

Université de Montréal

**Séquestration nucléolaire des histones durant le traitement anticancer à l'inhibition
du protéasome : un mécanisme inédit de régulation post-traductionnelle,
possiblement à l'origine de la mort cellulaire.**

par

Achraf Boutayeb

Département de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise (M.Sc) en biologie moléculaire

Janvier 2019

© Achraf Boutayeb, 2019

RÉSUMÉ

En dégradant la majorité des protéines cellulaires, le protéasome se positionne comme un régulateur clé du protéome, vis-à-vis duquel la plupart des tumeurs présentent une forte addiction en raison du déséquilibre protéique qui les caractérise. Quoique son inhibition se soit avérée être une bonne stratégie anticancer, elle est demeurée limitée aux cancers sanguins. Malheureusement, leur traitement devient tôt ou tard compromis par la résistance cellulaire. Raison pour laquelle l'élucidation du mécanisme de mort en jeu pourrait permettre de mieux cerner cette résistance, ce qui constituerait les fondements pour un traitement plus efficace.

L'un des événements les plus spectaculaires et les plus précoces à se manifester dans le cadre de ce traitement, est la déubiquitination massive de l'histone H2A sur la lysine (K) 119. Une corrélation positive plutôt paradoxale entre cet événement, qui est associé à l'expression génique, et la sensibilité cellulaire à l'inhibition du protéasome, a été remarquée. Cela a mené à s'intéresser à sa signification biologique.

Des cellules cancéreuses et primaires ont servi de systèmes d'étude protéomique par immunobuvardage et par immunofluorescence, pour analyser l'état de la chromatine et la distribution spatio-temporelle des histones durant l'inhibition du protéasome. Des inhibiteurs chimiques, des ARN interférents et des vecteurs d'expression ont été utilisés à cette fin.

Un impressionnant phénomène survenant à la suite de l'inhibition du protéasome a été révélé. En effet, une baisse drastique du niveau d'histones sur la chromatine s'opère simultanément à la déubiquitination de H2A-ub (K119). Le protéasome étant inhibé, celles-ci, et possiblement les histones synthétisées en phase S, subiraient une translocation irréversible dans les nucléoles, et ce avant le déclenchement de l'apoptose. Ce phénomène est reproduit par divers inhibiteurs du protéasome et par siRNA, et il survient autant dans des cellules cancéreuses que primaires, mais pas dans les cellules résistantes, qui ne démontrent d'ailleurs pas de déubiquitination de H2A-ub (K119). Par ailleurs, il a été montré que la surexpression d'histones exogènes mène à leur translocation nucléolaire, et que la combinaison de l'inhibition du protéasome à cette surexpression pourrait être létale.

Quoique majoritairement préliminaires, les résultats révéleraient un surprenant mécanisme de régulation post-traductionnelle des histones endogènes, qui seraient séquestrées dans les nucléoles lorsqu'elles ne sont pas incorporées à la chromatine. En effet, l'inhibition du protéasome occasionne une importante perturbation de la chromatine pendant plusieurs heures. En raison de la cytotoxicité intrinsèque des histones libres et de leur abondance dans les cellules, celles-ci pourraient bien être à l'origine de la mort induite par l'inhibition du protéasome. Enfin, en sa qualité de senseur majeur de stress, le nucléole pourrait bien être le point de départ de la signalisation menant à la mort.

Mots clés : Protéasome, Cancer, Résistance, Biomarqueur, Déubiquitination, H2A-ub (K119), Histones, Nucléoles, Apoptose.

ABSTRACT

By degrading most of cellular proteins, the proteasome is positioned as a key regulator of the proteome, against which most tumors have a strong addiction, due to the protein imbalance that characterizes them. Although its inhibition has been shown to be a good anticancer strategy, it is still limited to blood cancers. Unfortunately, their treatment sooner or later becomes compromised by cellular resistance. This is why the elucidation of the mechanism of death involved could allow a better understanding of this resistance, which would in turn constitute the basis for a more effective treatment

One of the most spectacular and early events to manifest during this treatment is the massive deubiquitylation of histone H2A on lysine (K) 119. A rather paradoxical positive correlation between this event, which is associated with gene expression, and cellular sensitivity to proteasome inhibition, has been noticed. This led to an interest in its biological significance.

Cancer and primary cells have been used as systems for proteomic study by immunoblot and immunofluorescence, to analyze chromatin status and the spatio-temporal distribution of histones during proteasome inhibition. Chemical inhibitors, interfering RNAs and expression vectors have been used for this purpose.

An impressive phenomenon occurring during the proteasome inhibition has been revealed. Indeed, a drastic drop in histones level on chromatin occurs simultaneously with the deubiquitylation of H2A-ub (K119). The proteasome being inhibited, these, and possibly histones synthesized in S phase, would undergo an irreversible translocation in the nucleoli before the onset of apoptosis. This phenomenon is replicated by various proteasome inhibitors and siRNA, and occurs in both cancer and primary cells, but not in resistant cells, which do not demonstrate deubiquitination of H2A-ub (K119). Furthermore, overexpression of exogenous histones has been shown to lead to their nucleolar translocation, and it is thought that the combination of proteasome inhibition with this overexpression could be lethal.

Although mostly preliminary, the results would reveal a surprising mechanism of post-translational regulation of endogenous histones, which would be sequestered in nucleoli when not incorporated into chromatin. Indeed, inhibition of the proteasome causes a significant disruption of the chromatin for several hours. Due to the intrinsic cytotoxicity of free histones and to their great cellular abundance, these may well be the cause of the death induced by proteasome inhibition. Finally, as a major stress sensor, the nucleolus could be the starting point of the death signaling.

Key words: Proteasome, Cancer, Resistance, Biomarker, Deubiquitylation, H2A-ub (K119), Histones, Nucleoli, Apoptosis.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SIGLES & ABBRÉVIATIONS.....	x
REMERCIEMENTS.....	xiii
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1.1. Protéome	
1.2. Régulation du protéome	
1.3. La signalisation médiée par l'ubiquitine	
1.4. Le protéasome	
1.5. L'ubiquitination	
1.6. Déubiquitination	
1.7. UPS et cancer	
1.8. Inhibition du protéasome	
1.9. Chromatine et histones	
1.10. Ubiquitination de l'histone H2A (K119)	
1.11. Chaperonnes et protéines de choc thermique (HSPs)	
1.12. Nucléoles	
2. HYPOTHÈSE & OBJECTIF.....	16
3. MATÉRIEL & MÉTHODES.....	18
3.1. Culture cellulaire	
3.2. Transfection transitoire	
3.3. Lyse cellulaire	
3.4. Immunodétection	
3.5. Immunofluorescence	
3.6. Test de prolifération au BrdU	
3.7. Extraction de chromatine	
3.8. Test de prolifération MTT	
3.9. Cytométrie en flux.	

- 3. 10. Extraction au tampon CSK
- 3. 11. Isolation des nucléoles
- 4. RÉSULTATS.....24**
 - 4.1. La déubiquitination de H2A-ub (K119) durant l'inhibition du protéasome : un bien pour un mal?
 - 4.2. Bien plus qu'une déubiquitination : libération massive d'histones de la chromatine durant l'inhibition du protéasome.
 - 4.3. Amasement d'histones hors de la chromatine durant l'inhibition du protéasome : phénomène reproductible dans les cellules humaines?
 - 4.4. Libres mais séquestrées : les histones seraient en réalité irréversiblement accumulées dans les nucléoles avant le déclenchement de l'apoptose.
 - 4.5. La translocation nucléolaire d'histones non-chromatiniennes : un mécanisme de régulation post-traductionnel?
 - 4.6. Néosynthèse des histones de phase S : la goutte qui fait déborder le nucléoplasme?
 - 4.7. Supplément d'acides aminés ou d'ubiquitine libre : des recettes pour éviter l'apparition des amas d'histones.
 - 4.8. Trop peu, trop tard : la cellule se débarrasserait enfin des amas d'histones, mais la mort serait déjà en cours.
- 5. DISCUSSION.....45**
 - 5.1. Retour sur la libération chromatinienne, la séquestration nucléolaire, puis le débarras des histones.
 - 5.2. La déubiquitination de H2A-ub (K119) n'est pas exclusive à l'inhibition du protéasome.

- 5.3. Transcrire à grande échelle pour rétablir l'homéostasie cellulaire, mais à quel prix?
 - 5.4. Histones et ADN : découplés malgré eux.
 - 5.5. Nouvelles histones et nouvel ADN : couplage impossible.
 - 5.6. Histones dénudées et abandonnées dans le nucléoplasme : était-ce un bon choix de se relocaliser au sein d'un senseur de stress majeur?
 - 5.7. Intoxication aux histones?
 - 5.8. La translocation nucléolaire : un mécanisme de protection contre le surplus d'histones?
 - 5.9. La dégradation des histones : une exclusivité du protéasome?
 - 5.10. Mieux comprendre la régulation de l'ubiquitination dégradative des histones.
 - 5.11. Fragmentation des amas d'histones : vers une expulsion du noyau ?
 - 5.12. Cellules cancéreuses vs cellules primaires
 - 5.13. Inhiber la sous-unité catalytique du protéasome ou les DUBs de la sous-unité régulatrice?
 - 5.14. Modèle
- 6. CONCLUSION & PERSPECTIVES.....65**
- 7. FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....69**
- 8. BIBLIOGRAPHIE.....74**

LISTE DES FIGURES

1. REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1. Diversité du protéome humain.

Figure 2. Régulation de l'homéostasie protéique.

Figure 3. Principaux types d'ubiquitination.

Figure 4. Protéasome 26S.

Figure 5. Réactions d'ubiquitination

Figure 6. Les 7 familles de déubiquitinases.

Figure 8. Modifications post-traductionnelles subies par les histones.

Figure 9. Nucléole.

Figure 10. Le nucléole est un senseur de stress majeur.

4. RÉSULTATS

Figure 11. L'inhibition du protéasome par le Bortézomib (Btz) cause la déubiquitination massive de l'histone H2A sur la lysine 119.

Figure 12. Le niveau de H2A-ub (K119) pourrait représenter un marqueur de résistance à l'inhibition du protéasome.

Figure 13. La déubiquitination de H2A-ub (K119) dissimulerait un important remodelage de la chromatine.

Figure 14. L'inhibition du protéasome par le Bortézomib cause l'apparition d'amas d'histones dans le noyau.

Figure 15. Les cellules résistantes au Bortézomib (Btz) ne contiennent pas d'amas d'histones dans les noyaux.

Figure 16. L'apparition d'amas d'histones dans le noyau est un phénomène commun aux inhibiteurs du protéasome.

Figure 17. L'apparition d'amas d'histones dans le noyau est reproduite par siRNA d'enzymes protéasomales.

Figure 18. Le phénomène d'accumulation d'histones dans le noyau est reproduit dans des cellules cancéreuses et primaires.

Figure 19. L'apparition des amas d'histones dans le noyau précède l'apoptose et est irréversible.

Figure 20. Les histones sont accumulées dans les nucléoles.

Figure 21. Les histones seraient libres et non pas incorporées à l'ADN ribosomal constituant les nucléoles.

Figure 22. L'excès d'histones exogènes tend à s'accumuler dans les nucléoles et à probablement causer de la léthalité.

Figure 23. Les amas d'histones apparaîtraient en phase S du cycle cellulaire.

Figure 24. L'inhibition de CDK2 empêcherait l'apparition des amas d'histones nucléolaires.

Figure 25. L'inhibition du protéasome semble requise avant la transition G1/S pour que le phénomène se produise.

Figure 26. Le phénomène est amoindri par un apport en acides aminés ou évité par la surexpression d'ubiquitine.

Figure 27. Les amas d'histones dans les nucléoles sont ubiquitinés et éventuellement fragmentés, puis dégradés ou sécrétés.

5. DISCUSSION

Figure 28. Évolution des niveaux de PCNA au cours du cycle cellulaire.

Figure 29. Redistribution des protéines nucléolaires au cours de l'apoptose.

Figure 30. Types de vésicules sécrétoires dans lesquelles sont retrouvées les histones.

Figure 31. Modèle.

6. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Figure 32. Diverses pathologies dans lesquelles sont impliquées les histones.

7. FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

Figure S1. L'inhibition du protéasome cause une baisse des niveaux d'ubiquitine libre.

Figure S2. Les amas d'histones seraient éventuellement ubiquitinés et désintégrés avant ou pendant la mort.

Figure S3. L'inhibition du protéasome cause une perturbation du signal nucléaire de H2B et H4.

Figure S4. L'apparition des amas d'histones nucléolaires se manifeste éventuellement dans la majorité des cellules.

Figure S5. La déplétion de la DUB de la sous-unité régulatrice du protéasome PSMD14, produit des effets plus forts que celle de la protéase de la sous-unité catalytique PSMB5.

Tableau S1. La supplémentation en acides aminés amoindri le phénomène d'accumulation nucléolaire des histones après l'inhibition du protéasome.

Tableau S2. La surexpression de l'histone H2A, ou de l'ubiquitine sauvage ou mutée, affecte à la baisse le phénomène d'accumulation nucléolaire des histones après l'inhibition du protéasome.

LISTE DES SIGLES & ABRÉVIATIONS

aa : Acides aminés

ADN : Acide désoxyribonucléique

APS : Amonium persulfate

ARN : Acide ribonucléique

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

BCA : BiCinchoninic acid Assay

BrdU : Bromodeoxyuridine

BSA : Albumine de sérum bovin

CDK : Kinase dépendante de cycline (Cyclin-dependant kinase)

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

CHX : Cycloheximide

CSK : Tampon de cytosquelette

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

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

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DUB : Deubiquitinase

E1 : Enzyme activatrice de l'ubiquitine

E2 : Enzyme conjugatrice de l'ubiquitine

E3 : Ubiquitine ligase

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

FACS : Tri cellulaire activé par fluorescence (Fluorescence-activated cell sorting)

FBS : Sérum bovin fœtal (Fetal bovine serum)

g : Force gravitationnelle (Gravitational force)

GFP : Protéine fluorescente verte (Green fluorescent protein)

HDAC : Histone Déacétylase

IC50 : Concentration inhibitrice médiane

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

K: Lysine

kDa : Kilodalton

LB : Laemmli Sample Buffer

MAPS : Sécrétion protéique associée au mauvais repliement (Misfolding-associated protein secretion)

MPT : Modification post-traductionnelle

MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

NBS : Sérum de veau nouveau-né (New Born Calf Serum)

NEM : N-Ethylmaleimide

NF-Kb : Nuclear Factor-Kappa B (Facteur de transcription nucléaire kappa-B)

NLS : Signal de localisation nucléaire (Nuclear localization signal)

NLOS : Signal de localisation nucléolaire (Nucleolar localization signal)

NP-40 : Nonidet P-40.

PBS : Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate salin)

PEI : Agent de transfection cellulaire (Polyethylenimine)

PIPES : Acide pipérazine-N,N'-bis (2-éthanesulfonique)

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle

PVDF : PolyVinylidene Fluoride

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS_PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA : Petits ARNs interférents (Small interfering RNA)

TEMED : N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

TSA : Trichostatin A

Ub : Ubiquitine

UPS : Système ubiquitine-protéasome (Ubiquitin proteasome system)

UCH : Hydrolases d'ubiquitine en C-terminal (Ubiquitin C-terminal hydrolase)

USP : Protéases spécifiques à l'ubiquitine (Ubiquitin-Specific Proteases)

WT : Type sauvage (Wild-type)

YY1 : Yin Yang 1

REMERCIEMENTS

Je profite de l'occasion pour remercier tous ceux et celles qui m'ont apporté leur soutien d'une manière ou d'une autre, et ce tout au long de mon cheminement académique et personnel.

Je remercie d'abord mes parents, Rachida M'Faddel et Mohamed Boutayeb pour leur valeureuse contribution à mon développement et à mon épanouissement. Ce sont eux qui m'ont inculqué, entre autres, la grande estime des études et du savoir, et qui m'ont transmis la passion de la littérature et des sciences, respectivement.

Je remercie donc mon frère Faysal et ma sœur Wissal pour toutes les belles années passées ensemble et pour leur soutien et conseils de qualité!

Je remercie ma merveilleuse épouse Anjeza Basha pour ne pas m'avoir poursuivi en justice durant ma maîtrise! Mais elle m'a toujours soutenu et elle a apprécié ma passion pour la recherche. Je lui suis donc redevable pour ce mémoire.

Je remercie le seul et unique El Bachir Affar, qui a été mon directeur de recherche. C'est un excellent scientifique, un véritable leader et un motivateur hors-pair. J'ai appris énormément en sa compagnie, tant sur le plan scientifique, que relationnel et professionnel. Donc je le remercie de m'avoir permis d'évoluer dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance. Il a également eu un rôle important dans mes demandes de bourses. Bachir adopte une approche très personnalisée avec ses étudiants, à qui il consacre beaucoup de temps dans toutes sortes de contextes. Il m'a par ailleurs permis d'acquérir une expérience enrichissante en termes de leadership, en me permettant de participer à certaines activités qu'il dirige en dehors du laboratoire. Je vous serai toujours reconnaissant pour ce que vous m'avez transmis! Votre rencontre est sans aucun doute un tournant dans mon parcours académique et personnel.

Je remercie le sheikh Haithem Barbour, qui a été mon formateur durant ma maîtrise. C'est un excellent scientifique et un véritable débrouillard pour ceux qui rencontreraient des problèmes techniques au laboratoire! Je le remercie d'avoir consacré une partie de son temps dans le cadre de ma formation et d'avoir enduré mes rafales de questions à des moments pas toujours appropriés.

Je remercie Diana Adjaoud, la littéraire et la personne-ressource du laboratoire. C'était ma voisine pendant ces deux années. Une voisine très sympathique qui m'approvisionnait, à son insu, en stylos et en scotch tape! Je suis désolé Diana pour tous ces stylos chapardés! Diana facilitait considérablement notre travail au laboratoire en nous procurant tout le matériel et les substances (licites) nécessaires à nos expériences.

Je remercie également tous les membres de l'équipe qui ont pu m'assister à un moment ou un autre, que ce soit pour me donner des cellules ou pour répondre à des questions : Nadine

Sen, Oumaima Ahmed, Louis Masclef, Daméhan Tchelougou, Maxime Uriartre et Saad Mengad.

Je remercie le pharaon souriant, Abdel Hamid El Sherbini du laboratoire Drobetsky pour le temps qu'il a consacré pour m'initier à une technique qu'il maîtrise et pour m'assister durant la partie analytique. Abdel Hamid maîtrise l'art du sourire, qu'il distribue à longueur de journée à tous ceux qui osent croiser son regard! C'est la personne la plus souriante que j'ai jamais connue!

Je remercie aussi tous les donateurs m'ayant permis de bénéficier d'une multitude de bourses tout au long de mon parcours universitaire, notamment la Fondation de l'HMR. Je remercie les membres du comité qui ont cru en ma candidature et en mon potentiel, en me décernant la bourse de recrutement de l'HMR. Une bourse très compétitive qui m'a certainement facilité les choses durant ma maîtrise. Merci Bachir pour votre apport à ma candidature!

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. Protéome

Les protéines sont les pierres angulaires de la biochimie cellulaire. En effet, elles orchestrent quasiment toutes les activités de la cellule. Ainsi, leur niveau de production et leur état d'activation doivent être strictement contrôlés afin que l'homéostasie soit maintenue. À cet effet, le protéome représente l'ensemble des protéines présentes dans un type cellulaire à un moment donné, dans un contexte particulier ¹. En effet, tout le génome ne peut pas s'exprimer de façon constitutive dans une cellule, et ce pour plusieurs raisons. Notamment à cause des limitations énergétiques et spatiales des cellules et en raison de la nécessité d'une fine régulation. D'une part, les protéines constituent la classe de macromolécules la plus abondante dans la cellule ¹ et il n'y aurait probablement pas assez d'espace pour toutes les contenir sans arriver à saturation du volume cellulaire. D'autre part, leur biosynthèse constitue la plus grande dépense énergétique de la cellule ². Il ne serait donc pas viable de produire continuellement toutes les protéines encodées par le génome. Mais plus important encore, il serait contre-productif de voir des protéines aux fonctions opposées présentes simultanément, vu qu'elles pourraient contre-carrer leurs effets respectifs. Il est donc évident qu'une très fine régulation des niveaux protéiques et de leur état d'activation est primordiale pour le maintien de cellules saines.

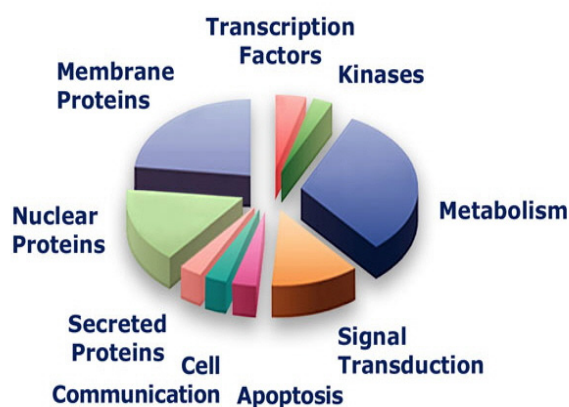


Figure 1. Diversité du protéome humain. La foisonnante diversité structurale et fonctionnelle des protéines humaines est représentée à travers ce schéma illustrant la répartition des familles fonctionnelles majeures ³.

1.2. Régulation du protéome

Cette régulation s'effectue d'abord au niveau épigénétique, en contrôlant l'état de la chromatine et sa propension à subir l'intervention de la machinerie transcriptionnelle. Une intervention qui est elle-même régulée tout comme le métabolisme de l'ARN_m qui sera produit. Sa traduction en protéine le sera également. Puis au niveau post-traductionnel, la régulation se poursuit notamment par des modifications chimiques ou par des clivages, qui affecteront à ce moment la structure protéique, et donc sa fonctionnalité. Une fois que leur fonction est accomplie, que leur durée de vie achevée ou qu'elles sont endommagées, les protéines peuvent être destinées à la dégradation afin de maintenir un certain équilibre protéique ¹, communément appelé protéostasie. Les deux principaux processus de dégradation protéique dans la cellule sont le système ubiquitine-protéasome (UPS) et la protéolyse lysosomale; le protéasome étant responsable de la dégradation de la majorité des protéines ⁴. Ainsi, l'UPS est un important régulateur du protéome cellulaire. En effet, non seulement il contrôle la stabilité protéique, mais il est de plus impliqué dans la signalisation coordonnant plusieurs des processus mentionnés ci-haut, ce qui justifie l'intérêt qui lui est porté en recherche fondamentale et clinique.

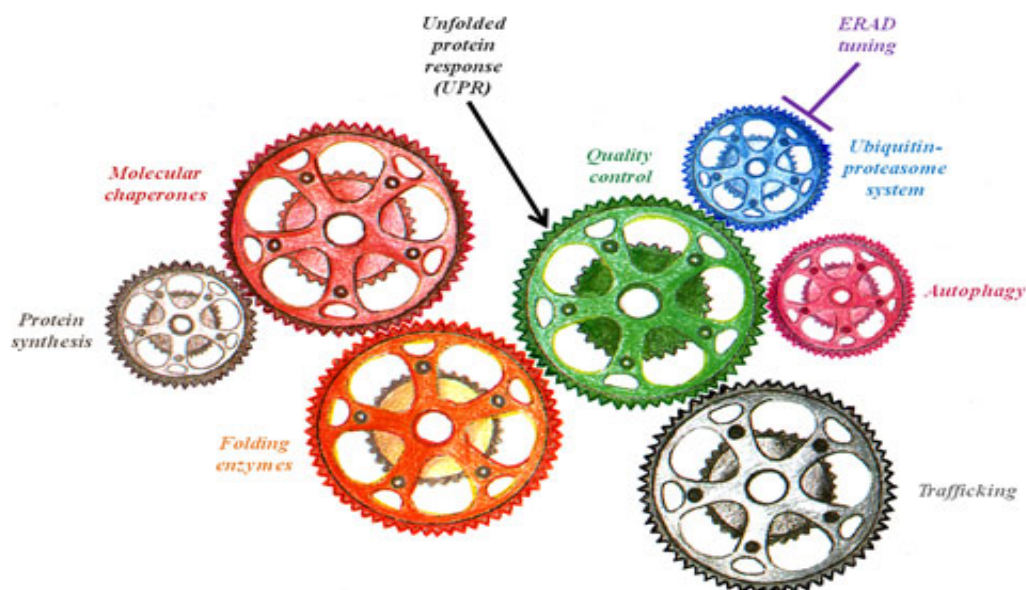


Figure 2. Régulation de l'homéostasie protéique. Représentation sous forme d'engrenage, illustrant l'interconnectivité de certaines composantes régulatrices de la protéostasie ⁵.

1.3. La signalisation médiée par l'ubiquitine

Les interactions protéines-protéines et les interactions protéines-acides nucléiques sont cruciales à l'établissement de la signalisation cellulaire. Ces interactions sont modulées par des modifications chimiques apposées sur les protéines et qui leur confèrent de nouvelles propriétés physico-chimiques. Il s'agit le plus souvent d'ajout de groupements fonctionnels simples; le phosphate, l'acétate et le méthyl en sont de bons exemples. L'ubiquitination elle, consiste en un ajout d'ubiquitine, qui est une petite protéine ubiquitaire de 76 acides aminés, sur une lysine de la protéine cible. Il est à noter que l'ubiquitination est réversible, et que la réaction inverse est catalysée par les déubiquitinases (DUBs). Les protéines peuvent subir une mono-ubiquitination, une multi-mono-ubiquitination (sur différents résidus) ou une poly-ubiquitination (sur le même résidu). En effet, l'ubiquitine est constituée de sept lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) et d'une méthionine en N-terminal, pouvant toutes servir de site d'ubiquitination ⁶. C'est ce qui rend ce mode de signalisation à la fois riche et complexe, d'autant plus que des chaînes composites pouvant impliquer d'autres modifications existent. La SUMO, qui est une petite protéine similaire à l'ubiquitine en est un bon exemple. Ainsi, en fonction du type d'ubiquitination, la protéine cible subira un sort particulier, notamment une activation, un changement de localisation cellulaire, ou bien une dégradation; cette dernière étant probablement la fonction la plus connue de l'UPS ⁷.

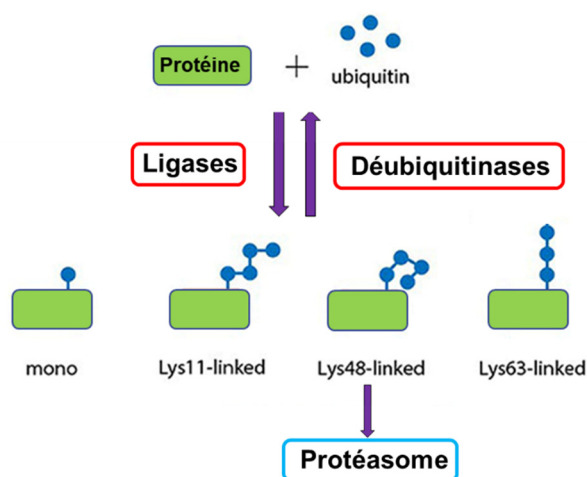


Figure 3. Principaux types d'ubiquitination. Différentes topologies d'ubiquitination auront des effets différents sur les protéines cibles. La formation d'une chaîne d'ubiquitine sur la lysine en position 48 mènera à la dégradation protéasomale ⁸.

1.4. Le protéasome

Le protéasome (26S) est un grand complexe multienzymatique agissant comme un déchiqueteur protéique spécifique et énergivore (ATP dépendant). Il dégrade la majorité des protéines dont la cellule doit se débarrasser, et ce dans un cadre spatio-temporel finement régulé; ce qui en fait un point de contrôle majeur de l'homéostasie cellulaire. Il est composé de deux types de sous-unités. La sous-unité catalytique (20S) est une sorte de canal macromoléculaire abritant des enzymes à activité protéolytique de type caspase, trypsine et chymotrypsine. Quant à la sous-unité régulatrice (19S), elle va couronner la première à l'une ou aux deux extrémités pour en contrôler l'accessibilité. En effet, elle permet d'abord la reconnaissance du motif moléculaire agissant comme signal de dégradation (Ub K48). Ce signal est porté par la protéine cible, et il est généralement composé d'une poly-ubiquitination sur la lysine 48. Le complexe 19S permet ensuite la dégradation de cette chaîne d'ubiquitine grâce aux déubiquitinasés protéasomales qu'il contient, et qui sont PSMD14, UCH37 et USP14. Enfin, la protéine est dénaturée puis transloquée de manière ATP-dépendante dans la sous-unité catalytique pour y être dégradée en petits peptides⁷. Ainsi, les acides aminés seront ultimement remis en circulation pour servir à la néosynthèse protéique et les ubiquitines le seront afin de participer aux différents autres processus qui en dépendent.

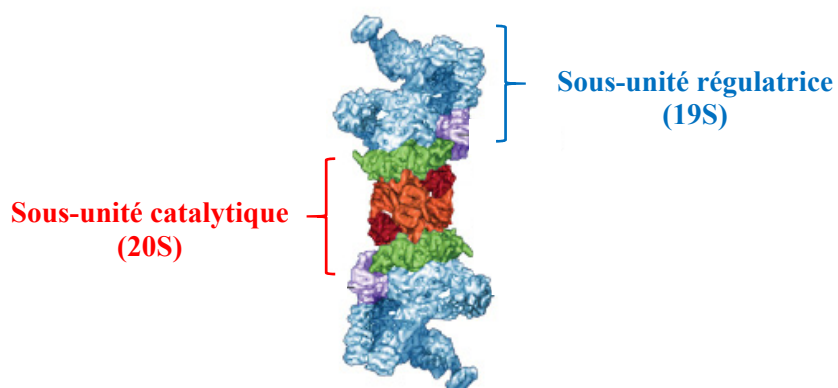


Figure 4. Protéasome 26S. Modèle décrivant la structure du protéasome 26S. Une ou deux sous-unités régulatrices peuvent contrôler l'accès à la « chambre » catalytique⁹.

1.5. L'ubiquitination

L'ubiquitination se fait via une cascade de trois réactions enzymatiques faisant intervenir trois différentes classes d'enzymes, et débutant par l'activation de l'ubiquitine par l'enzyme activatrice E1 de manière ATP dépendante. Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée de la E1 vers l'enzyme de conjugaison E2. Cette dernière transfère l'ubiquitine sur l'enzyme E3 ligase, à laquelle il revient de cibler de façon sélective la protéine substrat à laquelle sera liée l'ubiquitine de manière covalente. Le génome humain code pour 2 E1, 40 E2, plus de 600 E3 et près de 100 DUBs ¹⁰. La signalisation de l'ubiquitine est régulée à plusieurs points, et la déubiquitination en est un de majeur; celle-ci représente d'ailleurs une potentielle cible thérapeutique ⁷.

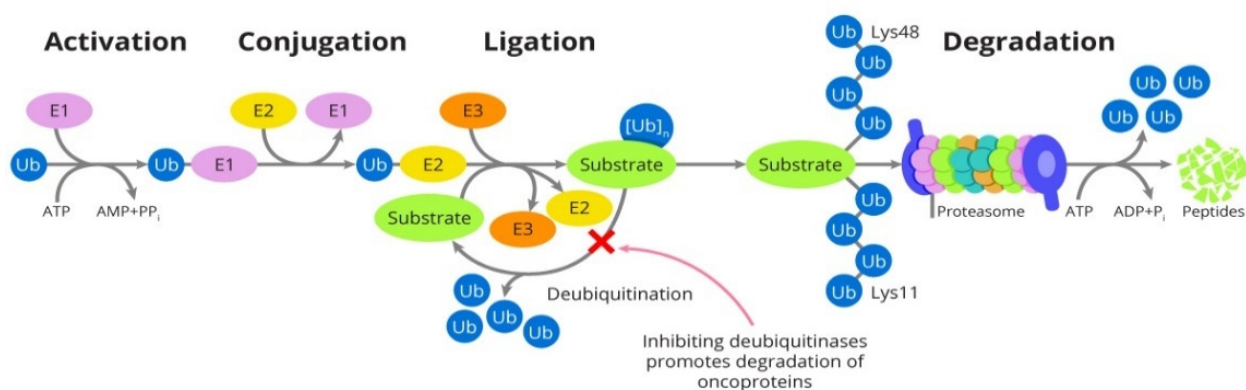


Figure 5. Réactions d'ubiquitination. L'ubiquitination consiste en un transfert coordonné de l'ubiquitine à la protéine cible par l'entremise de trois types de réactions enzymatiques. L'ubiquitine est d'abord activée par l'enzyme E1, puis elle est conjuguée à l'enzyme E2, avant d'être transférée à l'enzyme E3 ligase, qui procédera alors à sa ligation à la protéine cible. Si celle-ci n'est pas déubiquitinée lorsque modifiée sur la lysine 48, elle sera dégradée, libérant ainsi de l'ubiquitine et des peptides ¹¹.

1.6. Déubiquitination

Les déubiquitinases constituent une superfamille de protéases à cystéine et de métalloprotéases regroupées en 7 familles distinctes ⁶. Ces enzymes jouent des rôles divers et multiples en

intervenant dans la régulation d'importants processus cellulaires comme la transcription, la réplication, la réparation de dommage à l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose ¹².

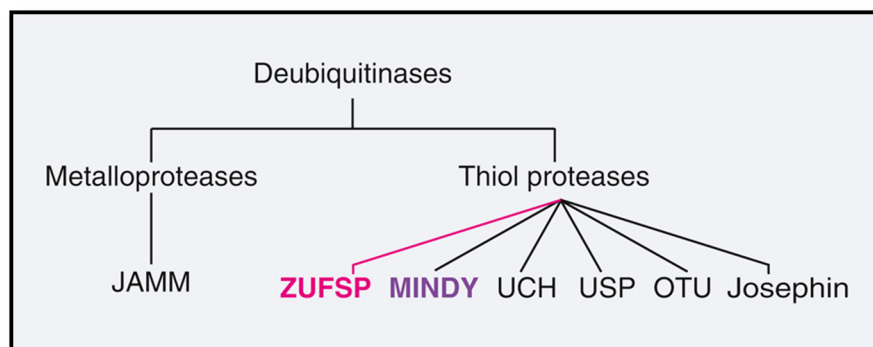


Figure 6. Les 7 familles de déubiquitinases. La spécificité réactionnelle des déubiquitinases permet de les regrouper en deux catégories, soit les métalloprotéases et les protéases à thiol, aussi appelées protéases à cystéine. Les JAMM se distinguent donc des autres familles par leur activité métalloprotéasique ⁶.

Ainsi, elles sont considérées être de bonnes cibles médicamenteuses potentielles, surtout au vu de leur grand nombre et de leur diversité. En effet, plusieurs inhibiteurs de DUBs sont actuellement en développement pré-clinique ¹³. Les travaux sur ces inhibiteurs sont d'autant plus légitimes que le protéasome, qui est le premier et le principal composant de l'UPS à être ciblé en thérapie du cancer, a démontré de réelles limitations. En effet, l'efficacité de son inhibition est limitée à quelques types de cancers sanguins seulement. Ceux-là même qui démontrent éventuellement une résistance acquise au traitement. De ce fait, les chercheurs se sont penchés sur l'inhibition de régulateurs intervenant en amont de la sous-unité catalytique du protéasome, notamment les E3 ligases et les DUBs. Alors que la majorité des DUBs existe sous forme d'enzymes libres, plusieurs sont incorporées dans des complexes multi-enzymatiques comme le protéasome ¹³, dont la sous-unité 19S en contient trois. D'ailleurs, un grand intérêt a été accordé aux constituants de cette sous-unité, tels que les ATPase Rpt, responsables du dépliement et de la translocation des protéines vers la sous-unité catalytique, le récepteur à ubiquitine Rpn13, ainsi que les DUBs y étant associées ¹⁴. Parmi ces dernières, PSMD14 est la seule à être essentielle à l'activité du protéasome et à la vie chez la levure. Ceci dénote donc son importance cruciale dans la régulation de la protéostasie, et dans la signalisation médiée par

l'ubiquitine globalement, ce qui en fait donc une cible protéasomale des plus prometteuses¹⁵. Au fait, PSMD14, également connue comme POH1 et Rpn11, fait partie de la famille JAMM.

1.7. UPS et cancer

Sachant que la perturbation des multiples processus dans lesquels intervient l'UPS influe sur le développement de pathologies comme le cancer, il est apparu évident durant les dernières décennies que l'UPS représentait un pan de la signalisation cellulaire qu'il fallait explorer davantage. D'ailleurs, son rôle dans la stabilité des protéines est l'exemple le plus probant de la relation entre l'UPS et la tumorigénèse. D'une part, la dérégulation du protéome est une caractéristique commune dans le développement et la progression de plusieurs types de cancers¹³. En l'occurrence, en raison de mutations, l'expression génique ou la stabilité des protéines peuvent être altérées, ce qui affecte le niveau de ces dernières à la hausse le plus souvent. Ainsi, qu'elles soient de type suppresseur de tumeur ou pro-prolifératif, ces protéines participeront à la perturbation de la signalisation cellulaire. D'autre part, peu importe leur identité, en excès elles tendront à s'agréger vu que la machinerie favorisant leur repliement sera excédée, ce qui mènera à un stress protéotoxique, et activera la réponse de stress du réticulum (UPR)⁷. Ceci mène éventuellement à la mort cellulaire par apoptose⁷. Or, les cellules cancéreuses sont dotées de cette aptitude à contourner ce mécanisme de mort. Elles vont opérer des ajustements de façon à minimiser l'accumulation protéique, notamment en suractivant la voie de dégradation protéasomale¹⁶.

Il est à noter que la dérégulation du système ubiquitine-protéasome lui-même a été reportée dans certains cancers, comme c'est le cas pour plusieurs autres régulateurs cellulaires. Il a également été proposé que plusieurs E3 ligases et DUBs seraient impliquées dans la formation de ces cancers¹³. Ainsi, l'étude de ces enzymes est d'autant plus importante qu'elles ne sont pas encore toutes caractérisées. En effet, les fonctions et les substrats de plusieurs d'entre elles ne sont pas encore connus. Étant donné le large éventail de mécanismes cellulaires régulés par l'ubiquitine, il est plus que jamais évident que le système ubiquitine-protéasome représente un véritable réservoir de cibles médicamenteuses potentielles.

1.8. Inhibition du protéasome

Le myélome multiple (MM) est le deuxième cancer sanguin le plus prévalent aux États-Unis ¹⁷. Il se caractérise par une prolifération clonale de cellules plasmiques différenciées, au sein de la moelle osseuse. Celles-ci vont alors produire et sécréter des immunoglobulines monoclonales non-fonctionnelles, ce qui va considérablement augmenter leur charge protéique ¹⁸. Le MM est d'ailleurs le principal cancer, avec le lymphome à cellules du manteau, pour lequel l'inhibition du protéasome comme traitement anticancer a été validé cliniquement. En effet, le Bortézomib ¹⁹, qui est un dipeptide synthétique agissant comme inhibiteur du protéasome et provoquant la mort préférentielle des cellules cancéreuses, est utilisé en clinique depuis plusieurs années; des inhibiteurs de deuxième génération ont également vu le jour. Or, ce traitement est limité à ces cancers sanguins, et son efficacité est entravée par de la résistance qui se manifeste tôt ou tard chez les patients ¹⁹.

Il est donc d'un très grand intérêt de cerner le mécanisme de mort cellulaire ainsi que le ou les mécanismes de résistance prépondérants. En effet, il n'existe pas réellement de consensus dans la communauté scientifique par rapport à ces mécanismes, vu qu'il n'y a pas eu de démonstrations probantes de leur importance relative. Le rationnel derrière l'utilisation des inhibiteurs du protéasome, était de favoriser l'accumulation de protéines pro-apoptotiques dans la cellule dérégulée, qui autrement contourne le programme la mort par apoptose. Plusieurs théories ont été formulées par la suite quant au mode d'action effectif, notamment la dérégulation de la signalisation NF- κ B, le stress protéotoxique, le stress oxydatif ou le dommage à l'ADN. En somme, aucune des explications proposées n'a été complètement satisfaisante. Ceci s'explique vraisemblablement par l'implication généralisée de l'UPS dans la biologie cellulaire, et donc la difficulté à disséquer des événements isolés ²⁰. Plus récemment, un intéressant mécanisme a été proposé. Celui-ci attribue le déclenchement de la mort cellulaire à l'amenuisement du réservoir d'acides aminés libres ²¹. En effet, il a été démontré que la mort peut être en très grande partie empêchée par un apport en acides aminés. Il est logique que la cessation de dégradation protéique ne permette plus de générer d'acides aminés libres devant servir à la néosynthèse. D'autant plus qu'une réponse convenable au stress imposé à la cellule

passé en partie par le déploiement des protéines nécessaires. Cela dit, il reste à savoir si cette sauvegarde est due en particulier à la synthèse d'une ou de plusieurs protéines qui interviendraient dans la résolution du problème.

L'une des premières réponses cellulaires perceptibles après l'inhibition du protéasome est la déubiquitination massive de H2A-ub (K119). En effet, ce remarquable phénotype observé généralement en moins de 30 min de traitement dans des cellules *in vitro*, est connu depuis plus de 20 ans sans pour autant avoir été caractérisé. Ce phénomène est également observable lorsque l'enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) est mutée, ou en cas de stress comme lors d'un choc thermique. Dans ce dernier cas, l'accumulation de protéines dénaturées tendant à s'agréger, va induire un stress protéotoxique ²².

1.9. Chromatine et histones

L'histone H2A, tout comme les autres histones canoniques, H2B, H3 et H4, sont des protéines structurelles autour desquelles s'enroulent l'ADN dans le noyau cellulaire. Ces protéines occupent une place centrale dans la biologie de la cellule, et sont d'ailleurs extrêmement bien conservées à travers l'évolution ²³. La chromatine, qui est la structure résultant de leur complexation réversible avec l'ADN, permet le compactage et la protection des gènes, ainsi que la régulation de leur accessibilité durant la transcription, la réplication et la réparation de dommages à l'ADN. Les histones sont de petites protéines (11,3–21,5 kDa) très basiques, car riches en arginines et en lysines, ce qui leur confère une grande densité de charges positives, d'où leur affinité pour l'ADN ²³. De ce fait, elles ont une propension à interagir avec ce qui est chargé négativement dans le noyau, en l'occurrence l'ADN et l'ARN, qui sont truffés de groupements phosphate, ainsi que les protéines négativement chargées. Cette réactivité représente un couteau à double tranchant étant donné le risque que les histones s'engagent dans des interactions incontrôlées et indésirables. De plus, elles font partie des protéines les plus abondantes de la cellule eucaryote, et sont probablement les plus représentées des protéines nucléaires ²³. Si jamais toutes ces protéines venaient à se retrouver non complexées dans le

noyau, ça serait très certainement problématique. D'ailleurs la cytotoxicité causée par un excès d'histones dans la cellule est bien documentée ²⁴. Quoique plusieurs mécanismes soient proposés pour expliquer cette toxicité, celui qui stipule qu'elle serait attribuable aux interactions non-spécifiques avec l'ADN et l'ARN semble le plus vraisemblable. In vitro, même un léger excès stœchiométrique d'histones par rapport à l'ADN, est suffisant pour provoquer l'agrégation de la chromatine et le blocage de la transcription ²³. Aussi, un excès d'histones résulte en une moindre viabilité, en une grande perte de chromosomes et en une plus grande sensibilité aux dommages à l'ADN chez la levure ²³. Par ailleurs, toujours chez la levure, la surexpression des histones canoniques accroît de plus de deux fois les niveaux de transcrits de ~240 gènes, ce qui découle vraisemblablement d'interactions indésirables avec l'ADN ²³. À l'opposé, un déficit d'histones est léthal.

Pour toutes ces raisons, les histones sont très finement régulées, que ce soit au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel, ou post-traductionnel. Par exemple, la cellule régule leur déplacement en les faisant escorter par des protéines chaperonnes spécifiques, dédiées à restreindre leurs interactions avec les autres macromolécules. Les chaperonnes d'histones jouent donc un rôle central dans leur transport ainsi que dans leur incorporation et leur désassemblage de la chromatine. Elles vont en fait neutraliser les charges des histones par l'entremise de leurs groupements acides (négatifs), ce qui empêche toute interaction non-spécifique potentiellement délétère ²⁵. Par ailleurs, l'excès d'histones libres est dégradable via l'UPS dans divers contextes, notamment lorsque la chromatine subit un remodelage, ou lorsqu'un découplage se fait entre la synthèse d'ADN et sa complexation avec les histones, comme lors d'un stress répliatif par exemple ²⁶.

La réplication de l'ADN est un processus d'une importance vitale pour toute lignée cellulaire; c'est d'ailleurs à ce moment que l'ADN est le plus vulnérable. Elle se déroule en phase S du cycle cellulaire, et elle est fortement coordonnée à la synthèse d'une quantité phénoménale d'histones devant être incorporées au nouvel ADN synthétisé. Il va sans dire que la régulation de la réplication est extrêmement bien chapeauté afin d'éviter tout défaut et de réparer toute anomalie avant la mitose. D'ailleurs, tout un pan de cette régulation est dédié aux histones, dont les niveaux doivent être suffisants pour permettre la formation de la chromatine, sans pour autant excéder la demande. Une grande partie de la régulation post-traductionnelle des histones

s'effectue par l'entremise des modifications post-traductionnelles (MPT) qu'elles subissent, dont l'ubiquitination.

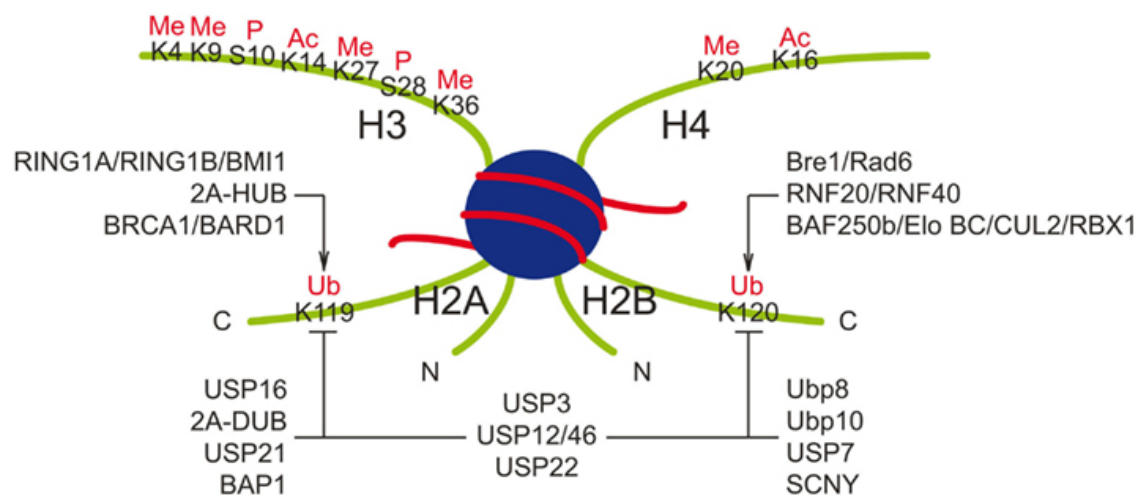


Figure 8. Modifications post-traductionnelles des histones. Une grande diversité de modifications décore et modulent la fonctionnalité des histones. L'ubiquitination de H2A et de H2B est régulée par plusieurs E3 ligases et DUBs comme illustré ²⁷.

1.10. Ubiquitination de l'histone H2A (K119)

Les histones subissent donc diverses modifications post-traductionnelles, les plus notables étant la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Celles-ci modulent les propriétés physico-chimiques des histones, qui participent ainsi à la régulation de la biologie de la chromatine, en servant notamment de plateformes interactives dynamiques, pour les différentes protéines interactrices. Cette régulation renferme donc un grand intérêt pour l'étude, aussi bien de l'état physiologique, que pathologique de la cellule.

L'ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine 119 est la toute première marque d'histone identifiée; c'est en fait la toute première protéine ubiquitinée à être identifiée ²⁸. Elle constitue une marque répressive de l'expression génique, notamment dans le contexte développemental et pendant la réponse aux dommages à l'ADN. Dans le second cas, la transcription serait ainsi empêchée à proximité des bris d'ADN, ce qui accélérerait la réparation ²⁸.

Par ailleurs, l'histone H2A est la protéine mono-ubiquitinée prédominante dans les cellules mammifères. Il est estimé que près de 10% de H2A de la chromatine est constitutivement mono-ubiquitiné durant l'interphase ²². D'où l'hypothèse originale voulant que cet immense réservoir d'ubiquitine soit réquisitionné, par une déubiquitination massive, lorsque les niveaux d'ubiquitine libre diminuent drastiquement dans la cellule suite notamment à l'inhibition du protéasome. En effet, les protéines ubiquitinées ne pouvant plus être dégradées, elles séquestrent bien malgré elles les molécules d'ubiquitine.

1.11. Chaperonnes et protéines de choc thermique (HSPs)

Le réseau de signalisation impliquant les protéines de choc thermique (HSP) et les chaperonnes représente un mécanisme d'adaptation très conservé à travers les espèces; en effet, il existe chez la plupart des procaryotes, des eucaryotes et même de certains virus ²⁹. Ce réseau est dédié à la résolution des problèmes d'agrégation protéique, à la favorisation du repliement protéique, et il participe à l'assemblage et au désassemblage de complexes protéiques, ce qui est plus que jamais important dans le cadre d'un stress protéotoxique.

Parmi les HSPs, Hsp70 en est une de principalement cytosolique et nucléaire ³⁰. Cette protéine est induite au niveau transcriptionnel, notamment pendant la réponse au choc thermique, et après l'inhibition du protéasome. Aussi, Hsp70 est impliquée directement dans le recrutement de substrats en vue de la dégradation protéasomale, de l'autophagie chaperone-dépendante, ainsi que de l'agrégation, qui consiste en la dégradation sélective d'agrégats protéiques par macro-autophagie ³⁰. HSP70 et HSP90 agissent également comme chaperonnes d'histones. Elles sont donc particulièrement sollicitées lors du remodelage de la chromatine associé à la transcription, à la réplication, ou à la réparation de dommage à l'ADN; en effet, une éviction d'histones s'opère alors à grande échelle, ce qui signifie le transport d'anciennes et de nouvelles histones

1.12. Nucléoles

Une portion de la chromatine adopte une organisation unique, au sein du plus grand compartiment nucléaire eucaryote, qu'est le nucléole. Ce sont des structures non-membranaires généralement positionnées vers le centre du noyau et regroupant les gènes ribosomaux. Les nucléoles sont donc les sites de biogenèse des ribosomes, ces complexes ribonucléoprotéiques essentiels à la traduction de l'ARNm en protéines, faisant partie des principaux constituants macromoléculaires de la cellule ³¹. D'ailleurs, les nucléoles sont considérés être les plus grandes usines transcriptionnelles de la cellule. Il est estimé que chez les eucaryotes, près de 50% de l'ARN naissant est synthétisé à partir de l'ADNr ³². Chez E.Coli, l'ARN ribosomal représente près de 85% de l'ARN cellulaire ³¹. Ceci dénote donc un rythme conséquent de production de ribosomes.

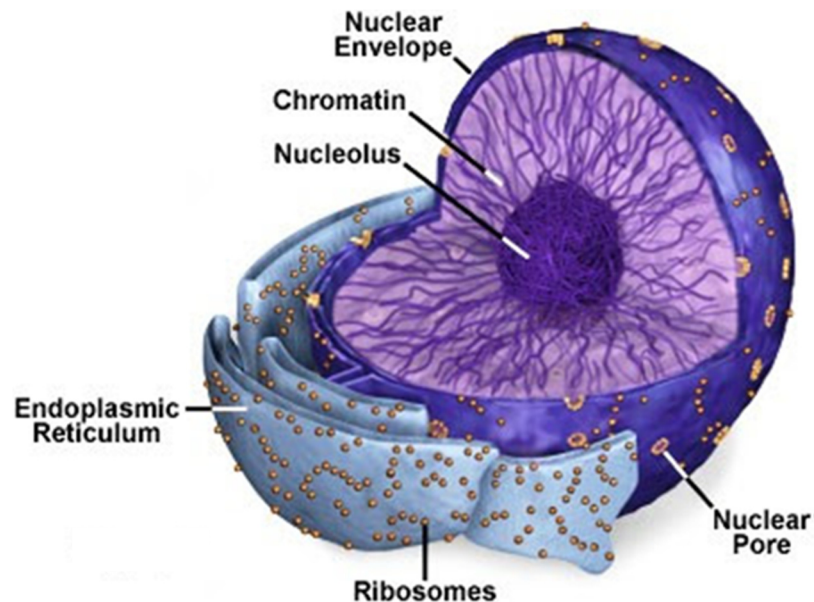


Figure 9. Nucléole. Illustration d'un nucléole au sein du noyau cellulaire ³³.

Par ailleurs, les noyaux de cellules mammifères primaires contiennent généralement un seul nucléole, alors que ceux des cellules cancéreuses tendent à en contenir plusieurs ³². Car le rythme auquel la synthèse protéique s'opère est en partie orchestré par les nucléoles, qui dictent les niveaux de ribosomes. Les cellules en division rapide comme les cellules tumorales

produisent donc beaucoup de ribosomes afin de s'adapter à un rythme frénétique de traduction d'ARNm. Ceci permettra de générer les protéines nécessaires à la croissance et à la division cellulaire. Il est donc compréhensible que ce type de cellules ajuste à la hausse leur nombre de nucléoles³¹. Enfin, il va sans dire que toute perturbation de la prolifération cellulaire va affecter le rythme de transcription de l'ADNr et vice-versa. Cette forte implication dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire explique en partie le rôle de senseur de stress qui a été attribué au nucléole depuis quelques années. Il a été démontré que le nucléole agit comme site de séquestration protéique à la suite de diverses perturbations cellulaires, comme régulateur de voies de surveillance dépendantes et indépendantes de p53 et comme acteur dans la maintenance du génome³⁴.

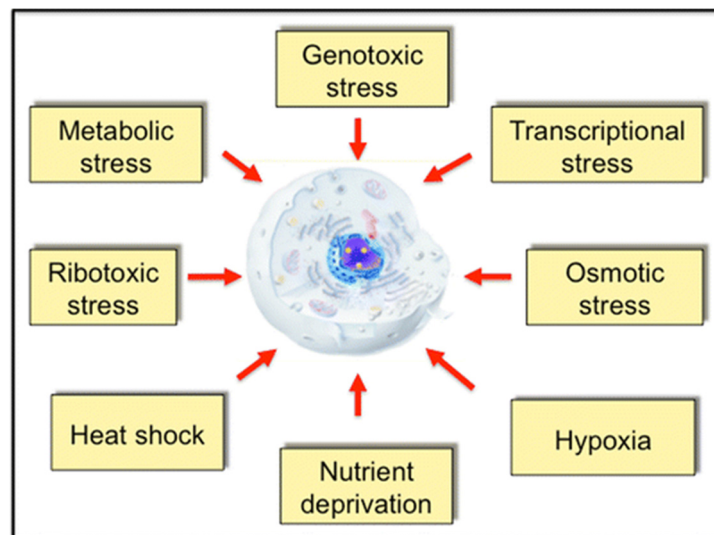


Figure 10. Le nucléole est un senseur de stress majeur. Toutes sortes de stress perçues par la cellule convergent vers le nucléole et sont intégrés au niveau de la transcription de l'ADNr, modulant ainsi la croissance cellulaire³⁵.

2. HYPOTHÈSE & OBJECTIF

Le travail présenté ici est basé sur l'observation que des cellules résistantes au Bortézomib générées au laboratoire, ne démontraient plus de déubiquitination de H2A-ub (K119) à la suite du traitement au Bortézomib. Ainsi, l'hypothèse était qu'une corrélation positive pourrait exister entre le niveau de sensibilité cellulaire à ce traitement, et le niveau de déubiquitination de H2A-ub (K119) survenant à la suite du traitement. L'objectif était donc de proposer H2A-ub (K119) comme biomarqueur de résistance au Bortézomib.

Étant donné la rapidité et l'intensité de la déubiquitination subie par H2A-ub (K119) à la suite de l'inhibition du protéasome, et en raison de son lien à la sensibilité au Bortézomib, il a été jugé pertinent de s'attarder à sa signification biologique. Cela a ainsi mené à décrire un impressionnant phénomène associé à cette déubiquitination, et de le proposer comme étant à l'origine de la mort cellulaire provoquée par l'inhibition du protéasome. Ce phénomène n'a pas encore été reporté dans la littérature, et il recèle peut-être un ou plusieurs mécanismes moléculaires originaux à explorer.

L'objectif de la partie du travail liée à ce phénomène, est de mettre en relief l'importance du protéasome dans la physiologie et dans la pathophysiologie cellulaire. En effet, sa défectuosité est impliquée dans plusieurs dérégulations et son activité est essentielle à la viabilité cellulaire, *a fortiori* celle des cellules cancéreuses. D'ailleurs, la forte perturbation de l'homéostasie cellulaire occasionnée par son inhibition pharmacologique dénote du rôle central qu'il y joue. En effet, parmi les conséquences majeures de son inhibition, on montre un remodelage à grande échelle et visiblement irréversible de la chromatine. Celui-ci cause vraisemblablement l'accumulation d'une importante quantité d'histones libres dans le noyau. Les histones sont parmi les protéines les plus abondantes de la cellule, et probablement les plus dangereuses. En effet, elles sont intrinsèquement toxiques en raison de la très forte densité de charges positives qu'elles représentent. Elles peuvent interagir de façon non-spécifique avec l'ADN et l'ARN, dont l'intégrité structurelle et fonctionnelle est vitale pour la cellule. L'hypothèse est que cette abondance d'histones libres et non-dégradables accumulées dans le noyau à la suite de l'inhibition du protéasome pourrait bien représenter l'élément déclencheur de la mort.

N.B. : *Il est important de noter que la majorité des résultats présentés sont préliminaires.*

3. MATÉRIEL & MÉTHODES

3. 1. Culture cellulaire. Les cellules adhérentes cancéreuses (U2OS et HeLa) et primaires (fibroblastes de type IMR90 et LL) sont maintenues dans un milieu DMEM, tandis que les 12 lignées de mésothélium (**Figure 2**) le sont dans un milieu RPMI, et ce à 37 °C avec 5% de CO₂. Le milieu est supplémenté soit avec 10% de FBS, soit avec 5% de NBS, pénicilline et streptomycine 1% (100 U/ml et 0.1 mg/ml respectivement) et glutamine 1% (584 mg/ml).

3. 2. Transfection transitoire. a) siRNA. Les cellules sontensemencées (pétris de 6 cm) de sorte qu'elles atteignent une confluence de près de 50% le jour de la transfection. Trois mélanges sont préparés : un pour l'agent de transfection (Lipofectamine 2000) (8 µl), un pour le siRNA contrôle (10 µl) et un pour le siRNA cible (10 µl), le tout dans du milieu OptiMEM (200 µl). Pour chaque pètri, la solution de siRNA est mélangée à la solution de lipofectamine (1:1), puis le tout est vortexé rapidement, centrifugé (5 sec) et laissé à incuber (40 min). Le milieu complet dans lequel baignent les cellules est remplacé par du milieu non-complet (2 ml), et le mélange de lipofectamine et de siRNA y est ajouté. Le lendemain matin, ce milieu est remplacé par du milieu complet (5 ml), et le soir, une seconde transfection est réalisée. Trois jours après la première transfection, les cellules sont récoltées tel que décrit en **3. 3. b) Surexpression.** Le plasmide EGFP-C1 contenant la séquence codante pour la protéine Ub-K0G76V ou celle codante pour la protéine Ub WT, ainsi que le plasmide Gateway contenant la séquence codante pour la protéine GFP ou pour la protéine GFP-H2A, ont été transfecté avec de la lipofectamine 2000 (selon le même principe que pour les siRNA) dans des U2OS, et les cellules ont été récolté après 2 jours. **N.B. :** Le ratio ADN : lipofectamine (1 ug : 3 ul) a été utilisé.

3. 3. Lyse cellulaire. Une fois que les cellules ont atteint une confluence de plus du trois quarts de la surface, elles sont récoltées et lysées avec un tampon de lyse (25 mM Tris-HCl 7.5 pH, 1% SDS). Le lysat est ensuite chauffé à 100 °C pendant 5 min et les échantillons sont soniqués. La technique de dosage colorimétrique BCA (BiCinchoninic acid Assay) permet ensuite de quantifier les protéines totales, en utilisant des triplicatas et une courbe standard de BSA (0 à 20) mg/ml en duplicata. Un volume de 200 µl du mélange des solutions A et B (50 : 1), du Pierce™ BCA Protein Assay Kit, est ajouté à 7 µl d'échantillon protéique et la mesure de l'absorbance se fait à 562 nm. Les échantillons sont mélangés avec le tampon de chargement

contenant le B-mercaptoéthanol (1/20). Les échantillons sont chauffés une dernière fois à 100 °C pendant 5 min.

3. 4. Immunodétection. a) Préparation des gels d'acrylamide 10% puis 15%. Gel de séparation (50 ml). 20 ml d'eau, 16.6 ml d'acrylamide 30%, 12.5 ml de 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.5 ml de SDS 10%, 0.5 ml d'APS 10%, 0.02 ml de TEMED. **Gel de concentration (50 ml).** 34 ml d'eau, 8.5 ml d'acrylamide 30%, 6.25 ml de 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.5 ml de SDS 10%, 0.5 ml d'APS 10%, 0.05 ml de TEMED. **b) Migration (SDS-PAGE).** 40 µg de protéine sont déposés dans le gel, qui est placé dans du tampon d'électrophorèse Tris-Glycine-SDS 1X. Le marqueur de poids moléculaire est chargé. La migration des échantillons s'est effectuée à 120 V pendant environ 60 min. **c) Immunobuvardage.** Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF pré-incubée durant 10 sec dans du méthanol 100%. Le montage s'effectue dans le tampon de transfert (200 ml de solution tampon Tris-Glycine 10X sans SDS, 400 ml de méthanol 100%, 10 ml de SDS 10% et 1400 ml d'eau ($V_T = 2$ l)). Le transfert liquide s'effectue à 4 °C pendant 3 h à 0.5 A ou 35 V durant toute la nuit. **d) Traitement de la membrane.** La membrane est alors incubée pendant 1 min dans du rouge Ponceau C (0.5% Ponceau S, 1% acide acétique glacial). Ensuite, la membrane est lavée avec du tampon PBS tween 0.1% (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% Tween 20), puis incubée pendant 1 h dans une solution de lait 5% dans le tampon PBS tween 0.1%. Ensuite des lavages sont faits avec le tampon PBS tween 0.1% (3 x 15 min). Par la suite, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires respectifs (3 h). La membrane est lavée avec du tampon PBS tween 0.1% (3 x 15 min). Elle est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire anti-souris (Peroxidase-AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat) ou anti-lapin (Peroxidase-AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat) (1/1000 à 1/2000) (lait 5% dans du tampon PBS tween 0.1% et l'anticorps secondaire) pendant 1 h. Ensuite, les lavages sont faits avec du tampon PBS tween 0.1% (3 x 15 min). Le signal des bandes est capté à l'aide de l'appareil LAS-3000 LCD couplé au logiciel MultiGauge, après exposition d'une minute dans la solution ECL (Perkin Elmer NEL105001EA).

3. 5. Immunofluorescence. a) Préparation des cellules. Une lamelle par puits est déposée dans une plaque de 6 puits, et de l'éthanol 70% (1 ml) est mis dessus, puis la plaque est séchée sous la hotte. Elle est rincée avec du tampon PBS 1X (2 ml), et les cellules sont mises en culture sur

les lamelles. **b) Fixation et perméabilisation.** Au moment opportun, elles sont lavées avec 2 ml de tampon PBS 1X, incubées dans 1 ml de PFA 3% pendant 20 min, incubées dans 2 ml de tampon de perméabilisation (0.5% NP-40, 1 mM azoture de sodium, PBS 1X) pendant 1 h, lavées avec 2 ml de tampon de lavage (0.1% NP-40, 1 mM azoture de sodium, PBS 1X), puis elles sont enfin incubées dans 2 ml de tampon de blocage (sérum FBS 10%, tampon de lavage) pendant 1 h. **c) Marquage.** S'en suit l'exposition des cellules perméabilisées aux anticorps primaires (1/500 à 1/2000 pour 3 h) puis secondaires (mélangés au DAPI, tous deux à 1/2000 pour 1 h), préparés (50 µl/lamelle) dans le tampon de blocage. Un lavage avec 2 ml de tampon de lavage (3 x 15 min) suit chacune des incubations. **d) Montage.** Les lamelles sont rincées dans de l'eau doublement distillée et délicatement séchées sur du papier. Elles sont ensuite déposées sur 20 µl de Mowiol (Alcool polyvinylique) (Sigma-Aldrich), sur des lames de microscope, puis maintenues à l'abri de la lumière. **e) Visualisation.** Les photos sont capturées par les caméras CCD Olympus SC30 couleur et XM10 monochromes (objectif 63X) d'un microscope Olympus IX73 inversé. Le traitement des photos a été réalisé grâce au logiciel ImageJ.

3. 6. Test de prolifération au BrdU. Les cellules sont exposées à 20 µM de BrdU (Sigma-Aldrich) durant 4 h à 37 °C, puis fixées en vue de l'immunofluorescence. Après un lavage au tampon PBS, un traitement de 20 min au HCl 2 N est réalisé à température ambiante, suivi d'un lavage basique (borax 0.1 M), puis d'un lavage au tampon PBS; le protocole de fluorescence ci-haut est ensuite appliqué en utilisant un anticorps α -BrdU (Invitrogen).

3. 7. Extraction de chromatine. Les cellules sont lysées dans le tampon suivant (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 250 mM sucrose, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X100, inhibiteurs de phosphatases (1 mM sodium orthovanadate (activé), 10 mM β -glycéro-phosphate, 50 mM NaF), inhibiteurs de HDACs (1µM TSA, 10 mM sodium butyrate), inhibiteurs de protéases (α -protéase 1/100, PMSF 1/100)). Un volume de 200 µl sert pour un pétri de U2OS de 10 cm de diamètre. Le lysat est incubé sur glace pour 10 min, puis centrifugé à 2000 g pendant 3 min à 4 °C. Le surnageant est alors mis de côté et le culot est lavé avec le tampon de lyse 2 X (1.5 ml), puis il est resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse, suite à quoi du SDS est ajouté aux deux fractions (1% final). Chacune est alors soniquée sur glace.

3. 8. Test de prolifération MTT. Les cellulesensemencées dans des plaques de 12 puits ont été traitées au Bortézomib pendant 72 h à 37 °C, puis rincées au tampon PBS. Elles ont ensuite été incubées avec 100 µg/ml de MTT pendant 3 h à 37 °C. La solution de MTT a ensuite été enlevé et les cellules ont été lavées avec 1 ml de tampon PBS. Enfin, la coloration produite par le MTT dans les cellules vivantes a été extraite dans 200 µl de DMSO qui ont été transférés dans une plaque de 96 puits pour une mesure spectrophotométrique à 490 nm.

3. 9. Cytométrie en flux. Après un rinçage au tampon PBS, les cellules ont été trypsinisées et récupérées dans un tube de 15 ml puis entreposées à -20 °C. Au moment opportun, elles ont été fixées avec de l'éthanol froid 75%. L'éthanol est ensuite enlevé et les cellules ont été lavées au tampon PBS, puis marquées par 20 µl d'iodure de propidium 50 µg/ml, et analysées par FACScalibur. Les données ont été analysées avec le logiciel CellQUEST PRO (Becton Dickinson).

3. 10. Extraction au tampon CSK. Les cellulesensemencées sur des lamelles dans des plaques de 6 puits ont été rincées au tampon PBS froid, puis incubées à température ambiante pendant 3 min sur glace dans 2 ml de tampon CSK (PIPES 10 mM, NaCl 100 mM, sucrose 300 mM, MgCl₂ 3 mM, Triton X-100 0.7%) après avoir enlevé le tampon PBS. Le tampon est ensuite renouvelé pour une autre incubation de 3 min sur glace, puis enlevé pour un rinçage au tampon PBS froid. Cette opération a été répétée une troisième fois. Les cellules ont ensuite été fixées à température ambiante pour procéder au protocole d'immunofluorescence. À noter que le tampon CSK contenait l'inhibiteur protéasique PMSF 1/100.

3. 11. Isolation des nucléoles. Les cellules U2OS presque confluentes (pétri de 10 cm de diamètre) ont été rincées (30 ml) 2 fois sur glace avec la solution SI (0.5 M sucrose, 3 mM MgCl₂) préalablement refroidie à -20 °C. La solution a ensuite été enlevée, puis le liquide résiduel a servi à récolter les cellules dans un tube de 15 ml. Le volume a été complété à 3 ml avec la solution I et les cellules ont été soniquées à une intensité de 10% pour une durée totale de 5 min, en alternant des périodes de 20 sec de sonication suivies de 20 sec sur la glace. Un volume de 3 ml de la solution II (1.0 M sucrose, 3 mM MgCl₂) a été déposé doucement au fond du tube (sous la solution I contenant les cellules), puis une centrifugation à 1800 g pendant 5

min à 4 °C s'en est suivie. Le surnageant a alors été enlevé doucement puis le culot contenant les nucléoles a été resuspendu dans 3 ml de la solution I pour ensuite répéter la centrifugation après avoir remis 3 ml de la solution II en dessous. À noter que les deux solutions utilisées contenaient les inhibiteurs protéasiques suivants : PMSF 1/100, NEM 1/100, α -protéase 1/500; ce dernier n'a pas été utilisé lors du rinçage initial des cellules.

4. RÉSULTATS

4.1. La déubiquitination de H2A-ub (K119) durant l'inhibition du protéasome : un bien pour un mal?

L'une des premières réponses cellulaires perceptible (par immunobuvardage et par immunofluorescence) (**Figure 11**) après l'inhibition du protéasome, est la déubiquitination massive de H2A-ub (K119), qui est détectable par un anticorps spécifique à cette modification; le niveau total de H2A est invariable. La déubiquitination débute après près de 30 min et se poursuit pour atteindre un niveau maximal près de 6 h après (**Figure 13A**). Cela fait plus de 20 ans que ce phénomène est connu, sans pour autant avoir vraiment été caractérisé. Étant justement intéressés à cette marque d'histone, nous avons jugé intéressant de s'attarder à la signification biologique de cette forte déubiquitination dans le contexte de l'inhibition du protéasome.

Il a été constaté que des cellules U2OS résistantes au Bortézomib ne démontraient pas de déubiquitination de H2A-ub (K119) (**Figure 15B**), ce qui a donné l'idée d'investiguer une potentielle corrélation entre le niveau de sensibilité au Bortézomib et l'intensité de la déubiquitination de H2A-ub (K119) dans diverses lignées cellulaires. Ainsi 12 lignées de

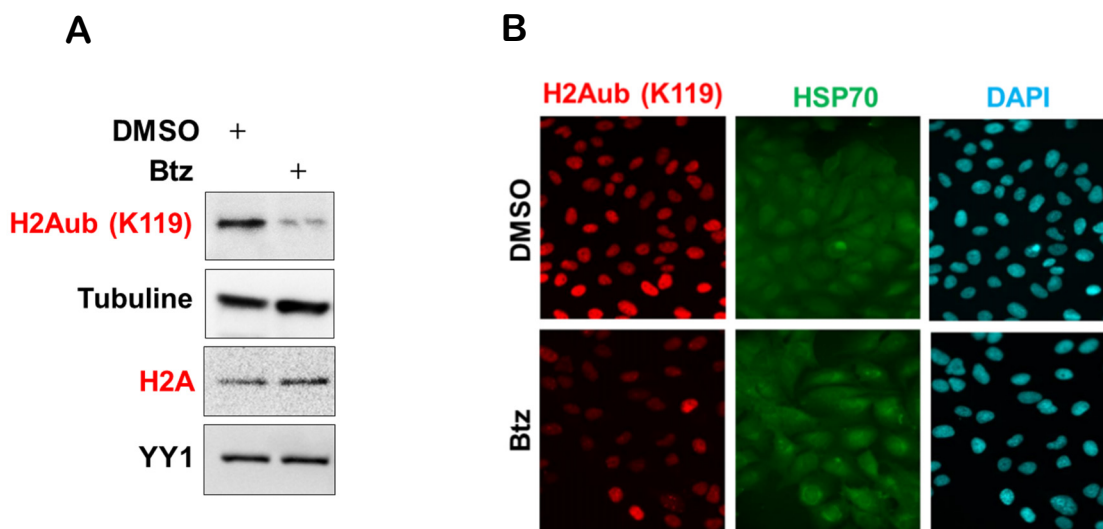


Figure 11. L'inhibition du protéasome par le Bortézomib (Btz) cause la déubiquitination massive de l'histone H2A sur la lysine 119. Des cellules U2OS ont été traité au Bortézomib (100 nM) durant 9 h, puis **(A)** lysées dans des conditions dénaturantes en vue de la détection de H2Aub (K119) et de H2A par immunobuvardage (n=2), ou **(B)** fixées en vue de la détection de H2Aub (K119) par immunofluorescence (n=1).

mésothélium, qui est un cancer agressif affectant les cellules pleurales et péritonéales, et qui n'est généralement pas traité par les inhibiteurs protéasomiques, ont été utilisées à cette fin; ainsi tout biais attribuable à une résistance acquise est évité. Pour chaque lignée, une cinétique de traitement à des doses croissantes de Bortézomib (**Figure 12A**) a été réalisée en parallèle à un test de viabilité (MTT) (**Données non montrées**), également basé sur une exposition au Bortézomib (72 h). La première expérience a permis de quantifier les niveaux relatifs de H2A-ub (K119) suite à un immunobuvardage. Ceux-ci ont positivement corrélé ($R^2 = 0,78$) avec les valeurs de concentrations inhibitrices médianes (IC50) obtenues lors de la seconde expérience (**Figure 12B**). Concrètement, l'IC50 représente la concentration de Bortézomib permettant de réduire la viabilité cellulaire de moitié. Mis à part cet événement de

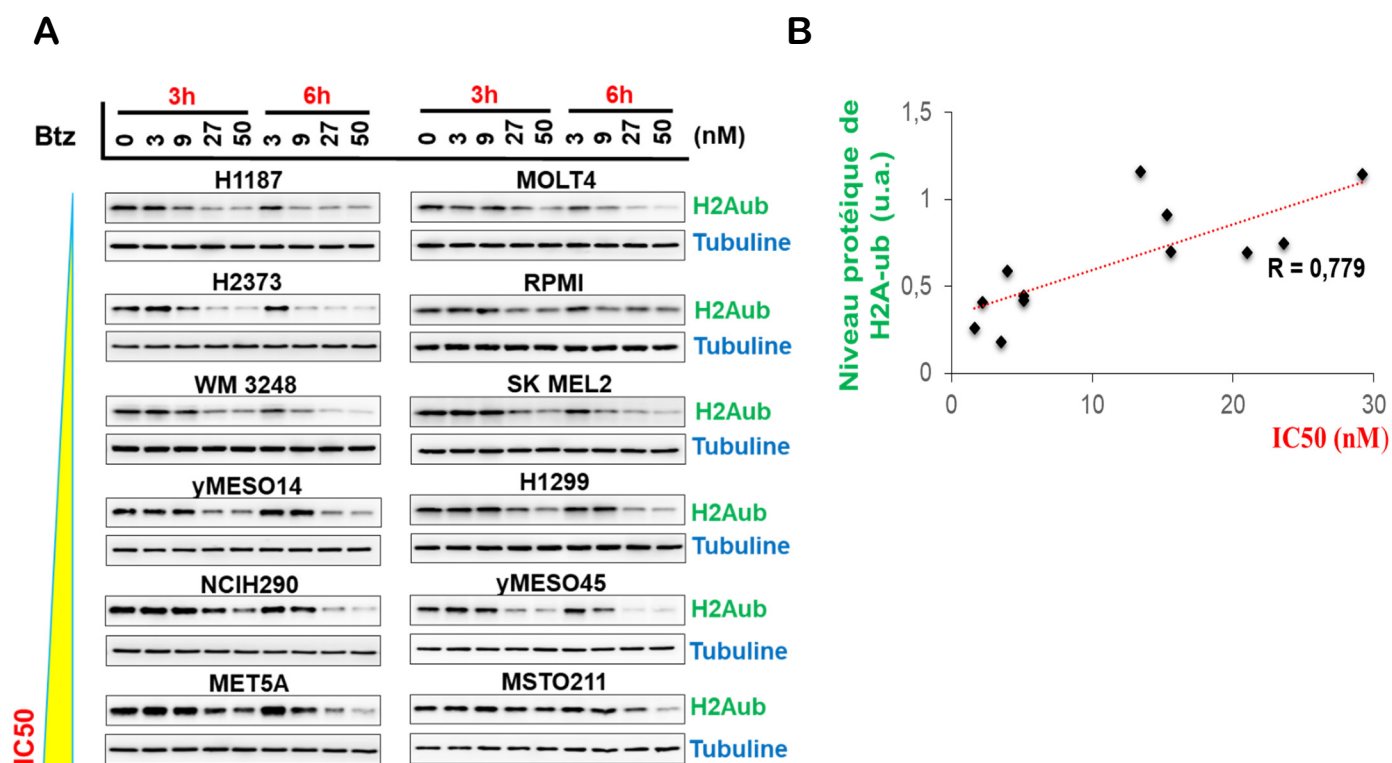


Figure 12. Le niveau de H2A-ub (K119) pourrait représenter un marqueur de résistance à l'inhibition du protéasome. Des lignées (12) de Mésothélium ont été traité avec des doses croissantes (0-50) nM de Bortézomib durant 3 ou 6 h, puis (**A**) lysées dans des conditions dénaturantes en vue de la détection et de la quantification de H2Aub (K119), par immunobuvardage. (**B**) Elles ont en parallèle été traité pendant 72 h avec les mêmes doses, ce qui a servi à réaliser un test MTT, et à déterminer leur IC50 respectif. Le graphique démontre une corrélation positive entre l'IC50 et le niveau protéique de H2A-ub (K119); $n=1$. Le traitement à 9 nM pendant 6 h a servi pour la corrélation ($n=1$). N.B. : Cette expérience a été réalisée communément avec Haithem Barbour et Saad Mengaad.

déubiquitination, l'une des autres conséquences majeures de l'inhibition du protéasome est l'accumulation de protéines poly-ubiquitinées ne pouvant plus être dégradées par le protéasome; elles séquestrent ainsi bien malgré elles les molécules d'ubiquitine. Ceci cause une forte chute des niveaux totaux d'ubiquitine libre (**Figure S1**). D'où la théorie originelle voulant que cet immense réservoir d'ubiquitine, que représente la chromatine, soit « réquisitionné » pour pallier à la pénurie d'ubiquitine lors d'un tel stress protéotoxique ²². Ainsi, cet évènement de déubiquitination semblait faire partie d'une réponse cellulaire visant à remédier au stress. Or, la relation de proportionnalité directe entre la sensibilité cellulaire au Bortézomib et l'intensité de déubiquitination de H2A-ub (K119), pouvait suggérer qu'une plus forte déubiquitination menait à une plus grande sensibilité, ce qui semblait paradoxal.

4.2. Bien plus qu'une déubiquitination : libération massive d'histones de la chromatine durant l'inhibition du protéasome

À ce stade, il semblait tout à fait pertinent de me pencher sur le rôle communément attribué à H2A-ub (K119), soit celui de marque répressive de transcription. Ainsi, l'idée que cette

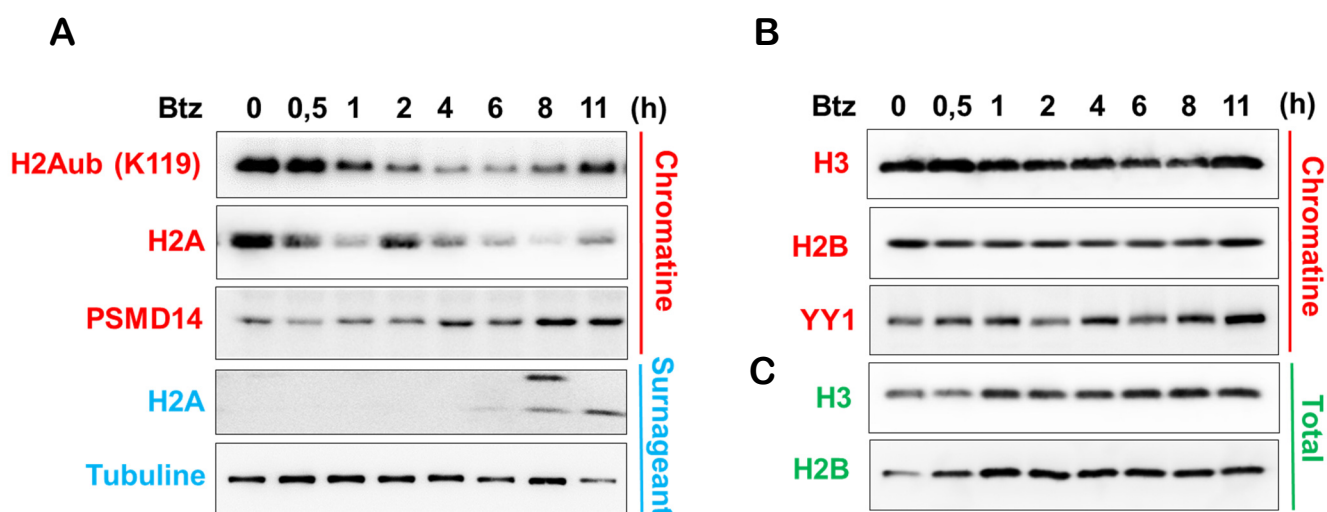


Figure 13. La déubiquitination de H2A-ub (K119) dissimulerait un important remodelage de la chromatine. Des cellules U2OS ont été traité (A) avec 100 nM de Bortézomib durant 11 h, puis lysées dans des conditions dénaturantes en vue de la détection de H2A par immunobuvardage, ou (B), (C) avec 50 nM de Bortézomib selon la cinétique indiquée, en vue de l'extraction de la chromatine et de la détection des protéines indiquées. (C) Un extrait total ayant subi le même traitement a servi de contrôle (n=1).

déubiquitination fasse partie d'une réponse transcriptionnelle majeure enclenchée pour remédier au stress perçu par la cellule semblait logique; mais comment cela pourrait-il donc sensibiliser les cellules? En effet, les études protéomiques et transcriptomiques révèlent une forte et rapide augmentation des niveaux de protéines de choc thermique (HSP) entre autres ⁷⁵. Vu que H2A-ub (K119) représente près du dixième des histones H2A ²², et étant donné la perte drastique de cette modification, la déubiquitination se produit apparemment à une assez grande échelle du génome. Il a été établi que la transcription et la réparation de dommage à l'ADN occasionne un remodelage de la chromatine visant à faciliter l'accessibilité aux différentes machineries moléculaires. Il est donc légitime de se s'interroger sur les niveaux totaux des histones canoniques. Comme on peut le voir, après isolation de la chromatine, on se rend compte que le niveau de H2A y étant incorporé diminue parallèlement à celui de H2A-ub (K119), et ce, de manière aussi drastique (**Figure 13A**). Ce qui n'est pas le cas de PSMD14, dont le recrutement est connu. On remarque qu'il y a en parallèle, un enrichissement graduel de H2A dans la fraction soluble à partir de 6 h; avec une forme de plus haut poids moléculaire qui apparaît à 8h (**Figure 13A**). L'analyse d'une plus grande quantité de protéines aurait probablement permis de

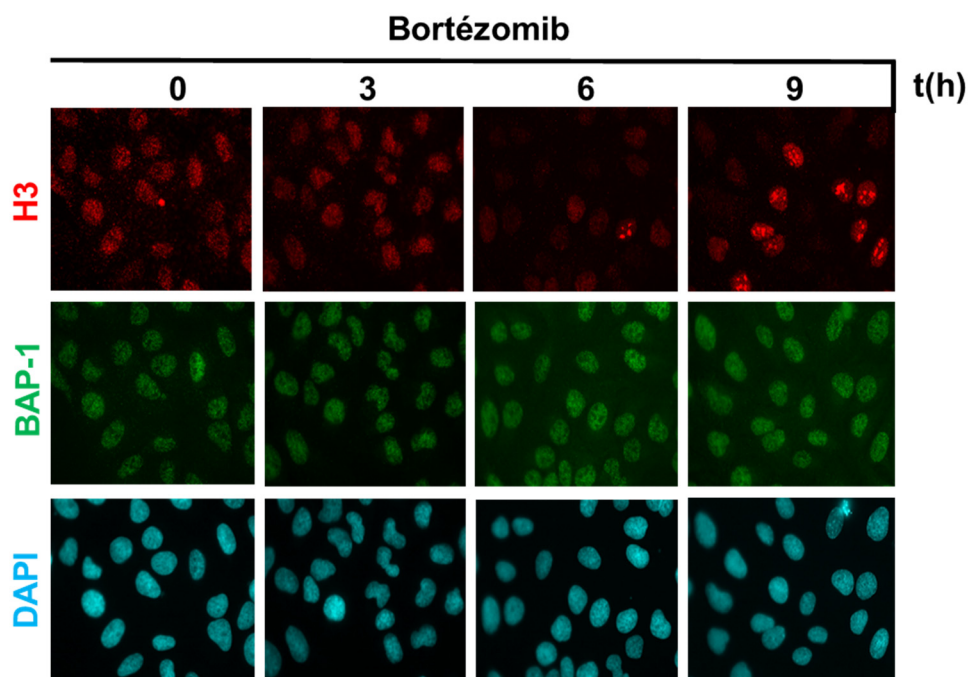


Figure 14. L'inhibition du protéasome par le Bortézomib cause l'apparition d'amas d'histones dans le noyau. Des cellules U2OS ont été traité avec 100 nM de Bortézomib selon la cinétique indiquée, puis fixées en vue de la détection de H3 par immunofluorescence; BAP-1 ayant servi de contrôle (n>3).

visualiser l'enrichissement plus tôt, pour que ce soit cohérent avec la cinétique de la baisse sur la chromatine. Ce qui était donc décrit dans la littérature comme un événement de déubiquitination venait probablement de dévoiler un événement beaucoup plus important. À ce stade, il était pertinent de d'abord se demander si le phénomène était réservé exclusivement à H2A. Ce que rien n'aurait justifié étant donné la stœchiométrie paritaire entre les histones canoniques au sein de la chromatine. En effet, contrairement au facteur transcriptionnel YY1 dont le recrutement est connu, le niveau d'autres histones canoniques, notamment H2B et H3, a également baissé de manière considérable, mais certainement pas aussi drastique que pour H2A. Toutefois, le profil est assez similaire. La différence pourrait en partie s'expliquer par une isolation moins efficace, d'autant plus que le protocole a été légèrement modifié lors de la seconde expérience. Le niveau total de H2B et de H3 demeure assez stable (**Figure 13C**); les

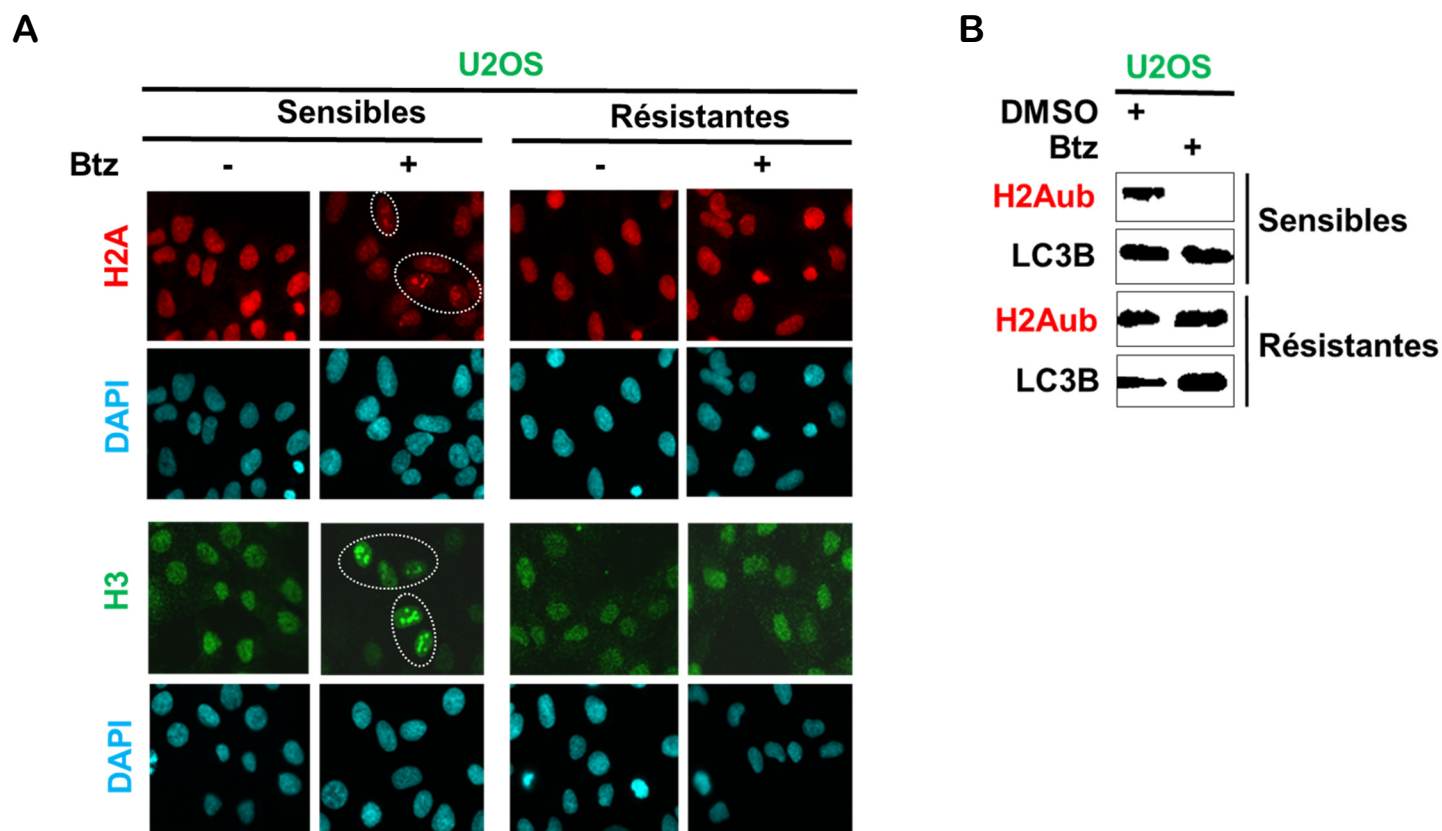


Figure 15. Les cellules résistantes au Bortézomib (Btz) ne contiennent pas d'amas d'histones dans les noyaux. Des cellules U2OS sensibles ou résistantes ont été traité avec 100 nM de Bortézomib pendant (A) 9 h, puis fixées en vue de la détection de H3 et de H2A par immunofluorescence, ou pendant (B) 3 h, puis lysées dans des conditions dénaturantes en vue de la détection de H2A-ub (K119) par immuno-buvardage; LC3B ayant servi de contrôle (n=1).

niveaux plus faibles à 0 h et à 30 min ne sont pas représentatifs des répliques de cette expérience. Une moindre quantité de protéines a vraisemblablement été déposée avant la migration des échantillons, tout comme pour l'échantillon de 0 h ayant permis de révéler H3 et H2B. En somme, étant donné ces baisses considérables d'histones sur la chromatine, un remodelage conséquent semble s'opérer. Ce qui est plutôt étonnant, c'est que cet amenuisement de la quantité d'histones sur la chromatine se prolonge considérablement dans le temps. Par ailleurs, un autre point particulier est que les niveaux d'histones sont au moins partiellement rétablis, 11h après le début du traitement.

J'ai ensuite voulu vérifier si toutes ces histones étaient transloquées vers le cytoplasme, afin d'éviter que leur toxicité n'exerce des effets délétères dans un noyau rempli d'ADN et d'ARN. De façon surprenante, une examination par immunofluorescence de la localisation des histones après traitement au Bortézomib n'a rien dévoilé de tel. Elle a plutôt révélé l'apparition de zones nucléaires très fortement enrichies en histones H3 (**Figure 14**) et H2A (**Figure 15A**), et ce à partir de 6h dans certaines cellules; ce qui n'a pas été reporté dans la littérature à notre connaissance. Ce phénomène n'a cependant pas pu être observé pour H2B et H4, du moins pas de façon aussi flagrante (**Figure S3**). Car en réalité, on peut apercevoir un signal similaire pour

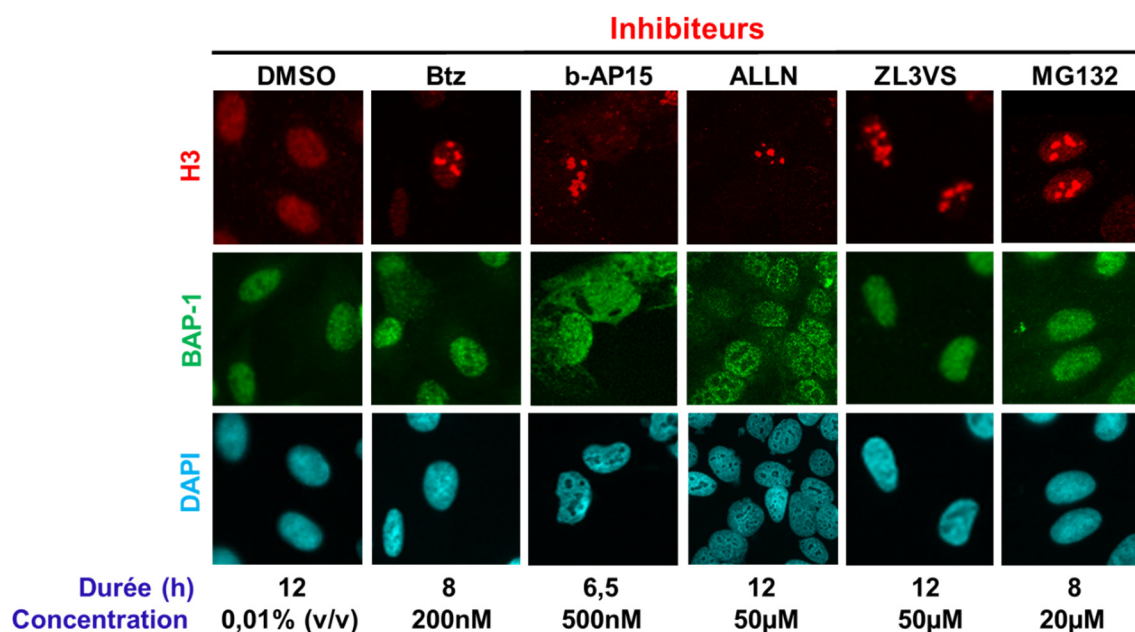


Figure 16. L'apparition d'amas d'histones dans le noyau est un phénomène commun aux inhibiteurs du protéasome. Des cellules U2OS ont été traité avec les inhibiteurs protéasomiaux indiqués, et ce pour la durée indiquée, puis fixées en vue de la détection de H3 par immunofluorescence; BAP-1 ayant servi de contrôle (n=2).

H2B, mais de très faible intensité. Ceci pourrait être expliqué par un changement d'environnement (ex : enfouissement) subi par les épitopes envers lesquels sont dirigés les anticorps respectifs après le traitement. D'autant plus que ces derniers sont de type monoclonal, contrairement à ceux de H2A et de H3 (polyclonaux), qui peuvent reconnaître en théorie plus d'une région de la protéine. Tout compte fait, le signal nucléaire initial, qui est fort et clairement défini, s'atténue très drastiquement suite au traitement, ce qui témoigne d'un bouleversement quelconque affectant quantitativement ou structurellement les histones H2B et H4. Pour la suite du projet, ce sont les histones H2A et H3 qui ont été analysées.

4.3. Amasement d'histones hors de la chromatine durant l'inhibition du protéasome : phénomène reproductible dans les cellules humaines

Ainsi, les résultats accumulés à ce stade indiquaient que le traitement au Bortézomib occasionne une forte deubiquitination de H2A-ub (K119) et un remodelage vraisemblablement concomitant de la chromatine, ce qui causerait l'apparition d'amas d'histones non chromatiniennes dans le

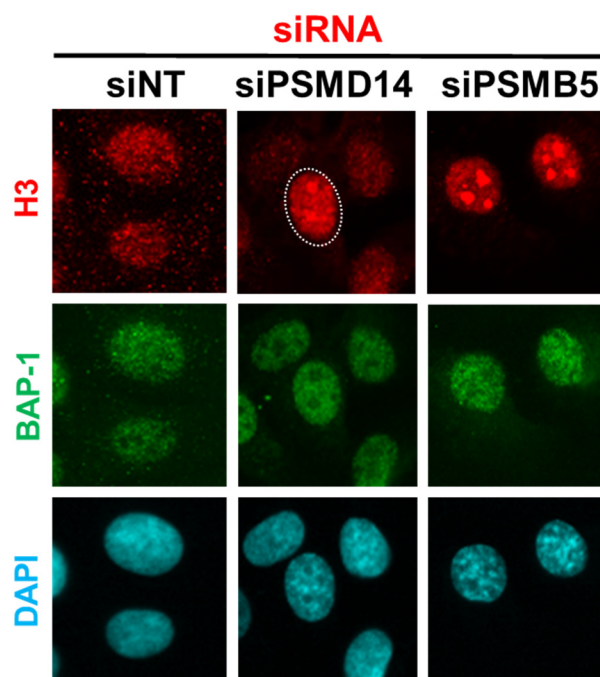


Figure 17. L'apparition d'amas d'histones dans le noyau est reproduite par siRNA d'enzymes protéasomales. Des cellules U2OS ont été traité par siRNA de PSMD14 et de PSMB5, puis fixées après 3 jours en vue de la détection de H3 par immunofluorescence; BAP-1 ayant servi de contrôle (n=2).

noyau. La relation séquentielle entre ces événements suggérerait donc que le phénomène d'apparition d'amas d'histones serait corrélé, toute comme la déubiquitination de H2A-ub (K119) à la sensibilité cellulaire; en fait, il pourrait même en être à l'origine. Pour vérifier cela, des cellules résistantes au Bortézomib (produites par sélection) y ont été traitées. Cela dit, elles n'ont pas démontré le phénomène (**Figure 15A**); ni la deubiquitination de H2A-ub (K119) d'ailleurs, tel qu'envisagé (**Figure 15B**).

Il était en tout cas primordial de vérifier la spécificité du phénomène avant de s'y attarder plus longuement. À savoir si celui-ci était caractéristique de l'inhibition du protéasome ou s'il n'était qu'une simple conséquence d'un effet hors-cible du Bortézomib. J'ai alors montré que le phénomène est reproduit par d'autres inhibiteurs du protéasome (**Figure 16**). Cela dit, il n'était pas exclu que d'autres protéines sur lesquelles pouvaient agir ces inhibiteurs soient impliquées. En effet, plusieurs des inhibiteurs ont également une affinité, moindre, pour les protéases à cystéine de type cathepsines et calpaines. Toutefois, j'ai pu montrer en déplétant les enzymes PSMD14 et de PSMB5 par siRNA, que le phénomène était reproduit (**Figure 17**).

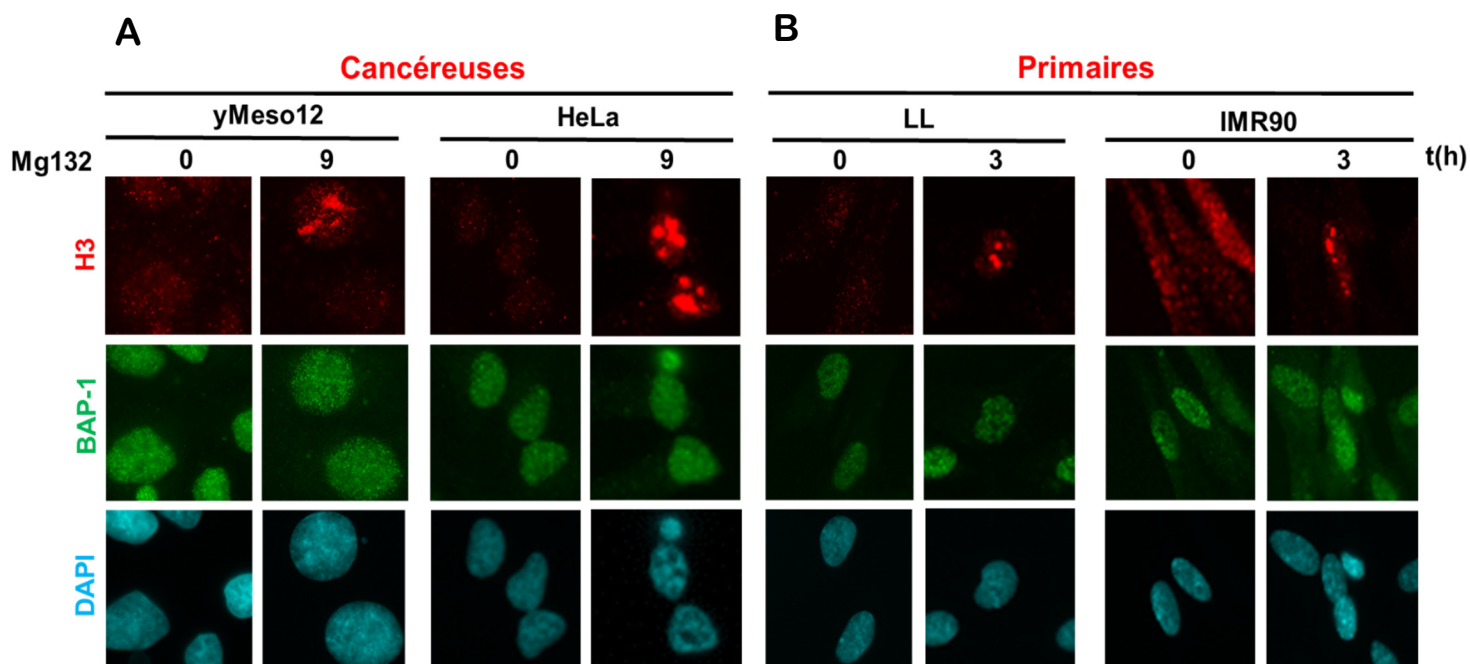


Figure 18. Le phénomène d'accumulation d'histones dans le noyau est reproduit dans des cellules cancéreuses et primaires. (A) Des cellules cancéreuses (yMeso12 et HeLa) et (B) des fibroblastes humains (LL et IMR90) ont été traité par 20 μ M de Mg132, puis fixées après la durée indiquée, en vue de la détection de H3 par immunofluorescence; BAP-1 ayant servi de contrôle (n=1).

Cela était prévisible étant donné que la déubiquitination de H2A-ub (K119) se produit également par siRNA (**Figure S5A**). Les images présentées pour les inhibiteurs proviennent de cinétiques ayant pour seul objectif de détecter le phénomène; il n'y a donc pas eu de comparatif quant aux vitesses d'apparition respectives. À noter qu'à l'exception de b-AP15, qui est un inhibiteur des DUBs protéasomales UCH37 et USP14, les autres agents ciblent tous la peptidase PSMB5, tout comme le Bortézomib. Toutefois, la Capzimine (10 μ M), qui est un inhibiteur de la DUB protéasomale PSMD14 n'a pas démontré le phénomène, après le seul temps de traitement (8h) testé (**Données non montrées**). Un plus long traitement ou une plus forte concentration devraient être utilisés pour une ultime vérification. Il est à noter que seule une cellule sur 400 a démontré le phénomène après le siPSMD14, contre une quinzaine pour le siPSMB5. Quoiqu'il faille comparer quantitativement les niveaux protéiques ou transcriptionnels des deux protéines, l'efficacité des déplétions respectives ne semble pas refléter cette différence par immunobuvardage (**Figure 27C**). En fait, on constate que pour des niveaux de déplétion

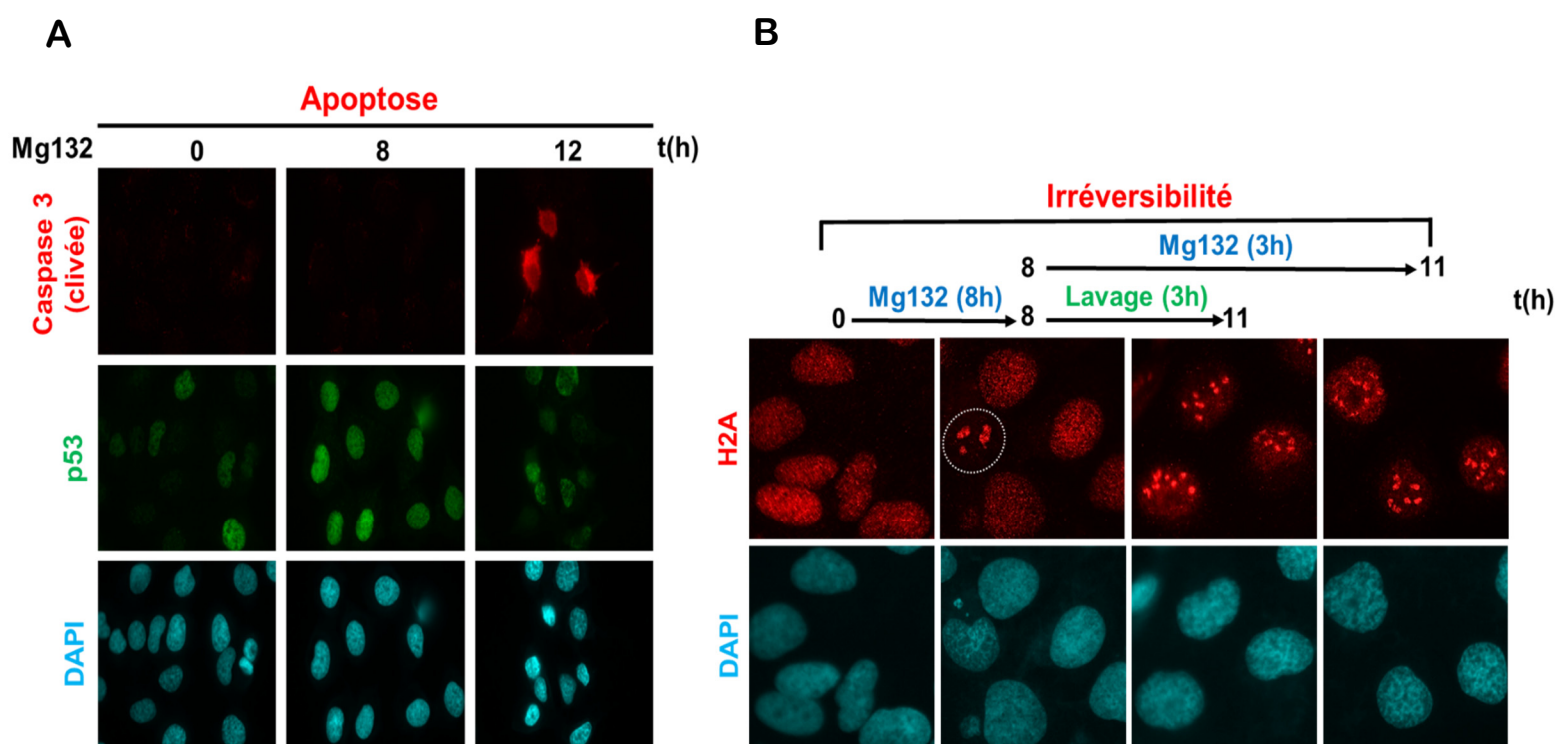


Figure 19. L'apparition des amas d'histones dans le noyau précède l'apoptose et est irréversible. Des cellules U2OS ont été traité avec 20 μ M de Mg132 pendant (A) 8h et 12h, ou (B) pendant 8h, 11h et 8h suivi d'un lavage de 3h, puis fixées en vue de la détection par immunofluorescence des protéines indiquées (n=1).

visiblement comparables par immunobuvardage (**Figure S5A**), le siPSMD14 produit toujours des effets plus forts. Que ce soit en termes de déubiquitination de H2A-ub (K119) et d'accumulation de protéines poly-ubiquitinées (**Figure S5A**), ou en termes de baisse de prolifération cellulaire (**Figure S5B, C**). La même chose vaut pour la baisse de viabilité analysée par MTT (**Données non montrées**).

Sachant qu'il a été établi que le phénomène est associé à l'inhibition du protéasome, il s'agissait désormais de vérifier si celui-ci n'est pas strictement réservé au U2OS, qui était la seule lignée cellulaire utilisée à ce stade. En effet, une lignée cellulaire, cancéreuse de surcroît, est génotypiquement unique. Il se pouvait donc que ce phénomène soit propre au phénotype moléculaire des U2OS utilisées. Ce n'était cependant pas le cas, car on l'a observé dans deux autres lignées cancéreuses humaines (yMESO12 et HeLa) et dans deux lignées primaires humaines de type fibroblaste (LL et IMR90) (**Figure 18**). Cela suggère donc que les événements moléculaires qui conduisent à ce phénomène sont probablement communs aux cellules humaines. On peut supposer que toutes les cellules (**Figure 12**) qui subissent la déubiquitination de H2A-ub (K119) après l'inhibition du protéasome, pourraient subir un remodelage de la chromatine et être le théâtre de ce phénomène d'accumulation d'histones. Ceci a donc renforcé mon intérêt pour cette observation, qui paraissait de plus en plus intrigante.

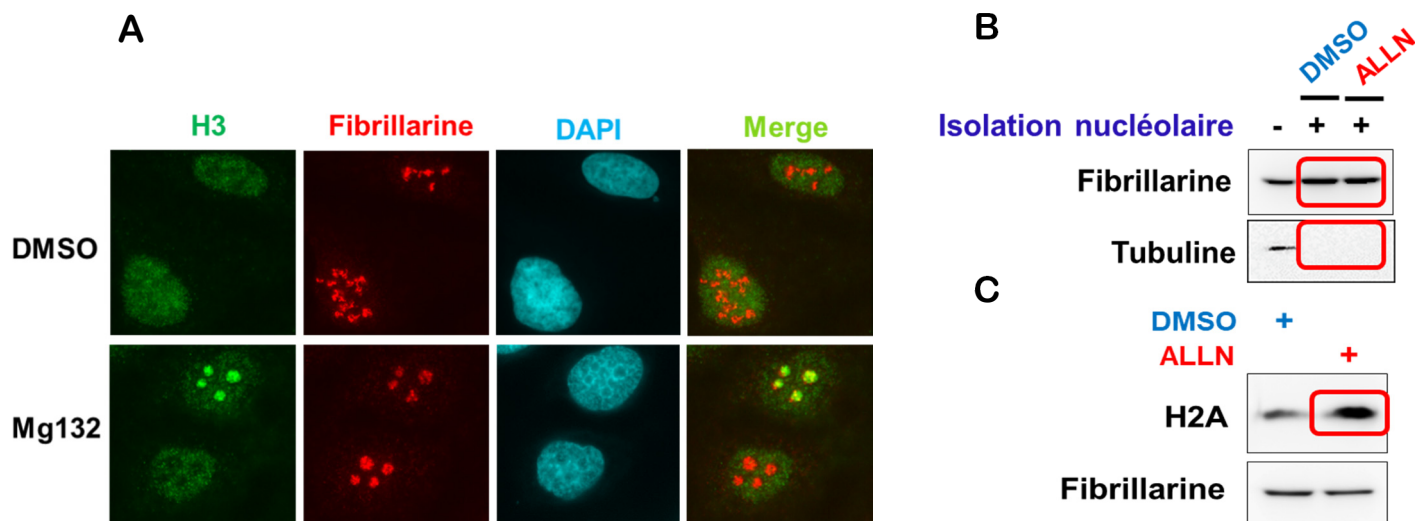


Figure 20. Les histones sont accumulées dans les nucléoles. Des cellules U2OS ont été traité par, **(A)** 20 μ M de Mg132 pendant 8h, puis fixées en vue de la détection de H3 et du marqueur nucléolaire fibrillarine par immunofluorescence (n=2), ou **(B)**, **(C)** par 50 μ M de l'inhibiteur protéasomal ALLN en vue de l'enrichissement des nucléoles, et de la détection subséquente de H2A. La tubuline et la fibrillarine ayant servi de contrôles d'enrichissement (n=1).

4.4. Libres mais séquestrées : les histones seraient irréversiblement accumulées dans les nucléoles avant le déclenchement de l'apoptose.

Toutefois, il s'agissait désormais de vérifier s'il ne s'agissait pas là d'un sous-produit de la mort; en d'autres termes, une simple conséquence de la perturbation cellulaire majeure qui symbolise l'apoptose. J'ai pu montrer par immunofluorescence que le clivage de la caspase-3, qui est un marqueur de l'apoptose, n'apparaît qu'après le phénomène d'accumulation des histones (**Figure 19A**). De ce fait, l'idée que ces accumulations d'histones non-chromatiniennes puissent être à l'origine de l'apoptose provoquée par les inhibiteurs du protéasome n'était pas écartée. Ensuite, une des questions les plus légitimes à se poser était de savoir si ces accumulations étaient réversibles une fois qu'elles apparaissent. En d'autres termes, seraient-elles régulées? La réponse semble négative (**Figure 19B**), étant donné que même en lavant et en réincubant les cellules dans du milieu frais après que le phénomène soit apparu (après 8h), celui-ci se

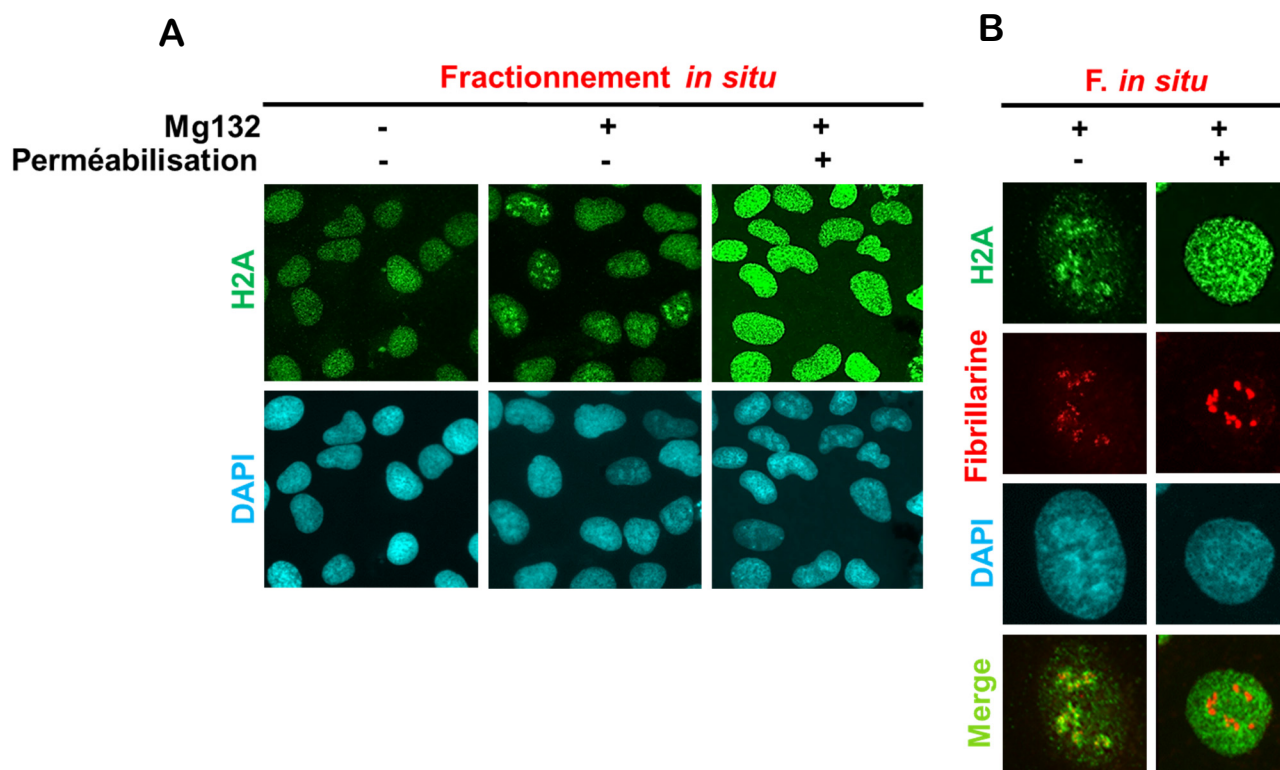


Figure 21. Les histones seraient libres et non pas incorporées à l'ADN ribosomal constituant les nucléoles. (A), (B) Des cellules U2OS ont été traité par 20 μ M de Mg132 pendant 8h, puis perméabilisées au tampon CSK et fixées en vue de la détection de H2A et du marqueur nucléolaire fibrillarine par immunofluorescence (n=1).

maintenait 3h plus tard. Tout comme la toxicité de l'inhibiteur d'ailleurs, qui est perceptible au changement morphologique du noyau (DAPI). Une autre question tout aussi légitime était de se demander où pouvaient bien être localisés ces amas d'histones. On sait que certaines marques épigénétiques d'histones peuvent former des foci dans divers contextes. Cela dit, ces amas n'étaient probablement pas incorporés à la chromatine (**Figure 13**). On sait aussi que le noyau abrite plusieurs corps nucléaires, qui sont des organelles non-membranaires, et dans lesquelles pourraient se situer ces amas d'histones. D'autant plus, que certains sont justement connus pour séquestrer et modifier des protéines³⁶. Il était toutefois assez évident que les histones étaient transloquées dans les nucléoles, ces organelles sphériques qui se caractérisent par un fort affaiblissement du signal du DAPI (**Figure 20A**); un co-marquage à la protéine nucléolaire fibrillarine a d'ailleurs confirmé cette co-localisation. Cela dit, l'immunofluorescence étant une grande source potentielle d'artefacts, j'ai procédé à une isolation biochimique des nucléoles (**Figure 20B**) avant et après l'inhibition du protéasome. Ce qui a permis de valider cette localisation, étant donné le fort enrichissement en histone H2A après le traitement (**Figure 20C**). On pourrait être tenté de justifier la présence des histones dans les nucléoles par une possible incorporation à l'ADN ribosomal qui y réside. En effet, les cellules subissant un stress vont

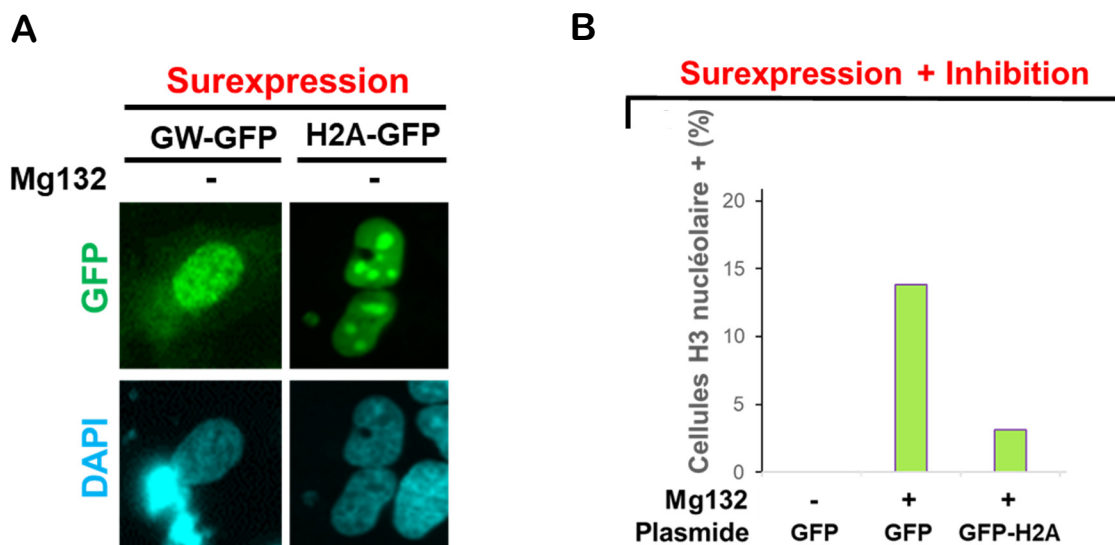


Figure 22. L'excès d'histones exogènes tend à s'accumuler dans les nucléoles et à probablement causer de la léthalité. (A), (B) Des cellules U2OS ont été transfecté transitoirement avec les plasmides indiqués et ont été traité ou non avec 20 μ M de Mg132 pendant 8h, puis fixées en vue de la détection de H3 endogène et de GFP-H2A par immunofluorescence. (B) Un compte (> 200 cellules) des cellules démontrant une accumulation nucléolaire de H3a été réalisé (n=1).

entres autres, mettre un terme à la ribogénèse, étant donné que c'est un processus très énergivore qui n'est pas forcément prioritaire dans ce contexte³⁵. D'ailleurs, les nucléoles sont considérés comme les plus grandes usines transcriptionnelles. Ainsi, pourrait-il y avoir une répression génique majeure par compactage de la chromatine? Un fractionnement *in situ* consistant à perméabiliser les cellules avant leur fixation pour en extraire la fraction soluble a permis de révéler que les histones semblent solubles, et donc libres (**Figure 21A**). En réalité, une régulation beaucoup plus fine aurait pu consister à inhiber la polymérase I, qui transcrit spécifiquement l'ADN ribosomal. Voulant vérifier que cette disparition de signal ne camouflait pas une potentielle solubilisation des nucléoles, j'ai fait un co-marquage de l'histone H2A et de la fibrillarine, pour confirmer le maintien de la structure nucléolaire (**Figure 21B**). Malgré le fort accroissement du signal vert provoqué par la perméabilisation, celui-ci ne semblait pas dissimuler le signal des histones nucléolaires lorsque la luminosité était abaissée au microscope. D'ailleurs, on peut apercevoir après la perméabilisation, que le marquage de H2A (**Figure 21B**)

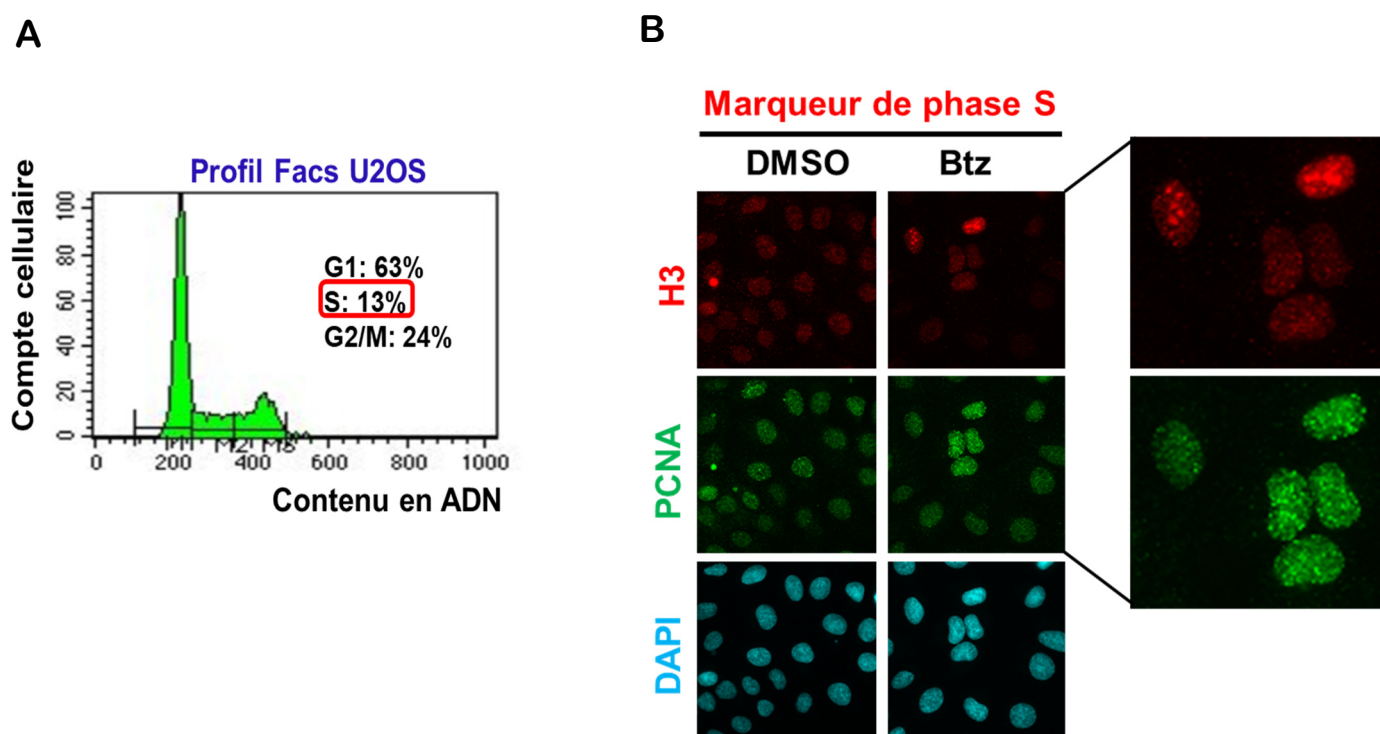


Figure 23. Les amas d'histones apparaissent en phase S du cycle cellulaire. Des cellules U2OS ont été (**A**) fixées à l'éthanol 75%, marquées à l'iodure de propidium, puis analysées par FACS pour une quantification relative des sous-populations du cycle cellulaire, ou (**B**) traité par 20 μ M de Mg132 pendant 8h, et fixées en vue de la détection, par immunofluorescence, de H3 et du marqueur de phase S PCNA (n=1).

contient de petites zones où le signal est beaucoup moins fort; celles-ci correspondent au signal de la fibrillarine. Ainsi, sachant que le signal des histones nucléolaires est plus fort que le reste du signal nucléaire, il devrait en théorie suivre la même tendance après perméabilisation. Or, ce n'est pas le cas.

4.5. La translocation nucléolaire d'histones non-chromatiniennes : un mécanisme de régulation post-traductionnel?

Tout portait à croire à ce stade, que cette population d'histones visiblement libérée de la chromatine après l'inhibition du protéasome, était accumulée librement dans les nucléoles. Ce qui suggérerait qu'un vraisemblable mécanisme de translocation nucléolaire, actif ou passif,

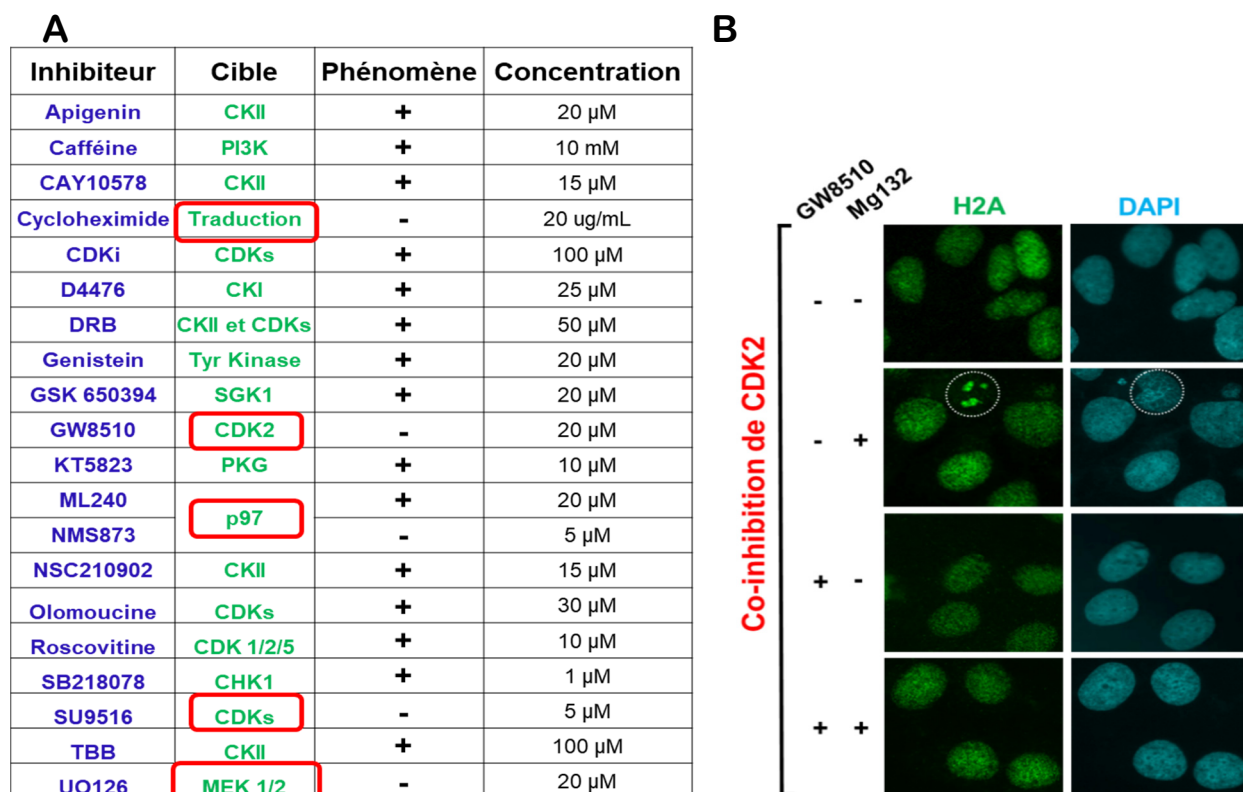


Figure 24. L'inhibition de CDK2 empêcherait l'apparition des amas d'histones nucléolaires. (A) Des cellules U2OS ont subi un co-traitement au Mg132 (20 μ M) et aux différents inhibiteurs indiqués, pendant 8h, puis fixées en vue de la détection de H2A par immunofluorescence. Les cellules ont été exposées aux inhibiteurs 1 h avant l'ajout du Mg132. **N.B. :** Le phénomène fait référence à l'accumulation d'histones dans les nucléoles (n=1). (B) Validation de l'effet de l'inhibiteur de CDK2, GW8510 (n=1)

entraîné probablement en jeu lorsqu'un grand excès d'histones était libéré de la chromatine. Mais ne serait-ce pas là le sort de tout excès d'histones n'y étant pas incorporées? Ainsi, l'expérience suivante consistait à surexprimer une histone exogène (H2A), pour d'une part valider cette hypothèse, et pour d'autre part valider la localisation nucléolaire des histones à la suite de l'inhibition du protéasome, et ce sans faire appel aux anticorps (**Figure 22 A**). Effectivement, la simple surexpression mène à l'apparition d'amas nucléolaires de l'histone H2A fusionnée à la GFP, sans même avoir inhibé le protéasome; la GFP surexprimée toute seule ne montrait pas le même comportement. Par ailleurs, l'expérience suivante a consisté à surexprimer GFP ou bien H2A-GFP, et à ensuite traiter ou non à l'inhibiteur de protéasome. Alors que 13,8% des cellules de la condition transfectée à la GFP démontraient le phénomène pour H3 endogène après 8h de traitement, seulement 3,1% le démontraient dans la condition où H2A-GFP était surexprimé (**Figure 22 B et Tableau S2**).

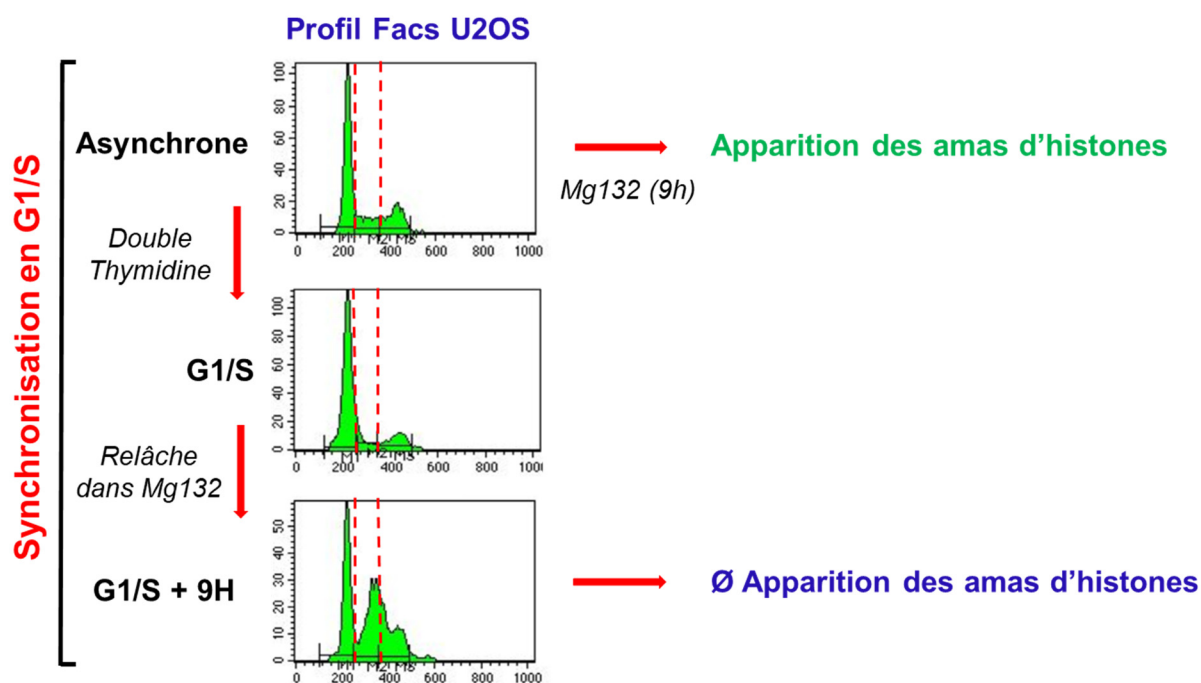


Figure 25. L'inhibition du protéasome semble requise avant la transition G1/S pour que le phénomène se produise. Des cellules U2OS ont été synchronisées à l'interphase G1/S par un double blocage à la thymidine, puis relâchées dans un milieu contenant 20 μ M de Mg132 pendant 9h. Elles ont ensuite été, soit fixées à l'éthanol 75%, marquées à l'iodure de propidium, et analysées par FACS pour obtenir un profil de cycle cellulaire (G1 | S | G2-M), ou bien fixées en vue de la détection, par immunofluorescence, de H2A (n=1).

4.6. Néosynthèse des histones de phase S : la goutte qui fait déborder le nucléoplasme?

L'une des caractéristiques les plus flagrantes de ce phénomène est le fait qu'il ne se manifestait, comme mentionné plus haut, que dans une portion des cellules traitées (~ 15%), alors que toutes ont été exposées à l'inhibiteur. La sous-population cellulaire la plus évidente à associer à ce pourcentage était celle de la phase S (**Figure 23 A**). D'autant plus qu'elle est caractérisée par la néosynthèse d'une grande quantité d'histones en vue de la réplication de l'ADN et de la

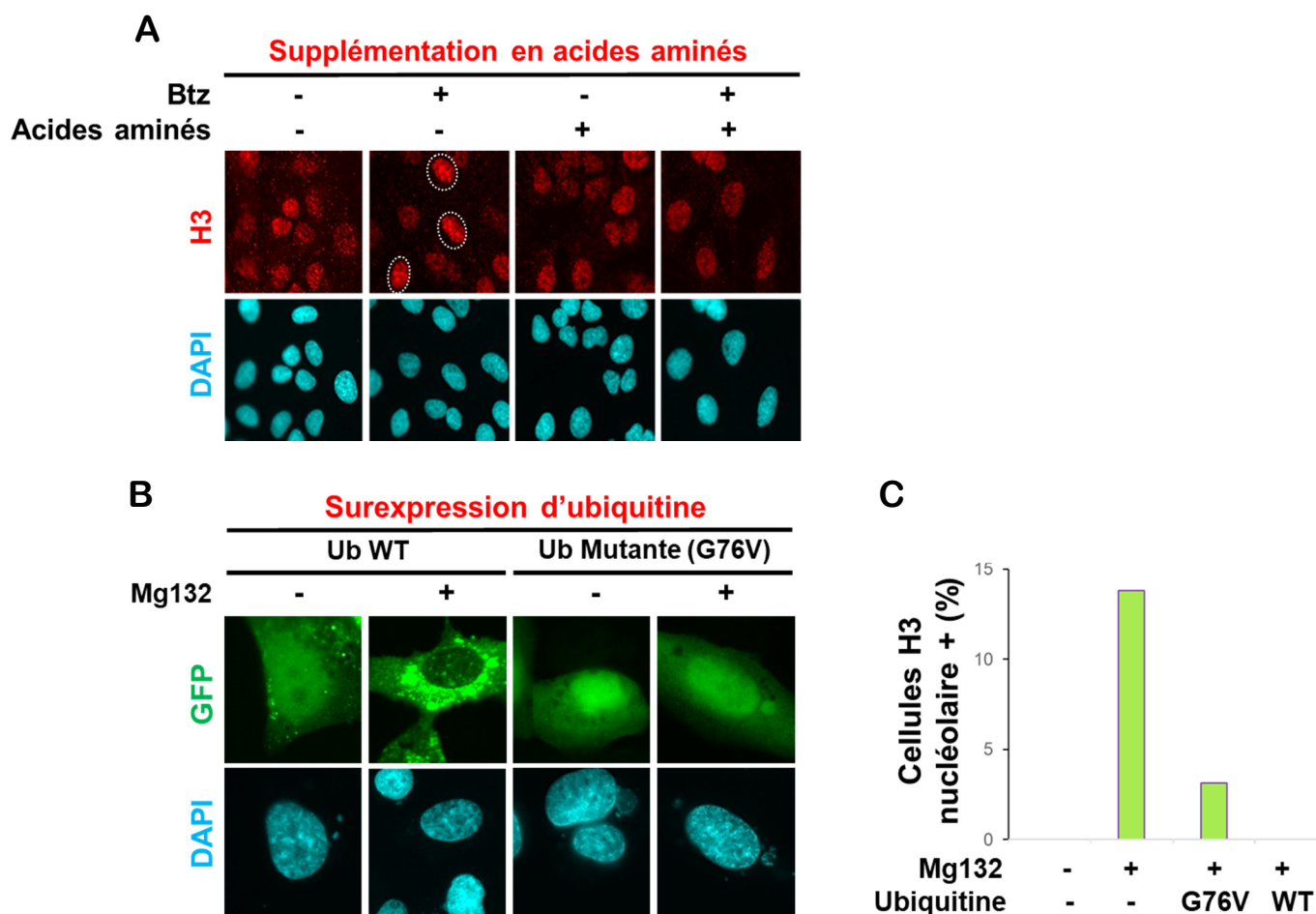


Figure 26. Le phénomène est amoindri par un apport en acides aminés ou évité par la surexpression d'ubiquitine. Des cellules U2OS ont été (A) traitées ou non avec 50nM de Bortézomib (9h), avec ou sans supplémentation en acides aminés, ou (B), (C) transfectées transitoirement avec les plasmides indiqués, puis traitées ou non avec 20 μ M de Mg132 (8h), puis fixées en vue de la détection de H3 endogène et de GFP par immunofluorescence. (C) Un compte (> 200 cellules) des cellules démontrant une accumulation nucléolaire de H3 a été réalisé; n=1. Acides aminés : non essentiels (1x), Cystéine (1 mM) et Asparagine (10 mM) (n=1).

reformation subséquente de la chromatine. En fait, l'une des questions les plus intrigantes, à laquelle les prochaines expériences ont d'ailleurs apporté un élément de réponse, concernait l'origine de ces histones accumulées dans les nucléoles. Provenaient-elles de la chromatine, qui semblait avoir subi un important remodelage, ou bien de la néosynthèse en phase S? Le plus probable est que la contribution de ces deux sources mène au phénomène. En effet, des cellules enrichies en PCNA, un marqueur de phase S, contenaient ces amas d'histones, mais pas toutes (**Figure 23 B**). Aussi, d'autres cellules non enrichies en PCNA en contenaient également.

Pour tenter de mieux comprendre le phénomène, l'idée suivante était de tenter de situer les événements moléculaires menant à son apparition, dans le paysage de la signalisation cellulaire. J'ai alors débuté un criblage chimique basé sur des inhibiteurs de divers processus cellulaires, dans le but d'identifier une ou des protéines qui empêcheraient l'apparition du phénomène. Le premier essai, ciblant principalement des kinases (**Figure 24A**), a révélé un potentiel acteur

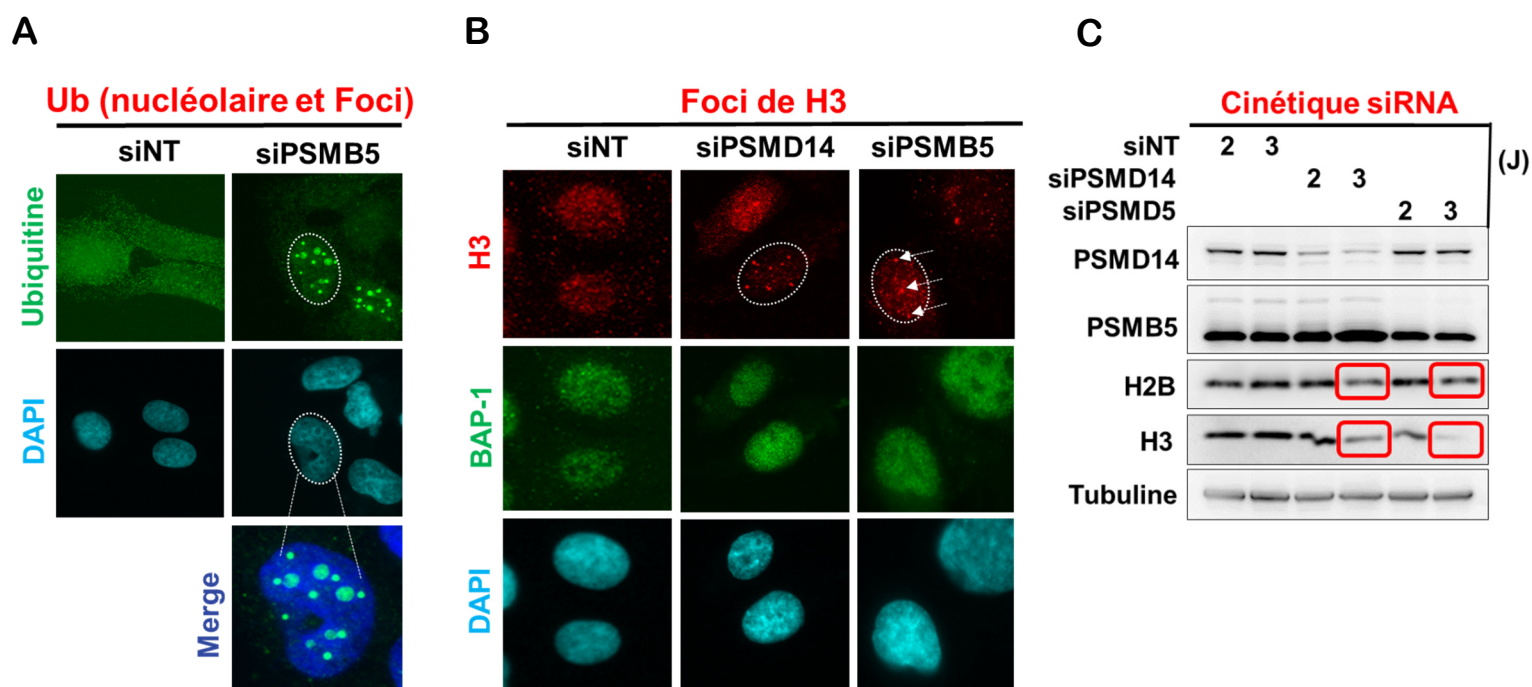


Figure 27. Les amas d'histones dans les nucléoles sont ubiquitinés et éventuellement fragmentés, puis dégradés ou sécrétés. Des cellules U2OS ont été traité par siRNA dirigé contre PSMD14 ou contre PSMB5, et fixées en vue de la détection de **(A)** l'ubiquitine conjuguée (FK2) (n=1) et de **(B)** H3 par immunofluorescence (n=2), ou **(C)** lysées dans des conditions dénaturantes en vue de la détection des protéines indiquées par immunobuvardage, selon une cinétique en termes de jours (n>2). **N.B.** : pour PSMB5, la bande supérieure est le précurseur, alors que l'inférieure est la forme mature.

intéressant que je me suis contenté de valider; il s'agissait de CDK2 (**Figure 24B**). Cette kinase est un régulateur clé de la transition G1/S. Elle active d'ailleurs indirectement la transcription des gènes d'histones³⁷. Par ailleurs, un autre acteur intéressant qui s'est révélé est MEK1/2. Il est d'ailleurs un activateur indirect de CDK2³⁷. Il va en effet activer la kinase ERK, qui elle va favoriser la translocation nucléaire de CDK2 d'une part, et qui d'autre part va lui apposer une phosphorylation activatrice (T160). Il est à noter qu'un inhibiteur général de CDKs empêche également l'apparition du phénomène alors que d'autres non. L'ATPase p97, qui est une composante du système ubiquitine-protéasome, s'occupe d'extraire des protéines ubiquitinées intégrées dans divers complexes macromoléculaires et structures cellulaires¹⁴. Elle semble jouer un rôle, tout comme la synthèse protéique inhibée par cycloheximide, dans l'apparition du phénomène.

L'expérience suivante consistait en une synchronisation des cellules à l'interphase G1/S et à leur relâchement dans un milieu contenant l'inhibiteur du protéasome (**Figure 25**). L'un des objectifs était de visualiser l'apparition du phénomène en S, afin de valider les indices précédents qui pointaient vers cette phase du cycle. L'autre objectif était d'obtenir une population homogène, où toutes les cellules contiendraient ces amas d'histones dans les nucléoles, et ce dans le but de faciliter l'analyse d'expériences subséquentes. Cela dit, les cellules relâchées avec l'inhibiteur du protéasome ne contenaient pas d'amas d'histones (**données non montrées**). Ces résultats suggèrent que l'inhibition du protéasome doit probablement débiter un certain temps avant que les cellules ne soient à l'interphase G1/S, pour que le phénomène se manifeste (en phase S).

4.7. Supplément d'acides aminés ou d'ubiquitine libre pour éviter l'apparition des amas d'histones.

Ensuite, il était pertinent de se pencher sur le triple rôle du protéasome dans l'homéostasie cellulaire, pour tenter de mieux comprendre le phénomène. On sait que mis à part son rôle dans la dégradation protéique en tant que tel, le protéasome est un acteur clé dans la gestion du réservoir cellulaire d'acides aminés libres et de celui de l'ubiquitine libre. Ceci a permis, tel que mentionné plus tôt, de démontrer qu'en réalité, la léthalité provoquée par l'inhibition du protéasome²¹ ne serait pas attribuable à l'accumulation de protéines indésirables, mais plutôt à un appauvrissement de la cellule en acides aminés. D'où le sauvetage de la mort d'un maximum

de 90% des cellules par une supplémentation en acides aminés. Ainsi, une supplémentation m'a permis d'atténuer considérablement l'apparition du phénomène, qui se manifestait initialement dans ~19% des cellules, puis dans seulement ~3% d'entre elles après; soit une baisse de près de 84% (**Figure 26A et Tableau S1**).

La baisse des niveaux d'ubiquitine libre après l'inhibition du protéasome (**Figure S1**), est également une conséquence majeure affectant l'homéostasie cellulaire. Ainsi, elle pourrait potentiellement avoir un rôle dans l'apparition du phénomène. En effet, en surexprimant de l'ubiquitine, les amas d'histones n'apparaissaient plus. Par ailleurs, ils apparaissaient dans la condition où l'ubiquitine mutée non conjugable (G76V) était surexprimée. Cela dit, ~4 fois moins de cellules en contenaient, comparativement au contrôle GFP (**Figure 26C et Tableau S2**). La réduction attribuable à la forme mutée est étonnante en raison du fait que celle-ci ne se comporte pas comme la forme sauvage dans le contexte de l'inhibition du protéasome (**Figure 26B**). En effet, sa distribution cellulaire ne change pas comparativement à la condition contrôle, alors que la forme sauvage suit, comme envisagé, le même profil de distribution que l'ubiquitine endogène. Le signal de cette dernière s'enrichi dans le cytoplasme tout en s'appauvrissant dans le noyau (**Figure S2**).

4.8. Trop peu, trop tard : la cellule se débarrasserait enfin des amas d'histones, mais la mort serait déjà en cours.

L'une des questions pertinentes à se poser était de savoir si ces histones étaient ubiquitinées. En effet, qu'elles soient synthétisées en phase S ou relâchées lors du remodelage de la chromatine observé, elles sont probablement signalées tôt ou tard comme étant des protéines à dégrader. Des indications concernant le sort de ces amas d'histones nucléolaires ont été livrées lors de l'inhibition du protéasome par déplétion des enzymes PSMD14 et PSMB5. Cela a donc permis de révéler une forte accumulation nucléolaire d'ubiquitine lorsqu'un marquage de l'ubiquitine conjuguée a été fait par immunofluorescence (**Figure 27A**). Quoiqu'il n'y ait pas eu de co-marquage avec l'une des histones pour confirmer la nature des protéines ubiquitinées, il est fort probable qu'il s'agisse d'elles. Ne serait-ce qu'au vu de l'intensité du signal nucléolaire de l'ubiquitine comparativement au reste du noyau, qui suit la même tendance que celui des histones. Par ailleurs, ce qui était également intéressant, c'était l'apparition de foci d'ubiquitines

nucléaires caractérisés par une densité de signal similaire à celle originant des nucléoles (**Figure 27A**). D'ailleurs, H3 forme également des foci nucléaires (**Figure 27B**), en plus des amas nucléolaires (**Figure 17**). Ce qui mène au questionnement suivant : qui est-ce qui précède, les foci ou les amas nucléolaires? Car les foci pourraient d'abord se former et converger vers les nucléoles, ou bien, ils pourraient résulter de la désintégration des amas nucléolaires. Cette dernière explication semble plus probable pour deux raisons. D'une part, le changement de la morphologie nucléaire de cellules (probablement en cours d'apoptose) contenant les foci indique un stade avancé du traitement, alors que les inhibitions chimiques, qui sont généralement restreintes à des cinétiques où la mort n'est pas entamée, n'ont jamais révélé de foci. Le seul traitement (11 h) où l'apoptose était probablement en cours (**Figure S4**), n'a toutefois pas révélé de foci non plus; cela dit, il faut noter que c'est l'histone H2A qui a été marquée. D'autre part, le fait que le siRNA de PSMD14 n'ait permis d'apercevoir qu'une seule cellule présentant les amas d'histones sur 400 cellules, alors que celui de PSMB5 a permis l'observation d'une quinzaine, pourrait suggérer que les amas se fragmentent en foci. Car les deux conditions permettent l'observation de foci. Ainsi, si tel est le cas, qu'advient-il du niveau d'histones cellulaires après une telle durée d'inhibition? Une expérience similaire de siRNA a permis de montrer que le niveau total des histones H2B et H3 diminuaient considérablement (**Figure 27C**), tout comme celui de H2A (**Données non montrées**).

5. DISCUSSION

5.1. Retour sur la libération chromatinienne, la séquestration nucléolaire, puis le débarras des histones.

Cette étude a pu révéler que la déubiquitination de H2A-ub (K119), qui survient avant les 30 premières minutes (**Données non montrées**) de l'inhibition du protéasome, est positivement corrélée ($R^2 = 0,78$) à la sensibilité au Bortézomib. Elle s'est montrée être temps et dose dépendante (**Figure 12**), tel que reporté dans la littérature ²². Fait important, cette déubiquitination ne serait en réalité que la pointe de l'iceberg symbolisant la perturbation que subi la chromatine suite à ce traitement. En fait, il y a simultanément une importante baisse des niveaux d'histones canoniques sur la chromatine (**Figure 13**), ce qui en suggère un remodelage conséquent; on voit parallèlement un enrichissement d'histones (H2A) dans le surnageant. Cette baisse se maintient d'ailleurs sur au moins 8 h, pour ensuite s'atténuer. Cela semble dénoter un découplage majeur des histones et de l'ADN. On remarque ensuite par immunofluorescence, l'apparition irréversible d'amas d'histones solubles dans les nucléoles de cellules sensibles cancéreuses et primaires (**Figure 14, 15 et 18-21**). Ces amas sont reproduits par divers inhibiteurs du protéasome et par siRNA d'enzymes protéasomales (**Figure 16 et 17**). Les résultats suggèrent que celle-ci se ferait dans des cellules en phase S (**Figure 23 et 24**); il semblerait toutefois que l'inhibition doive débiter avec l'interphase G1/S (**Figure 25**). D'ailleurs, l'apparition de ces amas est temps-dépendante (**Figure 14 et S4**). Ceux-ci se maintiennent d'ailleurs jusqu'à la mort (**Figure S4**). Sans en avoir maîtrisé la cinétique détaillée, on a montré qu'en fait, ces amas se fragmentent ultimement avant ou pendant la mort, et que le niveau total d'histones canoniques baisse considérablement (**Figure 27**). De plus, au moins un type d'histone serait ubiquitiné à ce moment (**Figure 27A**). Par ailleurs, ce phénomène serait évité par la surexpression d'ubiquitine sauvage, et il serait grandement amoindri par une supplémentation en acides aminés (baisse de ~ 84%) (**Figure 26 et Tableau S1**). D'autres traitements comme l'inhibition de la traduction, le sevrage (**Données non montrées**), l'inhibition de l'ATPase p97 ainsi que l'inhibition de CDK2 et de MEK1/2 ont également empêché l'apparition du phénomène (**Figure 24**). Aussi, il a été montré que la translocation nucléolaire d'histones serait un mécanisme exploité par la cellule lorsqu'une grande quantité d'histones s'accumule dans le nucléoplasme (**Figure 22A**). Enfin, un des résultats obtenus peut porter à

croire que cette accumulation nucléolaire pourrait causer la mort cellulaire (**Figure 22B**); cela devra d'ailleurs être investigué dans le cadre de la finalisation de ce projet.

5.2. La déubiquitination de H2A-ub (K119) n'est pas exclusive à l'inhibition du protéasome.

En fait, plusieurs types de traitements générant un important stress cellulaire induisent pareille déubiquitination de H2A-ub (K119). Le choc thermique et l'inhibition du protéasome sont probablement les plus connus, mais il y a aussi l'exposition à des métaux comme l'arsenite et le cadmium; l'inhibition de l'enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) produit également le même effet ²². Il y aurait également l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène et le méthyl méthanesulfonate (MMS) ³⁸. En réalité, toutes les formes d'histones ubiquitinées baisseraient, y compris H2A K118 ³⁸, H2B K120 et le variant H2A-Z ²², mais la majorité du signal nucléaire d'ubiquitine (**Figure S2**) est attribuable à H2A K119, qui serait lui, éventuellement déplété. Il a été montré que des cellules HeLa exprimant un double mutant (K118 et K119) de H2A ne pouvant être ubiquitiné sur ces deux lysines, font preuve d'une viabilité légèrement plus faible à la suite d'un choc thermique. Il serait donc intrigant d'étudier le comportement de la chromatine, et la potentielle apparition d'amas d'histones dans le cadre de ces traitements, ainsi que pour un mutant de K119 dans le cadre de l'inhibition du protéasome. Il semble toutefois peu probable que les histones s'accumulent, et ce malgré un éventuel remodelage de la chromatine aussi important soit-il. Du moins, si l'activité protéasomale n'est pas compromise par ces traitements. La déubiquitination de H2A-ub (K119), qui est donc l'un des événements les plus spectaculaires et les plus rapides à survenir dans la cellule après l'inhibition du protéasome, est depuis plus de 20 ans considérée comme une signature moléculaire de ce traitement anticancer. Cela dit, sa signification biologique n'a pas été vraiment caractérisée à ma connaissance. Ce qui a ainsi légitimé mon intérêt pour cet événement, d'autant plus que la corrélation positive qui liait son intensité à la sensibilité cellulaire pouvait donner lieu à une interprétation paradoxale et contre-intuitive. En effet, comment une réponse cellulaire qui est supposée remédier aux effets causés par un stress, peut au contraire y sensibiliser la cellule?

5.3. Transcrire à grande échelle pour rétablir l'homéostasie cellulaire, mais à quel prix?

On sait que lorsque que la cellule est exposée à un sévère stress pouvant compromettre son homéostasie et sa viabilité, celle-ci doit forcément pouvoir s'adapter pour se rétablir et survivre. Ainsi, l'une des transformations les plus dramatiques s'opère au niveau transcriptionnel, où un grand nombre de gènes sont réprimés alors que d'autres sont pour l'occasion fortement activés³⁹. Ainsi, l'état de la chromatine passe de répressif à permissif, notamment par le retrait de marques épigénétiques associées aux histones comme H2A-ub (K119)⁴⁰. La première étape du projet a donc consisté à montrer qu'en réalité, un important remodelage de la chromatine semble se produire de façon concomitante à cette déubiquitination, ce qui n'avait pas été reporté dans la littérature. Il serait tout de même intéressant de vérifier l'ordre de survenue de ces deux événements. Si ceux-ci se font effectivement dans le cadre d'une réponse transcriptionnelle, le plus probable est que la déubiquitination fasse partie des premières réactions ayant lieu sur la chromatine pour favoriser sa relaxation et l'accessibilité subséquente de la machinerie de remodelage et transcriptionnelle. Cela mènerait alors à l'éviction des histones. D'ailleurs, la déubiquitinase la mieux caractérisée pour H2A-ub (K119) est BAP1 dont la possible implication serait forcément intéressante à investiguer dans ce contexte²⁸. Qu'advierait-il donc après l'inhibition du protéasome dans des cellules cancéreuses où ce suppresseur tumoral bien établi est muté? Est-ce qu'il y aurait malgré tout déubiquitination de H2A-ub (K119) par d'autres DUBs? Sinon, pourrait-il y avoir remodelage malgré tout? Il est intéressant de noter qu'une autre marque associée à l'expression génique, l'acétylation des histones, est enrichie suite à l'inhibition du protéasome⁴¹, comme c'est d'ailleurs le cas suite à d'autres types de stress³⁸. Cela dit, ces résultats ont été montrés plusieurs heures à la suite des traitements, ce qui n'exclut pas que cela se fasse au même moment que la déubiquitination dans le cadre de l'inhibition du protéasome. À la lumière de ces éléments, se pourrait-il que l'effet synergique exercé par l'inhibition du protéasome et l'inhibition des désacétylases d'histones (HDAC)⁴¹ soit le résultat d'un remodelage plus important de la chromatine, et donc d'une plus grande quantité d'histones potentiellement toxiques libérées? Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition des HDACs favorise une baisse protéasome-dépendante des niveaux d'histones à la suite d'un dommage à l'ADN⁴². Or, dans le contexte de l'inhibition du protéasome comme seul traitement, la libération d'une

quantité très importante d'histones, comme en témoigne la chute drastique du niveau de H2A sur la chromatine, ne permet pas pour autant leur dégradation.

5.4. Histones et ADN : découplés malgré eux.

Fait intrigant, la période pendant laquelle les niveaux de H2A sont très faibles sur la chromatine est prolongée (au moins 8 h). Pour une ou plusieurs raisons, la chromatine ne se reformerait visiblement pas après la baisse initiale des niveaux d'histones. Cela favoriserait donc le maintien dans le nucléoplasme d'une population abondante d'histones pouvant exercer à sa guise des effets cytotoxiques et potentiellement mortels; le rôle des chaperonnes, lesquelles peuvent représenter un facteur limitant, sera considéré plus loin. Mais pourquoi et comment un tel découplage entre histones et ADN se produirait-il? C'est là qu'on réalise à quel point il est difficile d'étudier les conséquences de l'inhibition du protéasome, un régulateur clé de l'homéostasie, omniprésent dans la régulation de la majorité des processus cellulaires. C'est ce qui explique probablement l'absence de consensus dans la littérature quant au mécanisme de mort effectif. En effet, il semble ardu de décortiquer les événements moléculaires au point d'en isoler un et de lui attribuer une responsabilité. On peut toutefois imaginer un des innombrables scénarios plausibles pour expliquer la perturbation de l'équilibre chromatinien. Imaginons que les histones relâchées de la chromatine n'aient pas pu subir un marquage (MPT) leur permettant d'être réincorporées dans la chromatine. En d'autres termes, le niveau d'une enzyme agissant comme « écrivain » par exemple, pourrait être abaissé en raison de l'accumulation d'une E3 ligase promouvant sa dégradation, ou d'une protéine inhibitrice. Le même scénario pourrait s'appliquer à une enzyme de type « effaceur », qui devrait enlever une modification portée par l'histone pour qu'elle puisse être incorporée. Ces considérations sont tout à fait pertinentes sachant par exemple que la mono-méthylation de H4K20 a lieu suite à sa déposition au sein de la chromatine ⁴³, tout comme l'acétylation de H3K56 se fait avant l'incorporation ⁴⁴. D'ailleurs il semblait tout à fait utile de tester la présence de telles marques d'histones dans les nucléoles afin de tenter d'obtenir un indice quant aux origines des histones nucléolaires. N'ayant testé que la présence de H3K4me₂, l'enrichissement dans les nucléoles n'a pas été observé (**Données non montrées**), quoique la spécificité de l'anticorps n'ait pas été démontrée par IF.

5.5. Nouvelles histones et nouvel ADN : couplage impossible.

En fait, les résultats obtenus suggèrent que les histones néosynthétisées pourraient également contribuer à l'apparition des amas nucléolaires d'histones, qui se manifestent probablement en phase S. Une expérience qui pourrait faire suite à celle de synchronisation en G1/S, serait de synchroniser et de relâcher les cellules à différents moments du cycle pour démontrer sans équivoque le stade d'apparition du phénomène. Il serait attendu qu'une synchronisation en phase M (au Nocodazole), suivie d'une période de relâche dans du milieu normal, puis de l'inhibition subséquente du protéasome quelque temps avant l'interphase G1/S puisse montrer le phénomène. Il a d'ailleurs été remarqué à maintes reprises que le phénomène apparaît souvent dans des doublets de cellules semblant provenir de la même cellule mère, et ce en raison de la similitude morphologique, de la grande proximité et surtout de leur orientation mutuelle (parallèle). Ainsi, une grande quantité d'histones néosynthétisées en phase S pourrait se combiner à l'abondante population provenant du remodelage de la chromatine, ce qui fortifierait l'hypothèse de l'implication des histones libres dans le déclenchement de l'apoptose; il s'agirait là d'une quantité impressionnante d'histones. Cela pourrait d'autre part expliquer l'apparition plutôt tardive des amas, qu'on aurait pu s'attendre à voir assez rapidement après la baisse des niveaux chromatiniens. Dans ce sens, la contribution des histones néosynthétisées serait peut-être nécessaire à l'apparition du signal nucléolaire. Car il semble peu probable que la cinétique de diffusion et de convergence des histones provenant de la chromatine vers les nucléoles puisse expliquer ce délai. Quoi qu'il ne soit pas inimaginable qu'un certain ralentissement de la diffusion, causé par des interactions non spécifiques entre les histones et l'ADN ou l'ARN, se produise. En effet, une faible variation de la stœchiométrie entre l'ADN et les histones est connue pour causer des agrégations non-structurées²³. Dans ce cas, une des questions à se poser est la suivante : jusqu'à quel point les interactions entre les histones libres et l'ADN ou l'ARN peuvent être fortes? Car il faut se dire que l'isolation de la chromatine comportait des étapes de lavage qui auraient pu introduire un biais dans l'analyse. Si jamais les histones sont impliquées dans des interactions qui vont effectivement retarder leur diffusion *in vivo*, un bon lavage de la chromatine ne permettrait pas de visualiser ce phénomène. D'ailleurs, un lavage moins efficace pourrait expliquer les baisses moins drastiques observées pour H3 et H2B; il est à noter que le protocole de purification avait été modifié pour cette expérience. Aussi, on voit que

l'enrichissement des histones dans le surnageant n'apparaît que vers 6 h. Le surnageant n'ayant été analysé qu'une seule fois, il se peut tout simplement qu'une trop faible quantité de protéines ait été analysée. Sinon, ce résultat pourrait corroborer l'hypothèse des interactions qui tiendraient les histones occupées pendant un certain temps. Une portion des histones serait emprisonnée dans la chromatine puis subséquemment perdue lors des lavages. Enfin, l'enrichissement tardif des histones dans le surnageant pourrait encore une fois avoir nécessité la contribution d'histones néosynthétisées. Il est évident qu'une expérience d'imagerie directe serait bénéfique à bien des égards, ne serait-ce que pour mieux cerner la cinétique et le comportement des histones. On pourrait en théorie utiliser une lignée exprimant une histone fluorescente de façon constitutive ainsi qu'une autre forme fluorescente de cette histone, qui serait elle, inductible pour observer le comportement des deux populations d'histones, la néosynthétisée et la recyclée. On pourrait même comparer par immunobuvardage leur abondance relative, du moment qu'on utilise un même anticorps : par exemple un anti-H2A pour deux types de H2A (de taille différente).

D'autres expériences pourraient répondre à la question de l'origine des histones nucléolaires. L'inhibition de la traduction est un traitement trop généralisé pour pouvoir tirer de conclusion, n'empêche qu'il semblerait que la synthèse d'une ou plusieurs protéines seraient impliqués dans l'apparition du phénomène. Ce pourrait tout simplement être la synthèse d'histones de phase S qui est empêchée de contribuer au pool d'histones provenant du remodelage initial. De façon plus rigoureuse, CDK2 et MEK1/2, qui sont deux kinases importantes pour la transition G1/S semblent requises pour que le phénomène apparaisse. Il est à noter que ce ne sont pas tous les inhibiteurs de CDKs (ni ceux de p97) qui ont permis d'éviter l'apparition du phénomène. Ce qui peut être dû à la différence d'affinité de chacun d'eux envers leurs cibles. CDK2, dans le contexte de son association avec la cycline E, est d'ailleurs activée indirectement par MEK1/2. Elle procède ensuite à la phosphorylation activatrice d'une protéine (NPAT) essentielle à l'entrée en phase S⁴⁵; celle-ci stimule en fait la transcription des gènes d'histones canoniques. Il serait donc pertinent pour valider ces résultats de dépléter CDK2 génétiquement, et éventuellement NPAT; il serait attendu que la déplétion de la cycline E puisse reproduire le même effet que celle de CDK2. Un autre élément clé de la production d'histones en phase S, est SLBP2 qui est une protéine requise pour la traduction des ARNm d'histones⁴⁵, et dont la

déplétion pourrait également apporter des réponses. Enfin, après avoir validé la conservation du mécanisme chez la levure, on pourrait s'attendre à ce que la synchronisation de levures en G1 (par le facteur α) ne démontre pas d'accumulation d'histones suite à l'inhibition du protéasome. D'ailleurs, il est important de savoir que l'inhibition du protéasome ne cause pas la mort de cellules quiescentes ⁴⁶, tout comme la plupart des traitements anticancer. On s'attendrait à ce que le phénomène d'accumulation d'histones n'apparaisse pas si on considère que les histones de phase S contribuent au signal d'histones nucléolaires.

Tout ce questionnement concernant la phase S n'aurait pas été possible hors du contexte de l'inhibition du protéasome. Car la production d'histones est extrêmement bien régulée dans les conditions physiologiques, et ce à tous les échelons du dogme central de la biologie moléculaire. Y aurait-il alors eu un découplage dans la régulation de la réplication? Si c'est le cas, la synthèse de l'ADN ne serait plus coordonnée à la synthèse d'histones. Il semblerait en tout cas d'après l'expérience de synchronisation, qu'une ou plusieurs protéines importantes dans l'apparition du phénomène devrait s'accumuler suffisamment avant la transition G1/S. On sait par exemple que le niveau de certaines protéines comme Cdt1, qui est probablement le facteur plus important pour la détermination des origines de réplication en vue de l'initiation de la réplication, doit être abaissé en début de phase S ⁴⁷. Cela a pour but d'éviter la réinitiation de la réplication.

Il serait intéressant de voir si du stress réplicatif est généré, en vérifiant l'accumulation par immunofluorescence ou immunobuvardage de marqueurs comme RPA. Il serait tout aussi pertinent de faire un suivi par FACS pour observer l'évolution des sous-populations cellulaires. Plusieurs études montrent une perturbation logique du cycle cellulaire, plus précisément un arrêt en G2/M (données d'une collègue – après 24 h). La levure *S. cerevisiae* possédant des protéases protéasomales mutantes connaît un arrêt en G2/métaphase ⁴⁸. Il a d'ailleurs été prouvé que la réplication et la transcription baissent considérablement après l'inhibition du protéasome, atteignant des niveaux minimums lorsque la grande majorité de l'ubiquitine est enlevée des histones. Ce qui revient à pointer du doigt une potentielle implication des histones libres, qui sont connues pour interférer avec les machineries agissant sur la chromatine ^{49,50}. Aussi, de hauts niveaux d'expression d'histones chez la levure cause un sévère défaut de croissance ⁵¹. Il est intéressant de noter que l'apparition des histones, initialement dans $\sim 15\%$ des cellules, se généralise à la grande majorité d'entre elle vers 11h, ce qui peut indiquer une synchronisation

avant M, en raison justement d'une perturbation au niveau de la réplication. Pour toutes les raisons mentionnées ci-haut, il semble peu probable que les cellules se divisent, auquel cas le signal d'histones serait réparti sur les deux cellules filles et donc amoindri, ce qui ne semble généralement pas le cas. En fait, un traitement au BRDU visant à vérifier si les amas d'histones apparaissent dans des cellules en prolifération n'a pas permis de les observer du tout, vraisemblablement en raison du traitement acide visant à dénaturer l'ADN. Le marquage de PCNA n'a pas été sans équivoque. Car d'une part, les cellules avec PCNA ne montrent pas toutes le phénomène. Probablement qu'elles sont à des étapes distinctes de la phase S (précoce, intermédiaire, et tardive), et que c'est à partir de l'une d'elle que le phénomène apparaît; en effet le signal de PCNA diffère selon les stades ⁵².

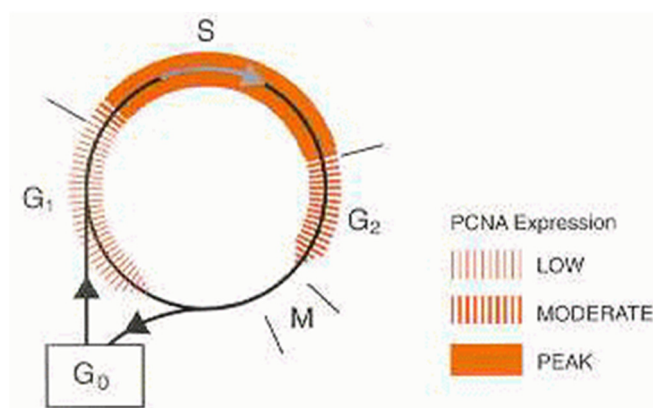


Figure 28. Évolution des niveaux de PCNA au cours du cycle cellulaire. ⁵² La protéine PCNA joue un rôle majeur au cours de la réplication de l'ADN. Ses niveaux fluctuent au cours du cycle cellulaire de la façon illustrée ici, atteignant un niveau maximal en phase S.

Aussi, il se pourrait que les cellules sans amas d'histones étaient en G1/S au moment de l'inhibition, ce qui n'a pas permis l'apparition. D'autre part, une cellule avec le phénomène n'est pas enrichie en PCNA. Elle est probablement à un stade où le niveau de PCNA baisse, par exemple en G2. Le fait que PCNA soit synonyme de réplication, porterait à croire qu'une partie des histones libres sert à former la nouvelle chromatine. Ce qui pourrait expliquer qu'une des deux cellules avec le phénomène a clairement un signal d'histones beaucoup plus faible (moins intense et de moindre surface). Cela dit, même s'il y a réplication, on n'a aucun indice sur sa complétion.

5.6. Histones dénudées et abandonnées dans le nucléoplasme : était-ce un bon choix de se relocaliser au sein d'un senseur de stress majeur?

L'une des questions les plus importantes soulevées par ce projet est la suivante : comment et pourquoi ces histones convergent vers les nucléoles? Considérons les histones provenant du remodelage initial de la chromatine. Il est reporté que la transcription se ferait généralement au centre du noyau ⁵³, là où sont d'ailleurs situés les nucléoles. Ce qui pourrait augmenter la probabilité que les histones s'y retrouvent. Le simple fait que les nucléoles soient les plus grands compartiments nucléaires, de surcroît non-membranaires, et qu'ils constituent un micro-environnement distinct, pourrait en partie expliquer qu'il fasse office de puits nucléaire. En effet, plusieurs études ont montré l'accumulation de diverses protéines dans les nucléoles suite à différents stress.

Mais pourquoi donc y demeurer? Vraisemblablement en raison d'une forte affinité pour un ou plusieurs types macromoléculaires quelconques. Il peut s'agir de l'ADNr, de l'ARNr ou de chaperonnes nucléolaires. On sait, comme mentionné plus tôt, que la majorité des ARN cellulaires proviennent des ribosomes ³². Aussi, les nucléoles abritent plusieurs types de chaperonnes, dont certaines sont dédiées aux histones ⁵⁴; la nucléoline est d'ailleurs l'une des protéines nucléolaires les plus abondantes ⁵⁵. Car il serait étonnant de penser que cette grande densité de charges positives, représentée par les histones, ne soit pas contrebalancée par une certaine densité de charges négatives. Comme mentionné, les nucléoles sont un haut lieu de transcription, et il se pourrait très bien que les histones y soient en interaction avec les quelques centaines de répétitions d'ADNr ou avec les innombrables ARN qui y transitent. Un traitement à la DNase et à la RNase respectivement, pourrait être révélateur de ces éventuelles interactions, si jamais le traitement ne permet plus de visualiser les amas. En d'autres termes, le support (ADN ou ARN) étant dégradé, les histones pourraient alors diffuser, diluant ainsi le signal fluorescent dans les nucléoles. Le traitement au tampon CSK a fait disparaître ce signal nucléolaire d'histones, sans pour autant perturber le signal émanant de la fibrillarine. Ceci suggère donc que l'intégrité nucléolaire est maintenue, mais que les histones n'interagissent pas fermement avec une structure quelconque. Qu'en serait-il des chaperonnes? Car c'est certainement l'une des questions les plus pertinentes. Supposons que celles habituellement affectées à l'escorte des histones soient saturées par cette profusion d'histones libres. Les

chaperonnes nucléolaires pourraient être sacrifiées, ce qui compromettrait par le fait même leurs fonctions régulières. La nucléophosmine a par exemple une multitude d'autres fonctions, comme dans la biogénèse des ribosomes et dans la régulation de la voie ARF/p53⁵⁴. Un argument de taille quant à une potentielle implication des chaperonnes nucléolaires est incarné par ce qui se produit durant l'embryogénèse et la spermatogénèse. La demande en histones est plus que jamais importante dans une cellule eucaryote. Ainsi, chez la drosophile par exemple, celles-ci sont entreposées dans l'oocyte afin d'approvisionner la demande lors des milliers de divisions successives; des complexes entre les chaperonnes N1–N2 et H3–H4, ainsi qu'entre la nucléoplasmine et H2A–H2B sont alors formés⁴⁵. Autre fait, les oocytes sont dotés de nucléoles géants, ce qui est probablement dû à la très forte demande en synthèse protéique, notamment en histones, et donc en ribosomes. Ce qui n'empêche pas qu'ils puissent agir comme site d'entreposage d'histones. Ce modèle pourrait en tout cas être intéressant en termes de rendement pour faire des isolations de nucléoles et des immunoprécipitations⁵⁶. Par ailleurs, les protéines de choc thermique HSP70 et HSP 90 agissent également comme chaperonnes d'histones⁵⁴. HSP70 semble justement enrichie dans les nucléoles à la suite de l'inhibition du protéasome, mais de façon beaucoup moins importante (**Figure 11**). Quoi qu'on ne puisse pas comparer l'intensité produite par deux anticorps différents.

5.7. Intoxication aux histones?

Depuis quelques années, le nucléole s'est révélé être un senseur de stress majeur. Celui-ci y répond notamment en relâchant des facteurs nucléolaires qui médient l'activation de voies signalétiques affectées à l'arrêt du cycle cellulaire, au vieillissement, à l'autophagie, à l'apoptose, à la différenciation cellulaire ou à des changements métaboliques⁵⁷. D'autre part, des protéines nucléaires reliées à la réponse au stress, comme Hsp70, PML, p53, MDM2 s'accumulent dans les nucléoles suite à l'inhibition du protéasome. Plusieurs se constituent d'ailleurs en agrésomes nucléolaires. Que ce soient des protéines du cycle cellulaire (CDK, cycline, p21, p27, Rb), de la réponse au stress (ATM, Chk1, p53), de la transcription, de la transduction signalétique, de l'UPS, des chaperonnes ou des corps PML⁵⁸. Plusieurs études montrent que le désordre nucléolaire serait un mécanisme conservé menant à la mort cellulaire dans le contexte développemental, et ce du moins dans certains types cellulaires d'organismes

multicellulaires. Ainsi, la perte de l'intégrité structurelle ou fonctionnelle des nucléoles peut provoquer la mort des cellules eucaryotes, incluant les cancéreuses^{57, 59}. Dans ce cas, il est tout à fait imaginable que les histones accumulées dans les nucléoles puissent générer une toxicité locale en entravant une ou des fonctions nucléolaires, puis déclencher l'apoptose. Il serait intéressant d'utiliser des histones où les NLOS seraient délétés, pour voir si la mort se ferait malgré tout aussi vite lorsqu'elles s'accumulent dans le nucléoplasme. L'exemple le plus probant quant à la cytotoxicité des histones concerne les spermatides de souris qui, en cas de déféctuosité d'une sous-population de protéasomes dédiées à la dégradation d'histones, mourront par apoptose suite à une forte accumulation d'histones⁴².

Probablement que plusieurs événements peuvent exercer des effets cumulatifs ou synergiques causant le déclenchement de la mort à la suite de l'inhibition du protéasome. L'expérience clé pour pouvoir inculper les histones dans l'induction de la mort consisterait à abaisser leur niveau protéique avant le traitement. S'il y a atténuation de la mort, cela constituerait une belle démonstration de leur implication. La déplétion par siRNA ou la délétion génique n'est malheureusement pas une stratégie envisageable chez les métazoaires, dont l'Humain qui possède de multiples copies pour chaque gène d'histones⁴⁵. Il y aurait approximativement 75 ARNm distincts d'histones canoniques. La déplétion des protéines NPAT ou SLBP2, dont il a été discuté plus haut, pourrait apporter une réponse chez l'Humain. Sinon, chez la levure, il y a possibilité de dépléter une des deux copies de chaque gène d'histones; cette opération est une pratique assez courante n'induisant pas la léthalité. La synchronisation en G1 permettrait d'étudier une contribution hypothétique de chacune des deux populations d'histones à la mort.

5.8. La translocation nucléolaire : un mécanisme de protection contre le surplus d'histones?

Le seul indice relatif à la potentielle toxicité des histones en excès a été obtenu lors de l'inhibition du protéasome de cellules surexprimant transitoirement une histone exogène (H2A-GFP). La population surexprimant l'histone contenait ~84% moins de cellules présentant les amas d'histones endogènes (H3); il serait d'ailleurs intéressant de voir si les seules à les présenter n'auraient internalisé que peu ou pas de plasmides du tout. L'interprétation la plus

simple est qu'un effet cumulatif des histones endogènes et des histones exogènes accumulées dans les nucléoles aurait pu causer une sévère toxicité, si forte que de la mort aurait eu lieu, ce qui expliquerait cette impressionnante baisse. Toutefois, une expérience rigoureuse devrait être réalisée, où un suivi de l'apparition des deux populations d'histones dans les nucléoles (imagerie directe, immunofluorescence ou immunobuvardage) serait fait. Et puis plus important encore, l'apparition de la mort devrait être observée et mesurée, par marquage de la caspase-3 activée et par essai de viabilité MTT, respectivement. Car, il se pourrait aussi que le phénomène ne se soit tout simplement pas manifesté dans des cellules surexprimant H2A-GFP. Par exemple, sachant que la surexpression protéique peut favoriser la dénaturation⁶⁰, et que le protéasome est inhibé, les cellules pourraient être d'autant plus sensibilisées. Mais si c'est le cas, pourquoi le contrôle GFP serait épargné? Est-ce que H2A-GFP pourrait être plus problématique? Aurait-elle une plus grande propension à s'agrèger que la GFP seule? Une autre possibilité, serait que l'excès de H2A-GFP dans le nucléoplasme puisse interférer avec le remodelage de la chromatine qui a normalement lieu après l'inhibition du protéasome? Si c'est le cas, la déubiquitination de H2A-ub (K119) et la baisse des histones sur la chromatine seraient amoindries. Enfin, une autre interprétation possible serait que les histones surexprimées aient saturé les nucléoles avant l'avènement des endogènes. Il serait d'ailleurs très intéressant d'avoir une idée du volume nucléolaire moyen d'une cellule et donc sa capacité. Car il doit très probablement déborder à un moment donné. Ce qui mène à la réflexion suivante : quand bien même l'accumulation nucléolaire serait un mécanisme de protection du génome ou de la cellule, si sa capacité est excédée, il pourrait y avoir intoxication. Quoiqu'il en soit, l'inapparition des amas d'histones endogènes en présence d'histones surexprimées n'exclurait en aucun cas un effet délétère plus élevé sur ces cellules. Une expérience bien réalisée serait complémentaire à celle de la déplétion des histones, dans le sens où elle pourrait apporter des éléments de réponses quant à la capacité d'un grand excès d'histones à déclencher la mort.

On pourrait questionner le choix du contrôle négatif, qui est la GFP. Car étant donné le signal de localisation nucléaire des histones, leur concentration nucléaire est telle que la probabilité de l'accumulation nucléolaire est plus élevée. Toutefois, il a été démontré que les histones en excès s'accumulent dans les nucléoles^{61,62} et que H2B (la seule étudiée) contient un signal de localisation nucléolaire au sein de son signal de localisation nucléaire⁶¹. Les cellules

transfectées stablement et exprimant des quantités comparables à celles physiologiques ne montre pas cette translocation. Aussi, il a été montré que H2B interagit avec l'ARNr et la matrice nucléaire ⁶¹. Ce qui porte à croire que cela pourrait refléter un mécanisme physiologique, pouvant même survenir continuellement dans la cellule pour entreposer transitoirement les histones (liées ou non aux chaperonnes). Cela pourrait être intéressant à investiguer dans le cadre de cellules cancéreuses où des chaperonnes d'histones sont mutées, tout comme dans le cadre de l'embryogénèse, où d'énormes quantités d'histones sont entreposées comme discuté plus haut. Une simple expérience consisterait à synchroniser des cellules en phase G1 et en phase S pour isoler les nucléoles et y comparer les niveaux d'histones, sans qu'il y ait eu un quelconque traitement; cela permettrait de voir si elles sont entreposées ne serait qu'en petites quantités.

En somme, la surexpression d'histones dans des cellules où les protéasomes sont fonctionnels semble être un bon système pour étudier le rôle du protéasome dans l'évitement de leur toxicité. Est-ce que l'autophagie peut permettre de se débarrasser des histones? Est-ce que l'excès d'histones est exportable vers le cytoplasme? Car l'inhibition du protéasome pourrait bien causer une perturbation du transport nucléo-cytoplasmique, ce qui causerait la séquestration nucléaire des histones. La cellule peut-elle déployer assez de chaperonnes et de protéines de choc thermique pour les neutraliser? Car il a été montré que le stress réplicatif chez la levure peut causer une rapide saturation des chaperonnes d'histones ⁵¹. Il serait intéressant d'exprimer une histone dépourvue de signal de localisation nucléaire puis d'inhiber le protéasome pour voir s'il peut y avoir colocalisation avec des marqueurs d'autophagie ou s'il peut y avoir sécrétion.

5.9. La dégradation des histones : une exclusivité du protéasome?

Chez la levure, les histones démontrent une demi-vie de ~30 min ²⁴. La dégradation de leur forme libre par le protéasome est bien établie, et ce dans divers contextes. Cela a été montré pour les histones oxydées ⁶³, lors du dommage à l'ADN ou dans le contexte physiologique, que ce soit lors de la transcription, la réplication, la mitose ou l'embryogénèse. Toutefois, il n'y a presque pas d'évidence d'une poly-ubiquitination à but dégradatif survenant sur les histones canoniques chez l'Humain. Probablement que le seul élément de réponse provient de l'étude ayant montré que HUWE1, qui est l'homologue humain de la E3 ligase Tom1 chez la levure, ubiquitinerait les histones canoniques *in vitro* ⁶⁴. La polyubiquitination a justement été montrée

chez la levure où elle serait apposée entre autres par Tom1²⁶. Sinon les implications de la mono et de la di-ubiquitination⁶⁵, de l'acétylation⁴² et de la phosphorylation⁶⁶ ont été mise de l'avant. La monoubiquitination pouvant mener à la dégradation dans le lysosome, il a été proposé que les histones solubles soient justement dégradables par voie d'autophagie médiée par les chaperonnes. Il est également suggéré qu'elles puissent être dégradées par des protéases non lysosomales et non protéasomales⁶⁷.

5.10. Mieux comprendre la régulation de l'ubiquitination dégradative des histones.

Dans le cadre de notre projet, on a eu des indications qu'au moins une partie des histones pourrait être ubiquitinée avant ou pendant la mort. Il faut savoir que l'ubiquitine libre devient presque indétectable après les premières heures d'inhibition²². Il n'est pas impensable que l'ubiquitine puisse subir une importante redistribution à un moment donné. Les protéines polyubiquitinées peuvent être éventuellement dégradées par autophagie ou bien une accumulation de DUBs peut libérer de l'ubiquitine conjuguée. Il est important de savoir que l'ubiquitine elle-même est une protéine inductible par choc thermique²² et donc vraisemblablement par l'inhibition du protéasome aussi. Qui sait si une disponibilité plus précoce d'ubiquitine libre aurait pu permettre à la cellule de se débarrasser des amas d'histones? Car on pourrait se demander si leur possible ubiquitination ait pu avoir un rôle dans leur désintégration.

Ce qui pourrait être extrêmement prometteur si l'ubiquitination d'une ou de plusieurs des histones est validée, c'est qu'on aurait un superbe essai in vivo pour étudier l'ubiquitination des histones par fluorescence, grâce à la présence d'histones et d'ubiquitine fluorescentes. Cela pourrait permettre d'identifier des sites d'ubiquitination et des enzymes (E2, E3 et DUBs) régulant leur ubiquitination. On pourrait théoriquement préparer un criblage par siRNA (ou par CRISPR) des E2 et des E3 ligases, pour identifier les enzymes dont la déplétion diminuerait ou ferait disparaître le signal de colocalisation entre l'ubiquitine et les histones. À l'opposé, en surexprimant les DUBs à tour de rôle, on pourrait identifier celle ou celles dont la forte présence diminuerait ou ferait disparaître ce signal. La même stratégie s'appliquerait à d'autres formes modifiées d'histones si elles sont assez fortement représentées parmi les histones nucléolaires.

Par ailleurs on pourrait exprimer des mutants ponctuels de lysines pour trouver des sites d'ubiquitination d'histones nécessaires à l'apparition du signal. Ce système d'histones nucléolaires pourrait donc recéler toute une gamme de criblages à usage mécanistique dont le but serait de mieux comprendre la régulation de l'ubiquitination des histones. Ce qui pourrait ultimement être utile en oncologie et dans la physio-pathologie du développement et de la fertilité.

5.11. Fragmentation des amas d'histones : vers une expulsion du noyau ?

Il serait intéressant de faire un fractionnement pour isoler les noyaux avant et après la vraisemblable désintégration des amas d'histones, pour voir si elles s'enrichissent dans le cytoplasme. Étant donné la baisse de leur niveau total après une certaine durée d'inhibition du protéasome, il faudrait non seulement faire une analyse spatio-temporelle de la dynamique des histones, mais aussi vérifier leur présence dans le milieu concentré. Car elles peuvent théoriquement être soit dégradées soit sécrétées. Leur sécrétion est très plausible, et ce pour plusieurs raisons. Malgré le fait qu'elles se logent au plus profond du noyau, les histones sont communément retrouvées dans le milieu extracellulaire ⁶⁸. Elles sont véhiculées dans des vésicules de type microvésicules, exosomes ou vésicules apoptotiques.

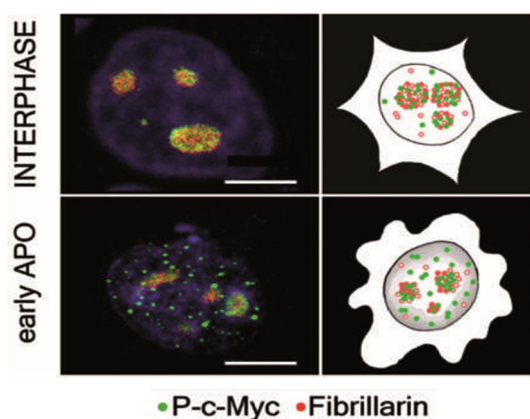


Figure 29. Redistribition des protéines résidant dans les nucléoles au cours de l'apoptose.⁷⁰ La redistribution spatiale de c-myc, qui se situe dans les nucléoles durant l'interphase, est visible en début d'apoptose, contrairement au marqueur nucléolaire fibrillarine. Les images de microscopie situées dans la partie gauche de la figure sont schématisées dans la partie droite.

Quoi qu'elles puissent agir de manières autocrine, paracrine ou endocrine, leurs fonctions biologiques extracellulaires ne sont pas très bien comprises. Il a été démontré qu'une élévation rapide de la sécrétion d'histones exosomales s'opère à la suite du choc thermique ⁶⁹. Par ailleurs, les histones et les HSPs font partie des protéines les plus abondantes dans les exosomes de cellules cancéreuses en condition normale ⁶⁸. Aussi, il a été montré que durant l'apoptose, les histones canoniques sont transloquées dans le cytoplasme, puis relâchées dans le milieu extracellulaire. Il est intéressant de noter qu'en début d'apoptose, les protéines nucléolaires subissent une redistribution qui pourrait expliquer la fragmentation des amas d'histones nucléolaires ⁷⁰.

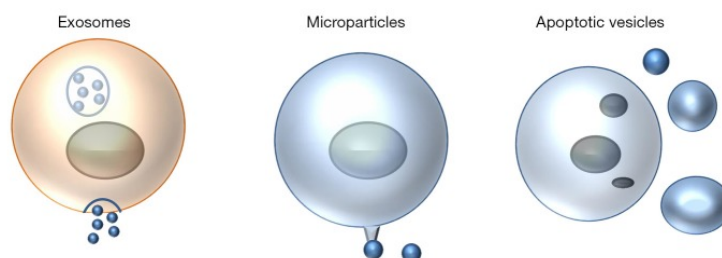


Figure 30. Types de vésicules sécrétoires dans lesquelles sont retrouvées les histones.⁶⁸ Les cellules mammifères et non-mammifères relâchent différents types de vésicules extracellulaires, et ce durant divers contextes. Ici, les trois plus importantes sont illustrées. Les exosomes en sont les plus petites, et elles sont générées intracellulairement au sein de corps multivésiculaires. Les vésicules apoptotiques en sont les plus grandes, et elles sont générées durant la fragmentation accompagnant l'apoptose. Enfin, les microvésicules sont quant à elles produites par bourgeonnement de la membrane extracellulaire.

Que ce soit pour cette raison ou que ce soit régulé, il serait intéressant de voir si ces histones subissent le même sort que celles qui demeurent sur la chromatine. De plus, elles pourraient également être sécrétées par deux autres mécanismes. En effet, il existe un mécanisme sécrétoire nommé MAPS, qui est complémentaire à la régulation protéostatique opérée par l'UPS ⁶⁰. Celui-ci pourrait, tout comme la sécrétion médiée par l'autophagie, qui régule également les protéines dénaturées, être impliqué dans une possible sécrétion d'histones.

5.12. Cellules cancéreuses vs cellules primaires

Si on considère que les histones de la phase S jouent un rôle déterminant dans la mort par inhibition du protéasome, ce modèle d'intoxication aux histones justifierait la plus grande sensibilité des cellules cancéreuses comparativement à des cellules quiescentes (sans réplication) et à des cellules non transformées (prolifération mieux régulée). D'autant plus que l'hyperploïdie qui caractérise une grande partie des cancers devrait en théorie être synonyme d'une plus grande quantité d'histones, ce qui devrait sensibiliser encore plus les cellules⁷¹. Cela dit, il a été très étonnant de voir que les cellules primaires utilisées ont montré le phénomène beaucoup plus rapidement que les cancéreuses; avant 3 h de traitement (comparé à 6 h). Une différence au niveau de la durée des phases du cycle cellulaire pourrait expliquer le décalage; dans ce cas, un cycle plus court serait attendu pour les cellules primaires. Sinon, il se peut que cela soit dû au fait que les nucléoles y sont moins nombreux et plus petits; ils seraient ainsi saturés plus vite. En effet, les noyaux de cellules mammifères primaires contiennent généralement un seul nucléole, alors que ceux des cellules cancéreuses tendent à en contenir plusieurs, de plus grande taille, ce qui est signe d'une plus forte prolifération⁵⁷. Si cette dernière interprétation est vraie, elle pourrait suggérer que seule la population d'histones provenant du remodelage initial de la chromatine est suffisante pour générer une assez forte densité de signal dans les nucléoles. Cela se ferait donc avant même qu'il n'y ait néosynthèse d'histones de phase S. Enfin, l'apparition plus précoce des amas d'histones dans les cellules primaires ne signifie pas qu'ils se maintiendront forcément, ni qu'ils induiront une mort plus rapide, si tel est le cas.

5.13. Inhiber la sous-unité catalytique du protéasome ou les DUBs de sa sous-unité régulatrice?

Concernant la différence obtenue par la déplétion des deux enzymes du protéasome, soit le fait qu'on ne voit qu'une cellule sur 500 qui manifeste le phénomène pour PSMD14 contre une quinzaine pour PSMB5. Si on considère qu'une meilleure déplétion devrait donner lieu à une plus grande proportion de cellules dans lesquelles ces amas d'histones apparaissent, on aurait dû obtenir un résultat opposé, vu que la déplétion de PSMD14 semble plus forte. En tout cas, PSMD14 induit des effets plus forts que PSMB5 comme on a pu le voir. Ce qui peut expliquer

la quasi absence de gros amas d'histones, qui se seraient peut-être déjà désintégrés. En somme, il semble que leur implication spatio-temporelle distincte dans le processus de dégradation protéasomale pourrait expliquer la différence. Leurs effets seraient ressentis de façon décalée. C'est-à-dire que si on attend plus longtemps, on pourrait peut-être obtenir des effets aussi forts pour PSMB5. Cette logique devrait également être appliquée aux co-traitements ayant évités ou amoindris l'apparition du phénomène. Il s'agirait de voir s'il apparaît plus tard. Sinon, il serait intéressant de remonter la cascade d'événements allant de la déubiquitination de H2A et la baisse du niveau d'histones chromatiniennes, jusqu'à une possible synthèse d'histones de phase S et à l'accumulation nucléolaire des histones, afin de voir où se fait l'évitement.

L'autre explication quant à la différence entre la déplétion des enzymes protéasomales serait que les DUBs du protéasome représentent de meilleures cibles à inhiber pour entraver son activité. Par exemple, l'inhibition de PSMD14 causerait un blocage de protéines étant sur le point de transiter vers la sous-unité catalytique, et ce en raison de l'encombrement causée par les chaînes d'ubiquitine. La délétion de USP14 et UCH37 causerait la destruction de l'ubiquitine qui resterait conjuguée à certaines protéines dégradées, ce qui atténuerait son recyclage. Par ailleurs, certaines protéines qui se lient au protéasome sont déubiquitinées sans pour autant être dégradées, ce qui suggère qu'elles joueraient un rôle additionnel. En effet, l'inhibition de la sous-unité catalytique qui est ciblée en clinique n'empêche pas la déubiquitination, ce qui permet au moins le recyclage de l'ubiquitine qui devient limitante dans toutes sortes de voies signalétiques dans ce contexte.

5.14. Modèle

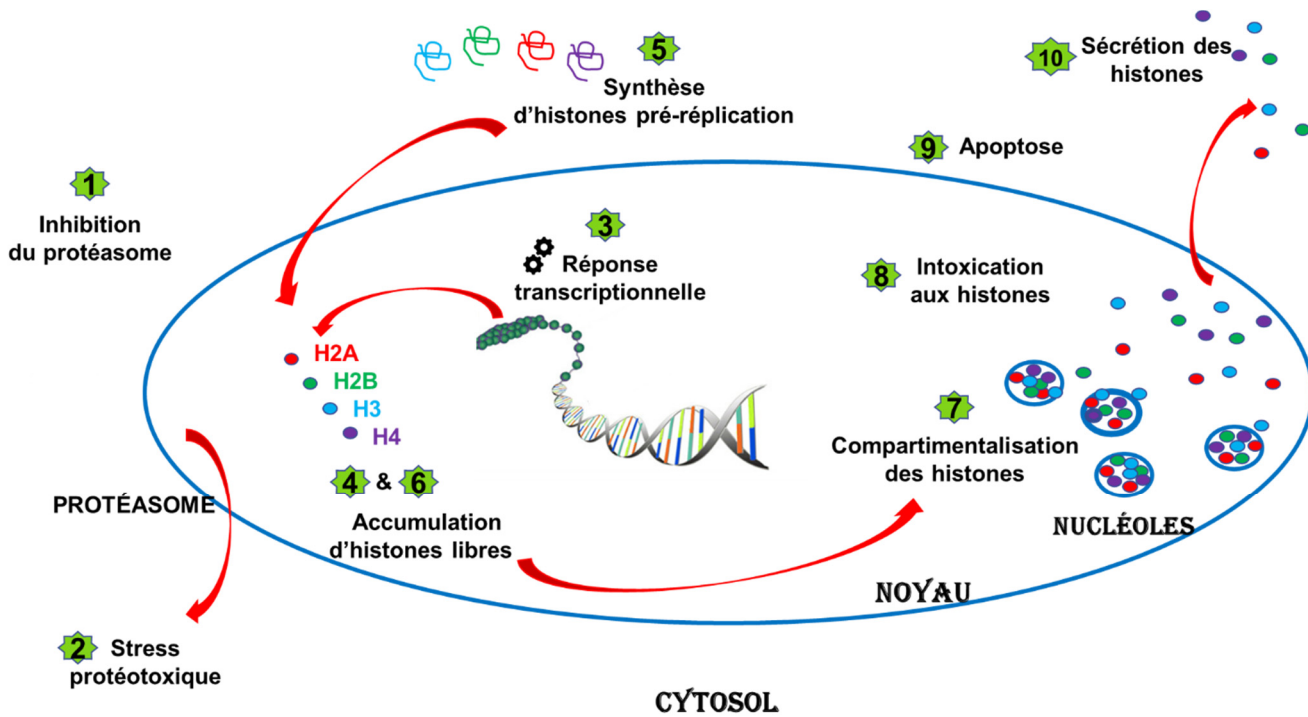


Figure 31. Modèle. Suite à l'inhibition du protéasome, une multitude d'événements moléculaires ont lieu dans la cellule. Ceux-ci mènent entre autres à la baisse des niveaux cellulaires de l'ubiquitine et des acides aminés. Une importante réponse transcriptionnelle aurait alors pour objectif de rétablir l'homéostasie en produisant les protéines utiles à cette fin. Ceci dit, pour une raison inconnue, les histones ne réintègreraient pas la chromatine s'étant préalablement défaits, et s'accumuleraient dans le nucléoplasme. Les cellules en cours de réplication produiraient les histones nécessaires à la formation d'une seconde chromatine. Ces histones ne pouvant probablement pas s'incorporer à l'ADN, se joindraient aux autres histones libres qui convergeraient vers les nucléoles où ils induiraient un stress majeur menant au déclenchement de l'apoptose. Enfin, les histones seraient d'une manière quelconque externalisées hors de la cellule.

6. CONCLUSION & PERSPECTIVES

En somme, ce projet met en lumière un phénomène inédit impliquant des protéines centrales à la biologie cellulaire. En effet, les histones sont cruciales à la survie et à l'homéostasie cellulaire, ainsi qu'au développement des organismes multicellulaires. Elles sont aussi impliquées dans diverses pathologies, sans pour autant que leurs fonctions soient comprises. Il va sans dire qu'une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de leur niveau cellulaire dans ces différents contextes, serait très importante. Ce projet semble donc prometteur à bien des égards.

L'objectif ultime afin de le mener à terme est de vérifier si l'excès d'histones libres est effectivement l'élément déclencheur de la mort causée par l'inhibition du protéasome; ce qui serait majeur en raison de l'absence de consensus quant au mécanisme de mort effectif. L'élucidation du mécanisme de mort ouvrirait la porte à une compréhension plus approfondie de la résistance, qui rend par exemple le myélome multiple largement incurable avec moins de la moitié des patients qui survivent 5 ans. La résistance acquise compromet éventuellement le traitement de quasiment tous les patients, alors que la résistance innée empêche l'efficacité du traitement des cancers solides ⁷². Une meilleure compréhension des facteurs contribuant à la sensibilité cellulaire pourrait non seulement faciliter le développement de thérapies, mais aussi aider à mieux comprendre et prédire la réponse des patients.²⁰

Par ailleurs, on sait que les histones agissent au niveau de la communication extracellulaire, où elles sont clairement impliquées dans une panoplie de maladies. Cela dit, ces implications ne sont pas encore vraiment comprises. Elles peuvent par exemple induire l'apoptose de façon paracrine, ce qui peut être sauvagée par l'ajout d'anticorps dirigés contre les histones. En théorie, l'usage intranucléaire d'anticorps contre les histones (surexprimés en fusion avec un NLS) pour tenter de les neutraliser dans le nucléoplasme, serait une belle tentative de démonstration de leur rôle dans la mort. Quoiqu'il en soit, si leur sécrétion après l'inhibition du protéasome est validée, ce modèle d'accumulation d'histones pourrait permettre d'en étudier le mécanisme. Cela pourrait être d'intérêt dans des conditions où leur sécrétion est bien établie, qu'elles soient physiologiques ou pathologiques (maladies neurodégénératives et cancer) ⁶⁹. Ce modèle pourrait d'ailleurs servir à investiguer un lien potentiel entre la sécrétion d'histones dans ces pathologies et l'efficacité du protéasome, dont la baisse d'activité a souvent été suggérée

dans le contexte de maladies neurodégénératives et cardiaque notamment ⁷³.

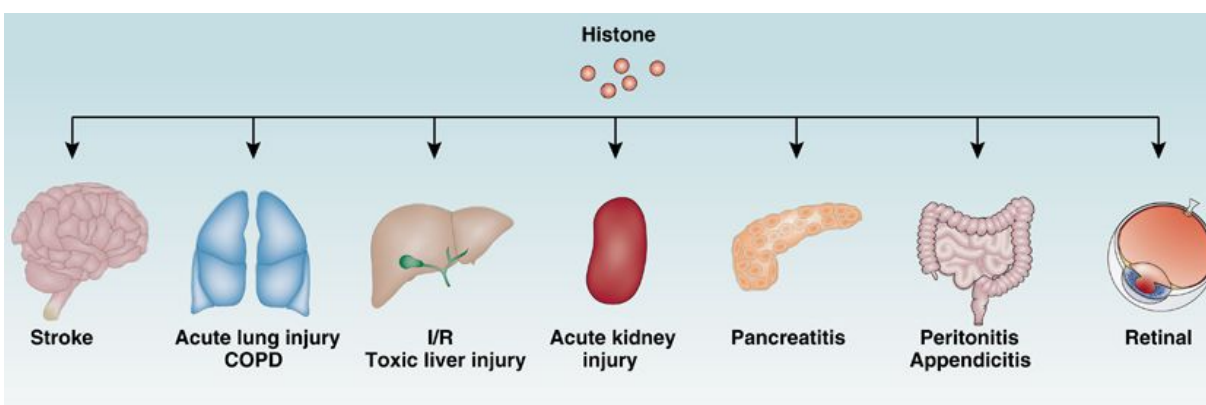


Figure 32. Diverses pathologies dans lesquelles sont impliquées les histones sécrétées. ⁷⁴ Les histones extracellulaires joueraient un rôle de médiateur dans le cadre des blessures tissulaires et des pathologies présentées ci-haut. Plusieurs organes seraient affectés par ces effets délétères des histones.

Une caractérisation de l'ubiquitination à usage dégradatif des histones chez l'Humain serait également très importante. Car si on identifie des sites d'ubiquitination et les enzymes en jeu, des liens pourraient se faire avec des dysfonctions ou des mutants impliqués dans des cancers, des maladies développementales ou des types d'infertilité. Par exemple, des amplifications de gènes d'histones et des régulations à la hausse de leur ARNm ont été observés dans des cancers du sein.⁵¹ On a vu plus haut que l'excès d'histones chez la levure cause des pertes de chromosomes. Il n'est donc pas impensable qu'un excès chez l'Humain puisse affecter l'intégrité génomique des cellules et être impliqué dans la cancérogénèse. D'ailleurs, on sait qu'une corrélation existe entre le haut niveau de cycline E, qui régule avec CDK2 la transcription d'histones en phase S, et le pronostic défavorable et l'instabilité génomique de cancers du sein; cela pourrait être expliqué par la forte association entre ces niveaux élevés de cycline E et une production excessive d'histones de phase S.⁵¹ Enfin, sachant que les besoins en histones sont plus élevés que jamais durant l'embryogénèse, une régulation stricte de leur niveaux et de leur dégradation est forcément extrêmement importante; des dysfonctionnements pathologiques de cette régulation sont à explorer.

Il est aussi intéressant de réaliser que ce phénomène d'accumulation nucléolaire des histones, vient peut-être mettre en évidence un mécanisme de régulation post-traductionnelle des histones. En effet, qu'il s'agisse d'histones endogènes ou exogènes, la translocation dans les nucléoles agirait comme un puits d'histones excessives. Il serait très intrigant de valider la généralisation de ce mécanisme dans des contextes physiologiques comme en phase S ainsi que dans des cellules germinales ou des embryons. Il suffirait de synchroniser des cellules en G1 et en S et d'en isoler les nucléoles pour voir s'il y a enrichissement des histones dans le premier cas. D'autre part, il s'agirait d'étudier le contenu des nucléoles géants d'ovocytes en histones libres.

En rétrospective, les cellules pourraient être bien malgré elles à l'origine d'un problème tout aussi sérieux, sinon plus sérieux qu'au début de l'inhibition du protéasome. On sait que l'inhibition du protéasome mène à une forte régulation transcriptionnelle et traductionnelle des protéines HSP et chaperonnes⁷⁵. Donc si la baisse des niveaux d'histones sur la chromatine se fait bel et bien dans le cadre d'une réponse transcriptionnelle, la forte demande en HSP et en chaperonnes pourrait être la cause de cette libération majeure d'histones. Car même si elles s'occupent de neutraliser le plus de protéines possibles, elles seront probablement saturées lorsque les histones de la phase S se rajouteront présumément aux histones libérées initialement. On sait par exemple que lors d'un stress réplicatif, les chaperonnes d'histones sont rapidement saturées.²⁶ Il est de plus dur à imaginer que la cellule puisse produire assez de chaperonnes pour neutraliser une si grande quantité d'histones libérée de la chromatine après l'inhibition du protéasome. Par ailleurs, on sait qu'une répression globale de la transcription et de la traduction se fait quelques heures après le début de l'inhibition²², ce qui compromet probablement une réponse adéquate à ces amas d'histones. Cette réponse pourrait également être compromise par la forte baisse en acides aminés, sans lesquels d'éventuels nouveaux acteurs comme les HSP et les chaperonnes ne pourraient être synthétisés; d'où la sauvegarde de la mort par supplémentation en acides aminés peut-être.²¹ Enfin, il serait important d'identifier par spectrométrie de masse les protéines interagissant avec les histones dans les nucléoles.

7. FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

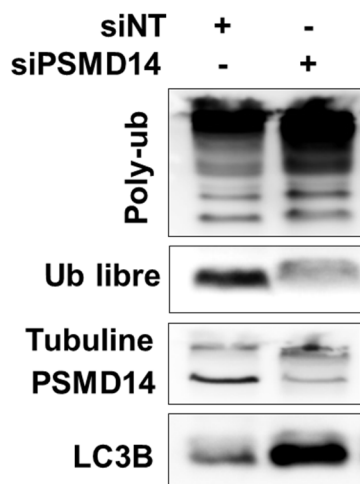


Figure S1. L'inhibition du protéasome cause une baisse des niveaux d'ubiquitine libre. Des cellules U2OS ont été traité par 400 dirigé contre PSMD14, et lysées dans des conditions dénaturantes en vue de la détection des protéines indiquées par immunobuvardage (n>3).

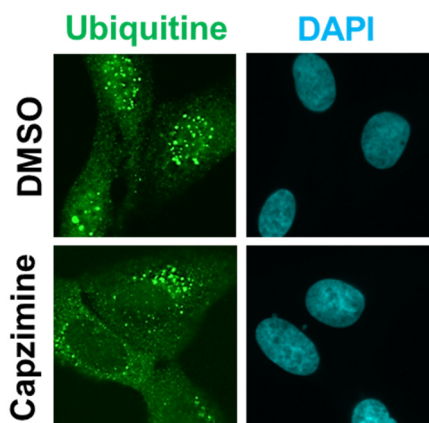


Figure S2. L'inhibition du protéasome cause une redistribution du signal de l'ubiquitine entre le noyau et le cytoplasme. Des cellules U2OS ont été traité ou non avec 10 μ M de l'inhibiteur protéasomal Capzimine pendant 8h, puis fixées en vue de détecter l'ubiquitine conjuguée (FK2) par immunofluorescence (n=1).

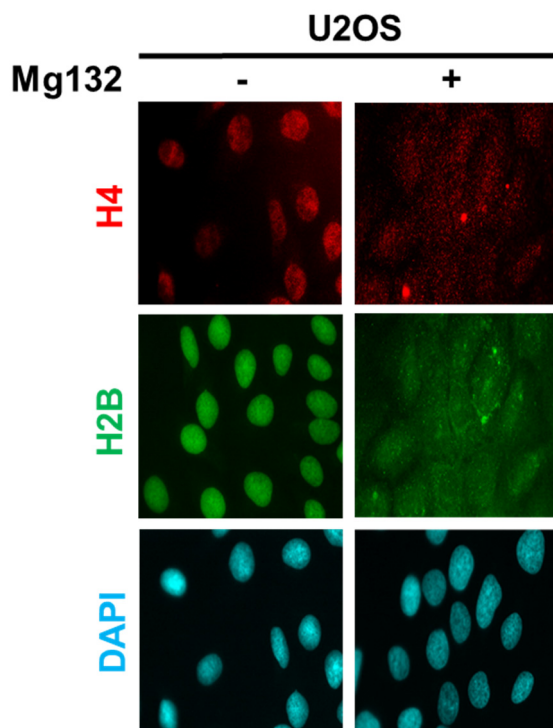


Figure S3. L'inhibition du protéasome cause une perturbation du signal nucléaire de H2B et H4. Des cellules U2OS ont été traité par 20 μ M de Mg132 pendant 8h, puis fixées en vue de la détection de H2B et H4 par immunofluorescence (n=1).

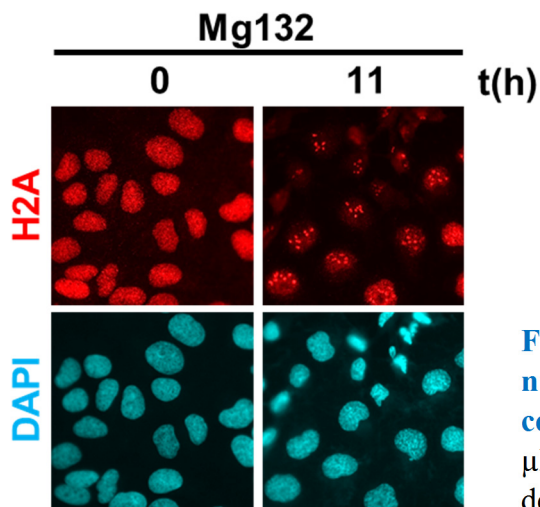


Figure S4. L'apparition des amas d'histones nucléolaires se manifeste dans la majorité des cellules. Des cellules U2OS ont été traité par 20 μ M de Mg132 (11h), puis fixées en vue de la détection de H2A par immunofluorescence (n=2).

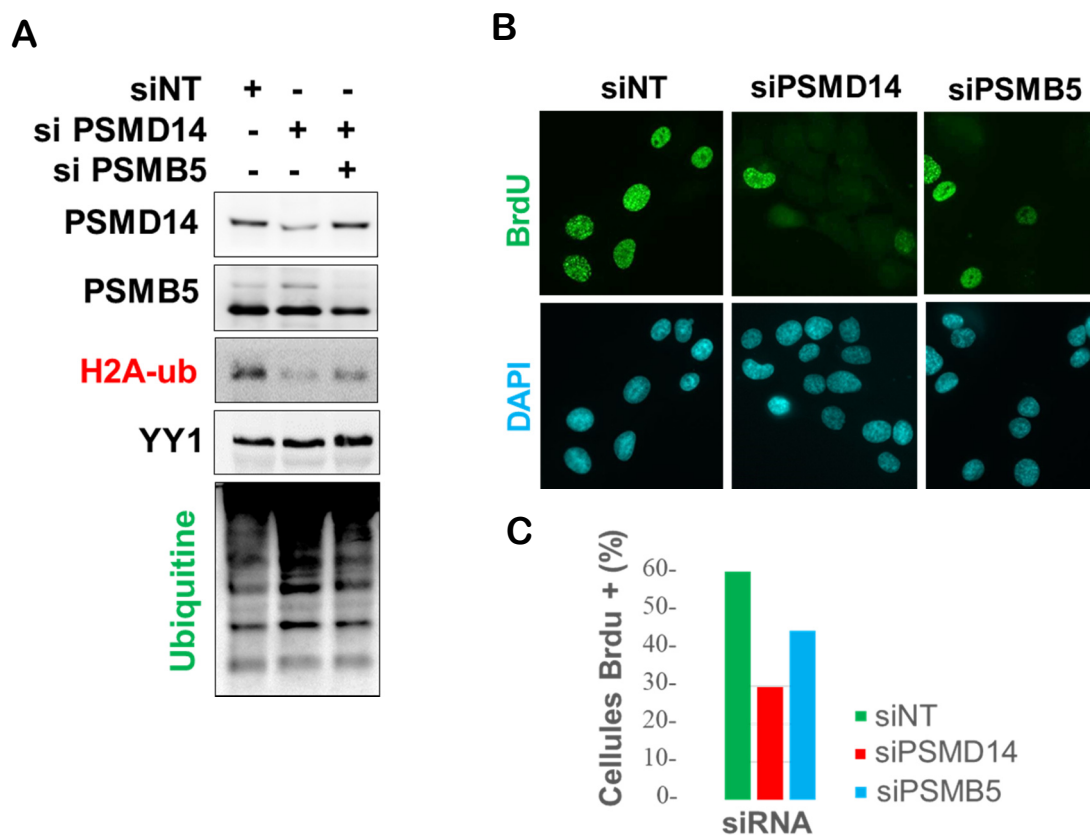


Figure S5. La déplétion de la DUB de la sous-unité régulatrice du protéasome PSMD14, produit des effets plus forts que celle de la protéase de la sous-unité catalytique PSMB5. Des cellules U2OS ont été traité par siRNA dirigé contre PSMD14 ou contre PSMB5, et (A) lysées dans des conditions dénaturantes en vue de la détection des protéines indiquées par immunobuvardage, ou (B) traitées avec 20 μ M de BRDU (4h), puis fixées en vue de la détection du BRDU par immunofluorescence. (C) Un compte de 200 cellules a permis de tracer un histogramme comparatif (n=2).

Tableau S1. La supplémentation en acides aminés amoindri le phénomène d'accumulation nucléolaire des histones après l'inhibition du protéasome.

Bortézomib	-	+	+
Acides aminés	-	-	+
Nb de cellules +	0	94	15
Nb de cellules	500		
%	0,0	18,8	3,0

N.B. :

- Voir la **Figure 26**.
- Ici les cellules + représentent celles montrant l'accumulation nucléolaire de l'histone H3 endogène.

Tableau S2. La surexpression de l'histone H2A, ou de l'ubiquitine sauvage ou mutée, affecte à la baisse le phénomène d'accumulation nucléolaire des histones après l'inhibition du protéasome.

		GFP	H2A-GFP	Ub-WT	Ub-G76V
Bortézomib	-	+	+	+	+
Surexpression	-	+	+	+	+
Nb de cellules +	0	39	10	0	6
Nb de cellules		282	320	338	187
%	0,0	13,8	3,1	0,0	3,2

N.B. :

- Voir la **Figure 22 et 26**.
- Ici les cellules + représentent celles montrant l'accumulation nucléolaire de l'histone H3 endogène.

8. BIBLIOGRAPHIE

-
- ¹ Bernot, A. (2004). *Genome Transcriptome and Proteome Analysis*. John Wiley & Sons Ltd.
- ² Marks, F., Klingmüller, U., et Müller-Decker, K. (2009). *Cellular Signal Processing: An Introduction to the Molecular Mechanisms of signal transduction*. Garland Science.
- ³ http://shop.arrayit.com/proteome_microarray.aspx (26-03-19) (14h08).
- ⁴ Lim, J. et al. (2015). *Proteotoxic Stress Induces Phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to Regulate Selective Autophagic Clearance of Protein Aggregates*. PLoS Genet 11, e1004987.
- ⁵ Noack, J., Brambilla, P.G., et Molinari, M. (2014). *Proteostasis: bad news and good news from the endoplasmic reticulum*. Swiss Med Wkly 144, w14001.
- ⁶ Kwasna, D. et al. (2018). *Discovery and Characterization of ZUFSP/ZUP1, a Distinct Deubiquitinase Class Important for Genome Stability*. Mol cell 70, 150-164.
- ⁷ Coux, O. (2011). *Protéasome, ubiquitine et protéines apparentées à l'ubiquitine*. Lavoisier.
- ⁸ Dantuma, N.P. et Bott, L.C. (2014). *The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution*. Front Mol Neurosci. 7.
- ⁹ <https://www.the-scientist.com/infographics/infographic-proteasome-basics-31600> (03-01-19) (15h33).
- ¹⁰ Wang, Y. et al. (2017). *Identifying the ubiquitination targets of E6AP by orthogonal ubiquitin transfer*. Nat Commun. 8, 2232.
- ¹¹ <http://formatherapeutics.com> (26-03-19) (15h50).
- ¹² Dikic, I., Wakatsuki, S. et Walters, K.J. (2009). *Ubiquitin-binding domains — from structures to functions*. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 659-71.
- ¹³ Mofers, A. et al. (2017). *Proteasome-associated deubiquitinases and cancer*. Cancer Metastasis Rev 36, 635-653.
- ¹⁴ Li, J. et al. *Capzimin is a potent and specific inhibitor of proteasome isopeptidase Rpn11*. Nat Chem Biol 13, 486-493.
- ¹⁵ Gallery, M. et al. (2007). *The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability*. Mol Cancer Ther. 6, 262–8.
- ¹⁶ Kumatori, A. et al. (1990). *Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 87, 7071-5.
- ¹⁷ Gozzetti, A. et al. (2016). *Second generation proteasome inhibitors in multiple myeloma*. Anticancer Agents Med Chem 17, 920-926.
- ¹⁸ Paul, B. et al. (2018). *The challenges of checkpoint inhibition in the treatment of multiple myeloma*. Cell Immunol. 334, 87-98.
- ¹⁹ Wondrak, G.T. (2015). *Stress Response Pathways in Cancer: From Molecular Targets to Novel Therapeutics*. Springer.
- ²⁰ Roelofs, J. (2015). *Proteasome inhibition by bortezomib: A left hook and a right punch*. EBioMedicine 2, 619-20.

-
- ²¹ Suraweera, A. et al. (2012). *Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition*. Mol cell 48, 242-53.
- ²² Mimnaugh, E.G. et al. (1997). *Rapid Deubiquitination of Nucleosomal Histones in Human Tumor Cells Caused by Proteasome Inhibitors and Stress Response Inducers: Effects on Replication, Transcription, Translation, and the Cellular Stress Response*. Biochemistry 36, 14418-29.
- ²³ Hawkins, J.D. (1996). *Gene structure and expression*. Cambridge University Press.
- ²⁴ Singh, R.K. et al. (2010). *Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms*. Cell Cycle 9, 4236-4244.
- ²⁵ Warren, C. et Shechter, D. (2017). *Fly Fishing for Histones: Catch and Release by Histone Chaperone Intrinsically Disordered Regions and Acidic Stretches*. Journal of molecular biology 429, 2401-2426.
- ²⁶ Gunjan, A. et Verreault, A. (2003). *A Rad53 Kinase-Dependent Surveillance Mechanism that Regulates Histone Protein Levels in S. cerevisiae*. Cell 115, 537-49.
- ²⁷ Cao, J. et Yan, Q. (2012). *Histone Ubiquitination and Deubiquitination in Transcription, DNA Damage Response, and Cancer*. Front Oncol 2, 2234-943X.
- ²⁸ Uckelmann, M. et Sixma, T.K. (2017). *Histone ubiquitination in the DNA damage response*. DNA Repair (Amst). 56, 92-101.
- ²⁹ Jacob, P., Hirt, H. et Bendahmane, A. (2017). *The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance*. Plant Biotechnology Journal 15, 405-414.
- ³⁰ Reeg, S. et al. (2016). *The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome*. Free radical biology and medicine 99, 153-166.
- ³¹ Warner, J.R. (1999). *The economics of ribosome biosynthesis in yeast*. Trends Biochem Sci. 24, 437-40
- ³² Bártoová, E. et al. (2010). *Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments*. J Histochem Cytochem. 58, 391-403.
- ³³ <https://www.biologyexams4u.com/2012/06/nucleolus.html#.W-zE9PZFzsY> (14-11-18) (20h04)
- ³⁴ Núñez V.L. et al. (2018). *New Roles for the Nucleolus in Health and Disease*. BioEssays 40, e1700233.
- ³⁵ Grummt, I. (2013). *The nucleolus—guardian of cellular homeostasis and genome integrity*. Chromosoma 122, 487-97.
- ³⁶ Mao, Y.S., Bin, Z. et Spector, D.L. (2011). *Biogenesis and function of nuclear bodies*. Trends Genet. 27, 295-306.

-
- ³⁷ Lents, N.H. et al. (2002). *Stimulation of the Raf/MEK/ERK cascade is necessary and sufficient for activation and Thr160 phosphorylation of a nuclear-targeted CDK2*. J Biol Chem 277, 47469–47475.
- ³⁸ Nakata, S. et al. (2016). *The dynamics of histone H2A ubiquitination in HeLa cells exposed to rapamycin, ethanol, hydroxyurea, ER stress, heat shock and DNA damage*. Biochem Biophys Res Commun. 472, 46-52.
- ³⁹ Zid, B.M. et O'Shea, E.K. (2014). *Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast*. Nature 514, 117-21.
- ⁴⁰ Park, J. et al. (2018). *Epigenetic switch from repressive to permissive chromatin in response to cold stress*. PNAS 115, E5400-E5409.
- ⁴¹ Huang, H., et al. (2012). *HDAC Inhibitor L-Carnitine and Proteasome Inhibitor Bortezomib Synergistically Exert Anti-Tumor Activity In Vitro and In Vivo*. PLoS One 7, e52576.
- ⁴² Qian, M.X. et al. (2013). *Acetylation-Mediated Proteasomal Degradation of Core Histones during DNA Repair and Spermatogenesis*. Cell 153, 1012-24.
- ⁴³ Van Nuland, R. et Gozani, O. (2016). *Histone H4 Lysine 20 (H4K20) Methylation, Expanding the Signaling Potential of the Proteome One Methyl Moiety at a Time*. Molecular & cellular proteomics 15, 755-764.
- ⁴⁴ Das, C. et Tyler, J.K. (2013). *Histone exchange and histone modifications during transcription and aging*. Biochimica et biophysica acta 1819, 332-342.
- ⁴⁵ Marzluff, W.F., Wagner, E.J. et Duronio, R.J. (2008). *Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail*. Nature Reviews Genetics 9, 843-54.
- ⁴⁶ Legesse-Miller, A. et al. (2012). *Quiescent fibroblasts are protected from proteasome inhibition-mediated toxicity*. Mol Biol Cell 23, 3566-3581.
- ⁴⁷ Pozo, P.N. et Gowen Cook, J. (2016). *Regulation and Function of Cdt1; A Key Factor in Cell Proliferation and Genome Stability*. Genes 8, 2.
- ⁴⁸ Ghislain, M., Udvardy, A. et Mann, C. (1993). *S. cerevisiae 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase*. Nature 366, 358-362.
- ⁴⁹ Miles, D.M. et al. (2018). *High levels of histones promote whole-genome-duplications and trigger a Swe1^{WEE1}-dependent phosphorylation of Cdc28^{CDK1}*. eLife 7, e35337.
- ⁵⁰ Prado, F., Jimeno-Gonzalez, S. et Reyes, J.C. (2017). *Histone availability as a strategy to control gene expression*. RNA Biol 14, 281-286.
- ⁵¹ Mei, Q. et al. (2017). *Regulation of DNA replication-coupled histone gene expression*. Oncotarget 8, 95005-95022.
- ⁵² <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto3/7/coulter/ss000087.html> (29-11-18) (12h57).
- ⁵³ Bártoová, E. et al. (2010). *Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments*. J Histochem Cytochem. 58, 391-403.

-
- ⁵⁴ Hammond, C.M. et al. (2017). *Histone chaperone networks shaping chromatin function*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 18, 141-158.
- ⁵⁵ Gaume, X. et al. (2011). *In vivo Study of the Histone Chaperone Activity of Nucleolin by FRAP*. Biochemistry Research International 2011, 187624.
- ⁵⁶ Fulka H.Jr. et al. (2012). *Production of giant mouse oocyte nucleoli and assessment of their protein content*. J Reprod Dev. 58, 371-6.
- ⁵⁷ Stępiński, D. (2018). *The nucleolus, an ally, and an enemy of cancer cells*. Histochemistry and Cell Biology 150, 607–629.
- ⁵⁸ Galimberti, V. et al. (2016). *The stress-inducible transcription factor ATF4 accumulates at specific rRNA-processing nucleolar regions after proteasome inhibition*. Eur J Cell Biol 95, 389–400.
- ⁵⁹ Golstein, P. (2017). *Conserved nucleolar stress at the onset of cell death*. FEBS J. 284, 3791-3800.
- ⁶⁰ Lee, J.G. et al. (2016). *Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells*. Nat Cell Biol. 18, 765-76.
- ⁶¹ Musinova, Y.R. et al. (2011). *Nucleolar localization/retention signal is responsible for transient accumulation of histone H2B in the nucleolus through electrostatic interactions*. Biochim Biophys Acta. 1813, 27–38.
- ⁶² Safina, A. et al. (2017). *FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells*. Nucleic Acids Res. 45, 1925-1945.
- ⁶³ Poletto, M. et al. (2017). *Modulation of proteostasis counteracts oxidative stress and affects DNA base excision repair capacity in ATM-deficient cells*. Nucleic Acids Res. 45, 10042-10055.
- ⁶⁴ Singh, R.K. et al. (2012). *Novel E3 Ubiquitin Ligases That Regulate Histone Protein Levels in the Budding Yeast Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE 7, e36295.
- ⁶⁵ Wike, C.L. et al. (2016). *Excess free histone H3 localizes to centrosomes for proteasome-mediated degradation during mitosis in metazoans*. Cell Cycle 15, 2216-2225.
- ⁶⁶ Singh, R.K. et al. (2009). *Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis*. Nat Cell Biol 11, 925-33.
- ⁶⁷ Chen, Y.S. et Qiu, X.B. (2012). *Transcription-Coupled Replacement of Histones: Degradation or Recycling?* Journal of Genetics and Genomics 39, 575-80.
- ⁶⁸ Ortiz, A. (2017). *Not all extracellular vesicles were created equal: clinical implications*. Ann Transl Med. 5, 111.
- ⁶⁹ <http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A1203620&dsid=mainwindow> (29-12-18) (22h05).
- ⁷⁰ Soldani, C. et al. (2006). *Nucleolus disassembly in mitosis and apoptosis: dynamic redistribution of phosphorylated-c-Myc, fibrillarin and Ki-67*. Eur J Histochem. 50, 273-80.

-
- ⁷¹ Freije J.P.M., Fraile, J.M. et Lopez-Otin C. (2011). *Protease Addiction and Synthetic Lethality in Cancer*. Front Oncol. 1, 25.
- ⁷² Uddin, M.M. et al. (2018). *Proteasome inhibition induces IKK-dependent interleukin-8 expression in triple negative breast cancer cells: Opportunity for combination therapy*. PLoS One 13, e0201858.
- ⁷³ Collins, G.A. et Goldberg, A.L. (2017). *The Logic of the 26S Proteasome*. Cell 169, 792-806.
- ⁷⁴ Chen, R. et al. (2014). *Release and activity of histone in diseases*. Cell Death Dis. 14, e1370.
- ⁷⁵ Yerlikaya, A. et al. (2015). *A proteomic analysis of p53-independent induction of apoptosis by Bortezomib in 4T1 breast cancer cell line*. J Proteomics. 15, 315-25.