



HAL
open science

La polyarthrite rhumatoïde et les auto-anticorps anti-protéines citrullinées. Le système ubiquitine-protéasome et ses implications dans le cancer

•
Elisabeth Girbal-Neuhauser

► **To cite this version:**

Elisabeth Girbal-Neuhauser. La polyarthrite rhumatoïde et les auto-anticorps anti-protéines citrullinées. Le système ubiquitine-protéasome et ses implications dans le cancer .. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006. tel-00092557

HAL Id: tel-00092557

<https://theses.hal.science/tel-00092557>

Submitted on 11 Sep 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Elisabeth GIRBAL-NEUHAUSER

Maître de Conférences en Section 65

IUT Paul Sabatier
Département Génie Biologique

DOSSIER

Présenté devant

L'Université Paul Sabatier de Toulouse

En vue de l'obtention de l'

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

UMR CNRS-Pierre Fabre 2587
Centre de Recherche en Pharmacologie-Santé

Table des matières

Curriculum vitae	1
Activités de recherche	5
1. La Polyarthrite Rhumatoïde et les anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA).....	6
1.1. Présentation du contexte.....	6
1.2. Identification des antigènes reconnus par les ACPA.....	7
1.2.1. Antigènes de l'épithélium d'œsophage de rat.....	7
1.2.2. Antigènes épidermiques humains.....	8
1.3. Caractérisation des épitopes reconnus par les ACPA.....	10
1.4. Recherche d'une cible articulaire pour les ACPA.....	10
1.5. Aspects diagnostiques.....	11
1.6. Aspects physiopathologiques.....	12
1.7. Conclusion.....	13
2. Le système ubiquitine-protéasome et ses implications dans le cancer.....	16
2.1. Introduction et état des connaissances.....	17
2.1.1. Le système ubiquitine-protéasome.....	17
2.1.2. Le protéasome 20S.....	19
2.1.3. Les modulateurs du protéasome.....	20
2.1.4. Protéasome et cancer.....	22
2.2. Résultats obtenus.....	23
2.2.1. Etude des modifications post-traductionnelles du protéasome 20S.....	23
2.2.2. Etude de la régulation fonctionnelle du protéasome dans les cellules tumorales... ..	26
2.3. Projets de recherche.....	28
2.3.1. Rôle fonctionnel de la phosphorylation des sous-unités β	28
2.3.2. Assemblage du protéasome et interactions protéine-protéine.....	29
2.3.3. L'immunoprotéasome, nouvelle cible pharmacologique anti-tumorale?.....	31
2.4. Conclusion.....	32
Liste des travaux	38
Activités d'enseignement	47
1. Enseignements dispensés en 1 ^{ère} année du DUT Génie Biologique (L1).....	48
1.1. Cours de Biochimie.....	48
1.2. Cours d'Immunologie.....	49
2. Enseignements dispensés en 2 ^{ème} année du DUT Génie Biologique (L2).....	49
2.1. Cours de Biochimie Alimentaire.....	49
2.2. Cours de Métabolisme Microbien.....	50
2.3. Cours de Microbiologie Industrielle.....	50
2.4. Cours de Techniques de Séparation.....	50
3. Autres activités d'enseignement.....	51
Liste des diplômes encadrés	52
Annexe 1 (organigramme UMR 2587).....	56
Publications fournies	57

Curriculum vitae

Nom	Girbal-Neuhauser
Prénom	Elisabeth
Date et lieu de naissance	2 octobre 1963 à Alpuech (12)
Situation	Mariée (2 enfants)
Adresse personnelle	22, rue Maletache, 31000 Toulouse
Adresses professionnelles	
Enseignement	IUT Paul Sabatier Département Génie Biologique 24, rue d'Embaques 32000 Auch tél : 05 62 61 63 00 e-mail : elisabeth.neuhauser@iut-tlse3.fr
Recherche	Centre de Recherche en Pharmacologie-Santé UMR 2587 CNRS-Pierre Fabre 3, rue des satellites 31400 Toulouse tél : 05 34 32 13 69 e-mail : elisabeth.neuhauser@istmt.cnrs.fr

Diplômes et titres universitaires

1985	Diplôme d'Ingénieur INSA Toulouse Option Génie Biochimique et Alimentaire
1985	Diplôme d'Etudes Approfondies en Microbiologie Appliquée INSA Toulouse, Département Génie biochimique et Alimentaire « Influence du degré de glycosylation sur la stabilité des enzymes »
1988	Doctorat de Microbiologie de l'INSA Toulouse « Etude de la polyphosphate-glucose phosphotransférase de Mycobacterium phléi ATCC 354 : production, purification et application à la synthèse de glucose-6-phosphate »

Fonctions exercées

Janv 89-Sept 93	Chercheur post-Doctoral Laboratoire de Biologie et Pathologie Cellulaire du Pr Guy Serre, Université Paul Sabatier et Hôpital Purpan de Toulouse. Diagnostic sérologique de la Polyarthrite Rhumatoïde : développement et optimisation d'un test de détection d'auto-anticorps circulants spécifiques de la maladie.
Oct 93 – Oct 98	Maître de Conférences, seconde classe (section 65) IUT Paul Sabatier, Département Génie Biologique , Université Toulouse III
Janv 95 à Déc 99	Enseignant-Chercheur au Laboratoire De Biologie et Pathologie de la Différenciation Malpighienne dirigé par le Pr. G. Serre Faculté de Médecine-Purpan, 37 allées Jules Guesde, 31053 Toulouse Caractérisation des antigènes reconnus par les auto-anticorps anti-protéines citrullinées spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde
Janv 2000 à Déc 2002	Enseignant-Chercheur dans l'équipe d'Immunopharmacologie Structurale et Fonctionnelle dirigée par le Pr. J.E. Gairin Institut de Pharmacologie et de Biologie structurale, UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31073 Toulouse Etude structurale et régulation fonctionnelle du protéasome humain
Depuis Oct 98	Maître de Conférences, première classe (section 65)
Depuis Janv 2003	Enseignant-Chercheur au Centre de Recherche en Pharmacologie-Santé dirigé par le Pr JE Gairin UMR CNRS-Pierre Fabre 2587, ISTMT, 3 rue des satellites, 31400 Toulouse Etude du protéasome comme cible pharmacologique anti-tumorale

Activités d'enseignement

◆ En DUT Génie Biologique

Enseignement dispensé aux étudiants Techniciens Supérieurs du département Génie Biologique de l'IUT Paul Sabatier délocalisé à Auch, et inscrits dans les options « Industrie Alimentaire et Biologique » (IAB) ou « Agronomie »

- Sept 93 à Juin 98** **Cours de Biochimie** : 72h éq TD (93/94, 95/96, 96/97) et 24h éq TD en 97/98, en 1^{ère} année des options IAB et Agronomie
Biochimie structurale des glucides et lipides. Cinétique enzymatique.
- Sept 97 à Juin 00** **Cours de Biochimie Alimentaire** : 52h éq TD, en 2^{ème} année de l'option IAB
Etude physico-chimique de divers aliments et de leurs traitements technologiques
- Sept 98 à juin 00** **Cours de Métabolisme Microbien** : 24h éq TD, en 2^{ème} année de l'option IAB
Métabolisme glucidique
- Depuis Sept 93** **Cours d'Immunologie** : 60h équivalent TD, en 1^{ère} année des options IAB et Agronomie
Présentation de la réponse immunitaire spécifique et non spécifique, des notions d'antigènes et de récepteurs spécifiques à l'antigène, ainsi que des différentes techniques immunologiques
- Cours de Microbiologie Industrielle** : 66h éq TD, en 2^{ème} de l'option « IAB »
Mise en œuvre industrielle des bioproductions, étude du comportement microbien lors des différents procédés de culture en réacteur
- Depuis Sept 00** **Cours de Techniques de Séparation** : 46h éq TD, en 2^{ème} année de l'option IAB
Extraction et précipitation des biomolécules, techniques électrophorétiques et chromatographiques.

◆ En Licence Professionnelle

Enseignement dispensé aux étudiants inscrits en licence «Sécurité Sanitaire des Aliments » au Département Génie Biologique de l'IUT Paul Sabatier

- Depuis Sept 2001** **Cours de Techniques Immunologiques** : 4h éq TD

◆ En Ecole d'Ingénieur

Enseignement dispensé aux étudiants inscrits en 5^{ème} année à l'INSA de Toulouse

- Sept 2001 à Juin 2003** **Travaux Pratiques dans le Module « Post-Génomique »**
Protéomique de *Saccharomyces Cerevisiae*

Activités de Recherche

◆ Thèmes de recherche

- Janv 89 à Déc 99** Caractérisation des antigènes reconnus par les auto-anticorps anti-filaggrines spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde

- Depuis Janv 2000** Etude structurale et régulation fonctionnelle du protéasome humain.
Etude des du protéasome comme cible pharmacologique anti-tumorale

◆ Publications

18 articles dans des revues à comité de lecture, un article soumis
2 contributions à un ouvrage collectif
3 brevets

◆ Communications lors de congrès

23 contributions à des congrès avec comité de lecture (5 présentations orales, 18 affiches)
8 contributions à des congrès francophones sans comité de lecture

◆ **Encadrement Scientifique**

Janv 89 à Déc 99 Doctorats : 2 co-encadrements
Diplômes d'Etudes Approfondies : 2 co-encadrements et 2 encadrements à part entière

Depuis Sept 2000 Doctorats : 2 co-encadrements et 1 encadrement à part entière
Diplômes d'Etudes Approfondies : 2 co-encadrements et 1 encadrement à part entière
Diplômes d'Etudes Supérieures d'Université : 2 co-encadrements et 1 encadrement à part entière
Diplôme Master Professionnel M2 : 1 encadrement à part entière

◆ **Collaborations Scientifiques**

Janv 1997 à Juin 1999 Dr T. Senshu, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173, Japan

Janv 2000 à Janv 2003 Dr B. Monsarrat, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse

Depuis Mai 2002 Dr A. Caignard, Unité INSERM U487, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif

◆ **Relations avec des Industriels**

Janv 89 à Déc 99 Société Clonatec, 60 rue de Wattignies, 75012 Paris
Société Biomérieux, Chemin de l'Orme, 69280 Marcy l'Etoile

Janv 01 à Janv 03 Centre de Recherche Pierre-Fabre de Saint Julien en Genevois (Programme « Après Séquençage Génomique , Protéomique et Cibles Thérapeutiques »)

Depuis Janv 2003 Partenariat avec le Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale Pierre Fabre ainsi qu'avec les Unités Mixtes de Service de Chimie des Substances Naturelles Bioactives (UMS 2597) et de Criblage Pharmacologique (UMS 2646)

Activités d'administration et de responsabilités collectives

◆ **Activités d'administration**

Depuis 1994 Responsable des admissions des étudiants du Département Génie Biologique de l'IUT Paul Sabatier
Membre du Conseil de Département (1994-95-96, 98-99-00, 03-04)

◆ **Responsabilités collectives**

Janv 99 à Janv 02 Membre de la Commission des Spécialistes de l'Université Paul Sabatier (Section 65)

Sept 01 à Sept 03 Membre de la Commission Formation et Vie Universitaire de l'IUT Paul Sabatier

◆ **Responsabilités pédagogiques**

Sept 99 à Juin 01 Responsable de l'option « Industries Alimentaires et Biologiques »

Activités de recherche

Après une formation d'Ingénieur et un doctorat de l'INSA financé par la société BioEurope, il apparaissait plus probable que ma carrière s'orienterait vers la recherche industrielle plutôt que vers l'Université. Toutefois, je me suis toujours efforcée d'équilibrer la balance entre recherche fondamentale et recherche appliquée et cet objectif a grandement orienté mes choix scientifiques. En effet, dès ma première expérience de chercheur post-doctoral dans l'équipe du Pr Guy Serre, j'ai côtoyé des chercheurs d'horizons différents tels que médecins, scientifiques ou industriels et j'ai rapidement compris l'intérêt qu'il y avait à réunir des compétences complémentaires au sein d'une même équipe. C'est aussi pourquoi, en janvier 2003, j'ai choisi d'intégrer l'UMR 2587, une unité mixte de recherche CNRS-Pierre Fabre, dirigée par le Pr JE Gairin et dont l'émergence témoigne de l'évolution des structures partenariales entre domaine académique et milieu industriel.

Les activités de recherche présentées dans ce document s'articuleront en deux parties distinctes. La première portera sur mes travaux de recherche antérieurs concernant la caractérisation des antigènes cibles d'auto-anticorps associés à une maladie auto-immune, la polyarthrite rhumatoïde. Dans la seconde partie, je présenterai l'activité de recherche que j'effectue actuellement dans l'UMR 2587 et qui est centrée sur l'étude d'un système biologique impliqué dans la dégradation des protéines intracellulaires, le système ubiquitine-protéasome et pouvant générer des cibles d'intérêt thérapeutique dans le domaine du cancer.

1. La Polyarthrite Rhumatoïde et les auto-anticorps «anti- protéines citrullinées »

Janv 89 à juin 98, « Laboratoire de Biologie et Pathologie de la Différenciation Malpighienne » du Pr Guy Serre, Faculté de Médecine Purpan, Université Toulouse III

1.1. Présentation du contexte

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune d'étiologie inconnue, caractérisée par une inflammation chronique et destructive des articulations synoviales. Le tissu synovial des articulations atteintes est infiltré par des cellules immunitaires et on observe une hyperplasie des synoviocytes. L'ensemble constitue un pannus érodant le cartilage et l'os sous-jacent, et dans les formes les plus sévères, la maladie progresse rapidement vers une destruction articulaire irréversible et une incapacité fonctionnelle majeure. La polyarthrite rhumatoïde affecte environ 1% de la population mondiale et, depuis de nombreuses années déjà, le processus auto-immun rhumatoïde fait l'objet d'intenses recherches. Elles ont permis de montrer que certains facteurs génétiques (gènes du complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH de classe II, répertoire du récepteur T des lymphocytes T), infectieux ou environnementaux sont liés à la maladie. Cependant, bien que des

progrès importants aient été réalisés dans la compréhension de certains mécanismes immunopathologiques mis en jeu, il n'a pas été possible d'identifier un élément unique comme responsable du processus inflammatoire auto-immun. Il est donc communément admis aujourd'hui que c'est la combinaison de divers facteurs qui détermine l'apparition et l'entretien de la maladie. La présence d'auto-anticorps circulants dans le sérum de patients et/ou retrouvés dans le liquide synovial infiltrant le pannus pourrait faire partie de ces éléments.

A ce titre, le Pr Guy Serre s'intéresse depuis une quinzaine d'années aux anticorps dits anti-protéines citrullinées (anti-citrullinated protein / peptides antibodies ou ACPA). Ces anticorps ont été décrits initialement en 1979 par Young et coll. pour leur marquage du Stratum Corneum (ou couche cornée) de l'épithélium d'œsophage de rat en immunofluorescence indirecte. Pensant que le marquage produit était dû à la reconnaissance du principal constituant de la couche cornée, les kératines, les auteurs baptisèrent ces anticorps « anticorps anti-kératines ». Cette dénomination était fautive car les antigènes reconnus ont été par la suite caractérisés dans le laboratoire du Pr Guy Serre, et identifiés à des variants acides d'une autre protéine épidermique, la filaggrine.

En 1989, à partir d'un vaste échantillon constitué par plus de 500 patients atteints de pathologies rhumatoïdes parfaitement caractérisées, une sensibilité de 46% pour une spécificité de 97% ont été calculées par l'équipe hospitalo-universitaire du Pr Guy Serre, montrant ainsi l'intérêt de ces anticorps pour le diagnostic de la maladie (Vincent et coll., 1989). Leur présence est donc une caractéristique suffisamment fréquente et spécifique de la maladie rhumatoïde pour qu'on puisse les suspecter de jouer un rôle significatif dans les processus responsables de l'inflammation articulaire chronique. D'autres arguments tels que leur association aux formes les plus sévères et actives de la maladie ainsi que leur apparition à un stade très précoce, pouvant précéder l'apparition des premiers symptômes, suggèrent leur implication dans la physio-pathologie de la polyarthrite rhumatoïde.

1.2. Identification des antigènes reconnus par les auto-anticorps « anti- protéines citrullinées » (ACPA)

1.2.1. Antigènes de l'épithélium d'œsophage de rat

Afin de mieux comprendre le rôle joué par ces auto-anticorps qualifiés alors d'anticorps « anti-kératines » dans la pathogénie rhumatoïde, il était essentiel d'identifier leur cible antigénique. C'est pourquoi, à mon arrivée en décembre 1989 dans le laboratoire du Pr Guy Serre, la ligne de recherche qui m'a été confiée ainsi qu'à Mireille Sebbag, étudiante en doctorat, consistait à caractériser biochimiquement les antigènes exprimés dans l'épithélium d'œsophage de rat (publications 3 à 5).

L'analyse par immunotransfert, à l'aide de sérums rhumatoïdes, d'extraits d'épithélium d'œsophage de rat séparés dans diverses conditions d'électrophorèse mono et bi-dimensionnelle, nous a permis de détecter, comme cibles murines des auto-anticorps, trois antigènes solubles dans des tampons de faible force ionique. Ces trois protéines présentaient un polymorphisme de charge très important avec des points isoélectriques pouvant varier de 4,5 jusqu'à 8,5, polymorphisme qui n'a pu être modifié après des expériences classiques de déglycosylation et de déphosphorylation. En réalisant des expériences d'adsorption de la réactivité des sérums vis à vis de ces trois protéines d'une part, et des cytokératines du stratum corneum d'épithélium d'œsophage de rat, d'autre part, nous avons établi l'indépendance de ces deux réactivités, confirmant ainsi que les anticorps étudiés n'étaient pas réactifs vis à vis des cytokératines mais vis à vis de nouvelles protéines spécifiques des étapes tardives du programme de différenciation de l'épithélium d'œsophage de rat (publications 4 et 5).

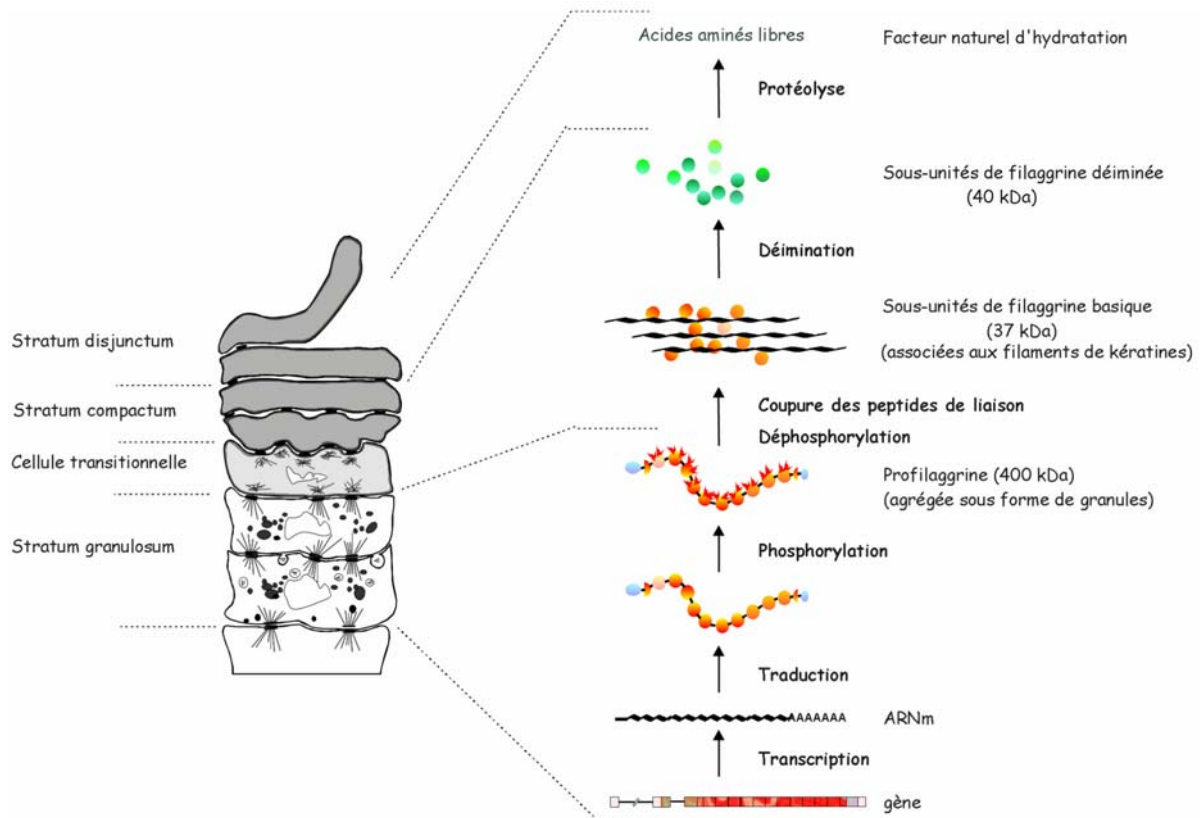
Bien que ces protéines n'aient pas été formellement identifiées, leurs caractéristiques physico-chimiques suggéraient qu'elles pourraient correspondre à des variants tissu-spécifiques de la (pro)filaggrine humaine, protéine originale jouant un rôle physiologique dans l'agrégation des filaments de kératines de l'épiderme (Harding et Scott, 1983).

1.2.2. Antigènes épidermiques humains

La capacité des sérums rhumatoïdes positifs sur stratum corneum d'œsophage de rat à générer un marquage sur épiderme humain, laissait penser que ces anticorps étaient d'authentiques auto-anticorps (Quismorio et coll., 1983 ; Serre et coll., 1986). En utilisant pour une large part les méthodes développées pour l'extraction et la caractérisation des antigènes d'œsophage de rat, nous avons donc entrepris la caractérisation des antigènes exprimés dans l'épiderme humain. Ces antigènes correspondent à une protéine de 37 à 40 kDa et de point isoélectrique variable de 5,8 à 7,2. Plusieurs arguments d'ordre biochimique et immunologique nous ont permis de les identifier sans ambiguïté à un variant acide de la filaggrine, cette dernière étant aussi spécifiquement reconnue par les sérums rhumatoïdes (publication 6).

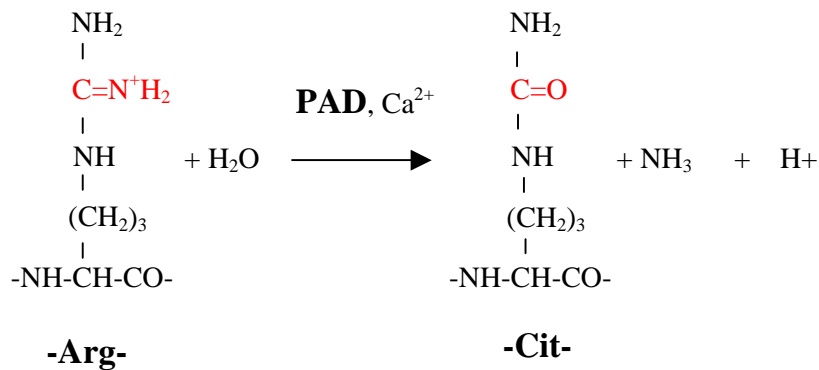
La filaggrine est une protéine cationique synthétisée lors des étapes tardives de la différenciation épidermique. Elle joue un rôle majeur dans l'agrégation des filaments intermédiaires des cytokératines de la couche cornée, ce qui lui a valu son nom : filament aggregating protein (Dale, 1977). Elle est tout d'abord synthétisée au sein de la couche sous-jacente, la couche granuleuse, sous forme d'un précurseur de haut poids moléculaire (400 kDa) constitué de plusieurs sous-unités de filaggrine et appelé profilaggrine (Figure 1). Lors de la transition des cellules vers la couche cornée, la profilaggrine est protéolysée générant alors des molécules de filaggrine basique et fonctionnelle (Mack et coll., 1993 ; Dale et coll., 1997). La structure et la composition en acides aminés des profilaggrines épidermiques humaines et murines sont similaires bien que ces deux protéines ne présentent que très peu d'homologie de séquence (MacKinley-Grant et coll., 1989).

Figure 1 : Schéma du métabolisme de la filaggrine



Par ailleurs, afin de préciser le processus de maturation de la profilaggrine, nous avons étudié son expression dans des cultures de kératinocytes humains normaux réalisées en conditions différenciantes. Des protéines acides, de poids moléculaires intermédiaires et correspondant à une étape de maturation peu connue de la profilaggrine épidermique, ont été mis en évidence dans les épithéliums reconstitués (publication 12). Cette observation est en accord avec l'existence *in vivo* de variants acides de la filaggrine. Ces formes acides seraient générées par conversion de résidus arginine basiques en résidus citrulline par une enzyme, la peptidyl arginine déiminase, exprimée dans l'épiderme (Figure 2). Cette conversion a pour effet de modifier la charge globale des molécules de filaggrine afin de les rendre moins affines pour les cytokératines et permettre ainsi la dégradation finale de la filaggrine dans la partie supérieure de la couche cornée (Harding et Scott, 1983 ; Senshu et coll.,1995).

Figure 2: Conversion des arginines en citrullines par une Peptidyl Arginine Déiminase (PAD)



1.3. Caractérisation des épitopes reconnus par les ACPA

Les antigènes cibles des auto-anticorps anti-filaggrine et exprimés dans les divers tissus correspondent tous à des formes plus ou moins maturées de filaggrine et avec pour caractéristique commune, d'être des variants acides ou neutres de ces molécules. Ceci nous a amené logiquement à émettre l'hypothèse de l'existence d'une modification post-traductionnelle des (pro)filaggrines comme étant à l'origine de la génération des épitopes reconnus par les auto-anticorps. En accord avec ceci, le précurseur, c'est à dire la profilaggrine, n'était pas clairement pas reconnue par les sérums rhumatoïde dans l'épiderme humain (publication 8).

Grâce à notre partenariat avec la Société Biomérieux et le Dr T. Senshu de Tokyo, des outils moléculaires de premier intérêt tels qu'une filaggrine humaine recombinante et un anticorps anti-citrulline ont été élaborés. Ils nous ont permis de comprendre que les épitopes reconnus par les AFA étaient générés par déimination des résidus arginine de la filaggrine en citrulline. Cette modification a pu être reproduite *in vitro* après action de la peptidyl-arginine déiminase sur divers polypeptides dérivés de la séquence de la filaggrine humaine (publication 14). L'analyse par ELISA de la réactivité des sérums de patients sur ces peptides citrullinés a confirmé le rôle essentiel du résidu citrulline mais a aussi montré que la séquence des acides aminés environnant la citrulline était déterminante pour l'immunogénicité des épitopes analysés.

1.4. Recherche d'une cible articulaire pour les ACPA

A ce stade de l'étude, il devenait essentiel de rechercher une cible articulaire de ces anticorps anti-filaggrines citrullinées. Même s'il semblait peu probable que des (pro)filaggrines soient exprimées dans les tissus osseux et synoviaux, l'existence d'une cible portant des épitopes déiminés et immunologiquement apparentée à la filaggrine restait possible. La découverte d'un véritable auto-

antigène articulaire aurait permis de confirmer le rôle physio-pathologique de ces auto-anticorps dans le déclenchement et l'entretien de la maladie.

Ayant à disposition des tissus synoviaux provenant d'une série de patients ayant subi une synovectomie chirurgicale, nous avons pu obtenir diverses informations concernant ces prélèvements. La présence d'auto-anticorps anti-filaggrine citrullinée est observée dans les tissus lésés à un taux beaucoup plus important que celui trouvé dans le sérum des patients. De plus, la mise en culture de fragments de synoviale rhumatoïde, montre que ces anticorps sont synthétisés par des plasmocytes infiltrants, suggérant la présence d'un auto-antigène activateur au sein du tissu (publication 15). Enfin, quelques temps avant mon départ, Christine Masson-Bessière qui effectuait alors son doctorat au laboratoire, a identifié une cible articulaire pour ces auto-anticorps. Deux protéines, p55-61 et p64-78, portant toutes deux des résidus citrullines ont été extraites des membranes synoviales et reconnues spécifiquement par les sérums rhumatoïdes; ces protéines ont été identifiées aux chaînes a et b de la fibrine. D'autre part, le fait que ces deux protéines ne soient ciblées par les sérums rhumatoïdes qu'après déimination par une peptidyl arginine déiminase (PAD), soulignait une fois de plus le rôle fondamental de la déimination dans l'apparition des épitopes et justifiait une nouvelle dénomination pour ces auto-anticorps comme anticorps « anti-protéines citrullinées ».

La fibrine est une protéine complexe issue de la protéolyse du fibrinogène plasmatique par la thrombine lors de la cascade de la coagulation sanguine et facteur tissulaire de la réponse inflammatoire. Alors qu'il paraît logique de la retrouver au coeur du pannus rhumatoïde, les mécanismes impliqués dans l'apparition des épitopes restent à élucider. En particulier, l'implication éventuelle d'une PAD au sein de l'articulation pourrait être un facteur déterminant pour le développement la maladie. La distribution tissulaire des PAD est en effet très large et on les retrouve dans de nombreux organes et tissus tels que épiderme, muscle squelettique ou cerveau (Ishigami et coll., 2001). A ce jour, 5 types différents de PAD ont été clônées. L'équipe du Pr Serre participe activement à cette recherche, et a effectué en particulier le clonage des formes I et VI (Guerrin et coll., 2003 ; Chavanas et coll., 2004).

1.5. Aspects diagnostiques

Comme nous l'avons évoqué lors de la présentation de la polyarthrite rhumatoïde, les auto-anticorps ACPA présentent un intérêt diagnostique évident puisqu'ils sont associés aux formes les plus sévères de la maladie et leur apparition à un stade très précoce, en font des outils de diagnostic précieux pour le clinicien.

Durant les années 1985 à 1995, la présence des ACPA dans les sérums des patients atteints de maladies rhumatoïdes était établie dans de nombreux laboratoires, par immunofluorescence indirecte sur cryocoupages d'œsophage de rat (Vincent et coll., 1989; Hoet and VanVenrooij, 1992). Suite à la découverte des trois antigènes cibles de l'épithélium d'œsophage de rat, un test diagnostique par

immunotransfert a été mis au point qui a permis d'améliorer sensiblement les sensibilités et les spécificités diagnostiques (publication 7). Par la suite, nous avons aussi développé un test similaire, utilisant cette fois le variant acide de la filaggrine extrait à partir d'épiderme humain mais les paramètres diagnostiques n'ont pas été meilleurs que ceux obtenus sur l'œsophage de rat (publication 13).

Depuis mon départ, deux tests immuno-enzymatiques (de type ELISA) , basés soit sur une filaggrine recombinante humaine déiminée (Nogueira et coll., 2001), soit sur une filaggrine recombinante murine déiminée (Vincent et coll., 2002) ont été développés dans le laboratoire du Pr Guy Serre à l'hôpital Purpan. En accord avec les résultats obtenus par immunotransfert, on retrouve les meilleurs paramètres diagnostiques avec la séquence murine. Sur un échantillon composé de 711 patients atteints de diverses pathologies rhumatoïdes (dont 240 polyarthrites rhumatoïdes), ce test ELISA permet d'obtenir pour une spécificité de diagnostic de 99%, une sensibilité de détection de 65% des sérums rhumatoïdes (Vincent et coll., 2002). Une version automatisée de ce test immuno-enzymatique devrait être prochainement commercialisée sur l'automate VIDAS par la société Biomérieux (Nogueira et coll., 2004).

1.6. Aspects physiopathologiques

Les données obtenues soulèvent évidemment la question de l'implication de la PAD dans la physio-pathologie de la polyarthrite rhumatoïde et plus particulièrement dans le déclenchement du processus auto-immun. La conversion des résidus arginines des protéines en citrulline peut en effet modifier de façon importante la charge et donc le repliement des protéines, altérant ainsi leur propriétés fonctionnelles mais aussi leur propriétés immunogènes. En exemple, une déimination accrue de la myéline basique a été décrite chez les patients atteints de sclérose en plaques (Tranquill et coll., 2000 ; Kim et coll., 2003) alors qu'un défaut de déimination de la kératine 1 est observé au niveau des lésions cutanées dans le psoriasis (Ishida-Yamamoto, 2000).

En ce qui concerne la polyarthrite rhumatoïde, la présence d'une PAD au sein du pannus rhumatoïde reste à démontrer mais diverses données confortent déjà cette hypothèse (Asaga et coll., 1998 ; Ishigami et Yamada, 2001). En particulier, les travaux d'Asaga et coll. en 1998 suggèrent que la PAD de type II serait exprimée dans le cytoplasme de macrophages et pourrait donc être relarguée par les macrophages apoptotiques infiltrant le pannus. Plus récemment, une étude menée par Suzuki et coll. (2003) suggère que certains haplotypes de la PAD IV pourraient être associés à la polyarthrite rhumatoïde. Cette corrélation n'a toutefois pas pu être confirmée lors d'une étude réalisée par le groupe de Guy Serre à partir cette fois de patients d'origine caucasienne (Caponi et coll., 2005). Enfin, après déimination des protéines cibles, la réponse anticorps pourrait être entretenue par une stimulation des lymphocytes T spécifiques restreinte aux molécules du CMH II décrits comme facteurs de susceptibilité à la maladie. Il a en effet été observé que la conversion d'arginine en citrulline

augmente l'affinité des épitopes pour ces allèles (Hill et coll., 2003) et que le titre en ACPA est significativement plus élevé dans le sérum des patients porteurs de ces allèles de susceptibilité (Forslin et coll., 2000).

1.7. Conclusion :

La caractérisation biochimique des différentes cibles reconnues par les auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde a permis de mettre en évidence la présence de résidus citrulline dans l'ensemble des molécules étudiées, soulignant ainsi le rôle essentiel de la déimination pour leur antigénicité. Dorénavant appelés anticorps anti-protéines/peptides citrullinés, ces auto-anticorps étaient initialement dénommés anticorps « anti-kératine » et étaient utilisés dans les années 85 à 90, comme simple outil de diagnostic au service des cliniciens. Toutefois, les données fournies par les études cliniques indiquaient déjà leur association aux formes les plus sévères et actives de la maladie ainsi que leur apparition à un stade très précoce. Ces éléments suggéraient une implication forte de cette réponse auto-immune dans le physio-pathologie de la polyarthrite rhumatoïde.

Dès 1986, le Pr Guy Serre a entrepris de caractériser les antigènes ciblés par cette population d'auto-anticorps que l'on ne savait alors identifier que par immunofluorescence indirecte sur cryocoupes d'œsophage de rat. La position privilégiée de son laboratoire implanté sur un site universitaire bénéficiant d'une ouverture sur la réalité clinique ainsi que l'existence de partenariats avec l'industrie (Sociétés Clonatec et Biomérieux) ont été des facteurs clés pour l'émergence de cet axe de recherche. En décembre 1989, j'ai rejoint son équipe et me suis investie dans la caractérisation des antigènes murins et des antigènes humains exprimés dans divers tissus apparentés à l'épiderme. Les résultats concernant ces divers antigènes tous apparentés à la filaggrine se sont concrétisés par 9 publications dans des journaux à comité de lecture. Deux publications supplémentaires établissant les performances de tests basés sur l'utilisation en Western blots des antigènes murins ou humains ont permis de démontrer les applications diagnostiques de ces résultats.

La mise en évidence de résidus citrulline sur tous les antigènes et le fait que la déimination de la filaggrine soit étroitement liée à son caractère antigénique a été une avancée particulièrement importante. Outre deux publications dans *Journal of Immunology*, ces données ont eu des retombées importantes puisqu'elles ont permis de découvrir par quel type de mécanisme étaient générés les épitopes portés par les antigènes de type épidermique mais aussi d'identifier une cible antigénique dans les tissus synoviaux. Elles soulignaient alors le rôle émergent d'une « immunité anti-citrulline » reconnue aujourd'hui comme pouvant être à la base de certains dérèglements impliqués dans diverses maladies auto-immunes (Van Gaalen et coll., 2005). Les perspectives ouvertes par ces résultats pouvant s'avérer importantes d'un point de vue industriel, ce travail a fait l'objet de trois brevets couvrant l'utilisation de peptides citrullinés dérivés des séquences de la filaggrine pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde (brevet n°1 déposé par la société BioMérieux) ou pour d'éventuelles

applications thérapeutiques dans le cadre du traitement de maladies auto-immunes (brevet n°2 déposé par l'Université Paul Sabatier et brevet n°3 déposé par la société BioMérieux).

Enfin, je tiens à ajouter que cette expérience a été pour moi très enrichissante car elle m'a permis de découvrir ce qu'était le monde de la recherche, le travail en équipe ainsi que l'encadrement d'étudiants. Ainsi, j'ai participé au co-encadrement de deux étudiantes en thèse (Mireille Sebbag et Christine Masson-Bessière) et à l'encadrement de plusieurs étudiants en DEA (4 dont 2 à part entière).

Références

Asaga H., Yamada M. and Senshu T. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 1998, **243**: 641-646.

Caponi L., Petit-Teixeira E., Sebbag M., Bongiorno F., Moscato S., Pratesi F., Pierlot C., Osorio J., Chapuy-Regaud S., Guerrin M., Cornelis F., Serre G. and Migliorini P. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. **Ann. Rheum. Dis.** 2005, **64**: 587-593.

Chavanas S., Méchin M.C., Takahara H., Kawada A., Nachat R., Serre G. and Simon M. Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals conserved non-coding segments and a new human gene, *PADI6*. **Gene** 2004, **330**: 19-27.

Dale B.A. Purification and characterization of a basic protein from the stratum corneum of mammalian epidermis. **Biochim. Biophys. Acta.** 1977, **491**: 193-204.

Dale B.A., Presland R.B., Patrick Lewis S., Underwood R.A. and Fleckman P. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament network with alteration of cell shape and nuclear integrity. **J. Invest. Dermatol.** 1997, **108**:179-187.

Forslin K., Vincent C., Serre G. and Svensson B. Antifilaggrin autoantibodies in early rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.** 2000, **29**: 320-322.

Guerrin M., Ishigami A., Mechin M.C., Nachat R., Valmary S., Sebbag M., Simon M., Senshu T. and Serre G. cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. **Biochem. J.** 2003, **370**:167-174.

Harding C.R. and Scott I.R. Histidine-rich proteins (filaggrins): structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. **J. Mol. Biol.** 1983, **170**:651-673.

Hill J.A., Southwood S., Sette A., Jevnikar A.M., Bell D.A. and Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. **J Immunol.** 2003, **171**: 538-541.

Hoet R.M. and Van Venrooij W.J. The antiperinuclear factor (APF) and antikeratin antibodies (AKA) in rheumatoid arthritis. In Smolen J.S., Kalden J. R., Maini R.N. **Rheumatoid arthritis**.1992, Springer Verlag Publishers, berlin, Heidelberg, 299-318.

Ishida-Yamamoto A., Senshu T., Takahashi H., Akiyama K., Nomura K. and Iizuka H. Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. **J. Invest. Dermatol.** 2000, **114**: 701-705.

Ishigami A., Asaga H., Ohsawa T., Akiyama K. and Maruyama N. Peptidylarginine deiminase type I, II, III and IV are expressed in rat epidermis. **Biomed. Res.** 2001, **22**:63-65.

Ishigami A. and Yamada M. Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human

eosinophils and neutrophils. **J. Leucocyte Biol.** 2001, **70**: 46-51.

Kim J.K., Mastronardi F.G., Wood D.D., Lubman D.M., Zand R. and Moscarello M. Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis. **Mol. Cell. Proteomics** 2003, **2**: 453-462.

Mack J.W., Steven A.C. and Steinert P.M. The mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments. The ionic zipper hypothesis. **J. Mol. Biol.** 1993, **232**:50-66.

MacKinley-Grant L.J., Idler W.W., Bernstein I.A., Parry D. A., Cannizaro L., Croce C.M., Huebner K., Lessin S.R. and Steinert P.M. Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 1989, **86**:4848-4852.

Nogueira L., Sebbag M., Vincent C., Arnaud M., Fournie B., Cantagrel A., Jolivet M. and Serre G. Performance of two ELISAs for antifilaggrin autoantibodies, using either affinity purified or deiminated recombinant human filaggrin, in the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** 2001, **60**: 882-887.

Nogueira L., Foussadier A., Vincent C., Clavel C., Moinard N. and Jolivet M. Vidas-EDRA fully automated testing of autoantibodies to citrullinated proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. Ther.** 2004, **6**:14

Quismorio P.F., Kaufman Jr R.L., Beardmore T. and Mongan S. Reactivity of serum antibodies to the keratin layer of rat esophagus in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 1983, **26**: 494-499.

Senshu T., Akiyama K., Kan S., Asaga H., Ishigami A. and Manabe M. Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. **J. Invest. Dermatol.** 1995, **105**:163-169.

Serre G., Vincent C, Fournié B., Lapeyre F., Soleilhavoup J-P. and Fournié A. Anticorps anti-stratum corneum d'oesophage de rat, autoanticorps anti-kératines épidermiques et anti-épiderme dans la polyarthrite rhumatoïde et différentes affections rhumatologiques. **Rev. Rhum.** 1986, **53** :607-614.

Suzuki A., Yamada R., Chang X., Tokohiro S., Sawada T., Suzuki M., Nagasaki M., Nakayama-Hamada M., Kawaida R., Ono M., Ohtsuki M, Furukama H., Yoshino S., Yukioka M., Tohma S., Matsubara T., Wakitani S., Teshima R., Nishioka Y., Sekine A., Iida A., Takahashi A., Tsunoda T., Nakaruma Y. and Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. **Nat. Genet.** 2003, **34**: 395-402.

Tranquill L.R., Cao L., Ling N.C., Kalbacher H., Martin R.M. and Whitaker J.N. Enhanced T cell responsiveness to citrulline-containing myelin basic protein in multiple sclerosis patients. **Mult. Scler.** 2000, **6**: 220-225.

Van Gaalen F., Ioan-Fascina A., Huizinga T.W.J. and Toes R.E.M. The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis. **J. Immunol.** 2005, **175**:5575-5580.

Vincent C., Serre G., Lapeyre F., Fournié B., Ayrolles C., Fournié A. and Soleilhavoup J-P. High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called "antikeratin antibodies". **Ann. Rheum. Dis.** 1989, **81**: 83-89.

Vincent C., Nogueira L., Sebbag M., Chapuy-Regaud S., Arnaud M., Letourneur O., Rolland D., Fournie B., Cantagrel A., Jolivet M. and Serre G. Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by enzyme-linked immunosorbent assay : a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 2002, **46**: 2051-2058.

Young B.J.J., Mallya R.K., Leslie R.D.G., Clark C.J.M. and Hamblin T.J. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. **Br. Med. J.** 1979, **2**: 97-99.

2. Le système ubiquitine-protéasome et ses implications dans le cancer

*Janv 2000 à déc 2002, Equipe « Immunopharmacologie Structurale et Fonctionnelle » du Pr JE Gairin
Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (UMR 5089 CNRS-UPS)*

*Depuis Janv 2003, Equipe « Système Ubiquitine-protéasome et cancer » du Pr J.E. Gairin, UMR 2587 CNRS-
Pierre Fabre, Centre de Recherche en Pharmacologie Santé*

En janvier 2000, après dix années passées dans le laboratoire de Guy Serre, j'ai changé de thématique en rejoignant l'équipe du Pr. Jean-Edouard Gairin à l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (UMR 5089 CNRS-UPS) de Toulouse. Après les maladies auto-immunes et la polyarthrite rhumatoïde, c'était le domaine du cancer que je découvrais.

A mon arrivée en janvier 2000, le groupe de J.E. Gairin développait une thématique centrée sur l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la présentation des peptides antigéniques au système immunitaire. Il étudiait en particulier les mécanismes de reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques, mécanismes essentiels à l'immunosurveillance antitumorale (Blanchet et coll., 2001). Je me suis alors intégrée dans son équipe en choisissant d'étudier le protéasome humain et à sa régulation fonctionnelle, ce complexe jouant un rôle fondamental dans la maturation des peptides antigéniques d'origine tumorale.

Par la suite, janvier 2003 a vu l'émergence d'une nouvelle structure, l'UMR 2587, dirigée par le Pr J.E. Gairin et créée dans le cadre du partenariat CNRS – Pierre Fabre. L'unité bénéficie d'interactions privilégiées avec deux Unités Mixtes de Service implantées sur le même site : une unité de chimie des substances naturelles bio-actives et un centre de criblage pharmacologique. De plus, des interactions se sont également établies entre l'UMR et le Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale (CROE) du groupe Pierre Fabre qui a rejoint le site à l'automne 2004.

L'UMR 2587 a un double objectif : rechercher de nouvelles cibles pharmacologiques d'intérêt thérapeutique et découvrir de nouvelles molécules candidats-médicaments dans le domaine du cancer. Le cancer est en effet une préoccupation majeure de la santé publique et le développement de stratégies innovantes pour améliorer la situation des patients aussi bien sur le plan du diagnostic que sur le plan thérapeutique est une urgence en oncologie humaine. Les traitements actuels reposent sur des artilleries lourdes incluant des approches de chirurgie, de radio- et chimio-thérapie. Malgré les efforts considérables visant à améliorer ces thérapies classiques, certains types de cancers donnent des réponses insatisfaisantes. Toutefois, l'amélioration permanente de la compréhension des mécanismes de régulation/dérégulation cellulaire dans le contexte tumoral devrait permettre de proposer de nouvelles cibles pharmacologiques d'intérêt pour la chimiothérapie. Ainsi, les efforts de recherche de l'UMR 2587 ont été focalisés sur trois systèmes biologiques pouvant générer des cibles d'intérêt

thérapeutique dans le domaine du cancer : le centrosome et le cytosquelette microtubulaire, le système ubiquitine-protéasome et la synapse immunologique (Cf Organigramme de l'UMR 2587 en annexe 1).

J'ai choisi d'intégrer l'UMR dès sa création, en janvier 2003, pour participer au projet de recherche porté par J.E Gairin et centré sur l'étude du système ubiquitine-protéasome. J'ai vu là l'opportunité de pouvoir continuer la thématique de recherche que j'avais initiée et la possibilité de l'enrichir au contact de chercheurs issus du milieu industriel.

2.1. Introduction et état des connaissances

Le protéasome est un complexe multicatalytique présent dans le cytoplasme et le noyau de toutes les cellules eucaryotes. Il constitue la machinerie protéolytique de la voie ubiquitine-protéasome, voie majeure responsable de la dégradation des protéines intracellulaires. Cette voie assure un contrôle-qualité dans la cellule en dégradant les protéines produites en excès, défectueuses ou mal repliées par suite de mutations génétiques ou de stress variés et qui tendent à former des agrégats néfastes pour la cellule (Kostova et Wolf, 2003). A côté de ces fonctions de « ménage cellulaire », la voie ubiquitine-protéasome détermine la durée de vie et la concentration de nombreuses enzymes et protéines régulatrices dont beaucoup jouent un rôle dans la progression du cycle cellulaire, la transcription ou la réparation de l'ADN ainsi que dans le déclenchement de l'apoptose (Orlowski, 1999). De même, le fonctionnement du système immunitaire repose en partie sur la reconnaissance des peptides immunocompétents qui sont issus de la dégradation des protéines intracellulaires (Kloetzel, 2001).

2.1.1. Le système ubiquitine-protéasome

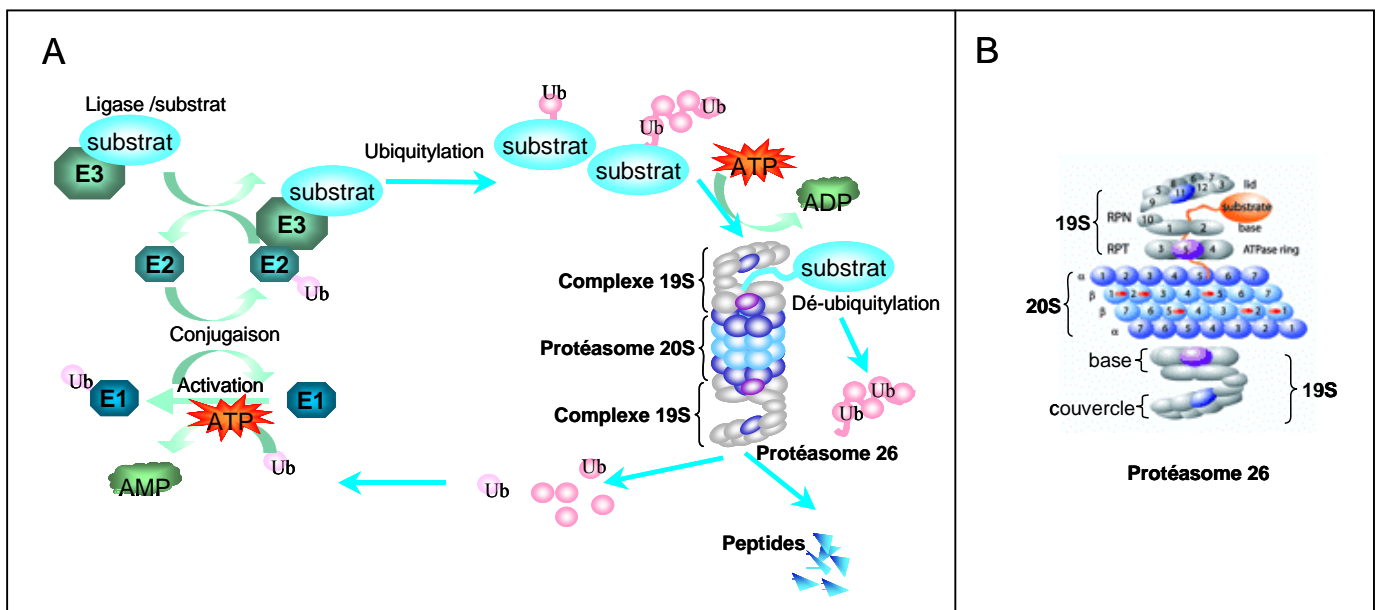
Le système ubiquitine-protéasome fonctionne en deux grandes étapes (Ciechanover, 1998): une première basée sur la modification post-traductionnelle du substrat par ajout covalent d'une chaîne d'ubiquitine et une seconde où le substrat ainsi modifié est dégradé par la structure multicatalytique du protéasome 26S (Figure 3A). L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés dont la séquence est hautement conservée chez les eucaryotes. La poly-ubiquitylation des protéines implique trois enzymes fonctionnant en cascade : en présence d'ATP, une première enzyme E1 lie l'ubiquitine (étape d'activation) puis la transfère sur l'enzyme E2 (étape de conjugaison) qui à son tour permettra le transfert de l'ubiquitine sur la protéine grâce à l'action de la dernière enzyme, l'ubiquitine-ligase E3. Dans la plupart des cas, l'enzyme E3 se comporte comme un récepteur qui sélectionne et présente à l'enzyme E2 la protéine à détruire. L'ubiquitine est fixée de façon covalente aux protéines cibles par une liaison isopeptidique entre le groupement COOH de sa glycine C-terminale et le groupement ϵ NH₂ d'un résidu lysine du substrat. Le processus se répète en se servant

par la suite de la lysine 48 de l'ubiquitine déjà fixée sur le substrat, aboutissant à la formation d'une chaîne d'ubiquitines. Généralement, une chaîne d'au moins quatre molécules d'ubiquitine représente le signal de dégradation.

La protéine ainsi étiquetée sera reconnue par le protéasome 26S qui permettra sa dégradation et le recyclage des molécules d'ubiquitine, l'ensemble de ces étapes étant ATP-dépendantes. A l'issue du processus de dégradation, les peptides libérés seront soit dégradés en acides aminés réutilisables au cours de la synthèse protéique, soit pris en charge par les molécules du CMH de classe I pour être présentés à la surface de la cellule (Kloetzel, 2001). La voie ubiquitine-protéasome participe ainsi au maintien de l'équilibre entre biosynthèse et dégradation des protéines intracellulaires et sa présence est donc essentielle à la viabilité de la cellule et au bon fonctionnement de son métabolisme.

Figure 3: La voie de l'ubiquitine-protéasome (A) et le protéasome 26S (B)

Le substrat protéique est couplé par liaison covalente à plusieurs molécules d'ubiquitine (Ub) par les enzymes E1, E2 et E3. Il est ensuite reconnu et dégradé par le protéasome 26S qui relargue dans le milieu des peptides et de l'ubiquitine qui sera recyclée.



(d'après Kostova et Wolf, 2003)

Le protéasome 26S apparaît au microscope électronique comme une structure allongée de 45 nm de long comprenant un corps central, le protéasome 20S, porteur des activités protéolytiques, coiffé par deux complexes 19S, disposés symétriquement. Le complexe 19S se décompose en deux sous-complexes appelés couvercle et base (Figure 3B). La base comprend plusieurs ATPases

impliquées dans la reconnaissance, le dépliement et la translocation du substrat au sein du protéasome alors que le couvercle est impliqué dans la dé-ubiquitylation du substrat.

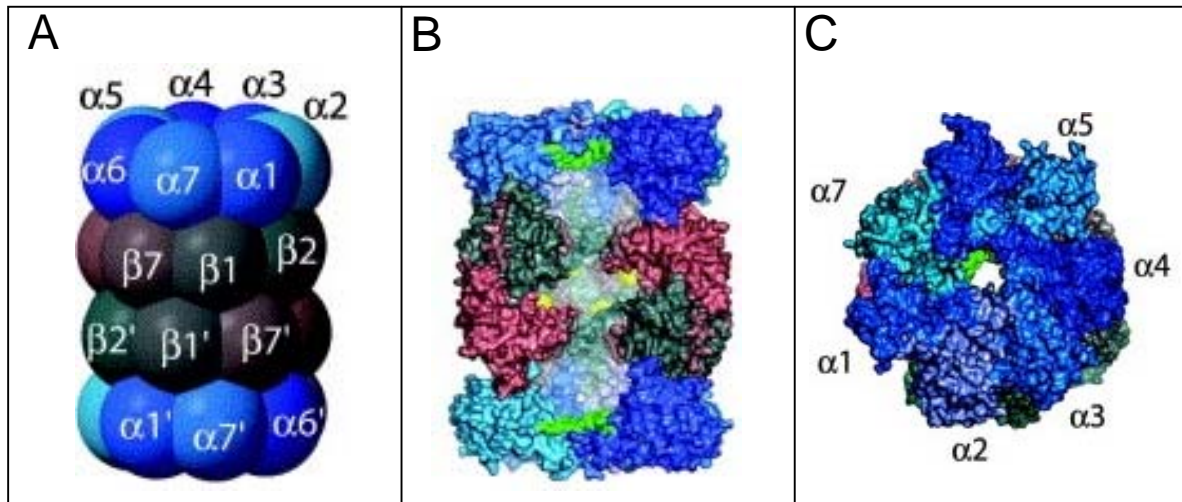
Dans la cellule eucaryote, le protéasome 26S, appelé ainsi en raison de son coefficient de sédimentation, est majoritairement présent dans le cytoplasme et le noyau, mais est également associé au réticulum endoplasmique où il dégrade les protéines anormales immédiatement après leur biosynthèse (Kostova et Wolf, 2003).

2.1.2. Le protéasome 20S

Le cœur catalytique du protéasome ou protéasome 20S est un complexe protéique de 700 kDa, de forme cylindrique présentant chez toutes les cellules eucaryotes, une architecture commune en forme de baril (Figure 4). Ce baril est composé de quatre anneaux accolés, chaque anneau étant constitué de sept sous-unités différentes qui selon leur séquence, peuvent être classées en sous-unités de type α ou de type β . Les anneaux externes sont formés de sous-unités α ($\alpha 1$ à $\alpha 7$) sur lesquelles se lient les complexes régulateurs du protéasome 20S. Les deux anneaux internes constitués de sous-unités β ($\beta 1$ à $\beta 7$) renferment les sites actifs responsables des activités protéolytiques (Groll et coll., 1997; Unno et coll., 2002). L'empilement de ces anneaux génère un canal qui traverse la particule de haut en bas et délimite deux antichambres et une chambre catalytique centrale renfermant trois activités enzymatiques majeures de type chymotrypsine, trypsine et PGPH (post-glutamyl peptide hydrolyzing). Deux autres activités clivant préférentiellement les liaisons peptidiques après un acide aminé à chaîne ramifiée ou un petit acide aminé neutre ont aussi été décrites pour le protéasome des mammifères (Orlowski, 1993). Le protéasome 20S est donc en principe capable d'hydrolyser la plupart des liaisons peptidiques. Toutefois, cette architecture complexe prévient l'hydrolyse incontrôlée des protéines intracellulaires car l'assemblage des sous-unités α en anneau forme un pore central de très faible diamètre, limitant l'accès des substrats à la chambre protéolytique. L'ouverture du canal semble régulée par la fixation de complexes coiffant de part et d'autre le protéasome 20S. La porte d'entrée ouverte, les polypeptides dépliés se frayent un chemin jusqu'aux sites actifs situés dans la cavité centrale, le parcours réalisé étant alors d'au moins 8 à 10 nm. Le mécanisme mis en jeu est à ce jour inconnu tout comme le rôle précis des deux antichambres (Groll et Huber, 2003).

Figure 4 : Architecture du protéasome 20S vu de face (A), en coupe (B) ou de dessus (C)

Substrats et produits circulent à l'intérieur de la structure après ouverture du portail formé par les parties N-terminales des sous-unités α (marquées en vert). Trois sous-unités portent les sites catalytiques (marqués en jaune) et sont présentes au sein de la chambre catalytique.



(d'après Groll et coll., 1997)

D'une façon générale, le protéasome constitue le prototype d'une nouvelle famille de protéases appelées « N-terminal nucléophile hydrolases » où l'élément catalytique de ces enzymes est constitué par l'acide aminé N-terminal. Dans le cas du protéasome, les trois activités catalytiques, chymotrypsine, trypsine et PGPH ont été localisées physiquement sur les trois sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$. Ces sous-unités présentent des sites actifs relativement homologues et utilisent toutes le groupement hydroxyle de leur résidu thréonine N-terminal comme nucléophile pour attaquer les liaisons peptidiques (Fenteany et coll., 1995). D'autre part, il semble que l'architecture interne du protéasome ait pour but de guider la chaîne polypeptidique jusqu'aux sites actifs, en prévenant son repliement qui rendrait la dégradation inefficace. La relative largeur de la cavité interne permet ensuite un confinement du substrat en son sein, à proximité des sites actifs. Grâce à ce mécanisme, le protéasome engendre des produits de dégradation comprenant entre 3 à 20 acides aminés qui, exceptés ceux présentés sur les molécules de classe I du CMH, sont hydrolysés en acides aminés par des peptidases cellulaires.

2.1.3. Les modulateurs du protéasome

Dans la cellule eucaryote, le protéasome ne fonctionne probablement jamais seul mais en interaction avec d'autres facteurs qui contrôlent son ouverture et qui le fournissent en substrat. Parmi ces facteurs, le complexe 19S joue un rôle prépondérant en tant qu'activateur ATP-dépendant du protéasome 20S (Voges et coll., 1999). En se liant aux deux extrémités du corps catalytique 20S, il active la dégradation globale des protéines en « ouvrant » les orifices des anneaux α . Ce complexe

19S est organisé en deux sous-ensembles appelés base et couvercle (Ferrell et coll., 2000). La base du complexe 19S contient des sous-unités de type ATPases (Figure 3B) qui fournissent l'énergie nécessaire au dépliement des protéines et à l'ouverture de l'anneau α afin de permettre l'introduction du substrat à l'intérieur de la chambre catalytique du protéasome 20S (Köhler et coll., 2001). Le couvercle, uniquement formé de sous-unités non ATPasiques, joue un rôle dans la reconnaissance spécifique de la chaîne de polyubiquitine et contient également une activité isopeptidase permettant l'hydrolyse de ces chaînes en ubiquitine libre. Le complexe 19S semble aussi impliqué dans la reconnaissance de certains substrats qui peuvent être dégradés par le protéasome de façon ubiquitine-indépendante.

Dans un contexte de stimulation de la réponse immunitaire et notamment en présence d'interféron γ , trois nouvelles sous-unités β portant les activités enzymatiques majeures sont induites et incorporées au sein d'une structure tout à fait analogue au protéasome standard, appelée « immunoprotéasome ». La triple activité enzymatique du protéasome eucaryotique peut être ainsi modulée selon la fonction remplie et dans le cas de l'immunoprotéasome, les activités de type trypsine et chymotrypsine sont favorisées, tandis que l'activité PGPH est diminuée (Boes et coll., 1994). Ceci confère à l'immunoprotéasome une spécificité de clivage plus appropriée à la production de peptides immunocompétents car mieux « présentés » par les molécules de CMH de classe I (Rock et Goldberg, 1999) et de nombreux travaux mettent en évidence une maturation préférentielle des antigènes viraux par l'immunoprotéasome (Sijts et coll., 2000). En plus de son effet direct sur l'activité catalytique du protéasome, l'interféron γ induit la formation d'un autre activateur, le régulateur 11S ou PA28, capable de se lier au protéasome 20S et permettant une production plus efficace de peptides (Reichester et Hill, 2005).

Un dernier activateur plus récemment identifié est le PA200 qui est exprimé exclusivement dans le noyau et donc la fonction biologique serait de réguler la dégradation de protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN (Ustrell et coll., 2002).

Enfin, l'existence de modifications post-traductionnelles est un élément supplémentaire intervenant dans la complexité et l'hétérogénéité structurale du protéasome. Des modifications de type phosphorylation ont été décrites sur plusieurs composants formant la base et le couvercle du complexe 19S (Ferrell et coll., 2000). En ce qui concerne le cœur catalytique 20S, des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation ont été rapportées pour certaines sous-unités α et en particulier, des sites de phosphorylation sur des résidus sérine ont été identifiés sur la sous-unité $\alpha 7$ (Castano et coll., 1996; Feng et coll., 2001; Horiguchi et coll., 2005).

Les travaux de Bose et coll. (2001, 2004) indiquent que la phosphorylation de la sous-unité $\alpha 7$ augmente la stabilité de la liaison entre le régulateur 19S et le protéasome 20S. Bien que la

fonction de cette modification ne soit pas encore clairement identifiée, le fait que le niveau de phosphorylation de $\alpha 7$ soit diminué en présence d'interféron γ suggère que cette phosphorylation pourrait permettre d'orienter l'assemblage du protéasome 20S avec les différents régulateurs cellulaires et dans un contexte d'activation de la réponse immunitaire, favoriser l'assemblage du complexe 20S avec le régulateur PA28.

2.1.4. Protéasome et cancer

De nombreux travaux montrent l'intervention du protéasome dans des mécanismes de cancérisation liés à la dégradation de protéines telles que des facteurs de transcription (Coux et coll., 1996), des régulateurs du cycle cellulaire (Ciechanover, 1998) ou des protéines supresseurs de tumeurs (Zhang et coll., 2004). Ainsi, il est capable de réguler la survie des cellules en contrôlant la dégradation des protéines p53 et NF κ B (Nuclear Factor-kappa B) intervenant dans le phénomène d'apoptose. La protéine suppresseur de tumeur p53 est un substrat du protéasome : elle peut être en effet ubiquitinée par l'ubiquitine-ligase MDM2 et adressée au protéasome. Le taux d'expression de MDM2 étant contrôlé au niveau transcriptionnel par la protéine p53, ces deux protéines forment une boucle d'auto-régulation (Williams et McConkey, 2003). L'activité du facteur de transcription NF κ B est quant à elle sous le contrôle de la famille des protéines inhibitrices I κ B qui le « séquestrent » dans le cytoplasme. Divers types de signaux induisent la phosphorylation puis la dégradation *via* le protéasome de ces inhibiteurs pour que le NF κ B puisse être dirigé vers le noyau, où il activera la transcription de gènes de survie codant pour des cytokines, des molécules d'adhésion et des protéines anti-apoptotiques (Adams, 2003). De par sa fonction, le protéasome est donc considéré comme une cible de choix dans la recherche de traitements anti-cancéreux et en accord avec ceci, les cellules normales répondent aux inhibiteurs du protéasome par un simple arrêt de leur cycle cellulaire, tandis que les cellules cancéreuses s'orientent plutôt vers l'apoptose (Drexler et coll., 2000 ; Adams, 2003). D'abord mis au point pour bloquer et étudier des fonctions biologiques du protéasome, ces inhibiteurs ont rapidement été identifiés comme ayant de forts potentiels anti-tumoraux et anti-inflammatoires (Goldberg et Rock, 2002). Les mécanismes impliqués dans l'initiation et le maintien du processus d'apoptose restent toutefois à clarifier. Même si ces inhibiteurs induisent dans un premier temps l'accumulation de nombreux facteurs pro-apoptotiques, ils provoquent aussi l'augmentation de facteurs anti-apoptotiques, ce qui rend leur utilisation en pharmacologie anti-tumorale relativement délicate (Sohn et coll., 2006). De plus, il est fréquent d'observer des sensibilités différentes à un inhibiteur donné selon l'origine de la cellule tumorale (Almond et Cohen, 2002). Les inhibiteurs spécifiques du protéasome sont majoritairement de petits peptides liés par leur partie C-terminale à un pharmacophore (Kisselev et Goldberg, 2001). Le pharmacophore interagit avec le résidu catalytique en formant des liaisons covalentes réversibles ou irréversibles. A titre d'exemple, l'acide boronique

dipeptidique développé sous le nom de PS-341 puis de bortezomib Velcade®, a reçu l'autorisation de la « Food and Drug Administration » pour être utilisé en tant qu'agent unique de traitement chez des patients atteints d'un myélome multiple (Adams, 2002 ; Kane et coll., 2003).

Le rôle du protéasome dans la maturation des peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH de classe I suggère son implication dans les processus d'immuno-surveillance anti-tumorale (Kloetzel, 2001). Une réponse lymphocytaire T spécifique s'établit souvent spontanément contre des antigènes associés aux tumeurs, via la génération de peptides antigéniques présentés à la surface de la cellule tumorale. Certains résultats laissent supposer que l'immunoprotéasome est plus efficace que le protéasome standard pour la présentation d'antigènes tumoraux (Rock et Goldberg, 1999). Les résultats varient cependant selon le type cellulaire et le peptide antigénique considéré et le rôle de l'immunoprotéasome dans la génération d'épitopes tumoraux reste très controversé (Van den Eynde, 2001). Ainsi, si de nombreux peptides antigéniques sont générés préférentiellement par l'immunoprotéasome (Schultz et coll., 2002), d'autres sont générés par préférentiellement par le protéasome standard (Morel et coll., 2000). De plus, la transformation maligne des cellules est fréquemment associée à des dérégulations dans la machinerie de présentation antigénique, dérégulations qui permettent à la cellule tumorale d'échapper à l'immuno-surveillance.

2.2. Résultats obtenus:

Dans le cadre de l'étude des mécanismes moléculaires intervenant dans la régulation du système Ub-protéasome, j'ai initié deux axes de recherche qui ont concerné :

- 1) l'étude des modifications post-traductionnelles du protéasome 20S et de leur impact sur l'activité fonctionnelle du protéasome
- 2) la caractérisation des protéasomes exprimés dans les cellules tumorales afin d'en étudier la régulation, notamment sous l'effet de substances naturelles.

Outre une meilleure connaissance du fonctionnement de cette machinerie protéolytique au sein de la cellule tumorale, ce travail devait nous permettre de proposer à terme des modèles d'étude pertinents pour l'identification de nouveaux agents pharmacologiques à intérêt thérapeutique dans le cancer.

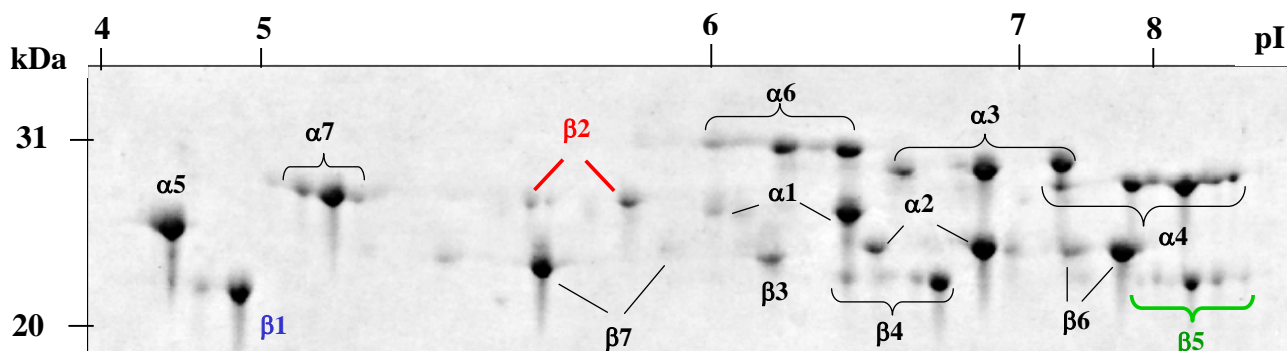
2.2.1. Etude des modifications post-traductionnelles du protéasome 20S

Dans une première phase du projet, nous avons réalisé une étude de type structure-fonction du protéasome 20S issu de cellules non tumorales. Compte-tenu de la complexité de cette structure, une

approche de type protéomique semblait particulièrement adaptée pour séparer et caractériser l'ensemble des sous-unités participant à l'architecture du protéasome 20S. J'ai donc initié ce travail en collaboration avec l'équipe de Bernard Monsarrat, à l'IPBS et plus particulièrement en participant à l'encadrement d'un étudiant en thèse, Stéphane Claverol, qui démarrait alors sa thèse basée sur l'étude structure-fonction du protéasome humain. Nous avons entrepris la séparation par électrophorèse 2D et la caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF de toutes les sous-unités du protéasome 20S purifié à partir d'érythrocytes humains. L'ensemble des sous-unités α et β du protéasome 20S humain ont ainsi été identifiées et la résolution atteinte lors de la cartographie en gel 2D a clairement souligné l'existence de plusieurs isoformes associées à la plupart des sous-unités, y compris aux sous-unités catalytiques (Figure 5). L'analyse plus poussée des sous-unités par couplage nano-HPLC/nanospray MS-MS a permis d'identifier diverses modifications post-traductionnelles du protéasome 20S (publication 17). Ce travail a été réalisé par Stéphane Claverol et par Thomas Clouaire, étudiant en D.E.A. En particulier, grâce à la mise au point d'une technique originale d'enrichissement en peptides phosphorylés issus des diverses sous-unités, il a été possible de localiser sur la sous-unité $\alpha 7$, la position de groupements phosphates sur les résidus sérine situés en position 250.

Figure 5 : Cartographie bi-dimensionnelle du protéasome 20S humain

Analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle (isoélectrofocalisation et séparation selon la taille) du protéasome 20S purifié à partir d'érythrocytes humains et identification des diverses sous-unités par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF.



L'arrivée en thèse en septembre 2001 de M^{elle} Bo Xu dans notre laboratoire a permis de poursuivre l'étude des modifications post-traductionnelles du protéasome. En effet, la cartographie publiée (publication 17) montrait l'existence de nombreuses isoformes mais, excepté pour la sous-unité $\alpha 7$ ou une phosphorylation avait été localisée par spectrométrie de masse, aucun élément n'avait pu être apporté pour expliquer la présence des autres isoformes. Une partie de du travail de thèse de Bo Xu a donc consisté à caractériser plus précisément la nature des sous-unités cartographiées. Nous avons choisi d'utiliser une approche différente et d'analyser les diverses sous-unités avec des anticorps spécifiques d'acides aminés phosphorylés. L'analyse avec un anticorps anti-phosphosérine a

confirmé la phosphorylation en sérine de la sous-unité $\alpha 7$, modification largement décrite dans la littérature, mais elle a permis de détecter deux nouvelles sous-unités phosphorylées que sont les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 7$. Ces deux sous-unités ont pu être déphosphorylées après incubation du protéasome 20S purifié avec une phosphatase à large spécificité telle que la phosphatase acide. L'accessibilité à la phosphatase des sites phosphorylés semble toutefois différente pour les deux sous-unités. En effet, la déphosphorylation de la sous-unité $\beta 7$ a nécessité un rapport phosphatase / protéasome beaucoup plus élevé que celui permettant la déphosphorylation de la sous-unité $\beta 2$. Ces observations ont confirmé la présence de groupements phosphates sur des sous-unités de type β et nous ont conduit à examiner la situation des sites potentiels de phosphorylation en sérine au sein du protéasome 20S natif. L'analyse des motifs consensus pour la phosphorylation présents sur les séquences primaires des deux sous-unités a permis d'identifier trois résidus phospho-sérine potentiels sur la sous-unité $\beta 2$ et cinq sur la sous-unité $\beta 7$. A partir de la structure cristallographique récemment établie pour le protéasome 20S bovin (Unno et al, 2003), nous avons modélisé la structure tri-dimensionnelle du protéasome 20S humain et inséré les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 7$ humaines au sein de l'architecture du complexe. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Monique Erard à l'IPBS.

Ainsi, après localisation des résidus phospho-sérine potentiels sur le modèle, il a été possible de discerner les sites sérine accessibles aux enzymes de phosphorylation ou déphosphorylation, de ceux masqués au sein du complexe par les interactions avec d'autres sous-unités. Parmi les trois sites identifiés dans la séquence de la sous-unité $\beta 2$, la sérine 171 apparaît comme le site le plus probable car elle émerge clairement à la surface de la sous-unité alors que les deux autres sérines identifiées restent partiellement enfouies dans le complexe (Figure 6). En ce qui concerne la sous-unité $\beta 7$, deux sites sérine émergent à la surface du complexe alors que trois autres présentent une moindre accessibilité aux enzymes, l'un d'eux étant même positionné dans la cavité intérieure du protéasome. La présence de groupements phosphates situés sur des résidus sérine peu accessibles permettrait de justifier le fait que la sous-unité $\beta 7$ soit difficile à déphosphoryler par traitement du protéasome natif aux phosphatases.

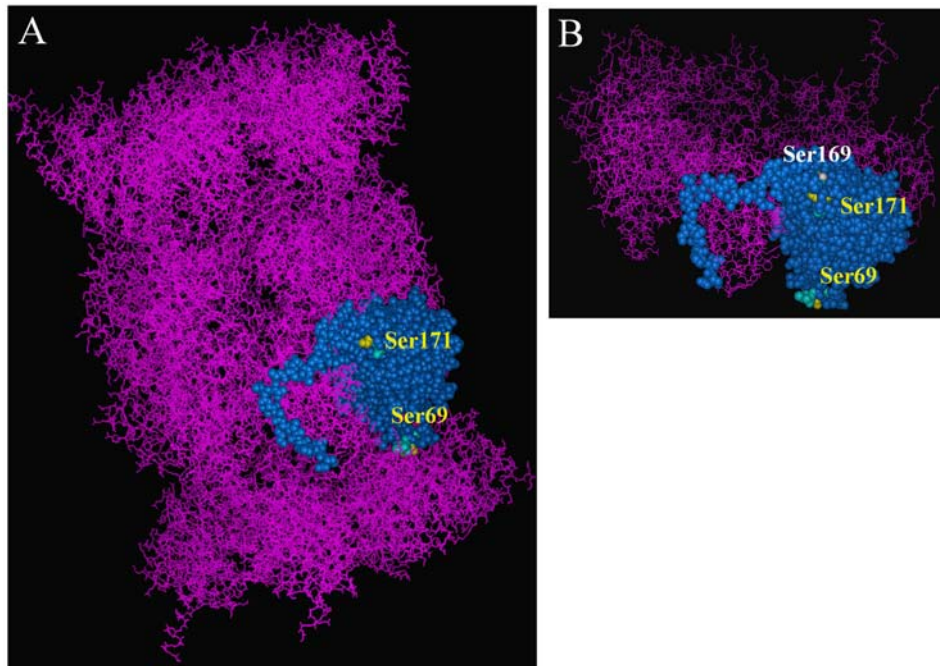
Les résultats préliminaires sur le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'activité du protéasome suggèrent que la phosphorylation n'affecte pas directement l'activité catalytique du complexe. En effet, le traitement préalable du protéasome aux phosphatases ne modifie pas le clivage de tétra peptides fluorescents utilisés en tant que substrats spécifiques des activités de type trypsine, chymotrypsine ou PGPH présentes au sein du complexe. D'autres expériences sont en cours afin d'évaluer un effet possible de la déphosphorylation sur la conformation du protéasome 20S modifiant ainsi la pénétration et le clivage de protéines substrats de plus grande taille.

Ces résultats établissent pour la première fois l'existence de modifications de type phosphorylation sur les sous-unités β du protéasome 20S incluant une sous-unité catalytique, la sous-

unité $\beta 2$; ils font l'objet d'une publication qui est actuellement soumise dans « Biochemical Journal » (publication 19).

Figure 6. Localisation des sites potentiels de phosphorylation en sérine sur la sous-unité $\beta 2$.

Les sites potentiels de phosphorylation en sérines (Ser) identifiés par le logiciel Phospho-Base et présentant des scores compris entre 0,8 et 0,9 (en blanc) ou supérieurs à 0,9 (en jaune) ont été localisés sur la sous-unité $\beta 2$, insérée dans le complexe entier (A), ou insérée dans l'anneau portant les autres sous-unités β .



2.2.2. Etude de la régulation fonctionnelle du protéasome dans les cellules tumorales

- Caractérisation des protéasomes exprimés dans les cellules tumorales

Dans une deuxième phase du projet, l'étude structure-fonction réalisée précédemment sur le protéasome d'érythrocytes a été élargie aux protéasomes préparés à partir de lignées tumorales humaines.

Lors de son stage de DEA, Cindy Savart a étudié les profils en gel 2D des protéasomes provenant de 5 lignées tumorales distinctes. Nous avons détecté trois nouvelles sous-unités présentes dans toutes les lignées cellulaires mais avec différents niveaux d'expression. Ces sous-unités correspondent aux sous-unités catalytiques de l'immunoprotéasome, sous-unités qui avaient été préalablement identifiées par spectrométrie de masse lors du travail de thèse de Stéphane Claverol. De façon intéressante, l'étude fonctionnelle réalisée avec les protéasomes purifiés provenant des cinq lignées a révélé une sensibilité différente des activités protéolytiques des divers protéasomes

tumoraux à certains inhibiteurs connus du protéasome 20S tels que la lactacystine ou l'aldéhyde peptidique MG115. Cette étude a par la suite été élargie à une série de molécules naturelles purifiées par l'UMS de Chimie des Substances Naturelles et sélectionnées par criblage à haut débit pour leurs effets inhibiteurs sur les activités protéasomales. Ces molécules ont été testées *in vitro* avec un protéasome standard provenant d'érythrocytes humains ainsi qu'avec un protéasome tumoral (lignée Raji issue du lymphome de Burkitt humain) contenant une forte proportion d'immunoprotéasome. Parmi les molécules testées, cinq ont présenté des spectres d'action différents sur les deux préparations de protéasomes avec notamment des effets modulateurs différentiels sur au moins une des trois activités catalytiques testées.

En parallèle de l'étude réalisée sur les protéasomes des lignées cellulaires, j'ai initié une collaboration avec le Dr Anne Caignard de l'Unité INSERM 487 de l'Institut Gustave Roussy de Villejuif afin d'étudier la régulation du protéasome 20S exprimé dans des lignées établies à partir de prélèvements réalisés chez un patient atteint d'un carcinome rénal. Le modèle d'étude est constitué par les cultures primaires des cellules normales, tumorales et métastatiques de ce patient. L'analyse comparative du protéasome exprimé dans les cellules normales rénales comparé à celui des cellules tumorales confirment la surexpression de l'immunoprotéasome dans les cellules cancéreuses. D'autre part, la cartographie du protéasome isolé des cellules métastatiques montre l'existence de sous-unités spécifiques à cette lignée. La caractérisation des modifications présentes au niveau des protéasomes tumoraux est en cours et leur impact sur la régulation et l'activité du protéasome reste à définir. De plus, d'un point de vue pharmacologique, il est tout à fait intéressant de comparer la sensibilité de ces diverses cellules aux inhibiteurs classiques du protéasome.

Les résultats obtenus suggèrent l'implication de l'immunoprotéasome dans la régulation du système Ub-protéasome et posent plus largement la question de son implication dans le cancer. Afin de répondre à ces questions, nous développons actuellement des outils moléculaires nécessaires à la quantification des expressions différentielles du protéasome et de l'immunoprotéasome dans les cellules tumorales. De plus, l'analyse comparative des protéasomes des cellules métastatiques et des cellules de la tumeur primaire pourrait nous permettre d'établir l'implication de certaines modifications post-traductionnelles dans des mécanismes cellulaires liés à l'initiation ou à la progression tumorale.

- Etude des effets d'une petite molécule naturelle, l'ajoène, sur l'activité du protéasome

Dans le cadre de la thèse de Bo Xu, préparée en co-tutelle avec l'Université de Pékin, nous avons pu bénéficier de molécules à activités pharmacologiques issues du « National Research Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs » de Pékin. L'une d'entre elles, l'ajoène (ou 4,5,9-

trithiadodéca-1,6,11-tre-9-oxide), composé naturel issu de l'ail a retenu notre attention car un effet cytotoxique sélectif sur des cellules tumorales (Li et coll., 2002), ainsi que sur des modèles de tumeurs greffées chez la souris avait été préalablement décrit (Nakagawa et coll., 2001). Nos résultats ont montré que *in vitro*, l'ajoène affecte sélectivement l'activité de type trypsine du protéasome et peut inhiber de ce fait la dégradation d'un peptide substrat. Ce mécanisme d'action diverge de celui de la majorité des inhibiteurs du protéasome déjà décrits qui *in vitro*, inhibent préférentiellement l'activité de type chymotrypsine. Un autre intérêt potentiel de l'ajoène réside dans la présence de groupements soufrés hautement réactifs de type sulfoxyde et disulfide, ce qui le différencie encore des inhibiteurs de type analogues peptidiques ou époxykétones naturelles. Enfin, lors du traitement par l'ajoène de cellules leucémiques humaines, deux types d'activités, trypsine et chymotrypsine, sont affectées alors que le cycle cellulaire est bloqué en phase G2/M. Les résultats obtenus confirment non seulement les potentialités pharmacologiques de cette molécule naturelle mais mettent aussi en évidence de nouveaux aspects concernant son mode d'action (publication 18). Toutefois, compte-tenu des difficultés pour l'obtention et la purification du principe actif, l'ajoène n'a pas été retenu pour des études pharmacologiques plus poussées.

2.3. Projets de recherche

La ligne directrice de mon travail de recherche reste centrée sur l'étude des mécanismes moléculaires intervenant dans la dérégulation du système ubiquitine-protéasome au sein des cellules tumorales. Il consistera à préciser le rôle des modifications post-traductionnelles du protéasome 20S mais aussi à investir d'autres mécanismes moléculaires tels que ceux impliquant les interactions du protéasome 20S avec certaines protéines régulatrices. D'autre part, l'expression des immuno-sous-unités dans l'ensemble des lignées tumorales cartographiées nous conduit à nous poser la question de l'implication de l'immunoprotéasome dans le cancer.

2.3.1 Rôle fonctionnel de la phosphorylation des sous-unités β

L'analyse déjà effectuée au niveau du protéasome d'érythrocytes a permis de cibler des sites de phosphorylation potentiels et en particulier de définir la sérine 171 au niveau de la sous-unité $\beta 2$ ainsi que 5 sites sérines potentiels au sein de la sous-unité $\beta 7$. L'identification du site de phosphorylation de la sous-unité $\beta 2$ peut être maintenant envisagée par mutagenèse dirigée de la sérine 171 et expression de la sous-unité $\beta 2$ mutée dans des lignées cellulaires. Ces expériences auront l'avantage de confirmer le site de phosphorylation suspecté et pourraient nous permettre d'apporter des informations quand au rôle de cette modification sur l'activité globale du protéasome.

Pour l'identification des sites sur la sous-unités $\beta 7$, des expériences restent à poursuivre pour trancher entre une phosphorylation en surface ou une phosphorylation située dans la cavité interne (sérine 101). La destructuration préalable du complexe avant le traitement aux phosphatases dans des conditions dénaturantes compatibles avec l'activité de déphosphorylation pourrait être un moyen de confirmer la présence d'un site dans la cavité interne du complexe.

D'autre part, même si le traitement à la phosphatase acide du protéasome 20S purifié ne génère aucun effet sur le clivage de petits peptides substrats (3 à 4 acides aminés), il serait intéressant d'utiliser des substrats de taille plus importante, voir même des protéines plus ou moins dénaturées. Il est en effet possible que la phosphorylation ou la déphosphorylation des sous-unités protéasomales puisse modifier leur conformation et donc la structure globale du complexe. Ces modifications de conformation pourraient affecter la translocation et donc la dégradation des substrats protéiques et modifier ainsi les paramètres cinétiques des activités enzymatiques. Les mesures des constantes d'affinité et des vitesses maximales lors de la dégradation de peptides fluorescents de vingt à quarante acides aminés pourraient nous permettre de mettre en évidence cet effet indirect de la déphosphorylation sur l'activité catalytique globale du protéasome. D'autre part, la dégradation des protéines cellulaires étant effectuée essentiellement par la forme 26S (partie catalytique 20S associée au complexe activateur 19S), il serait intéressant d'étudier l'impact de ces phosphorylations sur l'activité protéolytique de la forme 26S.

Enfin, les mécanismes de phosphorylation pourraient aussi être impliqués dans l'assemblage du protéasome 20S avec ses divers complexes régulateurs ou dans l'assemblage à proprement dit des divers anneaux α et β lors de l'édification du complexe. L'analyse des complexes générés *in vitro* ou dans la cellule après transfection des sous-unités mutées ou non permettrait de clarifier ces derniers points.

2.3.2. Assemblage du protéasome et interactions protéine-protéine

Nous nous proposons d'aborder la régulation fonctionnelle du système ubiquitine-protéasome à travers l'étude des interactions moléculaires du protéasome 20S avec ses complexes protéiques régulateurs que sont le complexe 19S ou le complexe PA28. Un des objectifs de cette étude sera la mise au point d'un essai adaptable pour le criblage à haut débit de molécules bioactives agissant au niveau de l'assemblage 19S / 20S.

La caractérisation des mécanismes impliqués dans l'assemblage des deux entités pourra être abordée par deux approches expérimentales : l'une, *in vitro*, avec les complexes protéiques ou les protéines purifiées; l'autre au niveau cellulaire, après ingénierie moléculaire. Après purification du protéasome 20S et du complexe 19S par des méthodes biochimiques (immunoaffinité, tamisage moléculaire), l'interaction de ces deux entités pourra être étudiée *in vitro*, par Résonance Plasmonique de Surface (appareil Biacore). Cette technologie permet une étude cinétique en temps réel des

associations et dissociations moléculaires, et ne requiert aucun marquage préalable. Nous étudierons notamment le rôle de l'ATP qui apparaît comme essentiel à la stabilité des assemblages (Babbitt et coll., 2005).

Toutefois, si cette approche présente certaines limitations liées par exemple à l'instabilité des complexes protéiques *in vitro*, il conviendra de travailler directement avec les sous-unités impliquées dans l'interaction du régulateur 19S avec le protéasome 20S. Les travaux de Satoh et coll. (2001) suggérant une interaction entre la sous-unité Rpt6 du 19S et la sous-unité $\alpha 2$ du 20S attestent de la faisabilité de cette approche. Nous utiliserons un système cellulaire basé sur l'expression d'un gène rapporteur permettant de quantifier le niveau d'inhibition du système Ub-protéasome. Ce système nous permettra de mettre en place un crible basé sur la technique du siRNA pour identifier les sous-unités de chaque complexe qui sont impliquées dans l'interaction. Une fois identifiées, les ADN codant pour ces protéines seront exprimés dans des vecteurs procaryotes et eucaryotes afin de mener en parallèle des études *in vitro* et *in vivo*. Les paramètres de l'interaction protéine-protéine pourront être caractérisés *in vitro* par Résonance Plasmonique de Surface (Biacore). En parallèle, nous étudierons les interactions protéine-protéine dans les cellules HeLa par une approche de type « complémentation bi-moléculaire ». Pour cela, les ADN codant pour les protéines candidates (sous-unité α du 20S et sous-unités de la base) seront clonés dans les vecteurs d'expression eucaryotes en fusion avec différents marqueurs. Par exemple, le système BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation, Hu et coll., 2002) permet la détection, dans les cellules, de la molécule fluorescente reconstituée uniquement s'il y a interaction des deux partenaires fusionnés chacun à une demi-molécule. Une alternative à ce système est l'approche PCA (Protein Fragment Complementation Assay) décrite par Michnick et coll. (2005); ce système présente l'avantage que la protéine reconstituée par l'interaction peut être une enzyme (bêta-lactamase ou dihydrofolate réductase). L'activité catalytique est alors détectée par des substrats qui peuvent être de différente nature: colorimétriques, fluorescents, ou chimioluminescents. Cet éventail de possibilités nous permettra d'adapter la sensibilité de la détection aux essais pratiqués: mise en évidence par marquage en microscopie ou dosage quantitatif en micro plaque.

L'identification des partenaires nécessaires à l'assemblage des deux complexes et la maîtrise des systèmes expérimentaux nous permettraient de cribler la chimiothèque des substances naturelles afin d'identifier des inhibiteurs de l'assemblage. Cet assemblage, crucial dans la voie de dégradation ubiquitine-protéasome, pourrait en effet constituer une cible pharmacologique originale. Les différentes familles d'inhibiteurs du protéasome actuellement connues, ont pour cible les activités protéasiques du protéasome (ex : lactacystine, époxomycine, peptides boroniques...) et la découverte de nouvelles molécules agissant à un tout autre niveau dans la voie de l'ubiquitine-protéasome ouvrirait de nouvelles perspectives en thérapie anti-tumorale.

2.3.3. L'immunoprotéasome, nouvelle cible pharmacologique anti-tumorale?

La présence d'immunoprotéasome dans l'ensemble des lignées tumorales cartographiées, et le fait que son rôle et sa régulation ne soient pas parfaitement caractérisés, nous a conduit à définir cet édifice moléculaire comme une cible anti-tumorale potentielle. Le rôle de l'immunoprotéasome dans la génération d'épitopes tumoraux et dans la modulation de la réponse immune anti-tumorale reste encore très controversé. La forme immunoprotéasome prédomine dans les cellules dendritiques jouant un rôle central dans l'activation des lymphocytes T et dans la l'initiation d'une réponse immune spécifique (ref). La présence d'immunoprotéasome dans la cellule tumorale devrait donc favoriser la présentation de peptides endogènes immunodominants aux lymphocytes T activés et permettre ainsi son élimination par le système immunitaire. En accord avec ceci, des études menées sur des mélanomes d'origine humaine ont montré une corrélation entre la diminution d'expression des immuno-sous-unités du protéasome et la résistance des cellules tumorales à la lyse par des lymphocytes spécifiques (Meidenbauer et coll., 2004). Toutefois, d'autres données établissent que l'induction de l'immunoprotéasome est associée à une faible génération des épitopes immunodominants issus de précurseurs tumoraux exprimés dans le mélanome tels que la protéine Melan-A (Morel et coll., 2000) ou les protéines gp100 et tyrosinase (Van den Eynde, 2001). Ces résultats laissent entendre que l'expression de ces immuno-sous-unités aurait un impact négatif sur la réponse immune anti-tumorale. Compte-tenu de ces résultats divergents, l'implication de l'immunoprotéasome dans la pathologie du cancer reste à élucider et notre objectif est de mieux définir le rôle de l'immunoprotéasome dans les mécanismes de cancérisation.

Nous proposons d'étudier la dérégulation du système ubiquitine-protéasome dans la cellule tumorale à travers l'expression de l'immunoprotéasome. En effet, lors de travaux antérieurs, nous avons effectué l'analyse qualitative de la composition des protéasomes et montré une expression différentielle de l'immunoprotéasome dans diverses lignées tumorales humaines. De plus, l'étude des prélèvements issus d'un patient porteur d'un carcinome rénal a mis en évidence une différence des niveaux d'expression de l'immunoprotéasome entre les cellules rénales normales comparées aux cellules tumorales et métastatiques (collaboration avec le Dr A. Caignard, Unité INSERM 487 de l'Institut Gustave Roussy). L'étude de la régulation fonctionnelle des protéasomes exprimés dans chacune des lignées devrait nous permettre de préciser la sensibilité relative de chaque type cellulaire à des inhibiteurs du système ubiquitine-protéasome. Afin de corréliser cette sensibilité à la présence de l'immunoprotéasome, nous développerons des outils moléculaires nécessaires à la quantification du taux d'expression de l'immunoprotéasome dans les différentes lignées. Cette méthode sera basée sur l'utilisation d'un peptide-substrat fluorescent contenant des sites de coupure préférentiels pour le protéasome standard ou pour l'immunoprotéasome. La conception de ces outils s'appuiera sur les travaux déjà publiés et décrivant une maturation différente de certains antigènes tumoraux par

l'immunoprotéasome comparée à celle effectuée par le protéasome standard (Chapiro et coll., 2006). Il semble en effet possible de déterminer des séquences peptidiques clivables spécifiquement par l'une ou l'autre des deux formes de protéasome. La synthèse de ces substrats peptidiques couplés avec des systèmes chimiques de fluorochromes et de quencheurs pourrait nous permettre de quantifier spécifiquement l'expression de chacune des deux formes. Ainsi, l'expression de l'immunoprotéasome pourra être évaluée dans diverses lignées cellulaires en fonction de l'origine de la cellule, de son état tumoral et de son micro-environnement. Il sera aussi possible d'analyser des échantillons cliniques issus de patients et en particulier de comparer le niveau d'expression de l'immunoprotéasome dans les biopsies de tumeurs et dans les prélèvements de tissus sains adjacents. Les données relatives à la quantification de l'immunoprotéasome pourront être ensuite corrélées aux caractéristiques de la tumeur ainsi qu'aux paramètres cliniques de chaque patient afin de confirmer ou non l'implication de l'immunoprotéasome dans la progression tumorale.

En parallèle de cette étude exploratoire, nous développons un modèle de cellules infectées par rétrovirus surexprimant de façon stable les immuno- sous-unités ($\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$) et qui devrait nous permettre de mieux comprendre les effets modulateurs de l'immunoprotéasome sur le système Ub-protéasome. En particulier, nous souhaitons étudier dans ce système, la dégradation de certaines protéines telles que les facteurs de transcription de la famille p53. Ces facteurs protéiques constituent une large famille de protéines apparentées et issues de l'épissage alternatif du gène p53 (Bourdon et coll., 2005) ou de gènes homologues (p63 ou p73, Melino et coll., 2003). Certains d'entre eux présentent des activités transcriptionnelles pro-apoptotiques alors que les formes protéiques tronquées en N-terminal exercent au contraire un effet anti-apoptotique. L'analyse, grâce à des anticorps spécifiques, des diverses isoformes et de leur distribution relative après surexpression de l'immunoprotéasome pourrait avoir des perspectives intéressantes quant à l'implication de cet édifice dans les mécanismes de tumorigénèse.

Enfin, la pertinence de l'immunoprotéasome en tant que cible pharmacologique sera validée à travers l'identification de modulateurs pharmacologiques spécifiques de l'immunoprotéasome dont l'efficacité sera évaluée *in vitro* et *in vivo*. L'identification de modulateurs originaux de l'activité biologique de l'immunoprotéasome bénéficiera des interactions avec l'unité mixte de criblage à haut débit ainsi qu'avec l'unité de chimie des substances naturelles, présentes au sein de l'ISTMT.

2.4. Conclusion

L'étude du protéasome préparé à partir de cellules humaines non pathologiques a mis en évidence de nouvelles modifications post-traductionnelles, posant ainsi la question du rôle joué par ces phosphorylations dans la régulation fonctionnelle du protéasome 20S. L'approche protéomique qui a été choisie s'est avérée appropriée pour la caractérisation biochimique du protéasome, ceci à

travers la réalisation de cartographies bi-dimensionnelles hautement résolutive de l'ensemble des sous-unités protéasomales. Grâce à l'expertise de l'équipe de Bernard Monsarrat et à la contribution de deux étudiants, Stéphane Claverol inscrit en doctorat et Thomas Clouaire en DEA, il a été possible d'identifier l'ensemble des sous-unités constitutives du protéasome 20S standard exprimé dans les érythrocytes humains et de mettre ainsi en évidence la présence de nombreuses isoformes. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « Molecular and Cellular Proteomics ». Sous ma tutelle, il a ensuite été poursuivi au cours de la thèse de Xu Bo, par la caractérisation des sous-unités modifiées par phosphorylation et a abouti à l'identification de deux nouvelles sous-unités phosphorylées : les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 7$. Une publication faisant état de ces données est actuellement soumise à « Biochemical Journal ».

L'analyse similaire des protéasomes exprimés dans diverses lignées tumorales a révélé une complexité structurale importante avec en particulier la co-expression de deux formes de protéasomes : le protéasome dit standard et l'immunoprotéasome. L'étude fonctionnelle de ces protéasomes réalisée par Cindy Savart que j'encadrais alors pour son stage de DEA a montré une sensibilité différente de ces deux formes à certaines molécules de la chimiothèque de substances naturelles purifiées dans l'UMS de Chimie CNRS-Pierre Fabre. En accord avec ceci, l'analyse comparative des protéasomes présents dans les cellules normales comparées à ceux présents dans les cellules tumorales d'un même patient a confirmé la surexpression de l'immunoprotéasome dans les cellules cancéreuses.

Le système ubiquitine-protéasome est un système cellulaire particulièrement sensible aux facteurs micro-environnementaux et l'induction de l'immunoprotéasome par l'interféron γ témoigne de ce processus. Il est donc probable que l'efficacité et la réussite des approches thérapeutiques contre le cancer dépendront de la compréhension du phénotype et de la fonctionnalité de la cellule tumorale prise dans le contexte de son environnement et non pas isolée. D'autres facteurs microenvironnementaux comme l'hypoxie, les variations de potentiel redox ou la présence d'effecteurs immunitaires peuvent avoir un impact considérable sur la machinerie de la cellule et sur les mécanismes moléculaires mis en jeu ainsi que les fonctions qu'ils sous-tendent. Dans ce contexte, l'impact de l'immunoprotéasome sur la dérégulation du système ubiquitine-protéasome est une question qui nous préoccupe. Afin de répondre à cette question, des outils cellulaires et moléculaires ont d'ores et déjà été développés : Nabila Jabrane-Ferrat qui est chercheur CR1 dans l'équipe, a établi des lignées de lymphomes surexprimant l'immunoprotéasome. En parallèle, nous essayons de développer des substrats peptidiques fluorescents spécifiques de l'immunoprotéasome ou du protéasome : ce projet a été initié lors du stage de master professionnel de Sofiane Houssaini en 2005 et se poursuit actuellement à travers le stage d'Aurélien Bernard, étudiante inscrite en dernière année d'école d'ingénieur au CUST. Outre une meilleure connaissance de cette machinerie protéolytique, la continuité de ce travail devrait aboutir à l'identification de nouveaux agents pharmacologiques anti-tumoraux. A l'occasion de la thèse de Xu Bo, nous avons pu bénéficier d'une petite molécule issue de

l'ail, l'ajoène, et étudier son action sur le protéasome. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « Fundamental and Clinical Pharmacology » et a été pour moi l'occasion de prendre la responsabilité d'un encadrement de doctorat à part entière.

L'ensemble de ces travaux est le résultat d'un travail d'équipe soutenu et dynamisé par les nombreux échanges dont j'ai pu bénéficier au sein de l'unité. A ce titre, je citerai l'interaction privilégiée avec Nabila Jabrane-Ferrat qui développe au sein de notre équipe un autre projet visant à étudier l'implication du système ubiquitine-protéasome dans la régulation du cycle cellulaire. Un des objectifs de ce projet est de définir le rôle du protéasome dans le recrutement et la régulation fonctionnelle des protéines du centrosome. Il est aussi le fruit de la participation active et enthousiaste de deux doctorants (Stéphane Claverol et Xu Bo) et de plusieurs étudiants (3 inscrits en DEA, 3 en DESU, 1 en Master Professionnel et 1 en stage ingénieur). Enfin, il s'intègre pleinement dans la logique de notre unité portée par Jean-Edouard Gairin en témoignant d'un effort de recherche focalisé sur des systèmes biologiques pouvant générer des cibles d'intérêt thérapeutique dans le domaine du cancer tels que le système ubiquitine-protéasome.

Références

Adams, J. Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 2002, **6**: 493-500.

Adams, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. **Cancer Treat. Rev.** 2003, **29**: 3-9

Almond J.B. and Cohen G.M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. **Nature** 2002, **16**: 433-443.

Babbitt S.E., Kiss A., Deffenbaugh A.E., Chang Y.H., Bailly E., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Burada T., Sklar L.A., Baumler J., Gogol E. and Skowyra D. ATP hydrolysis-dependant disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. **Cell** 2005, **121**: 553-65.

Blanchet J.S., Valmori D., Dufau I., Ayyoub M., Nguyen C., Guillaume P., Monsarrat B., Cerottini J.C., Romero P. and Gairin J.E. A new generation of MELAN-A/MART-1 peptides that fulfill both increased immunogenicity and high resistance to biodegradation: implication for

molecular anti-melanoma immunotherapy. **J. Immunol.** 2001, **167**: 5852-5861.

Bourdon J.C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A, Xirodimas D.P., Saville M.K and Lane D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes Dev.** 2005, **19**: 2122-2137.

Boes B., Hengel H., Ruppert T., Multhaup U.H., Koszinowski U. H. and Kloetzel P. M. Interferon g stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. **J. Exp. Med.** 1994, **179**: 901-909.

Bose S., Brooks P., Mason G.G. and Rivett A.J. Gamma-Interferon decreases the level of 26 S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation. **Biochem J.** 2001, **353**: 291-297.

Bose S., Stratford F.L., Broadfoot K.I., Mason G.G. and Rivett A J. Phosphorylation of 20S alpha subunit C8 (α 7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by g-interferon **Biochem. J.** 2004, **378**: 177-84.

Castano J.G., Mahillo E., Arizti P. and Arribas J. 1996. Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic

- proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. **Biochemistry** 1996, **35**: 3782-3789.
- Chapiro J., Claverol S., Piette F., Ma W., Stroobant V., Guillaume B., Gairin J.E., Morel S., Burlet-Schiltz O., Monsarrat B., Boon T. and Van den Eynde B. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigenic presentation. **J. Immunol.** 2006, **176**: 1053-1051.
- Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. **EMBO J.** 1998, **12**: 7151-7160.
- Coux O., Tanaka K. and Goldberg A.L. Structure and functions of 20S and 26S proteasomes. **Annu. Rev. Biochem.** 1996, **65**: 801-847.
- Drexler H.C.A., Risau W. and Konerding M.A. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. **FASEB J.** 2000, **14**: 65-77.
- Feng Y., Longo D. L. and Ferris D.K. Polo-like kinase interacts with proteasomes and regulates their activity. **Cell Growth & Differentiation** 2001, **12**: 29-37.
- Fenteany G., Standaert R.F., Lane W.S., Choi S., Corey E.J. and Schreiber S.L. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. **Science** 1995, **268**: 726-731.
- Ferrell K., Wilkinson C. R., Dubiel W. and Gordon C. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. **Trends Biochem Sci.** 2000, **25**: 83-88.
- Gaczynska, M., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. **Nature** 1993, **365**: 264-267.
- Golberg A. L. and Rock K. L. Not just research tools, proteasome inhibitors offer therapeutic promise. **Nat. Med.** 2002, **8**: 338-340.
- Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D. and Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. **Nature** 1997, **386**: 463-471.
- Groll M and R. Huber. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2003, **35**: 606-616.
- Horiguchi R., Yoshikuni M., Tokumoto M., Nagahama Y. and Tokumoto T. Identification of a protein kinase which phosphorylates a subunit of the 26S proteasome and changes in its activity during meiotic cell cycle in goldfish oocytes. **Cellular Signaling** 2005, **17**: 205-215.
- Hu C.D., Chinenov Y. and Kerppola T.K. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. **Mol. Cell.** 2002, **9**: 789-798.
- Kisselev A.F. and Goldberg A.L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. **Chem. Biol.** 2001, **8**: 739-758.
- Kloetzel, P. Antigen processing by the proteasome. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 2001, **2**:179-187.
- Kölher A., Cascio P., Leggett D.S., Woo K.M., Goldberg A.L. and Finley D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. **Mol. Cell.** 2001, **7**: 1143-1152.
- Kostova Z. and Wolf D.H. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. **EMBO J.** 2003, **22**: 2309-2317.
- Lam Y.A., Lawson T.G., Velayutham M., Zweier J.L. and Pickart C.M. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. **Nature** 2002, **416**: 763-767.
- Li M., Min J.M., Cui J.R., Zhang L.H., Wang K., Valette A., Davrinche C., Wright M. and Leung-Tag J. Z-ajoene induces apoptosis of HL60 cells: involvement of Bcl-2 cleavage. **Nutr. Cancer** 2002, **42**: 241-247.

- Meidenbauer N., Zippelius A., Pittet M.J., Laumer M., Vogl S., Heymann J., Rehli M., Seliger B., Schwarz S., Le Gal F.A., Dietrich P.Y., Andreesen R., Romero P. and Mackensen A. High frequency of functionally active Melan-A- specific T cells in a patient with progressive immunoproteasome-deficient melanoma. **Cancer Res.** 2004, **64**: 6319-6326.
- Melino G., Lu X., Gasco M., Crook T and Knight R.A. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. **Trends Biochem. Sci.** 2003, **28**, 663-6670.
- Michnick S.W., Remy I., Campbell-Valois F.X., Vallee-Belisle A. and Pelletier J.N. Detection of protein-protein interactions by protein fragment complementation strategies. **Methods Enzymol.** 2000, **328**: 208-230.
- Morel S., Lévy F., Burlet-Schiltz O., Brasseur F., Probst-Kepper M., Peitrequin A.L.- Monsarrat B., Van Velthoven R., Cerottini J.C., Boon T., Gairin J.E. and Van den Eynde B.J. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. **Immunity** 2000, **12**: 107-117.
- Nakagawa H., Tsuta K., Kiuchi K., Senzaki H., Tanaka K., Hioki K. and Tsubura A. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. **Carcinogenesis** 2001, **22**: 891-897.
- Orlowski R.Z. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. **Cell Death Differ.** 1999, **6**: 303-313.
- Rechsteiner M. and C.P. Hill. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. **TRENDS in Cell Biology** 2005,**15**:27-33.
- Rock K.L. and Goldberg A.L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I presented peptides. **Annu. Rev. Immunol.** 1999, **17**: 739-779.
- Satoh K., Sasajima H., Nyomura K.I., Yokosawa H. and Sawada H. 2001. Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. **Biochemistry** 2001, **40**: 314-319.
- Schultz E.S., Chapiro J., Lurquin C., Claverol S., Burlet-Schiltz O., Warnier G., Russo V., Morel S., Lévy F., Boon T., Van den Eynde B.J. and van der Bruggen P. The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. **J. Exp. Med.** 2002, **195**: 391-399.
- Sijts A.J., Standera S., Toes R.E., Ruppert T., Beekman N.J., van Veelen P.A., Ossendorp F.A., Melief C.J. and Kloetzel P.M. MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. **J. Immunol.** 2000, **164**: 4500-4506.
- Sohn D., Totzke G., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Levkau B. and Jänicke R.U. The proteasome is required for rapid initiation of death receptor-induced apoptosis. **Mol. Cell. Biol.** 2006, **26**: 1967-1978.
- Unno M., Mizushima T., Morimoto Y., Tomisugi Y., Tanaka K., Yasuoka N. and Tsukihara T. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2,75 Å resolution. **Structure** 2002, **10**: 609-18.
- Ustrell V., Hoffman L., Pratt G. and M. Rechsteiner. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. **EMBO J.** 2002, **21**: 3516-3525.
- Van den Eynde B.J. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. **Curr Opin Immunol.** 2001, **13**: 147-153.
- Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W.H., Yates I.J., Koonin E.V. and Deshaies R.J. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. **Science** 2002, **298**: 611-615.
- Vosges D., Zwickl P. and Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annu. Rev. Biochem.** 1999, **68**: 1015-1068.

Wilkinson K.D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. **Cell and Developmental Biology** 2000, **11**: 141-148.

William S.A. and McConkey D.J. The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP6Pro5 prostate cancer cells. **Cancer Res.** 2003, **63**: 7338-7344.

Zhang H.G., Yang X., Hsu H.C. and Mountz J.D. Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. **Oncogene** 2004, **23**: 2009-2015.

Liste des travaux

1. Publications dans une revue à comité de lecture :

1. D. Combes, T.Yoodvidhya, **E. Girbal**, R.M. Willemot and P. Monsan. Mechanism of enzyme stabilization. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1987, **501**: 59-62.
2. **E. Girbal**, R. Binot and P. Monsan. Production, purification, properties and kinetic studies of free and immobilized polyphosphate: glucose-6- phosphotransferase from *Mycobacterium phlei*. **Enzyme Microb. Technol.** 1989, **11**: 518-527.
3. C. Vincent, G. Serre, J-P. Basile, H-C. Lestra , **E. Girbal**, M. Sebbag and J-P. Soleilhavoup. Subclass distribution of IgG antibodies to the rat oesophagus stratum corneum (so-called antikeratin antibodies) in rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Immunol.** 1990, **81**:83-89.
4. M. Simon, **E. Girbal**, M. Sebbag, V. Gomès-Daudrix, C. Vincent and G. Serre. Molecular characterization of the rat and human antigens recognized by the so-called "antikeratin" autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. **EOS - Journal of Immunol. and Immunopharmacol.** 1993, **13**: 127-128.
5. **E. Girbal**, M. Sebbag, V. Gomès-Daudrix, **M. Simon**, C. Vincent and G. Serre. Characterization of the rat oesophagus epithelium antigens defined by the so-called "antikeratin antibodies", specific for rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** 1993, **52**: 749-757.
6. M. Simon, **E. Girbal**, M. Sebbag, V. Gomès-Daudrix, C. Vincent, G. Salama and G. Serre. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies", autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.** 1993, **92**: 1387-1393.
7. V. Gomès-Daudrix, M. Sebbag, **E. Girbal**, C. Vincent, M. Simon, J. Rakotoharivony, M. Abbal, B. Fournié and G. Serre. Immunoblotting detection of the so-called "antikeratin antibodies": a new assay for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** 1994, **53**: 735-742.
8. M. Simon, C. Vincent, M. Haftek, **E. Girbal**, M. Sebbag, V. Gomès-Daudrix and G. Serre. The rheumatoid arthritis-associated autoantibodies to filaggrin label the fibrous matrix of the cornified cells but not the profilaggrin-containing keratohyalin granules in human epidermis. **Clin. Exp. Immunol.** 1995, **100**: 90-98.

9. M. Simon, M. Sebbag, M. Haftek, C. Vincent, **E. Girbal-Neuhauser**, J. Rakotoharivony, G. Sommé, D. Schmitt and G. Serre. Monoclonal antibodies to human epidermal filaggrin, some not recognizing profilaggrin. **J. Invest. Dermatol.** 1995, **105**: 432-437.
10. M. Sebbag, M. Simon, C. Vincent, C. Masson-Bessière, **E. Girbal**, J.-J. Durieux and G. Serre. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. **J. Clin. Invest.** 1995, **95**: 2672-2679.
11. M. Simon, M. Haftek, M. Sebbag, M. Montézin, **E. Girbal-Neuhauser**, D. Schmitt and G. Serre. Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis. **Biochem. J.** 1996, **317**: 173-177.
12. **E. Girbal-Neuhauser**, M. Montézin, F. Croute, M. Sebbag, M. Simon, J.-J. Durieux and G. Serre. Normal human epidermal keratinocytes express in vitro-specific molecular forms of (pro)filaggrin recognized by rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies. **Mol. Medicine.** 1997, **3**: 143-154.
13. C. Vincent, M. Simon, M. Sebbag, **E. Girbal-Neuhauser**, J.-J. Durieux, A. Cantagrel, B. Fournié, B. Mazières and G. Serre. Immunoblotting detection of autoantibodies to human epidermis filaggrin: a new diagnostic test for rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.** 1998, **25**: 838-846.
14. **E. Girbal-Neuhauser**, J.-J. Durieux, M. Arnaud, P. Darbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessière, C. Jolivet, M. Jolivet and G. Serre. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are post-translationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. **J. Immunol.** 1999, **162**: 585-94.
15. C. Masson-Bessière, M. Sebbag, J.-J. Durieux, L. Nogueira, C. Vincent, **E. Girbal-Neuhauser**, R. Durroux, A. Cantagrel and G. Serre. In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. **Clin. Exp. Immunol.** 2000, **119** : 544-552.
16. C. Masson-Bessière, M. Sebbag, **E. Girbal-Neuhauser** , L. Nogueira, C. Vincent, T. Senshu and G. Serre. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the a and b chains of fibrin. **J. Immunol.** 2001, **166** : 4177-4184.

17. S. Claverol, O. Burlet-Schiltz, **E. Girbal-Neuhauser**, J.E. Gairin and B. Monsarrat. Mapping and structural dissection of human 20S proteasome using proteomics approaches. **Mol. Cell. Proteomics**. 2002, **1.8** : 567-578.
18. X. Bo, B. Monsarrat, J.E. Gairin and **E. Girbal-Neuhauser**. Effect of Ajoene, a natural antitumor small molecule, on human 20S proteasome activity in vitro and in human leukemic HL-60 cells. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 2004, **18**: 171-180.
19. **E. Girbal-Neuhauser**, X. Bo, M. Blaud, N. Jabrane-Ferrat and J.E. Gairin. Identification of phosphorylated isoforms of the $\beta 2$ and $\beta 7$ subunits of the human erythrocyte 20S proteasome. Soumis à **Biochem. J.**

2. Brevets d'Invention:

1. *Antigènes dérivés des filaggrines et leur utilisation pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.*
France : délivré le 06/11/98 (FR 2752842). **Extension internationale** : délivré en Europe le 03/11/04 (EP 0929 669 B1) et aux Etats-Unis le 10/05/05 (US 6 890 720 B1)
Déposant : BioMérieux
Inventeurs: G. Serre, **E. Girbal-Neuhauser**, C. Vincent, Michel Simon, M. Sebbag, P. Dalbon, C. Jolivet-Reynaud, M. Arnaud, M. Jolivet.
2. *Utilisation de peptides citrullinés dérivés de la filaggrine dans le cadre du traitement de maladies autoimmunes.*
France : délivré le 26/05/00 (FR 2773078). **Extension internationale** : délivré en Europe le 16/04/03 (EP 1 041 997 B1)
Déposant: Université Paul Sabatier
Inventeurs: G. Serre, **E. Girbal-Neuhauser**, C. Vincent, M. Sebbag, M. Simon , P. Dalbon, C. Jolivet-Reynaud, M. Arnaud, M. Jolivet.
3. *Épitopes peptidiques reconnus par des auto-anticorps anti-filaggrine présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.*
France : délivré le 05/10/01 (FR97/16673). **Extension internationale** : délivré en Europe le 11/10/00 (EP 1 042 366 B1)
Déposant : BioMérieux

Inventeurs : G. Serre, **E. Girbal-Neuhauser**, C. Vincent, M. Simon, M. Sebbag, P. Dalbon, C. Jolivet-Reynaud, M. Arnaud, M. Jolivet.

3. Contributions à des congrès internationaux:

1. Sebbag M, **Girbal E**, Gomès V, Simon M, Vincent C and Serre G. Isolation and characterization of the rat esophagus epithelium antigens defined by the so-called "antikeratin" antibodies specific for rheumatoid arthritis.
VIIIème Symposium International d'Immuno-rhumatologie, Montpellier, France. Mai **1992**.
2. Vincent C, Simon M, **Girbal E**, Sebbag M, Gomès V and Serre G. Molecular characterization of the rat and human antigens recognized by the so-called "anti-keratin" autoantibodies specific for rheumatoid arthritis.
International Conference on cellular and molecular aspects of self-reactivity and autoimmune diseases, Taormina, Italie. Juin **1992**.
3. **Girbal E**, Sebbag M, Gomès V, Simon M, Vincent C and Serre G. Isolation and characterization of the rat esophagus epithelium antigens defined by the so-called "antikeratin" antibodies specific for rheumatoid arthritis.
8th International Congress of Immunology, Budapest, Hongrie. Août **1992**.
4. Simon M, Gomès V, Vincent C, Sebbag M, **Girbal E** and Serre G. Identification of the target of the so-called "anti-keratin antibodies" associated with rheumatoid arthritis, as the cytokeratin intermediate filament-aggregating protein filaggrin.
8th International Congress of Immunology, Budapest, Hongrie. Août **1992**.
5. Gomès V, Simon M, **Girbal E**, Sebbag M, Salama G, Vincent C and Serre G. The so-called "antikeratin antibodies" specific for rheumatoid arthritis are directed to human epidermal filaggrins.
5th Immunodermatology Symposium of the European Immunodermatology Society, Szeged, Hongrie. Présentation orale. Août **1992**.
6. Gomès-Daudrix V, Sebbag M, **Girbal E**, Vincent C, Simon M, Rakotoarivony J, Fournié B and Serre G. Immunoblotting detection of the so-called 'antikeratin antibodies': a new assay for the diagnosis of Rheumatoid Arthritis.

4th Breton Workshop on Autoimmunity, Brest, France. Avril **1994**. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière, **Girbal-Neuhauser E**, Durieux J-J and Serre G. The rheumatoid arthritis-specific 'antikeratin antibodies' and antiperinuclear factor are the same autoantibodies directed to filaggrin.

15th European Workshop for Rheumatology Research, Erlangen/Bamberg, Allemagne. March **1995**.

7. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière, **Girbal-Neuhauser E**, Durieux J-J and Serre G. The rheumatoid arthritis-specific 'antikeratin antibodies' and antiperinuclear factor are the same autoantibodies directed to filaggrin.

13th European Congress of Rheumatology, Amsterdam, Pays Bas. Présentation orale. June **1995**.

8. **Girbal-Neuhauser E**, Montézin M, Croute F, Sebbag M, Simon M, Durieux J-J and Serre G. The (pro)filaggrin-related antigens recognized by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin auto-antibodies are expressed in vitro by normal human epidermal keratinocytes. **IXth International Symposium of Immuno-Rheumatology**, Montpellier, France. December **1995**.

9. **Girbal-Neuhauser E**, Durieux J-J, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessière C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M and Serre G. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are post-translationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. **18th European Workshop for Rheumatology Research**, Athènes, Grèce. Présentation orale et acte (Clin Exp Rheumatol **16** : 202, 1998). March **1998**.

10. Claverol S, **Neuhauser E**, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B and Gairin J-E. Deficiency of 20S proteasome functions induced by environmental and pathological factors : from structural analysis to pharmacoproteomics.

World Congress on Biological Oxidants and Antioxydants, Santa Barbara, CA-USA. Présentation orale. March **2001**.

11. Burlet-Schiltz O, Claverol S, Xu B, **Neuhauser E**, Gairin J-E and Monsarrat B. Impact of environmental and pathological factors on 20S proteasome function : from structure-function relationship to pharmacoproteomics.

Fourth International Workshop on Proteasomes, Clermont-Ferrand, France. Présentation orale. April **2001**.

12. Bulet-Schiltz O, Claverol S, **Neuhauser E**, Gairin J-E and Monsarrat B. Analysis of human 20S proteasome subunit composition using proteomics approaches.
Fifth International Symposium on Mass Spectrometry in the Life Sciences. Molecular and Cellular Proteomics, San Francisco, California, USA. August 26-30 **2001**.
13. Bulet-Schiltz O, Claverol S, **Neuhauser E**, Uttenweiler-Joseph S, Xu B, Gairin J-E and Monsarrat B. Human 20S proteasome : reference map, post-translational modifications, and comparative cancer cell lines analyses.
Fifth Siena Meeting from Genome to Proteome : Functional Proteomics, Siena, Italy. September 2-5 **2002**.
14. Claverol S, Bulet-Schiltz O, **Girbal-Neuhauser E**, Xu B, Uttenweiler-Joseph S, Gairin J-E and Monsarrat B. Proteomic approaches for the study of human 20S proteasomes.
Fifth International Workshop on Proteasomes, Clermont-Ferrand, France. April 27-29 **2003**.
15. **Girbal-Neuhauser E**, Bo X, Blaud M, Didier C, Jabrane-Ferrat N and Gairin J-E. The $\beta 2$ and $\beta 7$ subunits of 20S proteasome are phosphorylated.
Sixth International Workshop on Proteasomes, Clermont-Ferrand, France. April 27-29 **2005**.

4. **Contributions à des congrès nationaux:**

1. Sebbag M, **Girbal E**, Gomès V, Simon M, Hanoun N, Vincent C, Serre G. Caractérisation des antigènes épithéliaux oesophagiens murins et épidermique humain reconnus par les autoanticorps anti-Stratum Corneum, dits "antikératines", spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde. Etude de la réactivité de ces autoanticorps vis-à-vis des enveloppes cornifiées extraites des mêmes épithéliums. **3ème Journée de l'Association pour la Recherche sur la Polyarthrite**, Paris. Septembre **1992**.
2. Calvet C, Croute F, **Girbal E**, Hanoun N, Serre G. Expression par les kératinocytes humains en culture des antigènes épidermiques définis par les autoanticorps anti-Stratum Corneum, spécifiques de la Polyarthrite Rhumatoïde. **Congrès Annuel de Recherche Dermatologique**, Limoges. Octobre **1992**.

3. Sebbag M, **Girbal E**, Gomès V, Simon M, Vincent C, Serre G. Nouveaux antigènes de différenciation de l'épithélium malpighien cornifié d'oesophage de rat, définis par les autoanticorps anti-Stratum Corneum, spécifiques de la Polyarthrite Rhumatoïde. **Congrès Annuel de Recherche Dermatologique**, Limoges. Octobre **1992**.
4. **Girbal E**, Sebbag M, Gomès V, Croute F, Serre G. Expression de la (pro)filaggrine dans les épithéliums malpighiens cornifiés non épidermiques : nouvelles formes moléculaires définies dans l'oesophage de rat par des auto-anticorps humains. **Congrès Annuel de Recherche Dermatologique**, Limoges. Octobre **1992**.
5. **Girbal E**, Montézin M, Croute F, Sebbag M, Simon M, Masson Bessière C, Serre G. Formes moléculaires des (pro)filaggrines dans des cultures de kératinocytes humains réalisés en conditions différenciantes. **Congrès Annuel de Recherche Dermatologique**, Nîmes. Octobre **1993**.
6. **Girbal E**, Montézin M, Croute F, Simon M, Sebbag M, Serre G. Expression de l'antigène défini par les autoanticorps dits "antikératine", spécifiques de la Polyarthrite Rhumatoïde, par des kératinocytes humains en culture. **4ème Journée de l'Association pour la Recherche sur la Polyarthrite**, Paris. Octobre **1993**.
7. Simon M, Sebbag M, Girbal E, Vincent C, Boissier L, Rakotoarivony J, Serre G. Les autoanticorps anti-Stratum Corneum, spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde, sont dirigés contre la filaggrine épidermique humaine et contre un variant acide de cette protéine. **Rencontres INSERM Midi-Pyrénées**, Toulouse. Avril **1993**.
8. Girbal E, Sebbag M, Gomès-Daudrix V, Simon M, Vincent C, Serre G. Caractérisation des antigènes de l'épithélium d'oesophage de rat définis par les autoanticorps anti-Stratum Corneum dits "antikératines" spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde. **Rencontres INSERM Midi-Pyrénées**, Toulouse. Avril **1993**.
9. Sebbag M, Simon M, Masson Bessièrès C, Vincent C, **Girbal E**, Rakotoarivony J, Durieux J-J, Serre G. Les facteurs anti-périnucléaires, auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde, sont dirigés contre des protéines des cellules de l'épithélium jugal apparentées à la (pro)filaggrine épidermique humaine. **Congrès Annuel de Recherche Dermatologique**, Lyon. Octobre **1994**.
10. Durieux J-J, Girbal-Neuhauser E, Simon M, Mils V, Vincent C, Serre G. Epitopes reconnus par les auto-anticorps anti-filaggrine, spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde. **6ème Journée de l'Association pour la Recherche sur la Polyarthrite**, Paris. Octobre **1995**.

11. Simon M, Haftek M, Sebbag M, Montézin M, **Girbal-Neuhauser E**, Schmitt D, Serre G. La filaggrine est un composant des enveloppes cornées dans l'épiderme plantaire humain. **Congrès Annuel de Recherche Dermatologique**, Toulouse. Juin **1996**.
12. Simon M, Durieux J-J, Mils V, **Girbal-Neuhauser E**, Arnaud M, Jolivet C, Dalbon T, Vincent C, Jolivet M, Serre G. Cartographie épitopique de 29 anticorps monoclonaux spécifiques de la (pro)filaggrine humaine. **Congrès Annuel de Recherche Dermatologique**, Toulouse. Prix du meilleur poster. Juin **1996**.
13. **Girbal-Neuhauser E**, Durieux J-J, Sailler L, Salama G, Masson-Bessière C, Simon M, Vincent C, Serre G. Les épitopes reconnus par les autoanticorps antifilaggrine, spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde, sont générés par des modifications post-traductionnelles. **7^{ème} Journée de l'Association pour la Recherche sur la Polyarthrite**, Paris. Octobre **1996**.
14. Durieux J-J, Vincent C, Sebbag M, **Girbal-Neuhauser E**, Serre G. Identification de deux épitopes majeurs reconnus par les auto-anticorps anti-filaggrine, spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde. **8^{ème} Journée de l'Association pour la Recherche sur la Polyarthrite**, Paris. Octobre **1997**.
15. Xu B, **Girbal-Neuhauser E**, Monsarrat B, Gairin JE. Ajoene: a novel inhibitor of 20S human proteasome. **VIII^{ème} colloque "De la recherche à la découverte"**, Toulouse. Avril **2003**.

5. Contributions à des ouvrages collectifs:

1. Sebbag M, Simon M, Durieux J-J, **Girbal-Neuhauser E**, Vincent C, Serre G. Des anticorps « antikératines » et du facteur anti-périnucléaire aux autoanticorps anti-filaggrine. **Neuvième Symposium International d'Immuno-Rhumatologie**. Nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques. J. Clot et J. Sany. Editions de l'Interligne, Paris, pp 77-87, **1996**.
2. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière C, **Girbal-Neuhauser E**, Durieux J-J, Serre G. Antikeratin antibodies (AKA) and perinuclear factor (APF) are the same autoantibodies directed to filaggrin. *Rheumatology News International*, 23 : 6, **1995**.

Activités d'enseignement

Ma première expérience de chercheur post-doctoral au sein de l'équipe hospitalo-universitaire du Pr Guy Serre m'avait permis d'être en contact avec de nombreux étudiants et de mesurer mon intérêt pour le partage des connaissances. C'est pourquoi en juin 1993, je n'ai pas hésité à postuler sur un poste de Maître de Conférences à l'IUT Paul Sabatier. Ce fut un choix que j'ai pu depuis pleinement apprécier. En effet, l'enseignement dispensé dans un IUT présente certaines spécificités et exigences qui me conviennent tout à fait. En particulier, la formation d'un technicien supérieur sur 2 ou 3 ans doit reposer sur des bases théoriques solides et suppose un enseignement synthétique, proche des réalités industrielles et suffisamment diversifié pour permettre une insertion efficace dans la vie active.

J'ai été nommée en septembre 1993 au Département Génie Biologique de l'IUT Paul Sabatier délocalisé à Auch en 65^{ème} section. Ce département accueille chaque année 78 étudiants préparant un DUT et inscrits dans deux options différentes : Industrie Alimentaire et Biologique (IAB) ou Agronomie. Il comporte aussi deux formations de type licence professionnelle intitulées « Sécurité Sanitaire des Aliments » et « Génie Géomatique Appliqué à la Télédétection »

1. Enseignements dispensés en 1^{ère} année DUT Génie Biologique

1.1. Cours de Biochimie

A mon arrivée à l'IUT, j'ai dispensé des travaux dirigés (TD) ainsi que des travaux pratiques (TP) en biochimie pendant 4 ans aux étudiants inscrits dans les deux options du département. Ce cours était assuré par deux ou trois enseignants différents. Le volume ainsi que la nature des enseignements dispensés ont varié d'une année à l'autre et ont porté principalement sur la biochimie structurale des lipides (TP), le métabolisme glucidique (TD) et la cinétique enzymatique (TD et TP).

Volume horaire:

Année 93/94:	TP: 72h	
Années 94/95 et 96/97	TP: 72h	TD: 16h
Année 97/98	TP: 24h	

1.2. Cours d'Immunologie

Depuis ma nomination et jusqu'à aujourd'hui, j'ai dispensé les cours, TD et TP d'immunologie aux étudiants de première année inscrits dans les deux options du département. Des notions très générales sont abordées en cours où je présente les différents organes et cellules du système immunitaire, la dynamique des réponses immunitaires spécifiques et non spécifiques en insistant plus particulièrement sur les notions d'antigènes et d'anticorps. Au cours des travaux dirigés, je présente les différentes techniques immunologiques et les avantages qu'elles présentent d'un point de vue de leur rapidité de mise en œuvre, leur spécificité et leur sensibilité. Après avoir exposé la production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux, j'aborde la précipitation et l'agglutination en milieu liquide ou gélifié, les dosages de type immuno-enzymatique ou radio-immunologiques, les marquages immuno-histochimiques et les techniques de transfert ou Western blot. Enfin, je termine cet enseignement par une séance de TP au cours de laquelle les étudiants réalisent un dosage d'anticorps par une technique immuno-enzymatique.

Volume horaire:

Années 93/94 à 2005/06 : Cours : 6h TD : 18h TP : 48h

2. Enseignements dispensés en 2^{ème} année DUT Génie Biologique

Tous les enseignements que j'effectue en 2^{ème} année de DUT sont spécifiques à l'option « Industries Alimentaires et Biologiques ».

2.1. Cours de Biochimie Alimentaire

J'ai enseigné la biochimie alimentaire pendant trois ans entre septembre 1997 et juin 2000. J'ai abordé dans le cours des notions très générales sur la composition biochimique et l'étude physico-chimique de divers aliments. Des aspects de technologie alimentaire plus en relation avec la réalité industrielle ont ensuite été développés comme l'étude des principales réactions de détérioration des aliments, le comportement et l'activité de l'eau, ou la valorisation de sous-produits d'origine animale ou végétale. Lors d'une séance de TP de huit heures, les étudiants réalisent des contrôles qualité sur deux aliments selon des procédures normalisées.

Volume horaire:

Années 97/98 à 99/00 Cours : 10h TD : 16h TP : 16h

2.2. Cours de Métabolisme Microbien

J'ai participé au cours de métabolisme microbien pendant deux ans en présentant la partie concernant le métabolisme glucidique et sa régulation.

Volume horaire :

Années 98/99 et 99/00

Cours : 8h

TD : 10h

2.3. Cours de Microbiologie Industrielle

Depuis ma nomination et jusqu'à aujourd'hui, j'ai dispensé ce cours qui traite de la mise en œuvre industrielle des bio-productions et présente les différents procédés industriels et leurs finalités. Les comportements microbiens en réacteurs non renouvelés ou en réacteurs ouverts sont présentés. Les contraintes liées à la régulation des conditions de culture et plus particulièrement les paramètres d'aération et de transfert d'oxygène sont détaillés lors des TD.

Au cours des TP, les étudiants réalisent deux bio-productions dans des bio-réacteurs régulés en température, pH et oxygène qui sont d'une part, la production d'éthanol par une levure de boulangerie en milieu non renouvelé et micro-aérobie et d'autre part, la production de biomasse en réacteur aéré semi-ouvert.

Volume horaire:

Années 93/94 à 2005/06 :

Cours : 12h

TD : 16h

TP : 48h

2.4. Cours de Techniques de Séparation

En septembre 2000, j'ai choisi de prendre en charge le cours concernant les techniques de séparation et d'analyses de molécules biologiques. Diverses techniques biochimiques sont abordées telles que la précipitation de protéines ou de polymères en milieu liquide, les techniques électrophorétiques et les techniques chromatographiques. Le cours présente les principes théoriques de ces méthodes ainsi que les équipements utilisés depuis l'échelle du laboratoire jusqu'à l'échelle industrielle.

Des travaux pratiques en relation avec cet enseignement permettent aux étudiants de réaliser diverses manipulations telles que l'électrophorèse des caséines du lait, la purification de la phénoloxdase de chêne par chromatographie d'exclusion ou le suivi de la synthèse enzymatique d'oligosides par HPLC. Lors de ces TP qui se déroulent sur huit heures, j'encadre six travaux pratiques différents par séance.

Volume horaire:

Années 00/01 à 2005/06 :

Cours : 10h

TD : 12h

TP : 28h

3. Autres activités d'enseignement

Depuis l'ouverture de la licence professionnelle « Sécurité Sanitaire des Aliments » en septembre 2001, sur le site de l'IUT Paul Sabatier à Auch, je présente aux étudiants inscrits dans cette licence les différentes techniques immunologiques (2h de cours) et leurs applications en agro-alimentaire.

En 2001 et 2002, j'ai également participé à un Module de « Post-Génomique » dispensé aux étudiants de 5^{ème} année à l'INSA de Toulouse. Cet enseignement a été fait sous forme de Travaux dirigés et Travaux pratiques (4h de TD et 16h de TP) au cours desquels j'ai présenté les techniques de protéomique. Après production de levure en réacteur, les étudiants ont ensuite comparé les cartographies des protéines obtenues selon différentes conditions de culture.

D'autre part, j'encadre chaque année trois projet tutorés en DUT Génie Biologique. Ces projets tutorés ont été mis en place en 1996 et répondent à une directive des Programmes Pédagogiques Nationaux pour le DUT.

En première année, les projets tutorés portent sur la connaissance des différents secteurs industriels susceptibles d'embaucher des techniciens supérieurs de l'option agronomie ou IAB. L'objectif principal pour l'étudiant est d'approfondir par le biais d'une démarche active, ses connaissances du monde industriel et de ses réalités technologiques et économiques. Les étudiants réunis en groupe de travail de trois ou quatre personnes sont chargés de présenter un secteur industriel à travers les produits qui en sont issus, les procédés de fabrication utilisés et la réalité du marché économique.

En deuxième année, les étudiants doivent réaliser un produit destiné à un partenaire industriel. Ils ont la responsabilité de la conception de ce produit qui peut prendre des formes très variées telles que CD rom, plaquettes d'information, étude de marché,... En fin d'année, les étudiants doivent rédiger un document synthétisant l'ensemble des démarches et informations recueillies et présenter leur travail à l'oral devant l'ensemble de leur promotion. Le tutorat est pour moi une expérience pédagogique très positive qui facilite les échanges entre étudiant et enseignant en les liant par un projet commun. Il motive les étudiants qui s'investissent naturellement et acquièrent ainsi plus d'autonomie.

Enfin, je participe au suivi des étudiants de deuxième année au cours de leur stage en entreprise. Je suis amenée à visiter les étudiants pendant leur stage et à participer à l'évaluation de ce stage à travers la lecture du rapport et la participation au jury de soutenance orale.

Liste des diplômes encadrés

J'ai eu l'opportunité à travers le suivi de stages de recherche, d'encadrer de nombreux étudiants. J'ai pris une part importante aux choix stratégiques et à la réalisation des travaux de paillasse de certains d'entre eux (co-encadrements) et j'ai dirigé et encadré totalement les travaux de recherche de plusieurs étudiants y compris des doctorants (encadrement à part entière).

1. Doctorats

1. Sebbag Mireille. Identification des antigènes de différenciation malpighienne définis par les autoanticorps anti-Stratum Corneum, spécifiques de la Polyarthrite Rhumatoïde. Développement d'un test diagnostique par immunotransfert. **Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III (Biochimie et Immunologie)**, 29 octobre 1992. (co-encadrement).
2. Masson-Bessière Christine. Les autoanticorps antifilaggrine dans la polyarthrite rhumatoïde : relation avec les facteurs antipérimucléaires, synthèse articulaire et antigènes-cibles du pannus synovial. **Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III (Physiopathologie Humaine)**, 9 novembre 1999. (co-encadrement).
3. Stéphane Claverol. Le protéasome 20S humain : étude des relations structure-fonction par spectrométrie de masse et approches protéomiques. **Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III (Biochimie)**, 12 mai 2003. (co-encadrement)
4. Xu Bo. Le protéasome 20S humain, une nouvelle cible en thérapie anticancéreuse : effet de l'ajoëne, molécule naturelle anti-tumorale, et impact de modifications post-traductionnelles sur son activité catalytique. **Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III (Pharmacologie)**, 12 novembre 2003. (encadrement à part entière).
5. Eang Rothmonie. Etude du rôle de l'immuno-protéasome dans le développement du mélanome. **Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III**, en cours depuis octobre 2004. (co-encadrement).

2. Diplômes d'Etudes Approfondies

1. Redonnet Isabelle. Etude de la spécificité des auto-anticorps naturels humains de classe G anti-cytokératines épidermiques. **DEA de Physiopathologie Humaine, Université Paul Sabatier, Toulouse III**, 2 juillet 1990. (co-encadrement).
2. Calvet Christine. Expression in vitro d'antigènes tardifs de différenciation des kératinocytes définis par des auto-anticorps humains spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde. **DEA de Biologie Cutanée et Cosmétologie, Université Claude Bernard, Lyon I**, 22 septembre 1992. (encadrement).
3. Masson-Bessière Christine. Les auto-anticorps anti-Stratum Corneum et les facteurs anti-périnucléaires, tous deux marqueurs spécifiques de la Polyarthrite Rhumatoïde, sont une seule et même entité sérologique. **DEA de Physiopathologie Humaine, Université Paul Sabatier, Toulouse III**, 28 juin 1993. (co-encadrement).
4. Montézin Martine. Etude du métabolisme des (pro)filaggrines dans des cultures de kératinocytes humains. **DEA de Biologie Cutanée et Cosmétologie, Université Claude Bernard, Lyon I**, 30 septembre 1993. (encadrement).
5. Clouaire Thomas. Caractérisation de modifications post-traductionnelles sur le protéasome 20S humain. **DEA de Biologie-Santé-Biotechnologie, Université Paul Sabatier, Toulouse III**, juillet 2001. (encadrement).
6. Barrau Christophe. Conception et validation de substrats fluorescents du protéasome. **DEA de Biologie-Santé-Biotechnologie, Université Paul Sabatier, Toulouse III**, juillet 2002. (co-encadrement).
7. Savart Cindy. Le protéasome, une nouvelle cible d'intérêt pharmacologique : étude comparative du protéasome 20S de différentes lignées tumorales humaines. **DEA de Biologie-Santé-Biotechnologie, Université Paul Sabatier, Toulouse III**, 2 juillet 2004. (encadrement).

3. Diplômes d'Etudes Supérieures d'Université,

Mruck Caroline. Mise au point d'un protocole de purification et caractérisation structurale et fonctionnelle du protéasome 26S humain. **DESU de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III**, 7 juillet 2003. (encadrement).

Amar Sandrine. Etude des modifications post-traductionnelles du protéasome 20S. **DESU de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III**, 5 juillet 2004. (co-encadrement).

Eang Rothmonie. Etude de la modification par phosphorylation du protéasome 20S d'érythrocytes humains. **DES du Médicament de l'Université des Sciences de la Santé du Cambodge**, août 2004. (co-encadrement).

4. Master Professionnel M2

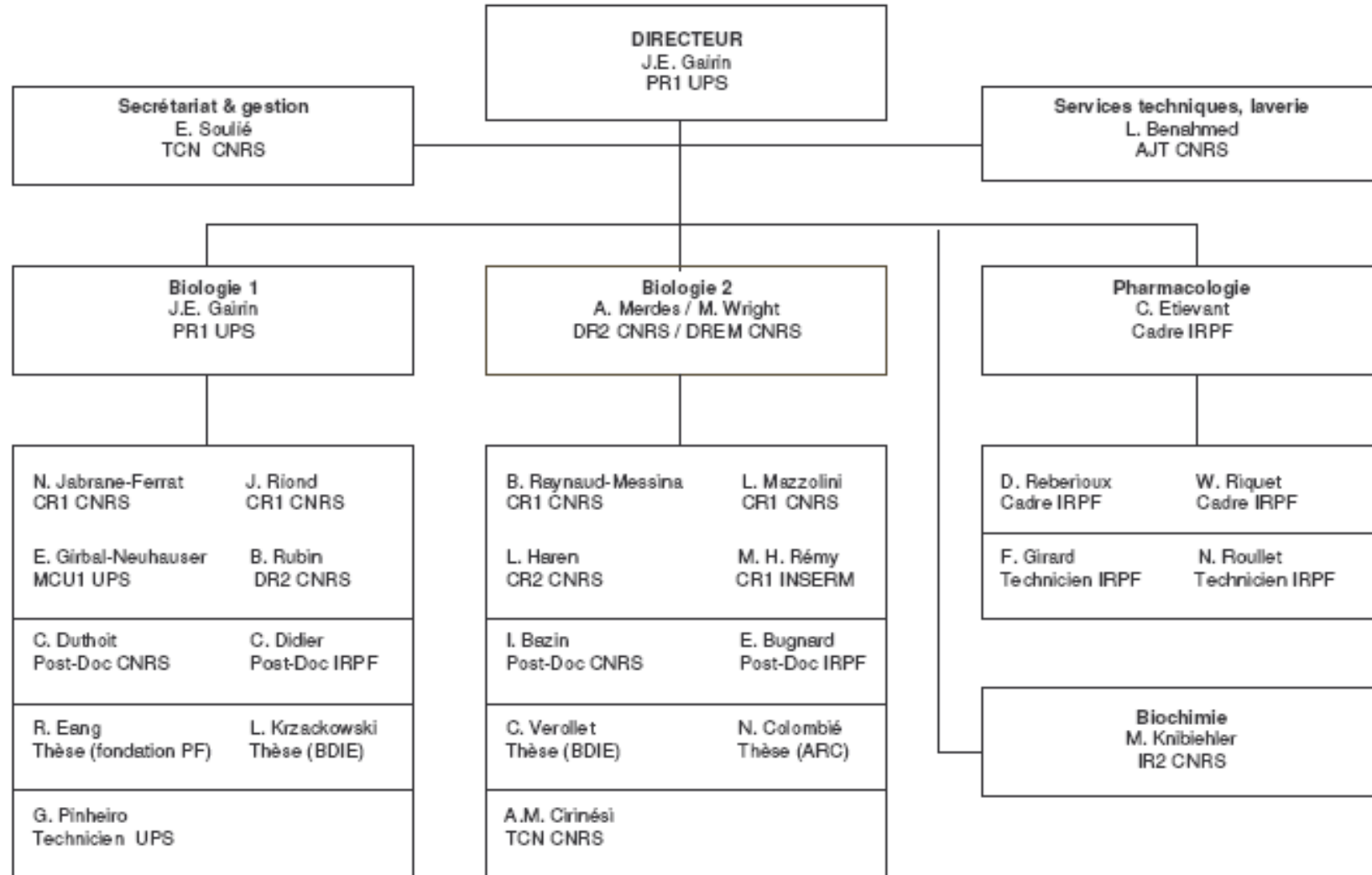
Houssaini Moulay-Soufyan. Mise au point d'outils moléculaires et cellulaires pour mesurer l'activité des protéasomes. **Master Biochimie - Ingénierie Biochimique. Université Claude Bernard, Lyon I**, septembre 2005. (encadrement)

4. Stage Ingénieur

Bernard Aurélie. Développement de tests spécifiques pour le dosage des activités catalytiques du protéasome et de l'immunoprotéasome. **Stage Ingénieur C.U.S.T. Institut des Sciences de l'Ingénieur, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand II**, en cours. (encadrement)

Annexe 1

UMR 2587 CNRS-Pierre Fabre



Publications fournies

6. M. Simon, **E. Girbal**, M. Sebbag, V. Gomès-Daudrix, C. Vincent, G. Salama and G. Serre. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies", autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.** 1993, **92**: 1387-1393.

14. **E. Girbal-Neuhauser**, J.-J. Durieux, M. Arnaud, P. Darbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessière, C. Jolivet, M. Jolivet and G. Serre. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are post-translationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. **J. Immunol.** 1999, **162**: 585-94.

16. C. Masson-Bessière, M. Sebbag, **E. Girbal-Neuhauser** , L. Nogueira, C. Vincent, T. Senshu and G. Serre. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the a and b chains of fibrin. **J. Immunol.** 2001, **166** : 4177-4184.

17. S. Claverol, O. Burlet-Schiltz, **E. Girbal-Neuhauser**, J.E. Gairin and B. Monsarrat. Mapping and structural dissection of human 20S proteasome using proteomics approaches. **Mol. Cell. Proteomics.** 2002, **1.8** : 567-578.

18. X. Bo, B. Monsarrat, J.E. Gairin and **E. Girbal-Neuhauser**. Effect of Ajoene, a natural antitumor small molecule, on human 20S proteasome activity in vitro and in human leukemic HL-60 cells. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 2004, **18**: 171-180.