **6**, 8471, doi:10.1038/ncomms9471 (2015).
- 63 Varambally, S. *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624-629, doi:10.1038/nature01075 (2002).
- 64 Ernst, T. *et al.* Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature genetics* **42**, 722-726, doi:10.1038/ng.621 (2010).
- 65 Yu, H. *et al.* The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression. *Mol Cell Biol* **30**, 5071-5085, doi:10.1128/MCB.00396-10 (2010).
- 66 Wysocka, J., Myers, M. P., Laherty, C. D., Eisenman, R. N. & Herr, W. Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes & development* **17**, 896-911 (2003).
- 67 Goto, H. *et al.* A single-point mutation in HCF causes temperature-sensitive cell-cycle arrest and disrupts VP16 function. *Genes & development* **11**, 726-737 (1997).
- 68 Julien, E. & Herr, W. Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *The EMBO journal* **22**, 2360-2369 (2003).
- 69 Luciano, R. L. & Wilson, A. C. HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein Krox20. *The Journal of biological chemistry* **278**, 51116-51124 (2003).
- 70 Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H. & Bonavida, B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* **25**, 1125-1142 (2006).
- 71 Shi, Y., Lee, J. S. & Galvin, K. M. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochimica et biophysica acta* **1332**, F49-66 (1997).
- 72 Okino, Y., Machida, Y., Frankland-Searby, S. & Machida, Y. J. BRCA1-associated protein 1 (BAP1) deubiquitinase antagonizes the ubiquitin-mediated activation of FoxK2 target genes. *The Journal of biological chemistry* **290**, 1580-1591, doi:10.1074/jbc.M114.609834 (2015).
- 73 Kar, A. & Gutierrez-Hartmann, A. Molecular mechanisms of ETS transcription factor-mediated tumorigenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**, 522-543, doi:10.3109/10409238.2013.838202 (2013).

- 74 Meadows, S. M., Myers, C. T. & Krieg, P. A. Regulation of endothelial cell development by ETS transcription factors. *Seminars in cell & developmental biology* **22**, 976-984, doi:10.1016/j.semcd.2011.09.009 (2011).
- 75 Scheuermann, J. C. *et al.* Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* **465**, 243-247 (2010).
- 76 Goldknopf, I. L. & Busch, H. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 864-868 (1977).
- 77 Vissers, J. H., Nicassio, F., van Lohuizen, M., Di Fiore, P. P. & Citterio, E. The many faces of ubiquitinated histone H2A: insights from the DUBs. *Cell division* **3**, 8 (2008).
- 78 Huen, M. S. *et al.* RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* **131**, 901-914 (2007).
- 79 Moore, S. C., Jason, L. & Ausio, J. The elusive structural role of ubiquitinated histones. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **80**, 311-319 (2002).
- 80 Simon, J. A. & Kingston, R. E. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 697-708, doi:10.1038/nrm2763 (2009).
- 81 Zhou, W. *et al.* Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Molecular cell* **29**, 69-80, doi:10.1016/j.molcel.2007.11.002 (2008).
- 82 Fang, J., Chen, T., Chadwick, B., Li, E. & Zhang, Y. Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *The Journal of biological chemistry* **279**, 52812-52815 (2004).
- 83 Wang, H. *et al.* Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-878 (2004).
- 84 Cao, R., Tsukada, Y. & Zhang, Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Molecular cell* **20**, 845-854 (2005).
- 85 Wang, R. *et al.* Structural transitions of the RING1B C-terminal region upon binding the polycomb cbox domain. *Biochemistry* **47**, 8007-8015, doi:10.1021/bi800857f (2008).
- 86 Buchwald, G. *et al.* Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *The EMBO journal* **25**, 2465-2474, doi:10.1038/sj.emboj.7601144 (2006).
- 87 Zhu, P. *et al.* A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Molecular cell* **27**, 609-621 (2007).
- 88 Nicassio, F. *et al.* Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Current biology : CB* **17**, 1972-1977 (2007).
- 89 Henry, K. W. *et al.* Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes & development* **17**, 2648-2663 (2003).
- 90 Joo, H. Y. *et al.* Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination. *Nature* **449**, 1068-1072 (2007).
- 91 Mimnaugh, E. G. *et al.* Caspase-dependent deubiquitination of monoubiquitinated nucleosomal histone H2A induced by diverse apoptogenic stimuli. *Cell death and differentiation* **8**, 1182-1196, doi:10.1038/sj.cdd.4400924 (2001).
- 92 Daou, S. *et al.* The BAP1/ASXL2 Histone H2A Deubiquitinase Complex Regulates Cell Proliferation and Is Disrupted in Cancer. *The Journal of biological chemistry* **290**, 28643-28663, doi:10.1074/jbc.M115.661553 (2015).

- 93 Yu, H. *et al.* Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 285-290, doi:10.1073/pnas.1309085110 (2014).
- 94 Pena-Llopis, S. *et al.* BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nature genetics* **44**, 751-759, doi:ng.2323 [pii]
10.1038/ng.2323 (2012).
- 95 Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E. & Burley, S. K. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**, 412-420, doi:10.1038/364412a0 (1993).
- 96 Ji, Z. *et al.* The forkhead transcription factor FOXK2 acts as a chromatin targeting factor for the BAP1-containing histone deubiquitinase complex. *Nucleic acids research* **42**, 6232-6242, doi:10.1093/nar/gku274 (2014).
- 97 Bott, M. *et al.* The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nature genetics* **43**, 668-672, doi:ng.855 [pii]
10.1038/ng.855 (2011).
- 98 Sirbu, B. M. *et al.* Identification of proteins at active, stalled, and collapsed replication forks using isolation of proteins on nascent DNA (iPOND) coupled with mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* **288**, 31458-31467, doi:10.1074/jbc.M113.511337 (2013).
- 99 Chambers, A. L. & Downs, J. A. The RSC and INO80 chromatin-remodeling complexes in DNA double-strand break repair. *Prog Mol Biol Transl Sci* **110**, 229-261, doi:10.1016/B978-0-12-387665-2.00009-2 (2012).
- 100 Falbo, K. B. & Shen, X. Function of the INO80 chromatin remodeling complex in DNA replication. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 970-975 (2012).
- 101 Gerhold, C. B. & Gasser, S. M. INO80 and SWR complexes: relating structure to function in chromatin remodeling. *Trends in cell biology*, doi:10.1016/j.tcb.2014.06.004 (2014).
- 102 Lee, H. S., Lee, S. A., Hur, S. K., Seo, J. W. & Kwon, J. Stabilization and targeting of INO80 to replication forks by BAP1 during normal DNA synthesis. *Nature communications* **5**, 5128, doi:10.1038/ncomms6128 (2014).
- 103 Zarrizi, R., Menard, J. A., Belting, M. & Massoumi, R. Deubiquitination of gamma-tubulin by BAP1 prevents chromosome instability in breast cancer cells. *Cancer research* **74**, 6499-6508, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0221 (2014).
- 104 Bononi, A. *et al.* BAP1 regulates IP3R3-mediated Ca²⁺ flux to mitochondria suppressing cell transformation. *Nature* **546**, 549-553, doi:10.1038/nature22798 (2017).
- 105 Inoue, D., Nishimura, K., Kozuka-Hata, H., Oyama, M. & Kitamura, T. The stability of epigenetic factor ASXL1 is regulated through ubiquitination and USP7-mediated deubiquitination. *Leukemia* **29**, 2257-2260, doi:10.1038/leu.2015.90 (2015).
- 106 Mertins, P. *et al.* Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nat Methods* **10**, 634-637, doi:10.1038/nmeth.2518 (2013).
- 107 Sun, L. & Fang, J. E3-Independent Constitutive Monoubiquitination Complements Histone Methyltransferase Activity of SETDB1. *Molecular cell* **62**, 958-966, doi:10.1016/j.molcel.2016.04.022 (2016).
- 108 Park, U. H. *et al.* ASXL2 promotes proliferation of breast cancer cells by linking ERalpha to histone methylation. *Oncogene* **35**, 3742-3752, doi:10.1038/onc.2015.443 (2016).
- 109 Baughman, J. M. *et al.* NeuCode Proteomics Reveals Bap1 Regulation of Metabolism. *Cell reports* **16**, 583-595, doi:10.1016/j.celrep.2016.05.096 (2016).

- 110 Blanchet, E. *et al.* E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nature cell biology* **13**, 1146-1152, doi:10.1038/ncb2309 (2011).
- 111 Katoh, M. Functional proteomics of the epigenetic regulators ASXL1, ASXL2 and ASXL3: a convergence of proteomics and epigenetics for translational medicine. *Expert Rev Proteomics* **12**, 317-328, doi:10.1586/14789450.2015.1033409 (2015).
- 112 Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* **11**, 783-784, doi:10.1038/nmeth.3047 (2014).
- 113 Stewart, M. D., Ritterhoff, T., Klevit, R. E. & Brzovic, P. S. E2 enzymes: more than just middle men. *Cell research* **26**, 423-440, doi:10.1038/cr.2016.35 (2016).