



HAL
open science

Caractérisation du mécanisme d'action de petites molécules dans le cancer

Laëtitia Lesire

► **To cite this version:**

Laëtitia Lesire. Caractérisation du mécanisme d'action de petites molécules dans le cancer. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS039 . tel-03935229

HAL Id: tel-03935229

<https://theses.hal.science/tel-03935229>

Submitted on 11 Jan 2023

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.

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Domaine scientifique : Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Présentée et soutenue publiquement par

LESIRE Laëtitia

Le 29 Octobre 2020

Caractérisation du mécanisme d'action de petites molécules dans le cancer

Thèse dirigée par le Pr. DEPRESZ Benoit

Jury :

Dr. Laurence LAFANECHERE

Dr. Jérôme MOREAUX

Pr. Rebecca DEPRESZ-POULAIN

Dr. Florence LEROUX

Pr. Peter VAN ENDERT

Pr. Benoit DEPRESZ

Rapporteur

Rapporteur

Président du jury

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

« Savoir s'étonner à propos
est le premier mouvement de l'esprit
vers la découverte »

Louis Pasteur

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

A mes deux rapporteurs, Madame Laurence Lafanechère et Monsieur Jérôme Moreaux,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et de m'avoir fait l'honneur d'en être les rapporteurs. Je vous suis sincèrement reconnaissante de cet investissement.

A mes examinateurs, Madame Rebecca Deprez-Poulain, Madame Florence Leroux et Monsieur Peter Van Endert,

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon sujet de thèse et pour votre participation lors des comités de suivi individuel.

A mon directeur de thèse, Monsieur Benoit Deprez,

Je vous remercie pour votre qualité d'encadrement, votre disponibilité, votre réflexion et vos conseils tout au long de cette thèse. Je vous remercie pour votre investissement sans faille dans ce projet.

Ce travail de thèse n'aurait pas été ce qu'il a été aujourd'hui sans ces personnes que je souhaite, du fond du cœur, remercier,

Aux personnes du laboratoire U1177,

A Mr Deprez, je vous remercie d'avoir, à chaque instant, fait partager votre réflexion et vos idées sur ce travail de thèse. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné les moyens de réaliser des collaborations et d'apprendre de l'expertise de chacun. Grâce à vous ce travail de thèse a été très enrichissant du point de vue technique, intellectuel et humain. Vous m'inspirez pour votre vivacité scientifique, votre passion et votre ouverture d'esprit. J'ai beaucoup appris de votre encadrement, vous avez fait de moi une chercheuse de demain déterminée à défendre des valeurs de la recherche, comme l'intégrité, la passion, le partage, la persévérance et l'inventivité.

A Florence, je vous remercie de m'avoir encadrée au quotidien et d'avoir toujours été présente et de bons conseils. Vous avez nourri ma réflexion par vos remarques constructives et pertinentes. Vous avez été ma source quotidienne d'inspiration par votre bienveillance et votre esprit critique. Merci du fond du cœur pour votre investissement dans ce projet de thèse, le soutien que vous m'avez apporté a été une source de dépassement de soi.

A Mme Deprez, je vous remercie de m'avoir fait partager votre passion pour la recherche depuis mon cursus universitaire de pharmacie. Je vous remercie d'avoir été ma tutrice pédagogique et de m'avoir permis de réaliser du monitorat pendant ma thèse. J'ai pris plaisir à faire de l'enseignement et à travailler ma pédagogie, merci de m'avoir fait partager cette autre valeur de la recherche qu'est la transmission des connaissances. Je vous remercie également pour votre soutien et la confiance que vous m'avez accordée pendant ces trois années de thèse sur votre projet de recherche.

A Marine, ma co-thésarde mais surtout mon amie. Merci d'avoir été ma confidente pendant ces trois années de thèse. Merci pour ta bonne humeur, ton soutien, ton écoute et ta bienveillance au quotidien. Grâce à toi j'ai toujours eu de la motivation pour les séances de sport de David. Sans ton amitié, ces trois années de thèse auraient été moins appréciables. Je te souhaite le meilleur car tu le mérites amplement.

A Adrien, merci d'avoir été là pendant ces trois années, ta bonne humeur et ton écoute m'ont toujours été d'un grand soutien. Merci pour tes précieux conseils avisés et objectifs qui m'ont aidé plus d'une fois. Merci d'avoir pris de ton temps pour me former au western-blot et à la technique du CETSA. Tout a toujours été très simple avec toi, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

A Valérie, à ma maman du boulot, merci d'avoir été là et toujours avec le sourire, tu partages une joie de vivre communicative qui fait chaud au cœur. Merci pour tous ces bons moments de rigolade. Merci également de m'avoir formée aux expériences d'apoptose. Tu es une personne que j'apprécie et à qui je souhaite beaucoup de bonheur. Merci pour ton soutien naturel et sincère.

A Morgane, une belle rencontre pendant cette thèse, un binôme lors des expériences d'irradiations, une complémentarité qui fonctionnait bien, merci pour tous ces bons moments passés.

A Julie, merci pour ta disponibilité et ton aide tout au long de cette thèse. Merci pour ton aide lors de l'envoi des échantillons RNAseq et lors du criblage agrésomes. Merci également pour ta bonne humeur communicative.

A Béa, qui est le dynamisme et la persévérance incarnée, une fille que rien n'arrête, mon modèle de dynamisme professionnel. Je te remercie pour tous les bons moments passés lors de cette première année de thèse, pour ton aide précieuse pour les expériences de création du vecteur CRISPR-Cas9. Une amitié qui s'est créée et dont je suis contente qu'elle soit toujours présente malgré la distance.

A Sandrine, je te remercie pour ta disponibilité et ton aide sur plusieurs points : pour les macros, qui ont été d'une aide précieuse et indispensable lors de cette thèse, pour les expériences d'enzymologie, pour tes qualités d'assistante de prévention et également pour la gestion des commandes.

A Cyril, je te remercie pour ton investissement lors du développement des constructions CRISPR-Cas9 lors de ma première année de thèse, cela fut très enrichissant.

Aux personnes d'Apteeus, merci à Betty pour sa gentillesse infinie, à Loïc pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils à chaque fois où j'en ai eu besoin, à Camille pour sa gentillesse débordante, mais aussi à Simon, Isabelle, Thibaut et TERENCE. Merci à tous de m'avoir prêté votre PSM à chaque fois où j'en ai eu besoin, merci également pour votre aide lors des expériences UV-C et pour l'utilisation de l'Hydrospeed.

A Damien, merci pour ta disponibilité et pour nos différents échanges toujours constructifs sur le projet. Je retiendrais une phrase de toi « La science ne repose pas sur Saint Thomas », une phrase qui résume les bons moments passés à Orléans.

A Catherine, merci pour ton aide précieuse lors des TP ADME, pour les QC lors du criblage agrésomes ainsi que pour les expériences de peptides. Je garderai de toi ta gentillesse et ton sourire à toute épreuve.

A Léo, mon co-thésard chimiste, merci pour ta bonne humeur quotidienne et pour nous avoir intégrées à vos sorties entre chimistes. Ce fut un réel plaisir de te connaître, j'espère que l'on gardera contact après la thèse.

A Valentin, un super informaticien sur qui j'ai pu compter à plusieurs reprises lors de ma thèse. Merci beaucoup pour ta disponibilité et ton aide indiscutable lors de l'analyse des résultats TPP-TR. J'ai adoré échanger avec toi sur n'importe quel sujet.

A Baptiste, merci pour tous ces bons moments partagés à rigoler et à jouer. Ce fut toujours un réel plaisir de discuter avec toi, ta bonne humeur communicative fut très agréable.

A Marion, un sourire jusqu'aux oreilles de quoi illuminer une journée, merci pour ta bonne humeur et ta bienveillance à toute épreuve.

A Aurore, une très belle rencontre pendant cette thèse, merci pour ta bonne humeur.

A Ronan, à mon dealer de composés pendant ces trois années, merci pour toutes ces pesées réactives, ce fut un plaisir de travailler avec toi sur ce projet.

A Ludovic, merci pour ton aide pour l'analyse des hits de la publication agrésomes.

A Virgyl, mon co-thésard dunkerquois et désormais allemand, merci pour ces bons moments lors des congrès, ce fut un plaisir de te connaître, bonne continuation.

A Lucile, une co-thésarde mi-biologie, mi-chimiste à qui je souhaite de très belles années de thèse, merci pour ta gentillesse et pour tes gâteaux, la meilleure pâtissière que je connaisse, et je peux te dire que j'en ai mangé des gâteaux !

A Xiao, merci pour ta bonne humeur et merci de nous avoir partagé ta culture chinoise par les différentes gourmandises qui tu as pu ramener.

A mes stagiaires, Sidonie, Laura, Jeanne et surtout à Paulina et Inès, des stagiaires UTC qui m'ont suivi et beaucoup aidé pendant 6 mois chacune, merci pour votre investissement et votre bonne humeur, des binômes au top.

A Nathalie, merci pour ta disponibilité et ta réactivité sans faille, merci pour toutes ces commandes passées, pour tous ces rendez-vous planifiés et pour tous ces papiers signés.

A toutes les personnes du laboratoire U1177, un très grand merci pour toutes ces années passées ensemble ! Votre sympathie et votre bonne humeur ont permis de créer une atmosphère de travail agréable chaque jour.

Je souhaite remercier également toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer,

A Fabien, je te remercie pour ton aide indiscutable pour l'analyse des résultats de RNAseq. Ton expertise est sans faille, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, tes conseils, ta pédagogie ... merci beaucoup !

A Nathalie, je vous remercie de m'avoir formée et aidée lors des différentes expériences de RT-qPCR et de m'avoir permis de les réaliser dans votre laboratoire. Merci pour votre gentillesse et vos précieux conseils.

A Isabelle, je te remercie pour ta gentillesse et pour m'avoir formée avec beaucoup de rigueur aux expériences de RT-qPCR. Merci également pour ta disponibilité vis-à-vis des oligos, ce fut un plaisir de faire ta connaissance.

A Bruno, je te remercie de ta gentillesse et pour avoir pris de ton temps pour me montrer la mesure des RIN de mes échantillons RNAseq.

A Jean-Michel, merci pour votre disponibilité, votre rigueur et votre persévérance lors de l'expérience de TPP-TR. Sans vous, je n'aurais pu obtenir ces résultats préliminaires qui nourrissent ma réflexion, merci beaucoup !

A Nicolas, je vous remercie pour votre aide et votre expertise lors des différentes expériences de microscopie électronique.

A Agata, merci de nous avoir aidés à organiser les expériences de radiations au sein d'OCR.

A Arnaud, Alexandre, Nathalie, Marie-Line et Priscille pour leurs aides et leurs disponibilités lors de l'organisation des TP HCS.

A Audrey, Quentin et Valentine, les thésards du laboratoire U1011, merci pour tous ces bons moments partagés.

Et je terminerais par remercier mes parents, ma famille, mes amis, pour m'avoir soutenue dans ce projet professionnel qui est également ma passion,

Un merci particulier à Maxence, qui fait de moi une femme comblée.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	9
RESUME	14
ABSTRACT	15
INTRODUCTION : BESOIN MEDICAL ET ETAT DE L'ART	17
1. LE BESOIN THERAPEUTIQUE POUR LE TRAITEMENT DU MYELOME MULTIPLE	18
1.1. <i>Le myélome multiple</i>	18
1.2. <i>Les modèles d'études</i>	26
1.3. <i>Les thérapies existantes</i>	30
1.4. <i>Les thérapies en développement</i>	35
2. LES INHIBITEURS DU PROTEASOME	39
2.1. <i>Le système ubiquitine-protéasome</i>	40
2.2. <i>Les inhibiteurs du protéasome pour le traitement du cancer</i>	44
3. LA REPONSE INTEGREE AU STRESS (ISR)	54
3.1. <i>Les différents senseurs de la réponse intégrée au stress</i>	55
3.2. <i>La convergence des réponses par eIF2α</i>	55
3.3. <i>Les spécificités des différentes réponses au stress</i>	57
3.4. <i>Le facteur de transcription ATF4</i>	70
3.5. <i>La réponse intégrée au stress et les inhibiteurs du protéasome</i>	76
4. LA SERIE CHIMIQUE DE BOOSTERS DE L' APOPTOSE INDUITE PAR DES ANTICANCEREUX	77
4.1. <i>Insulin-degrading enzyme : une protéine aux multiples facettes</i>	77
4.2. <i>Implication d'IDE dans la physiopathologie du cancer</i>	80
4.3. <i>Des composés inhibiteurs d'IDE</i>	83
4.4. <i>Utilisation de ces composés pour le traitement du cancer</i>	84
OBJECTIFS DE LA THESE	93
MATERIEL ET METHODES	95
RESULTATS : CARACTERISATION DU MECANISME D'ACTION	119
1. EFFICACITE DANS LE MODELE 5T33MM DE MYELOME MULTIPLE MURIN	120
1.1. <i>Le modèle animal 5T33MM</i>	120
1.2. <i>Efficacité in vitro</i>	120
1.3. <i>Protocole expérimental</i>	121
1.4. <i>Résultats</i>	122
2. CARACTERISATIONS PHENOTYPIQUES	123
2.1. <i>Rationnel pour le choix des phénotypes</i>	123
2.2. <i>Mesure de l'activité chymotrypsine du protéasome</i>	125
2.3. <i>Etude de la morphologie cellulaire par microscopie électronique</i>	126
2.4. <i>Etude transcriptomique de gènes impliqués dans l'UPR</i>	129
2.5. <i>Quantification des agrésomes</i>	132
2.6. <i>Etude de la mort cellulaire lors de l'association avec des radiations</i>	133
2.7. <i>Conclusions sur ces observations phénotypiques</i>	136
3. ETUDE DU TRANSCRIPTOME	137
3.1. <i>Design de l'expérience</i>	137
3.2. <i>Les changements transcriptomiques mis en évidence</i>	140
3.3. <i>Prédiction de facteurs de transcription</i>	184
4. EVALUATION DU STRESS NUTRITIONNEL	192

4.1.	<i>Comparaison avec le toiséostat</i>	193
4.2.	<i>Etude de l'expression de protéines pouvant être impliquées dans une réponse AAR et/ou UPR</i>	200
4.3.	<i>Synthèse des protéines</i>	206
5.	ETUDE DE L'IMPLICATION D'IDE DANS LES DIFFERENTS PHENOTYPES	207
5.1.	<i>Développement d'un outil cellulaire pour l'étude de l'implication du site catalytique d'IDE dans le phénotype de boost apoptotique</i>	207
5.2.	<i>Etude de différents phénotypes sur les MEFs IDE KO</i>	208
5.3.	<i>Etude de la conséquence sur différents phénotypes du knock-down d'IDE à l'aide de siRNA</i>	210
5.4.	<i>Composés boosters sans engagement d'IDE</i>	213
6.	PROFILAGE THERMIQUE DU PROTEOME	214
DISCUSSION		221
1.	LES COMPOSES DE LA SERIE CHIMIQUE D'INHIBITEURS D'IDE ONT UN INTERET THERAPEUTIQUE DEMONTRE	222
1.1.	<i>La stratégie de combinaison</i>	222
1.2.	<i>La preuve de l'intérêt thérapeutique chez l'animal</i>	222
1.3.	<i>Elargissement à d'autres cancers que le myélome multiple</i>	223
1.4.	<i>Elargissement à d'autres agents anticancéreux</i>	224
2.	L'IMPLICATION D'IDE DANS LE BOOST APOPTOTIQUE NE SERAIT PAS TOTALE	225
2.1.	<i>IDE serait une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du cancer</i>	225
2.2.	<i>La comparaison des propriétés d'analogues d'une même série chimique permet d'établir des relations structure-activité</i>	226
2.3.	<i>Le lien de causalité entre IDE et le boost apoptotique n'est pas entièrement établi</i>	227
2.4.	<i>L'inhibition d'IDE joue peut-être un rôle dans l'effet observé chez l'animal</i>	227
3.	LA DEMARCHE SCIENTIFIQUE POUR LA DETERMINATION DU MECANISME D'ACTION	228
3.1.	<i>La notion de causalité</i>	228
3.2.	<i>Les outils omics pour la compréhension du mécanisme d'action</i>	228
4.	DES PERSPECTIVES D'EXPLORATION POUR LA COMPREHENSION DU MECANISME D'ACTION	229
4.1.	<i>Approfondissement de l'étude du protéome pour la validation de cibles</i>	229
4.2.	<i>Approfondissement de l'étude transcriptomique pour la validation de voies de signalisation</i>	230
4.3.	<i>Exploration de phénotypes</i>	231
5.	DES HYPOTHESES SUR LES CHAINES D'EVENEMENTS	231
5.1.	<i>Hypothèses avec une causalité dépendante du zinc</i>	231
5.2.	<i>Elargissement du champ d'investigation</i>	233
6.	CONCLUSION	234
ANNEXES		235
BIBLIOGRAPHIE		255

Liste des abréviations

3-PG : 3 phosphoglyceric acid	ATP : adenosine triphosphate
4E-BP1 : <i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>	ATU : autorisation temporaire d'utilisation
AAR : <i>Amino Acid Response</i>	AUC : Aire sous la courbe
AARE : <i>amino acid response elements</i>	BCMA : <i>B-cell maturation antigen</i>
ADCC : Cytotoxicité Dépendante des anticorps	BDM : Biostructures et Découverte du Médicament
ADME : Absorption – Distribution – Métabolisme – Elimination	BHE : Barrière hémato-encéphalique
ADN : acide désoxyribonucléique	BIP : <i>Binding Immunoglobulin Protein</i>
ADP : adénosine diphosphate	BLIMP1 : <i>Beta-interferon gene positive regulatory domain 1-binding factor</i>
AKT : <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>	BRAF : serine/threonine-protein kinase B-raf
Ala : Alanine	BRCA1 : <i>Breast Cancer type 1 susceptibility protein</i>
AMBRA1 : <i>Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1</i>	BSA : <i>bovine serum albumin</i>
AMC : 7-Amino-4-methylcoumarin	BTZ : Bortezomib
AMM : Autorisation de mise sur le marché	bZIP : <i>basic leucine zipper</i>
AMP : adenosine monophosphate	CARS : cysteinyl tRNA synthetase
AMPK : <i>Adenosine Monophosphate-Activated protein kinase</i>	CAR-T : <i>Chimeric Antigen Receptor-T cell therapy</i>
ANP : <i>Atrial natriuretic peptide</i>	CASTOR1 : <i>Cytosolic arginine sensor for mTORC1 subunit 1</i>
APAF-1 : <i>Apoptosis activating Factor-1</i>	CBS : <i>Cystathionine beta-synthase</i>
AP1 : protéine activatrice 1	CCND1/3 : <i>G1/S-specific cyclin-D1/D3</i>
APB : Aminopeptidase B	CC₅₀ : Concentration cytotoxique 50
APIP : <i>APAF1-interacting protein</i>	CDK : <i>cyclin-dependent kinase</i>
APN : Aminopeptidase Neutre	CDKI : <i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor</i>
APRIL : A proliferation-inducing ligand	CD : Cluster de différenciation
ARE : <i>Antioxidant Response Element</i>	C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein
ARNg : acide ribonucléique guide	CETSA : <i>Cellular Thermal Shift Assay</i>
ARNm : acide ribonucléique messenger	CFZ : Carfilzomib
ARNt : ARN de transfert	CGP : <i>Chemical and Genetic Perturbations</i>
ARS : <i>AminoAcyl ARNt synthetases</i>	CGRP : α -Calcitonin gene-related peptide
ASNS : <i>Asparagine synthetase</i>	ChIP : immunoprécipitation de la chromatine
ASK1 : <i>Apoptosis Signal-regulating kinase 1</i>	CHOP : <i>C/EBP-homologous protein</i>
ATF4 : <i>Activating Transcription Factor 4</i>	CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
ATF6 : <i>Activating Transcription Factor 6</i>	COMB : Combinaison
ATG : <i>Autophagy-related protein</i>	

COPII : coat protein complex
COSMIC : Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CRAB : hyperCalcemia – Renal failure – Anemia – Bone disease
CReP : Constitutive repressor of eIF2 alpha phosphorylation
CRISPR-Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9
CRL4 : cullin 4-RING ubiquitin ligase
CRP : protéine C réactive
CTH : Cystathionine gamma-lyase
CXCL : C-X-C motif chemokine
CXCR : C-X-C chemokine receptor
DDIT : DNA damage-inducible transcript protein
DEPTOR : DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPP2/3 : dipeptidyl peptidase 2/3
DUB : Déubiquitinyase
ΔTagg : Différence des Tagg
EC₅₀ : Concentration efficace 50
EGF-R : Epidermal Growth Factor Receptor
EGR1 : Early growth response protein 1
eIF2 α : α subunit of eukaryotic initiation factor 2
eIF4 : eukaryotic translation initiation factor 4
EMA : Agence Européenne du Médicament
ERAP1/2 : Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1/2
ERO1 : ER oxidoreductin
ERK : extracellular signal-regulated kinase
ERSE : ER stress Response Element
FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
FASTKD2 : FAST kinase domain-containing protein 2, mitochondrial

FBW7 : F-box/WD repeat-containing protein 7
FC : Fold Change
FDA : Food and Drug Administration
FGFR3 : Fibroblast growth factor receptor 3
FIP200 : FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FOX : Forkhead box protein
GABARAP : γ aminobutyric acid receptor-associated proteins
GADD34 : Growth Arrest and DNA Damage gene 34
GAP : GTPase-activating protein
GARS : glycyl tRNA synthetase
GATOR1/2 : GAP activity towards the Rags 1/2
GCN2 : General Control Nonderepressible 2
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDP : guanosine diphosphate
GDF15 : Growth differentiation factor 15
GEO : Gene Expression Omnibus
GRP78 : Glucose-regulated protein 78
GSEA : Gene Set Enrichment Analysis
GSH : glutathion
GTP : guanosine triphosphate
HAS : Haute Autorité de Santé
Hb : hémoglobine
HDAC : Histone désacétylase
HIF : Hypoxia inducible Factor
HPG : L-homopropargylglycine
HRI : Heme regulated Inhibitor
HSP : Heat Shock protein
IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50
IDE : Insulin-degrading enzyme
IFN : interferon
Ig : Immunoglobuline
IGF : Insulin growth factor
I κ B : I-kappa-B

IKK : *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*

IKZF1/3 : Ikaros / Aiolos

IL : interleukine

Imids : Immunomodulateurs

IP : inhibiteur du protéasome

IRAP : *Insulin-regulated aminopeptidase*

IRE1 : *Inositol-Requiring Enzyme 1*

IRF4 : *Interferon regulatory factor 4*

IRF2BP : *Interferon regulatory factor 2-binding protein*

ISR : *Integrated Stress Response*

ISS : *International Staging System*

IV : Intraveineuse

JAK : Janus kinase

JNK : *JUN N terminal Kinase*

KD : *Knock-down*

Keap1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1*

KO : knock-out

KRAS : GTPase KRas

KSP : *Kinesin spindle protein*

KTGS : *Kinetic Target-guided synthesis*

LAP/LAP* : *liver-enriched transcriptional activated protein*

LAP3 : Leucine aminopeptidase 3

LC3 : Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B

Leu : Leucine

LIP : *liver-enriched transcriptional inhibitory protein*

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LT : lymphocyte T

LTA4H : *Leukotriene A-4 hydrolase*

Maf : *MusculoAponeurotic Fibrosarcoma proteins*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MARE : *Maf recognition Element*

MARS : *Methionyl tRNA synthetase*

MEC : Matrice extracellulaire

MEK : *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MetAP-2 : *méthionine aminopeptidase 2*

MGUS : *Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance*

MIC-1 : *Macrophage inhibitory cytokine-1*

miRNA : MicroARN

mLST8 : *Mammalian lethal with SEC13 protein 8*

MM : myélome multiple

MMP : *matrix metalloproteinase*

MMSET : *Multiple myeloma SET domain-containing protein*

MOPC : *Mineral-Oil induced Plamacytomas*

MTOC : *microtubule-organizing center*

mTOR : *mammalian target of rapamycin*

mTORC1/2 : *mammalian Target of Rapamycin complex 1/2*

Myc : *Myc proto-oncogene protein*

NAG1 : *NSAID-activated gene 1 protein*

NBR1 : *Next to BRCA1 gene 1 protein*

N-CAM : *Neural cell adhesion molecule*

NES : *normalized enrichment score*

NFIL3 : *Nuclear factor, interleukin 3 regulated*

NF-κB : *Nuclear factor NF-kappa-B*

NF-Y : *Nuclear Transcription Factor Y*

NK : *Natural killer*

NKT : *Natural killer T*

NOS : *endothelial nitric oxide synthase*

NP-40 : *Nonyl phenoxypolyethoxyethanol*

NRAS : GTPase NRas

NRF1/2 : *Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 1/2*

OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

OPG : *osteoprotégérine*

PA28γ : *Proteasome activator 28 subunit gamma*

PAC : *proteasome assembly chaperone*

Padj : *p-value adjusted*

PAX5 : *Paired box protein Pax-5*
PBS : *Phosphate-buffered saline*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PD-1 : *Programmed cell death protein 1*
PDI : *Protein Disulfide Isomerase*
PD-L1 : *Programmed-death ligand 1*
PE : *phosphatidylethanolamine*
PEP : *Phosphoénolpyruvate*
PERK : *Protein Kinase RNA-like ER kinase*
PHGDH : *D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*
PI3K : *Phosphatidyl Inositol 3 kinase*
PIP3 : *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*
PKR : *Protein kinase RNA-activated*
PLAP : *leucine aminopeptidase placentaire*
PM : *poids moléculaire*
POMP : *proteasome maturation protein*
PP1c : *Protein phosphatase 1 Cofactor*
PP2A : *protein phosphatase 2A*
PPAR- γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PPI : *eau pour préparation injectable*
PRAS40 : *Proline-rich AKT1 substrate 1*
PRDM1 : *Positive Regulatory domain zinc finger protein 1*
PSAT1 : *Phosphoserine aminotransferase*
PSM : *Proteasome subunit*
PSPH : *Phosphoserine phosphatase*
PTEN : *Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*
PuSA : *puromycin-sensitive aminopeptidase*
RAC : *Regulatory Particle assembly chaperones*
RANK : *receptor activator of nuclear factor kappa-B*
RANKL : *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*
RB1 : *Retinoblastoma-associated protein*

RE : *réticulum endoplasmique*
REDD1 : *Protein γ lated in development and DNA damage response 1*
REG γ : *11S regulator complex subunit gamma*
RIDD : *Regulated IRE1-dependent Decay*
RIN : *RNA Integrity Number*
RNAseq : *séquençage de l'ARN*
ROS : *Reactive Oxygen Species*
Rpn : *Regulatory particle non-ATPase*
RT-qPCR : *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
S1P/S2P : *Site 1/2 protease*
S6K1 : *Ribosomal protein S6 kinase beta-1*
SAMTOR : *S-adenosylmethionine sensor upstream of mTORC1*
SARS : *Seryl-tRNA synthetase*
SD : *standard deviation*
SDF1 : *Stromal cell-derived factor 1*
SEM : *standard error of the mean*
Sen2 : *Sestrin 2*
SiRNA : *small interfering RNA*
SIRT4 : *NAD-dependent protein lipoamidase sirtuin-4, mitochondrial*
SLAMF7 : *Signaling lymphocytic activation molecule family member 7*
SMM : *smoldering multiple myeloma*
SpCas9 : *Cas9 from Streptococcus pyogenes*
SQSTM1 : *Sequestosome-1*
SRE : *Stress Response Element*
SREBP : *sterol regulatory element-binding protein*
STAMPB : *STAM (Signal transducing adaptor molecule) -binding protein*
SVF : *sérum de veau foetal*
TA : *température ambiante*
Tagg : *Température d'agrégation ou température de fusion*
TBP : *TATA binding protein*
TBS : *Tris Buffered Saline*

TGF : *Transforming growth factor*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TOP : *thimet oligopeptidase*
TP53 : *Cellular tumor antigen p53*
TPP-II : *tripeptidyl peptidase II*
TPP-CR : *Thermal Proteome Profiling – Concentration Range*
TPP-TR : *Thermal Proteome Profiling – Temperature Range*
TRAF2 : *TNF receptor-associated factor 2*
TRIB3 : *Tribbles 3*
TSC : *Tuberous Sclerosis Complex*
Ub : ubiquitin
UBA : *Ubiquitin-like modifier-activating enzyme*
UCHL5 : *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5*
ULK1 : *Unc-51-like kinase 1*
uORF : *upstream Open Reading Frame*
UPR : *Unfolded protein response*
UPRE : *UPR Element*

UPS : Ubiquitin proteasome system
USP14 : *Ubiquitin Specific Protease 14*
UV : ultraviolet
UVRAG : *UV radiation resistance-associated gene protein*
VCAM1 : *vascular cell adhesion protein 1*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VLA4 : *Vascular cell adhesion protein 1/Integrin alpha-4*
VPS34 : *Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (PIK3C3)*
VS : versus
WARS : *tryptophanyl-tRNA synthetase*
WB : Western-Blot
XBP1s/u : *X Box binding Protein spliced/unspliced*
XIAP : *X-linked inhibitors of apoptosis*
XPO1 : *Exportin-1*
YARS : *Tyrosyl-tRNA synthetase*

Résumé

Une série de composés synthétiques conçus pour inhiber l'*Insulin-Degrading Enzyme* (IDE) augmentent la puissance d'induction de l'apoptose par des inhibiteurs du protéasome, tel que carfilzomib, sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses de manière dose-dépendante. Utilisés seuls, les composés de cette série chimique ne présentent pas de toxicité. Dans le cancer, où le besoin médical est insatisfait, les combinaisons thérapeutiques sont des opportunités pour augmenter l'efficacité de la thérapie et réduire les effets indésirables. L'intérêt thérapeutique du développement de ces molécules a été démontré dans un modèle murin de myélome multiple. Par ces travaux de thèse nous avons voulu comprendre le mécanisme d'action de cette série chimique. Pour cela, nous avons utilisé différentes stratégies basées sur la modulation de cible(s), sur l'exploration de phénotypes et sur l'identification des modifications du protéome. Nous nous sommes intéressés à différents phénotypes, observables quantitativement et choisis de manière rationnelle par rapport au mécanisme d'action du carfilzomib, comme l'activité du protéasome, la quantité d'agrésomes et la modulation de voies de signalisation. Nous avons développé une méthode d'observation des agrésomes permettant leur quantification à haut débit en microscopie à fluorescence, et cela a fait l'objet d'une publication. Une approche transcriptomique nous a permis d'identifier des voies de signalisation en réponse aux traitements. Le seul effet cellulaire provoqué sans l'aide d'un autre composé que nous ayons pu mettre en évidence est la modulation de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés. Les composés de cette série chimique ont été conçus pour inhiber l'enzyme IDE. Plusieurs données appuient l'implication de cette cible dans la physiopathologie du cancer. Cependant d'autres cibles pourraient être impliquées dans le boost apoptotique. Pour élucider cela, une approche préliminaire de protéomique a permis d'identifier des cibles potentielles, qu'il est nécessaire de valider. En multipliant les approches nous sommes en mesure d'émettre des hypothèses sur le mécanisme d'action de ces molécules boosters de l'apoptose induite par le carfilzomib, même si les chaînes causales complètes restent encore à décrire.

Mots clés : IDE – carfilzomib – myélome multiple – combinaison – mécanisme d'action – apoptose.

Abstract

We discovered that the combination of small chemical compounds designed to inhibit Insulin-Degrading Enzyme (IDE) boosts dose-dependently the proteasome inhibitor carfilzomib-based cytotoxicity in many cancer cell lines. Alone, the compounds display no toxicity. In oncology, where there are still unmet medical needs, therapeutic combinations are real opportunities to increase drug efficacy and to reduce side effects. The therapeutic interest of our molecules has been demonstrated in a mouse model of multiple myeloma. Through this thesis work, we wanted to decipher the mechanism of action of this booster series. To do so, we used different strategies based on target profiling, proteome modulation and phenotype exploration. We analyzed, in kinetics and/or with dose response, different phenotypes like proteasome activity, aggresome quantification or pathways modulations, rationally selected on the basis of the mechanism of action of carfilzomib. We have developed and published a method to observe aggresomes that allows quantification of these formations by fluorescence microscopy at high throughput. A transcriptomic approach was performed to identify pathways in response to treatments. The only biological effect produced by the compounds alone that we observed is the modulation of genes involved in amino-acid metabolism pathways. The compounds were designed as inhibitors of insulin-degrading enzyme but several data support that other targets could be involved in the phenotype. To elucidate this, a preliminary proteomic approach was performed that allowed the identification of potential targets which need to be further validated. By multiple approaches, we were able to hypothesize on a potential mechanism of action of the apoptotic boost-induced by our chemical series with cytotoxic agents. Still, the causal chains of events remain to be fully described.

Keywords: Insulin-degrading enzyme – carfilzomib - multiple myeloma, combination - mechanism of action – apoptosis.

Introduction : Besoin médical et état de l'art

1. Le besoin thérapeutique pour le traitement du myélome multiple

1.1. Le myélome multiple

1.1.1. La pathologie

Le myélome multiple (MM) (ou maladie de Kahler) est une hémopathie maligne d'étiologie inconnue qui se caractérise par la prolifération dans la moelle osseuse d'un clone de plasmocyte tumoral. Le myélome est dit multiple du fait que plusieurs os sont touchés. Les plasmocytes sont des cellules qui produisent des immunoglobulines constituées de chaînes lourdes (IgH) et de chaînes légères (**Figure 1**). Dans le cadre du MM, le clone plasmocytaire synthétise des immunoglobulines dites monoclonales, aussi appelées « protéines M », le plus souvent de type IgG ou IgA, et plus rarement IgD puis IgE, IgM ou encore uniquement des fragments d'immunoglobulines (chaînes légères kappa κ ou lambda λ , retrouvées chez 15% des patients) qui peuvent être détectés dans le sang et/ou les urines (1). Dans de très rares cas, le myélome est non sécrétant.

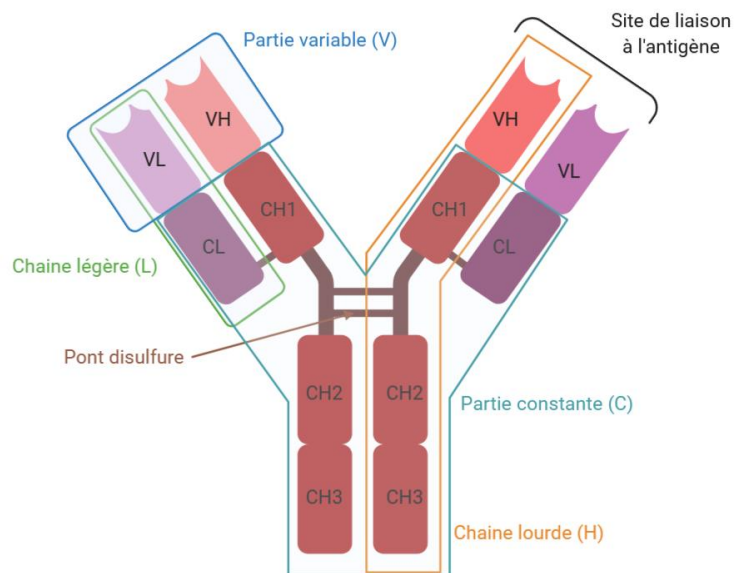


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'un anticorps.

Les symptômes du MM peuvent être définis par les critères « CRAB » :

- **C** (*hyperCalcaemia*): une hypercalcémie, due à une libération de calcium par la destruction de l'os. Cette hypercalcémie est responsable de troubles digestifs (nausées, vomissements), de sensation de bouche sèche, d'urines abondantes, et de confusion et de troubles du rythme cardiaque lorsque l'hypercalcémie est très élevée.
- **R** (*Renal insufficiency*) : une insuffisance rénale due à l'accumulation de calcium et de l'immunoglobuline monoclonale en particulier des chaînes légères. Les chaînes légères sont normalement filtrées au niveau du glomérule et réabsorbées au niveau du tubule proximal. Cependant, dans le myélome multiple cette capacité de réabsorption est saturée, les chaînes légères s'accumulent alors au niveau du

segment distal du néphron où elles précipitent par leur association avec l'uromoduline.

- **A (Anaemia)**: une anémie, due à une insuffisance de production des cellules du sang par la moelle osseuse. Cette insuffisance s'accompagne d'une fatigue, d'une pâleur (pour l'anémie), de risque d'infections (pour la leucopénie) et de risque d'hémorragie (pour la thrombopénie).
- **B (Bone disease)**: des lésions osseuses, par une stimulation des ostéoclastes et une inhibition des ostéoblastes, qui s'accompagnent de douleurs osseuses et de risque de fractures. Lors de fractures vertébrales, une compression médullaire peut survenir à l'origine de troubles neurologiques.

Les examens cliniques, biologiques (dont l'électrophorèse des protéines sériques qui permet la détection d'un pic monoclonal, ou d'un MM à chaînes légères par une hypogammaglobulinémie), le myélogramme (quantification des plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse) ainsi que les examens d'imagerie (radiologie, IRM, scanner) permettent de poser le diagnostic de ce cancer.

Le MM est précédé d'un stade pré-malin appelé MGUS (*Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance*) qui se caractérise par une gammopathie monoclonale peu élevée (<30g/L), une plasmocytose médullaire inférieure à 10% et sans symptômes cliniques, biologiques ou radiologiques. Ce stade pré-malin nécessite un suivi régulier des patients mais ne nécessite pas de traitement. La MGUS touche 3 à 4 % des personnes de plus de 50 ans et peut évoluer vers un MM (environ 1/4 des personnes présentant un MGUS développent un MM 25 ans plus tard soit un risque de transformation en myélome de 1% par an). Un stade intermédiaire asymptomatique entre le MGUS et le myélome multiple peut exister et est appelé SMM (*smoldering multiple myeloma*) où le risque de développer un myélome multiple est plus élevé (2). A l'inverse, le myélome multiple peut évoluer en formes extramédullaires et en leucémie à plasmocytes (3) (**Figure 2**).

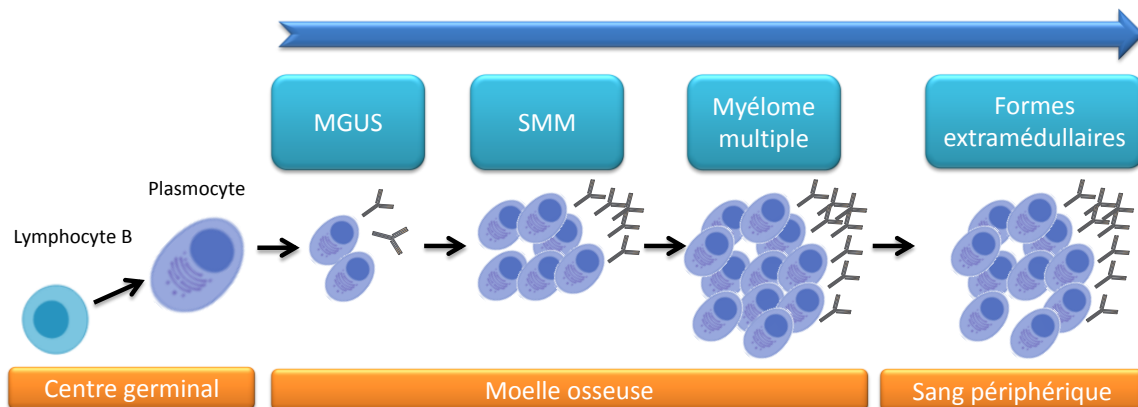


Figure 2 : Développement du myélome multiple.

Différents stades de MM sont décrits par la classification de Durie et Salmon, évaluant ainsi l'importance de la masse tumorale (**Tableau 1**).

Paramètres	Stade I (tous les critères)	Stade II (un ou plusieurs critères)	Stade III (un ou plusieurs critères)
Hb (g/dL)	>10	8.5 à 10	< 8.5
Calcium (mmol/L)	<3	<3	>3
Ig monoclonale (g/L)	IgA <30 IgG <50	IgA : 30 à 50 IgG : 50 à 70	IgA >50 IgG >70
Chaîne légère urinaire (g/24h)	<4	4 à 12	>12
Imagerie du squelette	Os normal ou lésion osseuse unique		3 lésions osseuses lytiques

Tableau 1 : Classification de Durie et Salmon du myélome multiple en différents stades

Il existe également une autre classification pronostique, la classification internationale (ISS *International Staging System*) basée sur les taux de β 2-microglobulinémie et de l'albuminémie (**Tableau 2**). Lors de l'établissement de cette classification, la médiane de survie des patients atteints d'un MM de stade I était de 62 mois, contre 44 mois et 29 mois pour les stades II et III respectivement (4).

	Stade I	Stade II	Stade III
β 2M (mg/L)	<3.5	Ni le stade I ni le stade III	>5.5
Albumine sérique (g/dL)	\geq 3.5		

Tableau 2 : Classification internationale ISS du myélome multiple

1.1.2. Epidémiologie

En France en 2012, environ 5000 nouveaux cas de MM ont été diagnostiqués ce qui représente un peu moins de 2% de l'ensemble des cancers et 10 à 12% des hémopathies malignes (5). L'incidence du myélome multiple en 2018 en France était estimée à 6205 cas (**Figure 3**). Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 159 985 nouveaux cas de myélome multiple ont été recensés dans le monde en 2018 (6). De plus, le myélome multiple représenterait 0.8% des cancers dans le monde avec un haut taux d'incidence dans les pays développés qui pourrait s'expliquer par de meilleures méthodes de diagnostics (**Figure 4**) (7). L'âge médian au diagnostic est de 70 ans pour l'homme et de 74 ans pour la femme, mais des cas jeunes peuvent être détectés avant 40 ans (environ 2.8%). En 2005, en France, la survie relative à 5 ans était de 40% environ.

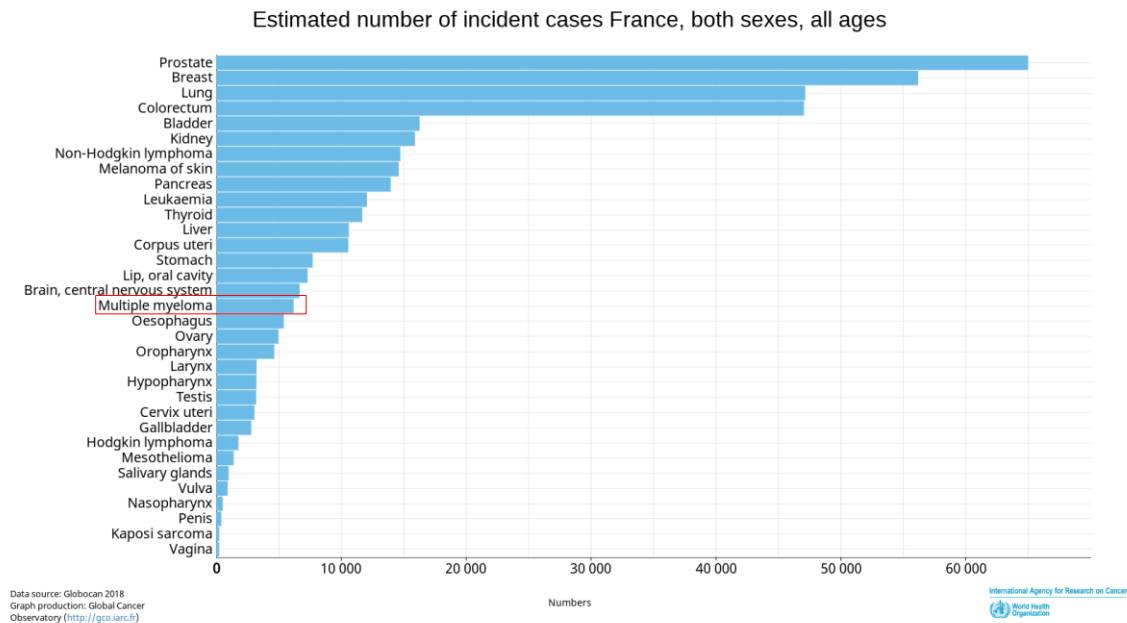


Figure 3 : Incidence pour tous les cancers en nombre de cas estimé en France pour les deux sexes et tous les âges, soit 6205 en 2018. Graphique produit par Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

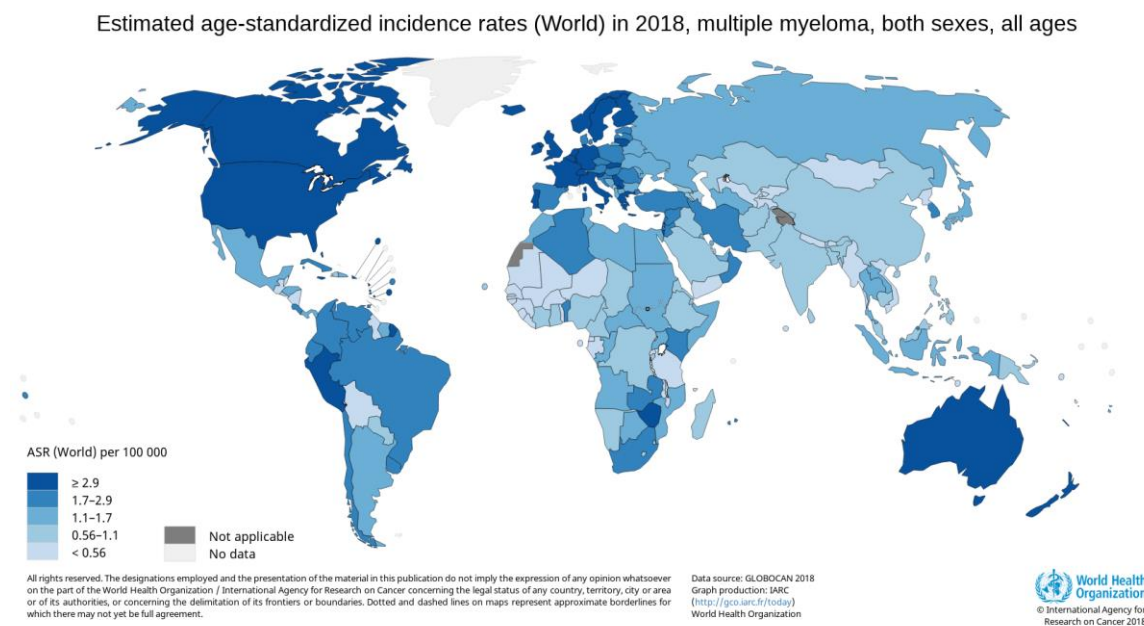


Figure 4 : Incidence du myélome multiple dans le monde en 2018. Graphique produit par Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

1.1.3. Caractéristiques moléculaires des cellules de myélome multiple

Altérations génétiques et épigénétiques :

Les cellules de myélome multiple présentent dans 50 à 60% une hyper diploïdie, c'est-à-dire la présence d'un ou de plusieurs chromosomes en plus du nombre normal diploïde de chromosomes. A l'inverse, les cellules de myélome multiple ne présentant pas une hyper diploïdie présentent des translocations qui impliquent l'IgH, c'est-à-dire un gène codant pour une chaîne lourde de l'immunoglobuline, et des oncogènes comme MAF (*V-maf*

musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog), MAFB (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*), MMSET (*Multiple myeloma SET domain-containing protein*), FGFR3 (*Fibroblast growth factor receptor 3*), cyclines D1 (CCND1) et D3 (CCND3) (8,9). Ainsi, cette translocation est responsable de l'augmentation de l'expression de ces gènes partenaires. Ces altérations génétiques représentent environ 40% des MM. D'autres événements génétiques peuvent survenir secondairement, contribuant à la prolifération des cellules de MM, comme l'activation de protéines oncogéniques comme K-RAS, N-RAS, MYC, PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), AKT, BRAF et/ou la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs comme TP53 ou RB1 (*Retinoblastoma-associated protein*).

Aussi, en plus des aberrations génétiques, des études épigénétiques ont mis en évidence une hypo méthylation globale de l'ADN et une hyper méthylation de gènes spécifiques comme des suppresseurs de tumeurs lors de la transformation du stade pré-malin MGUS au MM (10). De plus, la méthylation et l'acétylation des histones sont altérées dans le myélome multiple avec notamment une implication de plusieurs HDAC (histone déacétylase) (par exemple HDAC1, HDAC3, HDAC4, HDAC6) dans la pathogénèse du myélome multiple (11). L'expression de microARN (miRNAs), qui sont de petits ARN non codants de 19 à 25 bases de long et qui contrôlent l'expression génique par la destruction d'ARNm ou par l'inhibition de sa traduction, est également perturbée dans les cellules de MM. Par exemple, une surexpression de certains miRNA comme miR-21 et miR-221, et une diminution de l'expression d'autres miRNA comme miR-15a et miR-16 dans le MM sont décrites, suggérant des fonctions d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs de ces microARN (12) (Figure 5).

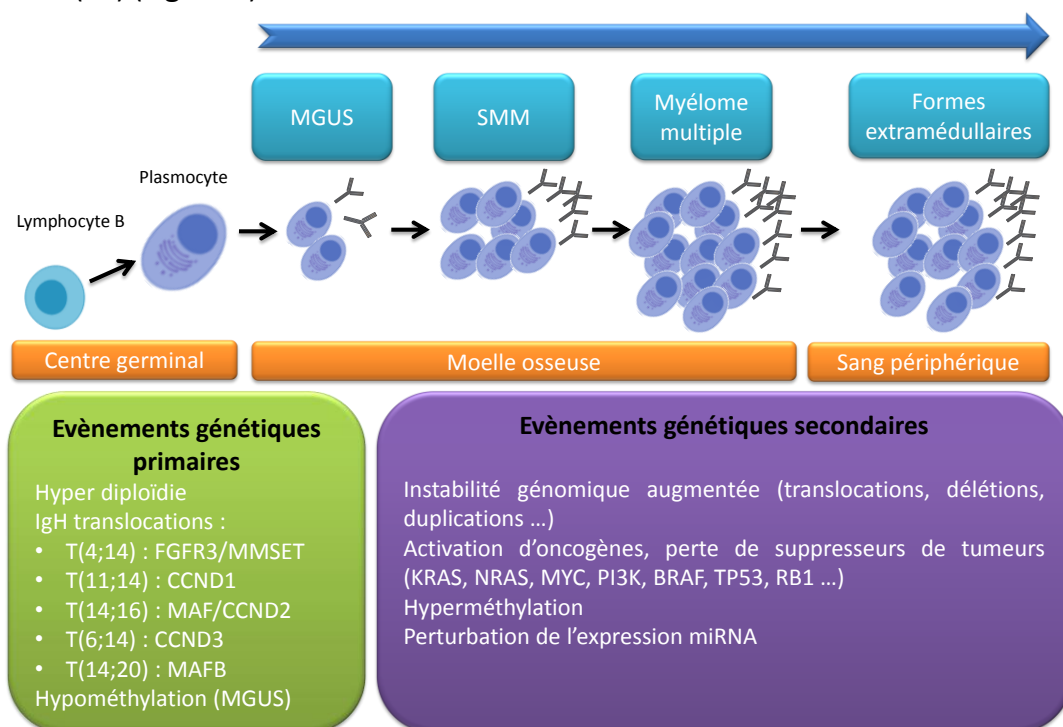


Figure 5 : Pathogénèse du myélome multiple. Des événements génétiques initiaux apparaissent au niveau de centre germinale, facilités notamment par le processus d'hypermutation somatique. Ce clone va ensuite subir d'autres événements génétiques, épigénétiques et biologiques dans la moelle osseuse conduisant au développement du myélome multiple. MGUS : gammopathie monoclonale de signification indéterminée. SMM : *smoldering multiple myeloma*.

Altérations de voies de différenciation des plasmocytes :

La différenciation des cellules B en plasmocytes est contrôlée par différents facteurs comme le facteur de transcription IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*). IRF4 réprime l'expression d'un répresseur transcriptionnel BCL-6, et augmente l'expression de la protéine de maturation du lymphocyte B, BLIMP1 (*Beta-interferon gene positive regulatory domain I-binding factor*) ou PRDM1 (*Positive Regulatory domain zinc finger protein 1*). Cette dernière est responsable de la répression de PAX5 (*Paired box protein Pax-5*) et de l'augmentation d'XBP1 (*X-box-binding protein 1*) (13) (**Figure 6**).

Dans les cellules de myélome multiple une dérégulation de ces facteurs impliqués dans la différenciation est observée (8). Par exemple, une addiction des gènes régulés par IRF4 a notamment été mise en évidence dans les cellules de MM et où la perturbation de l'expression de ce facteur est toxique pour ces dernières. Il a été mis en évidence une boucle d'autorégulation entre ce facteur de transcription IRF4 et l'oncogène MYC (14).

Aussi, les cellules de myélome multiple présentent une activation constitutive d'XBP1s, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des plasmocytes ainsi que dans la voie UPR (*Unfolded Protein Response*) (cf. **partie 3.3.1 de l'introduction**) (15). XBP1s participe alors à la pathogénèse du myélome multiple. En effet, des souris transgéniques sur-exprimant XBP1s développent des caractéristiques de myélome (16), et une forte expression d'XBP1s chez des patients atteints de MM est associée à une faible survie (17). XBP1s est impliqué dans la genèse des immunoglobulines, ainsi que dans la croissance clonale par l'induction de la cytokine IL6, essentielle à la survie des cellules de MM (18).

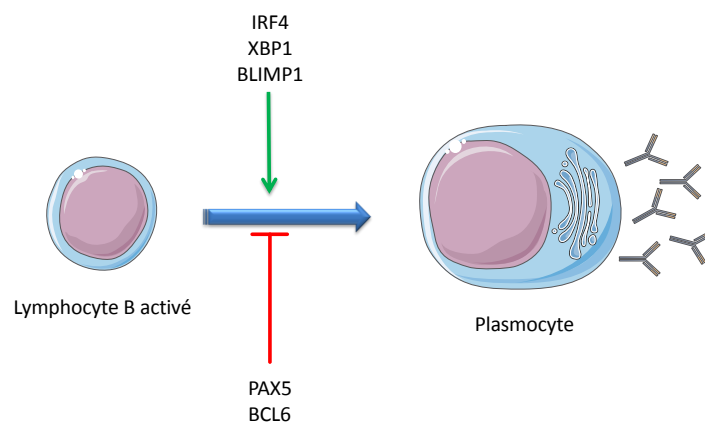


Figure 6 : Principaux facteurs contrôlant la différenciation des lymphocytes B en plasmocyte.

1.1.4. Le microenvironnement tumoral

L'interface entre le microenvironnement de la moelle osseuse et les cellules de MM est cruciale pour le développement et la progression de ce cancer, mais également pour la résistance aux traitements (1,19). Ce microenvironnement est constitué de différents éléments cellulaires et d'éléments acellulaires, comme des protéines solubles (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, exosomes ...), ou la matrice extracellulaire. Au sein de la moelle osseuse, les cellules de MM sont en contact avec les cellules hématopoïétiques,

comme les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules NK, les ostéoclastes ou encore les cellules myéloïdes suppressives (cellules dendritiques, macrophages, monocytes), mais aussi avec des cellules non hématopoïétiques comme les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules endothéliales ou encore les ostéoblastes. Ainsi, les cellules de MM interagissent avec leur microenvironnement par la sécrétion de facteurs ou des contacts directs, qui contribuent ainsi au développement, à la prolifération de ce cancer et également aux lésions osseuses (**Figure 7**).

Tout d'abord, les cellules de MM migrent et résident au niveau de la moelle osseuse par l'augmentation de l'expression de CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*), un récepteur C-X-C de chimiokine qui interagit avec CXCL12 (*C-X-C motif chemokine 12*, aussi appelé SDF1 (*Stromal cell-derived factor 1*) exprimée par les cellules stromales de la moelle osseuse (20,21). Les cellules endothéliales de la moelle osseuse contribuent également à la colonisation de la moelle osseuse par les cellules de MM par la sécrétion de cyclophiline A, qui interagit avec son récepteur CD147 exprimé à la surface des cellules cancéreuses (22).

De plus, l'interaction des cellules de MM avec les cellules stromales de la moelle osseuse est importante à prendre en compte car elle participe à la résistance aux traitements. Les cellules stromales de la moelle osseuse interagissent directement avec les cellules de MM par des molécules d'adhésion (par exemple VCAM-1/VLA4, *Vascular cell adhesion protein 1/Integrin alpha-4*) (23), ou par des interactions ligands/récepteurs à la surface cellulaire comme Jagged/Notch (24). Aussi, les cellules stromales de la moelle osseuse sécrètent des facteurs comme le VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor A*), impliqué dans l'angiogenèse, des facteurs de croissance comme IGF-1 (*Insulin-like growth factor I*), ou encore la cytokine IL-6 (*Interleukin-6*) qui participe à la survie et à la prolifération des cellules de MM (19,25,26). Il a été démontré que l'expression d'XBP1s dans ces cellules stromales de la moelle osseuse stimulait la sécrétion d'IL6, l'expression de VCAM-1 ainsi que RANK-L (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), un facteur stimulant la formation des ostéoclastes (27).

Aussi, la communication dans le microenvironnement tumoral est médiée par la sécrétion d'exosomes, principalement produits par les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules de MM. Les exosomes sont de petites vésicules extracellulaires (30 à 100nm) délimitées par une structure membranaire et contenant des molécules actives comme des miRNA (ARN non codants), des protéines solubles et des ligands membranaires. La communication via les exosomes dans le myélome multiple serait impliquée dans la résistance à l'apoptose, dans la modulation de la réponse immunitaire, ainsi que dans la résistance aux traitements. Les exosomes sont donc un outil de communication important entre les cellules et en particulier dans la pathologie du MM (28,29).

D'autre part, dans le myélome multiple l'équilibre entre les ostéoblastes, impliqués dans la production de l'os, et les ostéoclastes, impliqués dans la dégradation de l'os est dérégulé : il y a une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes, et une

réduction du nombre et de l'activité des ostéoblastes. Les cellules stromales de la moelle osseuse et les ostéoblastes, par l'interaction avec les cellules de MM, sécrètent RANK-L et diminuent l'expression d'ostéoprotégérine (OPG). RANK-L est le ligand de RANK présent sur les pré-ostéoclastes. Cette interaction contribue à la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes. L'OPG est un récepteur soluble qui se lie à RANK-L et empêche ainsi la liaison RANK-L avec RANK, nécessaire à la différenciation des ostéoclastes. Ainsi, par la diminution de l'expression d'OPG par les ostéoblastes induite par les cellules de MM, la différenciation des ostéoclastes est favorisée (30). Les ostéoclastes communiquent également avec les cellules de MM via la sécrétion d'APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) dans le microenvironnement tumoral, qui est un ligand de BCMA (*B-cell maturation antigens*) exprimé à la surface des cellules de MM. Cette interaction participe à la survie des cellules tumorales (31).

Puis, les cellules de myélome multiple interagissent avec les lymphocytes T présents dans la moelle osseuse par l'expression de PD-L1 (*Programmed-death ligand 1*) (32,33). Cette dernière est le ligand de l'immunorécepteur PD-1 (*Programmed cell death protein 1*), principalement exprimé sur les lymphocytes T cytotoxiques. La liaison de PDL1 avec PD1 a pour conséquence pour le LT une diminution de ses fonctions, de sa prolifération, de sa cytotoxicité, et une augmentation de sa susceptibilité à l'apoptose du LT. Cette interaction est donc immunosuppressive. De plus, cette interaction contribue également à la prolifération des cellules de myélome multiple via l'activation de la voie PI3K/AKT par PDL-1 (34). L'augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules de MM est induite par l'IL-6 et l'IFN- γ (*interferon gamma*) sécrétés dans le microenvironnement (35,36).

Enfin, la matrice extracellulaire dans cette niche osseuse participe également à la croissance et à la survie des cellules de myélome multiple. La composition de la MEC d'un patient atteint de MM est différente de celle d'un patient sain (37). L'expression de CD138 (aussi appelée Syndecan-1), de la famille des protéoglycanes transmembranaires, par les cellules de myélome multiple peut lier le collagène de type I de la MEC et contribue ainsi à la croissance, la migration, l'invasion de ces cellules cancéreuses (38,39).

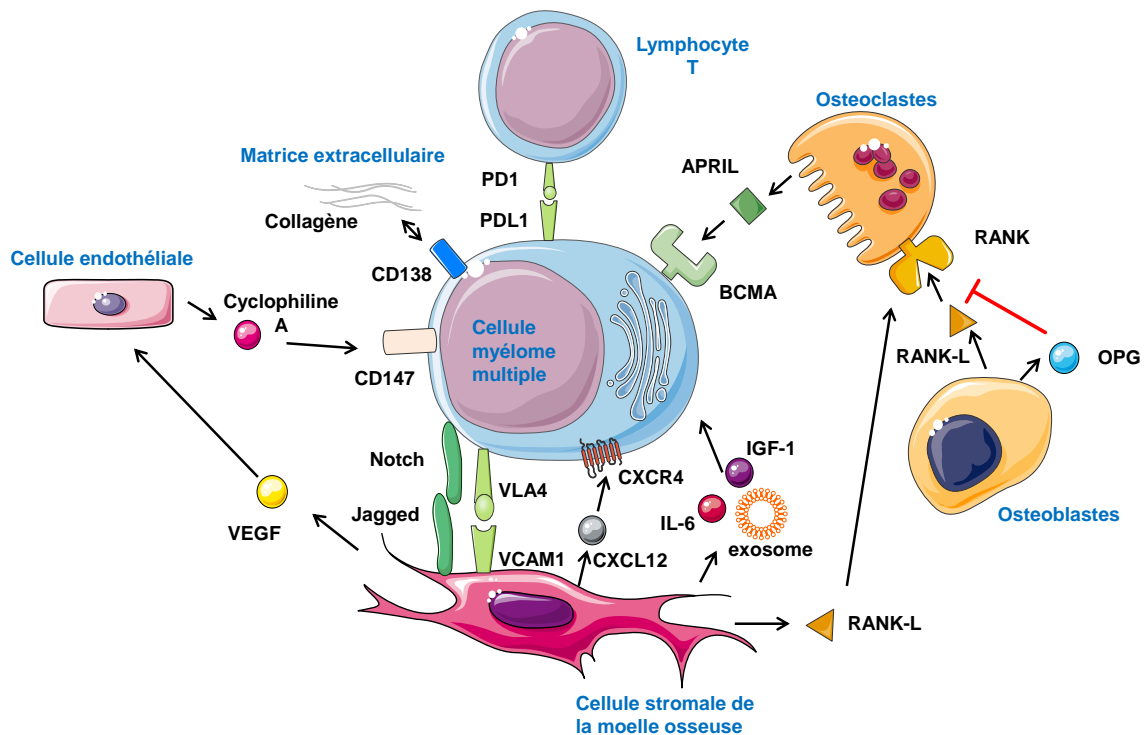


Figure 7 : Le microenvironnement médullaire tumoral des cellules de myélome multiple.

1.2. Les modèles d'études

Les modèles d'études sont des outils critiques pour la compréhension de la pathogénèse mais également pour le développement de nouvelles thérapies. Les modèles utilisés pour l'étude du myélome multiple sont, *in vitro*, les lignées cellulaires immortalisées issues de patients, des cellules de patients ainsi que des modèles plus physiologiques de co-culture (par exemple les co-cultures avec des cellules stromales de la moelle osseuse). L'hétérogénéité de la pathologie entre les différents patients nécessite de multiplier les modèles. Concernant les modèles plus complexes *in vivo*, des modèles animaux murins et de zebrafish existent (40–42).

Les intérêts de ces modèles animaux sont multiples pour la compréhension de la physiopathologie de ce cancer mais également pour l'évaluation d'agents thérapeutiques. En fonction des objectifs de l'expérience, certains modèles animaux seront plus adaptés que d'autres. Par exemple, pour l'étude d'agents thérapeutiques, un modèle animal de myélome multiple de développement rapide serait plus approprié, et la prise en compte de la physiopathologie du cancer du myélome multiple augmenterait la pertinence de ce modèle (immunocompétence, clone plasmocytaire résidant et interagissant avec la moelle osseuse, gammopathie monoclonale, ostéolyse, angiogenèse, symptômes associés ...).

1.2.1. Le modèle murin immunocompétent 5TMM

Parmi les modèles murins, on retrouve le modèle 5TMM où un myélome multiple murin se développe spontanément chez la souris immunocompétente C57BL/KaLwRij. L'inoculation de ces cellules de MM murin spontané, comme les 5T33MM (43,44), 5T2MM

(44), 5TGM1 (45), chez la souris jeune immunocompétente syngénique, reproduit des caractéristiques proches de la pathologie humaine, comme la niche des cellules de MM dans la moelle osseuse, l'hypercalcémie, l'angiogenèse ou encore la résorption osseuse ostéoclastique associée à une gammopathie monoclonale, c'est donc un modèle très pertinent (43,44,46) (**Tableau 3**).

	Modèles murins 5TMM		
	5T2MM	5T33MM	5TGM1
Souris	C57BL/KaLwRij	C57BL/KaLwRij	C57BL/KaLwRij
Espèce de MM étudiée	Souris	Souris	Souris
Immunocompétence	Oui	Oui	Oui
Gammopathie monoclonale	IgG2a (9 semaines)	IgG2b (1 semaine)	IgG2b (4 semaines)
Résidence moelle osseuse	Oui (10 semaines)	Oui (2 semaines)	Oui
Atteintes osseuses	Oui (10 semaines)	Oui (4 semaines)	Oui (4 semaines)
Stade terminal	20 semaines	6 semaines	ND
Référence(s)	(44)	(43,44)	(45)

Tableau 3 : Principales caractéristiques des modèles murins 5TMM décrites dans la littérature. ND : non décrit

1.2.2. Le modèle MOPC315.BM

Un modèle animal de plasmocytome induit par l'injection d'huile minérale (*MOPC for Mineral-Oil induced Plasmacytomas*) a été décrit mais est considéré comme un modèle peu représentatif de MM du fait de sa croissance extra médullaire. Cependant, il existe un variant cellulaire MOPC315.BM qui, lorsqu'elles sont injectées dans la souris BALB/C, conduit à un tropisme dans la moelle osseuse (47). Des clones stables de ces cellules avec une luciférase ou un fluorophore ont été également développés (MOPC315.BM.Luc et MOPC315.BM.Dsred) pour l'étude de ces cellules en imagerie. Ce modèle reproduit de nombreuses caractéristiques du MM humain comme les lésions osseuses ou le tropisme au niveau de la moelle osseuse (**Tableau 4**).

	MOPC315.BM
Souris	BALB/c
Espèce de MM étudiée	Souris
Immunocompétence	Oui
Gammopathie monoclonale	IgA
Résidence moelle osseuse	Oui (5 jours)
Ostéolyse	Oui (5 à 8 semaines)
Référence(s)	(47)

Tableau 4 : Caractéristiques du modèle murin de myélome multiple MOPC315.BM

1.2.3. Les modèles murins transgéniques

De nombreux gènes sont impliqués dans la pathogénèse du MM, et des animaux transgéniques ont été développés pour modéliser l'impact d'altérations génétiques sur la pathogénèse de ce cancer (**Tableau 5**).

On retrouve par exemple le modèle animal Eμ-XBP1s, où XBP1s est surexprimée sous le contrôle du promoteur VH de l'immunoglobuline et de la région régulatrice Eμ. XBP1s est impliqué dans la voie UPR ainsi que dans la différenciation des plasmocytes. Ce modèle transgénique mime un phénotype de MGUS-MM après de nombreux mois, avec une faible pénétrance appuyant le fait que d'autres altérations génétiques sont nécessaires pour le développement de ce cancer (16).

D'autres modèles utilisent l'implication de l'oncogène c-Myc et de l'IL-6 dans la pathogénèse du MM. Par exemple le modèle C.IL-6/iMyc, où l'IL-6 est surexprimée sous le contrôle du promoteur du complexe d'histocompatibilité H2-L^d, et l'oncogène c-Myc sous le contrôle du promoteur de l'immunoglobuline Eμ. La totalité des souris de ce modèle développent un MM en 3 à 6 mois (48). Un autre modèle utilisant l'implication de l'oncogène c-Myc est le modèle Vk*MYC où l'activation de MYC, sous le contrôle d'éléments régulateurs du gène de la chaîne légère κ, se produit sporadiquement par l'exploitation du processus physiologique d'hypermutation somatique dans les cellules B du centre germinal (processus à l'origine de la diversification des immunoglobulines). La pathologie développée par ces souris présente des caractéristiques humaines du MM, comme la présence d'une gammopathie monoclonale, une anémie, des dépôts d'Ig au niveau du rein ou encore des atteintes osseuses. Comme le modèle 5TMM, ces cellules de MM peuvent être transplantées dans des souris syngéniques jeunes qui développent ainsi un MM en 4 semaines (49,50).

Un autre modèle de souris transgénique exploite la translocation et/ou la surexpression de l'oncogène c-MAF observée chez des patients atteints de MM. Le modèle Eμ-MAF permet l'expression de l'oncogène c-MAF dans les lymphocytes B, et, tout comme le modèle Eμ-XBP1s, il présente une longue latence et une faible pénétrance. Cependant, les souris qui développent un MM présentent des caractéristiques proches de celles de l'homme comme une hyperglobulinémie ou encore des atteintes rénales (51).

	Modèles de souris transgéniques			
	Eμ-XBP1s	Eμ-MAF	Vk*MYC	C.IL-6/iMyc
Souris	C57BL/6	C57BL/6J	C57BL/6	BALB /c (C)
Espèce de MM étudiée	Souris	Souris	Souris	Souris
Immunocompétence	Oui	Oui	Oui	Oui
Gammopathie monoclonale	IgG ou IgM (40 semaines)	IgG ou IgM (20-50 semaines)	IgG (20 semaines)	IgG
Présence dans la moelle osseuse	Oui	Oui	Oui	Oui
Atteintes osseuses	Oui	Non	Oui	ND
Temps pour le développement du MM	Entre 14 et 24 mois	50 semaines	20 semaines	3-6 mois
Référence(s)	(16)	(51)	(49,50)	(48)

Tableau 5 : Principales caractéristiques de modèles de MM de souris transgéniques décrites dans la littérature. ND : non décrit

1.2.4. Les modèles murins de xéno greffes

On retrouve également des modèles de xéno greffes de cellules de MM, comme des lignées cellulaires humaines ou des cellules primaires, chez la souris immunodéficiente (**Tableau 6**). Les cellules peuvent être injectées par voie IV pour établir une pathologie

systémique, ou par voie sous-cutanée ou intra-tibiale pour établir une pathologie locale. Ces modèles peuvent permettre l'évaluation du « *homing* » des cellules de MM au niveau de la moelle osseuse. Cependant, la plupart des lignées cellulaires humaines de MM ont perdu leurs dépendances au microenvironnement de la moelle osseuse, à l'inverse des cellules primaires. De plus, certaines xénogreffes présentent le désavantage de développer des tumeurs extra médullaires très agressives, non représentatives de la plupart des MM humains.

Ainsi, il existe différents modèles de xénogreffes de lignées cellulaires de MM chez la souris SCID irradiée. L'injection intraveineuse de la plupart de ces lignées crée des développements tumoraux extra-médullaires, ce qui en fait une limitation. Les xénogreffes de cellules JN3, OPM2, U266, KPMM2 sont cependant localisées au niveau de la moelle osseuse avec des lésions osseuses. La xénogreffe de cellules JN3 résulte en un myélome plus agressif que des cellules OPM2 ou U266 (morbidity en 3 semaines contre 8 semaines) (52). La lignée cellulaire KPMM2 présente une croissance dépendante de l'IL-6 (53).

Aussi, des modèles d'implantation de tissus fœtaux osseux humains (SCID-hu) (54) ou de lapins (SCID-Rab) (55) chez la souris SCID ont été développés, notamment pour la reproduction d'un microenvironnement médullaire tumoral différent de la souris. Ensuite, des cellules primaires ou des lignées cellulaires de MM sont injectées en IV chez ces souris. Dans ces modèles, les cellules de myélome multiple humaines se développent au niveau du tissu osseux greffé, et présentent des caractéristiques similaires à la pathologie humaine. Le modèle SCID-hu est limité par la disponibilité du tissu osseux fœtal, un modèle SCID-synth-hu a alors été développé. Ce dernier utilise un pseudo-os 3D en polymère recouvert de cellules humaines stromales de la moelle osseuse (56).

	Modèles animaux de xénogreffe				
	SCID-hu	SCID-Rab	SCID-synth-hu	JN3, U266, OPM2	KPMM2
Souris	CB.17/ICr-SCID	CB.17/ICr-SCID	CB.17/ICr-SCID	NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG)	CB.17 scid/scid
Espèce de MM étudiée	humaine	humaine	humaine	humaine	humaine
Immunocompétence	Non	Non	Non	Non	Non
Gammopathie monoclonale	Oui	Oui	Oui	ND	Oui (10 jours)
Présence dans la moelle osseuse	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Atteintes osseuses	Oui	Oui	ND	Oui	Oui
Stade terminal	Variable en fonction des cellules de MM injectées	Variable en fonction des cellules de MM injectées	Variable en fonction des cellules de MM injectées	3 à 8 semaines	40 jours
Référence(s)	(54)	(55)	(56)	(52)	(53)

Tableau 6 : Principales caractéristiques de modèles de xénogreffe de myélome multiple. ND : non décrit

1.2.5. Modèles de xénogreffes chez le poisson-zèbre (Zebrafish)

Des modèles de xénogreffes chez le poisson-zèbre ont été développés comme alternatives aux modèles murins de xénogreffes. Ils ont l'avantage d'être

expérimentalement plus rapides, ce qui est un point important pour l'évaluation de molécules thérapeutiques à un plus haut débit (57,58). Cette rapidité est obtenue au détriment de la proximité génétique de l'espèce hôte et de la ressemblance physiopathologique.

Un des modèles consiste en l'injection dans l'espace périvitellin de cellules de myélome (primaires ou lignées) dans des embryons de 48h transparents de Casper Zebrafish immunodéficients. La transparence de ces embryons permet de suivre en imagerie la croissance tumorale par le marquage préalable des cellules de MM injectées. La croissance tumorale est ainsi suivie pendant 24 à 72h après l'ajout du traitement dans le milieu. Cependant, ce modèle ne reproduit pas les caractéristiques de la pathologie humaine comme les atteintes osseuses ou encore la niche au niveau de la moelle osseuse, même si l'espace périvitellin pourrait servir de support (57).

Un autre modèle de xénogreffe chez ce poisson consiste en l'injection intracardiaque de cellules de MM, puis au suivi de leurs migrations dans le tissu hématopoïétique caudal, qui simule alors l'environnement de la moelle osseuse chez l'homme (58).

1.3. Les thérapies existantes

Sans pouvoir guérir les patients, les traitements actuels permettent d'améliorer la qualité de vie de ces patients, par l'atténuation ou la disparition de signes de la maladie, par la limitation de la progression de la maladie, et/ou le traitement ou la prévention des complications de ce cancer. Le schéma thérapeutique (associations de traitements, doses, rythme d'administration) est fonction des caractéristiques du MM, de l'âge du patient et de son état général. Les modalités de prise en charge sont établies lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (59).

1.3.1. Les traitements symptomatiques

Ces traitements visent à atténuer les conséquences de la croissance du clone les plus péjoratives pour la qualité de vie du patient et le pronostic vital. Parmi les traitements symptomatiques du MM, on retrouve les médicaments pour la correction de l'anémie symptomatique, la correction de l'hypercalcémie (corticothérapie), la prévention des complications osseuses (bisphosphonates), la prise en charge de la douleur (antalgiques) et la prévention du risque infectieux (antibiothérapie de prophylaxie).

Les bisphosphonates (acides clodronique, pamidronique et zolédronique) sont des molécules qui inhibent la résorption osseuse ostéoclastique avec un effet antalgique. Leur structure de type pyrophosphate chélate le calcium et leur confère une forte affinité pour la surface de l'os. La principale cible moléculaire des bisphosphonates contenant un azote est l'enzyme farnésyl diphosphate synthase présente dans les ostéoclastes. Cette enzyme est impliquée dans l'isoprénylation de petites GTPases qui stimulent l'activité des ostéoclastes (60). Les bisphosphonates classiques (clodronate) sont métabolisés dans les ostéoclastes comme des analogues de l'ATP, toxiques pour la cellule (61). Certains bisphosphonates

auraient également des propriétés anti tumorales (62,63). L'utilisation de ces molécules peut engendrer comme effets indésirables un état pseudo-grippal (pour les bisphosphonates par voie IV), des troubles digestifs, ainsi qu'une ostéonécrose des maxillaires.

Aussi, des corticoïdes comme la prednisone et la dexaméthasone sont également utilisés dans le MM pour leurs activités anti-inflammatoire et immunosuppressive (64). En effet, les glucocorticoïdes, lorsqu'ils se lient à leurs récepteurs dans le cytosol, permettent leurs translocations dans le noyau et modulent ainsi l'expression de gènes. Ils inhibent ainsi la production d'IL-6 et la traduction protéique par l'inhibition de la voie mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) et la phosphorylation d'eIF2 α (*Eukaryotic translation initiation factor 2A*). Ils répriment également les facteurs de transcription NF- κ B (*Nuclear factor NF-kappa-B*) et AP-1 (protéine activatrice 1) impliqués dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires. Les principaux effets indésirables de cette classe thérapeutique sont des désordres hydroélectrolytiques, des troubles endocriniens, métaboliques, musculo-squelettiques, neuropsychiques et oculaires.

1.3.2. Les chimiothérapies dites « classiques »

Des chimiothérapies dites « classiques » sont indiquées pour le traitement du myélome multiple. Il s'agit de traitements cytotoxiques qui ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses, même si ces thérapies touchent majoritairement les cellules à division rapide comme les cellules cancéreuses.

On retrouve ainsi des agents alkylants dérivés des moutardes à l'azote (melphalan, cyclophosphamide, bendamustine) et des nitroso-urées (carmustine, lomustine) prescrits pour le traitement du myélome multiple. Ces médicaments font des liaisons covalentes par alkylation de l'ADN, inhibant ainsi la transcription et la réplication cellulaire. Les principaux effets indésirables sont hématologiques, digestifs et allergiques.

Des inhibiteurs de la topo-isomérase II sont aussi utilisés pour le traitement du myélome multiple. Ces agents, comme la doxorubicine, provoquent des cassures doubles brins de l'ADN inhibant ainsi sa réplication et induisant la mort cellulaire.

1.3.3. Les thérapies dites « ciblées »

Les médicaments dits de thérapies « ciblées », anticorps monoclonaux ou petites molécules chimiques, ciblent des anomalies moléculaires ou des mécanismes particuliers. Ces thérapies répondent ainsi à des caractéristiques tumorales permettant d'augmenter la réponse thérapeutique.

1.3.3.1. Les inhibiteurs du protéasome

Des inhibiteurs du protéasome comme le bortezomib, le carfilzomib et l'ixazomib possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le MM. Cette classe thérapeutique est l'une des classes les plus importantes qui a émergée pour le traitement de ce cancer. Elle exploite notamment le fait que les cellules de MM synthétisent beaucoup de

protéines (immunoglobulines). Ainsi, l'inhibition du protéasome, principale voie de dégradation des protéines dans la cellule, résulte en une accumulation de protéines mal-conformées causant un stress réticulaire et l'activation de la voie UPR responsable de la mort cellulaire. L'inhibition de la dégradation de protéines impliquées dans différents processus cellulaires, est également impliquée dans le mécanisme d'action de ces molécules (65,66) (cf. **partie 2.2 de l'introduction**).

Le bortezomib seul induit majoritairement de la fatigue, des troubles digestifs, de l'anorexie, ainsi qu'une majoration du risque de neuropathie périphérique en association avec dexaméthasone/thalidomide. L'ixazomib quant à lui présente des effets indésirables digestifs, hématologiques (thrombopénie), des neuropathies périphériques ainsi que des troubles cutanés. Le carfilzomib présente comme effets indésirables des troubles cardiaques (insuffisance cardiaque, ischémie), hématologiques (thrombopénie, anémie, neutropénie), respiratoires (pneumonie), hépatiques et hydroélectrolytiques (hypokaliémie).

1.3.3.2. Les immunomodulateurs

Les immunomodulateurs (Imid) comme le thalidomide, lenalidomide ou pomalidomide sont indiqués dans le MM pour leurs propriétés immunomodulatrices (co-stimulation des cellules T, activation des cellules NK et NKT), anti-angiogéniques, anti-inflammatoires (ex : inhibition de la production de TNF α , *Tumor necrosis factor*) et antiprolifératives (induction de CDKI, *Cyclin-dependent kinase inhibitor*) par divers mécanismes (67). Ces molécules lient le cereblon sur un complexe E3 ubiquitine ligase CRL4 (*cullin 4-RING ubiquitin ligase*) et induit le recrutement de substrats Ikaros (IKZF1) et Aiolos (IKZF3), deux facteurs de transcription, pour permettre leurs ubiquitinations et leurs dégradations par le protéasome. La diminution de l'expression d'IKZF1 et IKZF3 a pour conséquence une diminution de l'expression d'IRF4 et de c-Myc (68,69). Cependant, la combinaison entre ces agents et les inhibiteurs de protéasome montre un effet synergique et non antagoniste comme on aurait pu l'imaginer en fonction de leurs mécanismes d'action. En effet, lors de l'association du lenalidomide et du bortezomib, la dégradation d'Ikaros est assurée par calpaïne, activée par un flux de calcium induit par les deux molécules (70).

Les principaux effets indésirables de cette classe de médicaments sont la tératogénicité, des complications thromboemboliques, de la fatigue et des neuropathies périphériques. Le pomalidomide et le lenalidomide présente en plus des troubles hématologiques (neutropénie, thrombopénie). Ces effets indésirables limitent sévèrement la dose utilisable et sont responsables d'un index thérapeutique étroit.

1.3.3.3. Les inhibiteurs HDAC

Le panobinostat est un pan-inhibiteur d'histones déacétylases (HDAC), indiqué en association avec le bortezomib et la dexaméthasone pour le traitement des patients atteints de MM en rechute et/ou réfractaire ayant déjà reçu au moins deux lignes de traitement antérieur, incluant du bortezomib et un agent immunomodulateur. L'inhibition d'HDAC par

le panobinostat a pour conséquences des modifications épigénétiques et l'inhibition de la voie des agrésomes, une voie de survie aux inhibiteurs du protéasome, par l'inhibition d'HDAC6, conduisant à la mort des cellules de MM (71). Les principaux effets indésirables de cette molécule sont des troubles digestifs, cardiaques, respiratoires et hématologiques.

1.3.3.4. Les anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux ont été développés pour le traitement du myélome multiple, ils utilisent des spécifications moléculaires de la tumeur pour en bloquer leur développement et leur dissémination.

Anti-CD38 :

Parmi les anticorps monoclonaux utilisés dans le MM on retrouve le daratumumab et l'isatuximab, qui sont des anticorps de type IgG1 dirigés contre la protéine de surface CD38 exprimée en grande quantité sur les cellules de myélome multiple. CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de type 2, une ectoenzyme qui catalyse la synthèse et l'hydrolyse de l'ADP-ribose cyclique et régule le stockage du calcium intracellulaire. Cette enzyme est également impliquée dans la production d'adénosine immunosuppressive et intervient dans l'interaction avec les cellules stromales de la moelle osseuse (72,73).

Ces anticorps sont responsables d'une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps par le fragment Fc (ADCC), d'une cytotoxicité dépendante du complément, et d'une phagocytose cellulaire dépendante des anticorps induisant la mort des cellules de myélome multiple. Ces anticorps présentent aussi des effets immunomodulateurs notamment par la diminution du nombre de cellules Treg qui expriment également CD38. Les principaux effets indésirables de cette classe thérapeutique sont des troubles pulmonaires, hématologiques (neutropénie), digestifs et des réactions à la perfusion.

Anti-SLAMF7 :

Elotuzumab est un anticorps humanisé de type IgG1 dirigé contre la glycoprotéine de surface SLAMF7 (*Signaling lymphocytic activation molecule family member 7*) approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) en association avec lenalidomide/dexaméthasone. Cet antigène est hautement exprimé sur les cellules de MM ainsi que sur les plasmocytes sains, les cellules NK et certains LT CD8+. Cet anticorps est responsable d'une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps par les cellules NK (74).

1.3.3.5. Selinexor

En 2019, la FDA a approuvé le selinexor pour le traitement du myélome multiple. Il s'agit d'un inhibiteur sélectif de la protéine XPO1 (*Exportin-1*) impliquée dans l'export nucléaire de diverses protéines, comme les suppresseurs de tumeurs ou encore le récepteur aux glucocorticoïdes, et qui est surexprimée dans les cellules de MM. De plus, la protéine XPO1 se complexe avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E permettant le transport d'ARNm d'oncoprotéines du noyau au cytosol. Le selinexor provoque ainsi un arrêt du cycle

cellulaire et la mort des cellules de myélome multiple. Les principaux effets indésirables de ce traitement sont des troubles hématologiques, digestifs et pulmonaires (75,76).

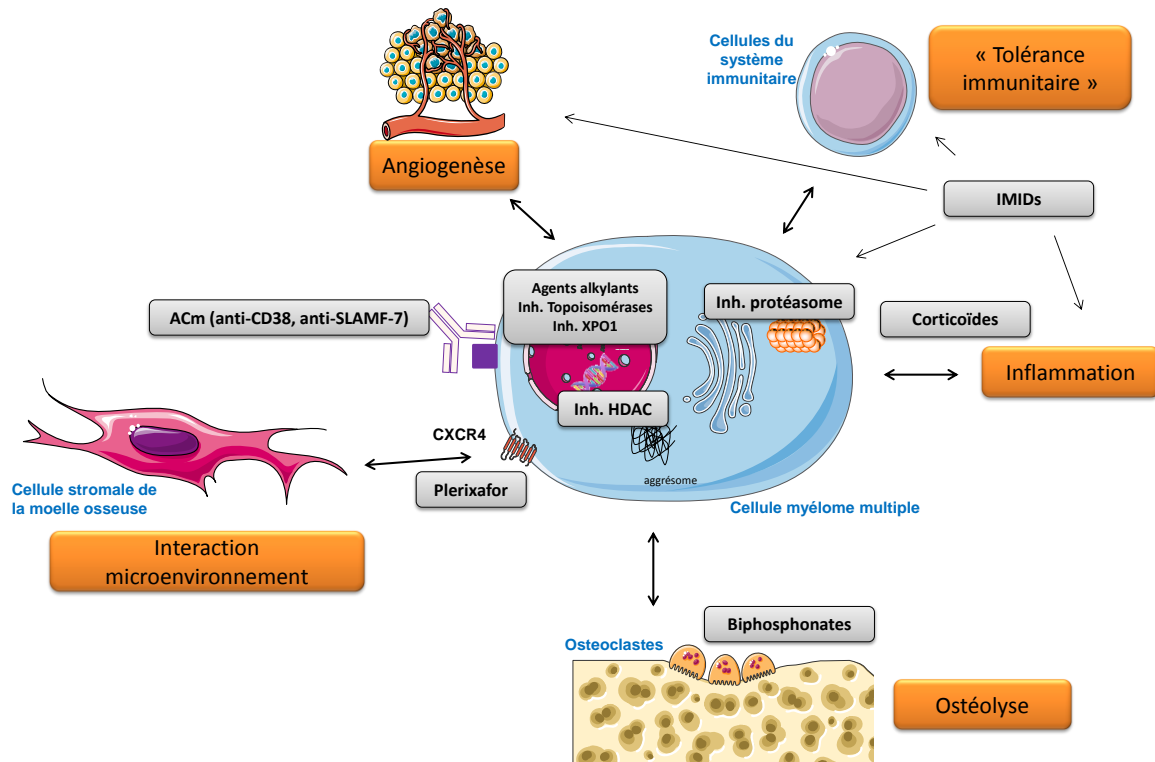


Figure 8 : Schéma non exhaustif des thérapies disponibles (encadrés gris) pour la prise en charge du myélome multiple : des traitements symptomatiques (par exemple les biphosphonates pour la prévention des complications osseuses ou la corticothérapie pour ses effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs), des chimiothérapies classiques qui sont des traitements cytotoxiques, non spécifiques des cellules cancéreuses (par exemple les agents alkylants et les inhibiteurs de topoisomérases II) et des thérapies dites « ciblées » qui ciblent des anomalies moléculaires ou des mécanismes particuliers tumoraux (par exemple les inhibiteurs du protéasome, les immunomodulateurs (IMiDs), les inhibiteurs d’histones déacétylases (HDAC), des anticorps monoclonaux anti-CD38 et anti-SLAMF7, deux protéines de surfaces des cellules de myélome multiple, les inhibiteurs de l’exportine-1 (XPO1) comme le Selinexor, ou encore l’autogreffe de cellules hématopoïétiques pour certains patients (par exemple le Plerixafor est utilisé avec le facteur de croissance G-CSF pour la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques).

1.3.4. L’autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L’autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est une solution thérapeutique envisagée généralement chez les patients de moins de 65 ans et présentant au moins un signe clinique ou biologique (critères CRAB). L’autogreffe de cellules souches hématopoïétiques comprend différentes phases (77) :

- Une phase d’induction qui consiste à réduire la quantité de plasmocytes tumoraux par l’association de thérapies (par exemple le bortezomib, un corticoïde, le thalidomide et/ou un agent alkylant). Cette phase peut durer 2 à 4 mois.
- Une phase de prélèvement de cellules souches hématopoïétiques par cytophérèse (une technique de prélèvement et de tri des cellules du sang à l’aide d’un séparateur de cellules), à la suite d’une chimiothérapie de mobilisation permettant la libération des cellules souches de la moelle osseuse dans le sang. Celle-ci se compose d’injections de facteur de croissance des globules blancs le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), seul ou association avec le cyclophosphamide ou le plérixafor (un antagoniste réversible et sélectif du récepteur de chimiokine CXCR4

impliqué dans la liaison avec CXCL12 exprimé par les cellules stromales de la moelle osseuse) (78).

- Une phase de chimiothérapie dite « intensive » où de fortes doses en chimiothérapie sont utilisées afin de détruire toutes les cellules tumorales.
- L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est ensuite réalisée afin de limiter la durée de l'aplasie.

1.4. Les thérapies en développement

Malgré les avancées thérapeutiques pour le traitement du MM, les rechutes sont fréquentes, les résistances aux traitements se développent, les effets indésirables sont nombreux, et le MM reste, à ce jour, une maladie incurable. Il est ainsi primordial d'approfondir la recherche pour comprendre les mécanismes tumoraux mis en jeu afin de développer de nouvelles thérapies anticancéreuses. Ainsi, de nombreuses molécules sont actuellement en développement dans des classes thérapeutiques existantes pour améliorer celles-ci, mais aussi avec de nouveaux mécanismes d'action pour la création de nouvelles classes thérapeutiques.

1.4.1. Les nouveaux inhibiteurs de protéasome

Les inhibiteurs du protéasome (IPs), qui constituent l'une des classes thérapeutiques les plus importantes pour le traitement du myélome multiple, ont émergé ces dernières années avec trois produits approuvés (bortezomib, carfilzomib, ixazomib), et ont contribué à l'augmentation de la survie des patients. La réussite de cette classe est due à la grande sensibilité des cellules de MM à l'inhibition du protéasome, par la sécrétion importante d'immunoglobulines mais également par l'implication de cette machinerie dans de multiples processus cellulaires essentiels (**cf. partie 2.2 de l'introduction**) (65).

Trois nouveaux inhibiteurs du protéasome sont actuellement en essais cliniques : le marizomib, l'oprozomib et le delanzomib. Différents points de comparaison peuvent être réalisés sur la structure chimique, sur le mode d'administration, mais aussi sur l'activité inhibitrice des différentes activités catalytiques du protéasome (**Tableau 7**).

Concernant les structures et leurs modes d'inhibition, le bortezomib, le delanzomib et l'ixazomib possèdent des acides boroniques dans leurs structures et sont des inhibiteurs réversibles du protéasome. Le carfilzomib et l'oprozomib ont quant à eux une époxycétone et sont des inhibiteurs irréversibles du protéasome. Le marizomib est un inhibiteur irréversible du protéasome ayant dans sa structure une β -lactone. De plus, le bortezomib et l'ixazomib sont des inhibiteurs de l'activité chymotrypsine ($\beta 5$) et caspase ($\beta 1$) du protéasome. Le carfilzomib, le delanzomib et l'oprozomib sont des inhibiteurs de l'activité chymotrypsine ($\beta 5$) du protéasome. Le marizomib est un inhibiteur de l'activité chymotrypsine ($\beta 5$) et trypsin ($\beta 2$) du protéasome principalement.

Concernant, leurs voies d'administration, le bortezomib est administré par voie sous-cutanée ou par voie intraveineuse (IV), le carfilzomib, le delanzomib et le marizomib sont administrés par voie IV et l'oprozomib et l'ixazomib par voie orale.

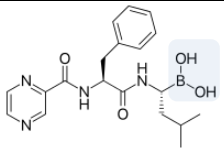
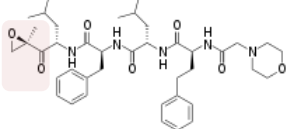
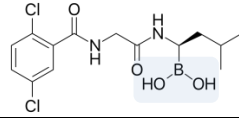
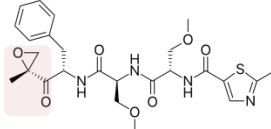
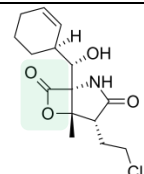
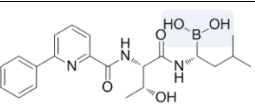
Nom	Structure	Voie d'administration	Sous unités inhibées	IC50 (nM) $\beta 5$ – $\beta 2$ – $\beta 1$	Référence(s)
Bortezomib		IV ou SC	$\beta 5$, $\beta 1$	2.4/7.9 – 590/4200 – 24/74	(79–81)
Carfilzomib		IV	$\beta 5$	6 – 3600 - 2400	(79,82)
Ixazomib		PO	$\beta 5$, $\beta 1$	3.4 – 3500 - 31	(80,83,84)
Oprozomib		PO	$\beta 5$	55 – ND - ND	(85–87)
Marizomib		IV	$\beta 5$, $\beta 2$, $\beta 1$	3.5 – 28 - 430	(81,88,89)
Delanzomib		IV	$\beta 5$, $\beta 1$	10/25 – ND - 40/75	(90–92)

Tableau 7 : Principales caractéristiques des molécules inhibitrices du protéasome. ND : non déterminé. $\beta 5$: activité chymotrypsine, $\beta 2$: activité trypsine, $\beta 1$: activité caspase.

Le développement du delanzomib en monothérapie dans le myélome multiple a pour le moment été arrêté en phase I/II par manque d'efficacité chez des patients en rechute et/ou réfractaires (92). Une autre étude de phase I/II cette fois-ci en combinaison avec lenalidomide et la dexaméthasone est en cours d'évaluation (NCT01348919).

1.4.2. Les nouveaux inhibiteurs d'HDAC

La classe des inhibiteurs d'HDAC constitue une classe thérapeutique intéressante notamment par l'association avec des inhibiteurs de protéasome vis-à-vis de la formation des agrésomes (**cf. partie 2.1 des résultats**). De nouvelles molécules sont actuellement en développement clinique pour le traitement du myélome multiple, le ricolinostat, le vorinostat, ACY-241 et la romidepsine. Ces composés présentent des profils différents de sélectivité vis-à-vis des différentes HDAC (**Tableau 8**). Globalement, la classe I des HDAC intervient dans la régulation transcriptionnelle, la classe II dans des fonctions spécifiques aux tissus ainsi que dans les agrésomes, la classe III sont des lysines deacétylases dépendantes du cofacteur NAD⁺ et la classe IV intervient dans l'expression de l'IL-10. Les classes I, II et IV contiennent un Zn²⁺ dans leurs sites catalytiques (93). On remarque que l'inhibition et la sélectivité vis-à-vis d'HDAC6, impliquée dans la formation des agrésomes, a été un critère pour le développement d'ACY-241.

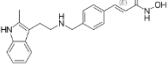
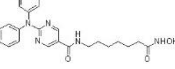
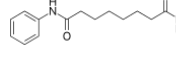
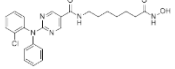
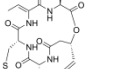
		Panobinostat	Ricolinostat	Vorinostat	ACY-241	Romidepsin
Structure						
Voie d'administration		PO	PO	PO	PO	IV
Classe I -log(IC ₅₀)	HDAC1	8.60	7.24	7.22	7.46	8.8
	HDAC2	7.88	7.32	6.60	7.35	8.41
	HDAC3	8.68	7.29	7.73	7.34	NR
	HDAC8	6.56	7.00	6.08	6.86	NR
Classe II -log(IC ₅₀)	HDAC4	6.69	5.15	>5.00	>4.70	7.60
	HDAC5	8.11	5.30	>5.00	>4.70	NR
	HDAC6	7.98	8.33	8.03	8.59	6.10
	HDAC7	6.27	5.85	>5.00	5.14	NR
	HDAC9	8.24	>5	>5.00	>4.70	NR
Classe IV -log(IC ₅₀)	HDAC10	8.64	NR	7.54	NR	NR
	HDAC11	8.57	>5	NR	NR	NR
Référence		(94)	(95)	(96)	(97)	(98)

Tableau 8 : Principales caractéristiques des molécules inhibitrices d'histones déacétylases (HDAC). NR : non référencé

1.4.3. De nouveaux mécanismes d'action (nouvelles entités chimiques ou extension d'indication de molécules approuvées dans d'autres indications en oncologie).

Des molécules présentant un nouveau mécanisme d'action pour le traitement du myélome multiple ont été développées. Voici une liste non exhaustive de molécules évaluées en clinique pour le traitement de ce cancer.

Filanesib

Filanesib est un inhibiteur de KSP (*Kinesin spindle protein*), une protéine impliquée dans la séparation des centrosomes et la mise en place du fuseau mitotique. Il touche donc principalement les cellules à haut taux de division cellulaire et est donc intéressant pour la cancérologie. Ce composé est actuellement étudié en clinique dans le MM en association (99).

Venetoclax

Le vénétoclax est un inhibiteur de la protéine anti-apoptotique BCL-2 approuvé pour le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC). Il présente ainsi une activité cytotoxique sur les cellules tumorales surexprimant BCL-2, ce qui est le cas des cellules de myélome multiple avec la translocation t(11 ;14). Ainsi, il est actuellement évalué en clinique pour le traitement du MM (100).

Dinaciclib

Le dinaciclib est un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (CDK1, CDK2, CDK5 et CDK9) impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Les cellules de MM peuvent présenter des altérations génétiques en particulier sur des cyclines. L'utilisation de ce produit en clinique pour le traitement du myélome multiple est actuellement évaluée (101).

Trametinib

Le tramétinib est un inhibiteur de kinase MEK (*MAPK/ERK kinase*), impliquée dans la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Il inhibe ainsi la prolifération de cellules ayant une mutation BRAF, KRAS, NRAS, comme cela peut être le cas dans le MM (environ 50%). Cette molécule est approuvée dans la prise en charge de mélanomes et de cancers bronchiques non à petites cellules, porteurs d'une mutation BRAF V600, et est évaluée pour le traitement du MM (102).

Afuresertib

Cette molécule est un inhibiteur réversible d'AKT, kinase hautement exprimée chez les patients atteints de MM. Cette molécule est actuellement évaluée en clinique pour le traitement du myélome multiple (103).

1.4.4. Anticorps monoclonaux

1.4.4.1. Antigènes des cellules de MM

De nombreux anticorps ont été développés pour cibler des antigènes présents à la surface des cellules de myélome multiple. Pour certains de ces anticorps, un couplage avec des agents cytotoxiques a été réalisé. Voici une liste non exhaustive des anticorps monoclonaux en développement pour le traitement du myélome multiple.

Anti-CD138 :

Indatuximab ravtansine est un anticorps monoclonal ciblant le CD138 (syndecan-1) couplé à un agent cytotoxique. CD138 est une protéine membranaire servant de récepteur pour la matrice extracellulaire, et qui est exprimée sur les plasmocytes différenciés, et donc sur les cellules de MM. Cette protéine intervient ainsi dans l'adhésion cellulaire et comme corécepteur de facteurs de croissance. Cet anticorps est actuellement évalué en clinique dans le MM (104,105).

Anti-CD56 :

Lorvotuzumab mertansine est un anticorps monoclonal ciblant l'antigène CD56 et couplé à un agent cytotoxique. CD56 ou N-CAM (*Neural cell adhesion molecule*) est exprimée sur certaines tumeurs comme les cellules de myélome multiple (environ 78% des patients atteints de MM). Cet antigène n'est ainsi pas exprimé sur les plasmocytes sains. Cet anticorps est ainsi évalué pour le traitement du myélome multiple positif CD56 (101,102).

Anti-BCMA :

BCMA est une protéine membranaire principalement présente sur les plasmocytes et hautement exprimée sur les cellules de MM. La cascade signalétique entre BCMA et son ligand APRIL permet la survie des cellules de MM. Ainsi de nombreuses stratégies se développent pour le traitement du myélome multiple en ciblant cette voie, par des anticorps

monoclonaux mais aussi par des cellules CAR-T (108). Parmi les anticorps développés, nous pouvons citer le belantamab mafodotin, qui est un anticorps anti-BCMA conjugué à un agent cytotoxique, et actuellement en ATU (autorisation temporaire d'utilisation) en France pour le traitement du myélome multiple (109).

1.4.4.2. Des voies de signalisation impliquées dans la croissance et la survie des cellules de MM

Anti-IL-6 :

L'IL-6 est reconnu comme un facteur de prolifération des cellules de MM et constitue une cible intéressante pour son traitement. Siltuximab est un anticorps monoclonal liant les formes bioactives solubles de l'IL-6 humaine, empêchant ainsi sa liaison avec son récepteur IL6-R. Cet anticorps est actuellement approuvé pour la prise en charge de maladies lymphoprolifératives de Castleman en France et est évalué pour le traitement du MM (110).

Voie PD-1/PD-L1 :

La voie PD-1/PD-L1 semble être une cible attractive pour le développement de nouveaux traitements pour le MM. En effet, cette voie est impliquée dans la « tolérance » des cellules de myélome multiple par les lymphocytes T. Différents anticorps ciblant cette voie ont été développés comme le pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, atezolizumab, mais cependant leur développement dans cette pathologie n'a pas montré d'efficacité en monothérapie. Des essais cliniques essaient de déterminer les combinaisons possibles et les stades de la maladie où ces traitements seraient les plus appropriés (32,33,111).

1.4.5. La thérapie cellulaire CAR-T

De nombreuses études cliniques, principalement aux Etats-Unis et en Chine, évaluent la balance bénéfique/risque de la thérapie cellulaire CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor-T cell therapy*) (112,113). Cette thérapie consiste en la modification génétique en laboratoire de lymphocytes T du patient, afin qu'ils expriment un récepteur chimérique contre un antigène de la cellule cancéreuse (par exemple BCMA, CD38, SLAMF-7 pour le traitement du myélome multiple), et en la réintroduction de ces cellules modifiées chez le patient.

2. Les inhibiteurs du protéasome

Les inhibiteurs du protéasome constituent l'une des classes thérapeutiques incontournables pour le traitement du myélome multiple avec trois molécules approuvées. Le succès de cette classe dans ce type de cancer est dû au fait que le clone plasmocytaire est une cellule qui produit de grandes quantités d'immunoglobulines. Cette cellule est ainsi considérée comme fortement dépendante des voies cellulaires de sécrétion et de dégradation des protéines. Ainsi, la perturbation de la voie de dégradation des protéines par le protéasome est une stratégie anticancéreuse intéressante.

2.1. Le système ubiquitine-protéasome

2.1.1. Généralités

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) constitue avec l'autophagie les deux voies majeures de dégradation des protéines dans la cellule. L'UPS permet la dégradation de protéines endommagées ou mal-conformées dans le cytosol et le noyau, et intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires, notamment par la dégradation de protéines impliquées dans le cycle cellulaire, la survie, l'apoptose, le métabolisme, ou encore le contrôle qualité protéique (114,115). Ce système est également essentiel pour l'homéostasie des acides aminés (116). Le processus de dégradation des protéines par l'UPS est complexe et hautement régulé. On peut ainsi établir différentes étapes lors du processus de dégradation des protéines par le protéasome : 1/ le marquage et l'adressage des protéines à dégrader ; 2/ l'hydrolyse de ces protéines par les différentes activités catalytiques du protéasome ; et 3/ la prise en charge des peptides produits par cette dégradation (**Figure 9**). La cellule contrôle l'activité de ce système par l'ajustement de l'abondance du protéasome, par la régulation de la transcription des constituants du protéasome et de protéines modulatrices, par le contrôle de son assemblage ainsi que par des modifications post-traductionnelles des constituants du protéasome (114,115). En particulier, les facteurs de transcription NRF1 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 1*) et NRF2 ainsi que le complexe mTORC1 sont impliqués dans ce contrôle (117).

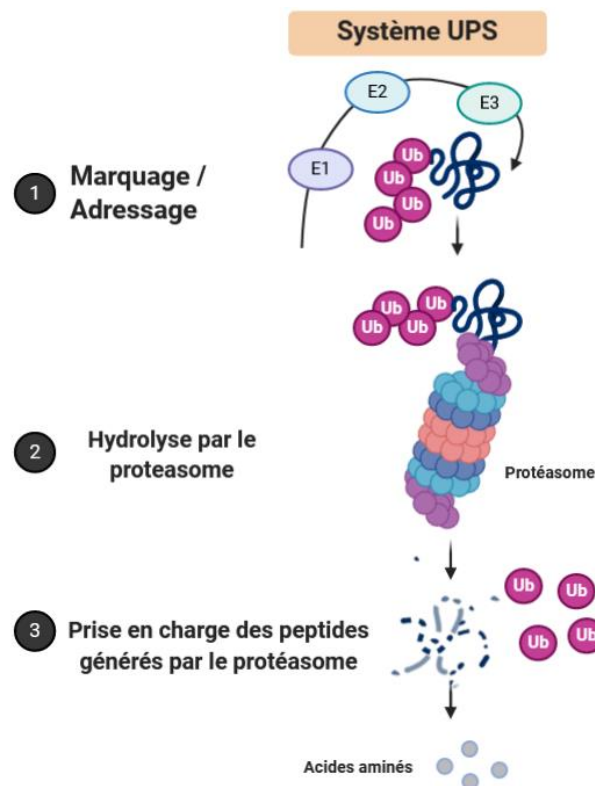


Figure 9 : Le système ubiquitine-protéasome (UPS). 1/ Le marquage/adressage des protéines au protéasome consiste en la liaison covalente de molécules d'ubiquitines sur la protéine à dégrader par le protéasome. Ce mécanisme est médié par des enzymes E1, E2 et E3. 2/ Le substrat est reconnu par le protéasome, déubiquitinylé et déplié pour être dégradé par les différentes activités catalytiques du protéasome. 3/ Les substrats sont dégradés en peptides qui sont pris en charge par des peptidases pour la génération d'acides aminés libres.

2.1.2. Processus de dégradation des protéines par le protéasome

2.1.2.1. Adressage

Deux types de signaux sont nécessaires pour la dégradation au protéasome : la présence d'une chaîne poly-ubiquitine sur la protéine à dégrader, et la présence de régions désordonnées dans la protéine (118).

L'ubiquitinylation est un processus complexe, consommateur d'ATP, qui fait intervenir différentes enzymes (E1, E2, E3) pour la liaison covalente d'ubiquitine sur le substrat. L'enzyme E1 permet l'activation de l'ubiquitine, par un processus ATP dépendant, et forme ainsi une liaison thioester entre la partie carboxy-terminale de l'ubiquitine et un résidu cystéine de l'enzyme. Ensuite, les enzymes E2 permettent le transfert de l'ubiquitine activée sur la protéine substrat, par la formation d'une liaison covalente entre la partie carboxy-terminale de l'ubiquitine et majoritairement une lysine de la protéine cible. Les enzymes E3 participent également au processus de conjugaison, en servant de plateforme entre le substrat et l'enzyme E2 chargée en ubiquitine. Le marquage d'une protéine cible pour sa dégradation au protéasome peut être une chaîne d'ubiquitine (polyubiquitinylation), ou être un marquage par des monomères d'ubiquitine à différents endroits de la protéine (multi-monoubiquitylation) (**Figure 10**). Cependant, le marquage ubiquitine serait plus complexe car il ne servirait pas seulement à la dégradation de la protéine par le protéasome, mais participerait également au transport cellulaire (119), à des cascades de signalisation (120) ou encore à la réparation de l'ADN (121). Ces différentes fonctions du « code ubiquitine » seraient fonction, entre autres, de la taille et de la quantité de(s) chaîne(s) polyubiquitine(s), de la position et de la conformation de celle(s)-ci (118,122,123). Différentes protéines possédant des domaines de liaison à l'ubiquitine joueraient un rôle dans ce « code ubiquitine », par exemple RAD23 pour la dégradation au protéasome, ou encore p62 pour la dégradation par l'autophagie.

Il existe des enzymes de dé-ubiquitinylation (DUBs) qui sont impliquées dans le recyclage de l'ubiquitine et le contrôle de cette machinerie. Ces enzymes peuvent être cytosoliques ou associées au protéasome.

La protéine substrat du protéasome doit également posséder un site d'initiation pour pouvoir être dégradée (124–128). Ce site d'initiation est une région désordonnée d'au moins 20 à 30 acides aminés, en fonction de sa localisation dans la protéine celui-ci peut être plus ou moins long, et dont la séquence en acides aminés conditionne sa dégradation. En effet, une protéine qui ne posséderait pas ce signal échapperait à la dégradation. La demi-vie des protéines corrèle ainsi avec la présence de ces régions d'initiation.

Cependant, quelques protéines sont dégradées par le protéasome sans posséder ce marquage ubiquitine, comme Rb, p53, I κ B α (*I-kappa-B-alpha*), HIF1 α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) ou encore p21, même si leur dégradation par ce marquage ubiquitine est également réalisée (129,130).

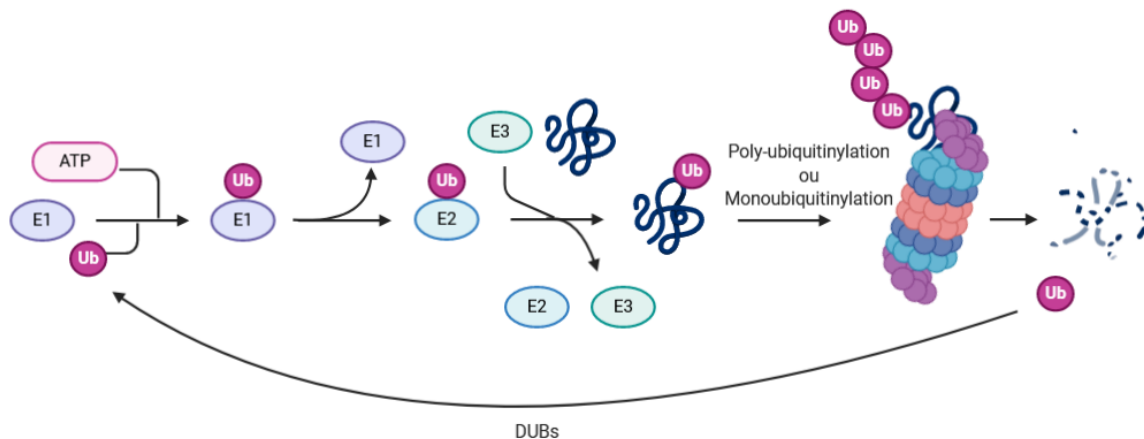


Figure 10 : Adressage des protéines pour leurs dégradations par le protéasome.

2.1.2.2. Hydrolyse par le protéasome

Structure du protéasome :

Le protéasome 26S est composé d'une partie centrale 20S, où réside l'activité catalytique du protéasome, et de une ou deux parties régulatrices 19S situées à chaque extrémité du 20S (**Figure 11**). La majorité des protéines sont dégradées par le protéasome 26S, mais le protéasome 20S est également capable de dégrader des protéines indépendamment de l'ATP et de l'ubiquitine via le 19S (129,130).

Le protéasome 20S se représente par un cylindre composé de sous unités α et β arrangés en 4 hétéroheptamères empilés en anneaux. Les deux anneaux α situés aux extrémités de ce cylindre fonctionnent comme une porte pour l'entrée des substrats au niveau de la chambre catalytique, où l'activité protéolytique est portée par les sous unités $\beta 1$ (PSMB6) pour l'activité caspase, $\beta 2$ (PSMB7) pour l'activité trypsine, et $\beta 5$ (PSMB5) pour l'activité chymotrypsine. L'assemblage de cette partie 20S est assisté par 5 protéines chaperons (PAC (*proteasome assembly chaperone*) 1-4 et POMP (*proteasome maturation protein*)). Il existe différents types de protéasome composés de sous unités α et/ou β différentes du protéasome constitutif. L'immunoprotéasome possède des sous unités $\beta 1i$ (PSMB9), $\beta 2i$ (PSMB10) et $\beta 5i$ (PSMB8), le thymoprotéasome possède quant à lui des sous unités $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5t$ (PSMB11), et le protéasome testiculaire possède des sous unités $\alpha 4s$ (PSMA8). Ces différences structurales confèrent des spécificités vis-à-vis des substrats cibles ainsi que des clivages préférentiels, différents du protéasome constitutif. Ainsi, l'immunoprotéasome, constitutivement exprimé dans les cellules hématopoïétiques permet la génération de peptides antigéniques pour le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I. Cet immunoprotéasome est également induit dans la plupart des types cellulaires à la suite d'une exposition par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ , IFN α , IFN β ou le TNF (1,2).

La partie régulatrice 19S du protéasome a pour fonction la reconnaissance, la déubiquitylation et le dépliement du substrat, sa translocation à la partie centrale 20S, et l'ouverture de l'anneau α . Le protéasome 19S est composé d'une base et d'un chapeau qui

s'assemblent séparément. La base est composée de 6 sous unités AAA+-ATPase (Rpt1-6 = PSMC1-6) organisées en un anneau qui sera en contact avec l'anneau α du 20S, ainsi que de sous unités non ATPase (Rpn1/PSMD2, Rpn2/PSMD1, Rpn10/PSMD4 et Rpn13/ADRM1). L'assemblage de la base est assisté par 5 protéines chaperons RACs (*RP assembly chaperones*). Le chapeau du 19S est quant à lui composé de 9 sous unités non ATPase (Rpn3/PSMD3, Rpn5-9/PSMD12-11-6-7-13, Rpn11/PSMD14, Rpn12/PSMD8 et Sem1). L'assemblage du 19S au 20S se réalise par l'insertion du motif Hy-Y-X (Hy : acide aminé hydrophobe ; Y : tyrosine ; X : n'importe quel acide aminé) de la partie C-terminale des sous unités AAA+-ATPases du 19S dans l'anneau α du 20S pour ouvrir celui-ci.

Il existe également des activateurs du protéasome qui peuvent substituer ou s'ajouter au protéasome 19S : REG γ (*11S regulator complex subunit gamma*, aussi appelé PA28 γ (*Proteasome activator 28 subunit gamma*), PA200 (*proteasome activator PA200*) et PA28. Ces activateurs ne possèdent pas d'activité ATPase ni de récepteurs à l'ubiquitine. Ainsi, dans une cellule plusieurs états d'assemblage du protéasome existent : 20S libre et/ou associé à 1 ou 2 sous unités de 19S et/ou de ces activateurs.

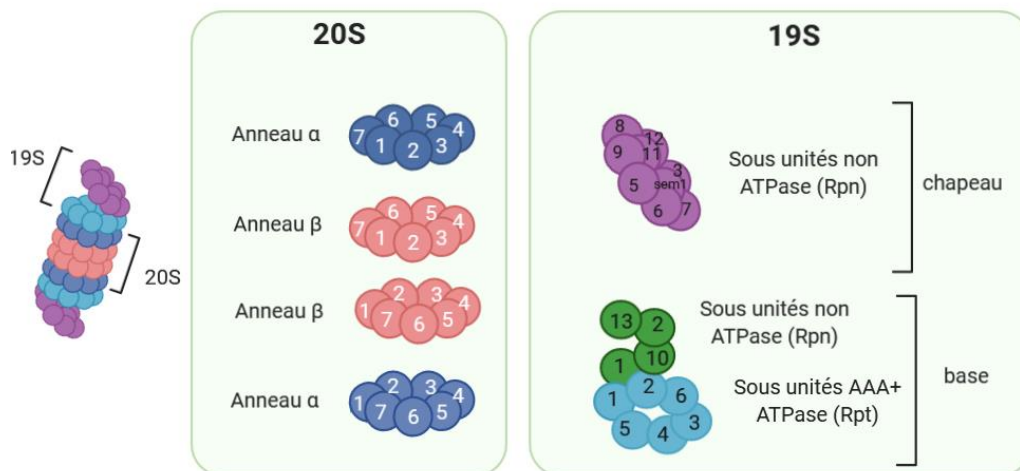


Figure 11 : Représentation schématique de la structure du protéasome 20S et 19S.

Reconnaissance et hydrolyse :

Les sous-unités Rpn1, Rpn10 et Rpn13 non ATPase du 19S servent de récepteurs à l'ubiquitine. Rpn11 est quant à lui une déubiquitinyllase (DUB) qui permet le clivage de la chaîne ubiquitine lors de l'engagement irréversible du substrat dans la partie centrale 20S où le substrat est hydrolysé. D'autres DUBs peuvent également s'associer au protéasome pour participer à cette fonction (environ une centaine).

2.1.2.3. Devenir des peptides générés par le protéasome

Le protéasome produit des peptides de 2 à 24 acides aminés dont la majorité est composée de moins de 8 acides aminés. Ces peptides sont pris en charge rapidement par des oligopeptidases et des aminopeptidases pour la génération d'acides aminés libres, essentiels pour la synthèse de nouvelles protéines (**Figure 12**). En effet, l'apport en acides aminés par l'alimentation pour une cellule saine ne représente que 20% environ du pool

nécessaire à la vie cellulaire, 80% des acides aminés proviennent de ce recyclage par les deux voies de dégradation de la cellule, le protéasome et l'autophagie (115,131). Une petite fraction de ces peptides générés par le protéasome échappe à cette dégradation totale pour la présentation antigénique par le CMH de classe I. Cette étape de dégradation de ces peptides en acides aminés est essentielle car ils peuvent être toxiques pour la cellule, même si cela semble mieux toléré que la perturbation de l'homéostasie des acides aminés (116). Il est admis que des exopeptidases et endopeptidases, comme la thimet oligopeptidase (TOP) et la tripeptidyl peptidase II (TPP-II), clivent les plus longs peptides en peptides plus petits, pour le clivage ensuite par les aminopeptidases (peptides de moins de 5 acides aminés) (132). Il existe de nombreuses enzymes impliquées dans ce processus de dégradation des peptides générés par le protéasome dont l'importance et la coordination entre elles varient en fonction du type cellulaire.

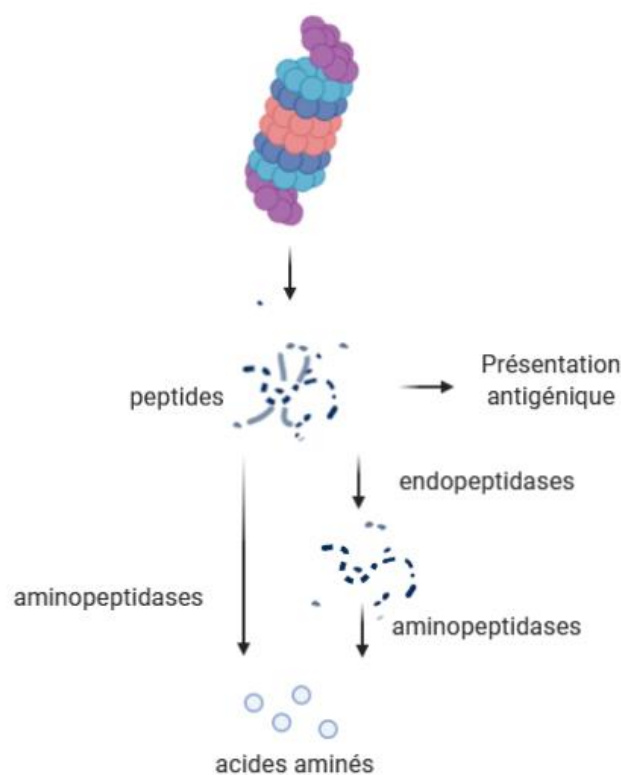


Figure 12 : Devenir des peptides produits par le protéasome.

2.2. Les inhibiteurs du protéasome pour le traitement du cancer

2.2.1. Rôles du protéasome dans le cancer

Le protéasome est une machinerie essentielle pour le fonctionnement cellulaire (Figure 13). De ce fait, le processus de dégradation des protéines par le protéasome est nécessaire et hautement régulé pour permettre la survie des cellules, en particulier des cellules cancéreuses.

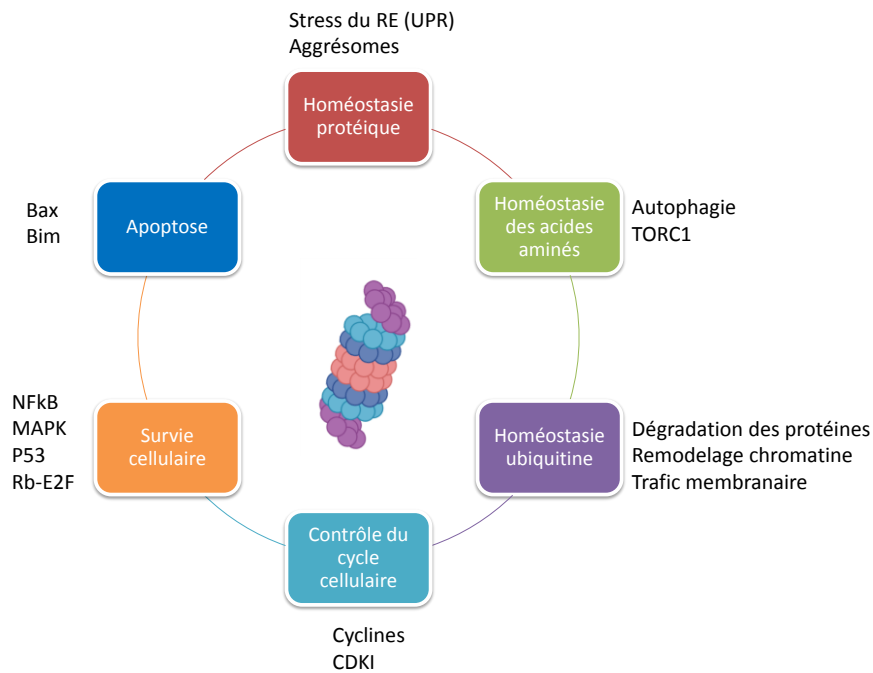


Figure 13 : Exemples de fonctions cellulaires du protéasome.

2.2.1.1. Maintien de l'homéostasie protéique

Le protéasome permet la dégradation de protéines mal-conformées et participe ainsi au maintien de l'homéostasie protéique. En particulier, la croissance rapide des cellules cancéreuses crée un stress protéique dont la gestion nécessite le fonctionnement du protéasome. Il existe ainsi une balance entre la charge de substrats à dégrader par le protéasome et sa capacité (133). Si cet équilibre est perturbé cela peut conduire à la mort de la cellule : par la réponse à l'accumulation de ces protéines mal-conformées, par le manque de nutriments, ou encore par le manque d'ubiquitine. Cette homéostasie est d'autant plus critique que la cellule produit de grandes quantités de protéines, comme c'est le cas des plasmocytes tumoraux dans le MM qui synthétisent de grandes quantités d'immunoglobulines. Cette dernière observation constitue le rationnel du développement du bortezomib, premier inhibiteur du protéasome dans sa première indication qui est le MM. Ainsi, un des mécanismes de résistance de la cellule face à l'inhibition du protéasome est le maintien de l'homéostasie protéique par la formation d'agrésomes, qui sont des sous-structures où les protéines mal-conformées s'accumulent, et qui sont dégradés par la deuxième voie de dégradation des protéines de la cellule, l'autophagie (134).

2.2.1.2. Maintien de l'homéostasie des acides aminés

Le protéasome, en dégradant les protéines, contribue au maintien du pool d'acides aminés. Il constitue, avec l'autophagie, les deux voies de dégradations des protéines responsables de 80% du pool d'acides aminés, 20% seulement proviennent de l'alimentation (115,131). Ainsi, l'inhibition du protéasome cause une privation en acides aminés qui est délétère notamment pour cellules cancéreuses (116). Cibler le métabolisme des cellules cancéreuses est notamment une stratégie thérapeutique fortement explorée (135).

2.2.1.3. Maintien de l'homéostasie de l'ubiquitine

L'inhibition du protéasome impacte l'homéostasie de l'ubiquitine, protéine impliquée dans diverses fonctions cellulaires (dégradation des protéines, remodelage de la chromatine, trafic membranaire...). Ainsi, il a été démontré que l'inhibition du protéasome diminuait l'ubiquitinylation des histones et impactait ainsi l'expression génique (136). On peut donc supposer que la perturbation de l'homéostasie de l'ubiquitine puisse contribuer à la mort cellulaire induite par les inhibiteurs du protéasome (137).

2.2.1.4. Régulation du cycle cellulaire

Une cellule cancéreuse est une cellule dont le cycle cellulaire est dérégulé causant une prolifération incontrôlée. Par exemple, les cellules cancéreuses sur-expriment des cyclines et perdent l'expression de CDKI. Le protéasome joue un rôle critique dans la maintenance de la division cellulaire cancéreuse (138). En effet, il intervient dans la dégradation de CDKI et de suppresseurs de tumeurs comme p53, p21, p27, contribuant ainsi à la prolifération cellulaire. MDM2, SCF, APC, UBE2C sont les ligases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire par le protéasome. Ainsi, les inhibiteurs de protéasome induisent un arrêt du cycle cellulaire. D'autres phénomènes intracellulaires peuvent être responsables de l'arrêt du cycle cellulaire par les inhibiteurs de protéasome comme la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la modulation de voie de signalisation comme NF-κB ou MAPK.

2.2.1.5. Implication dans des voies de signalisation de survie cellulaire

1/NF-κB

NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans l'inflammation, la réponse immunitaire et la survie de la plupart des cellules cancéreuses. Le protéasome est impliqué dans la survie des cellules cancéreuses par la dégradation d'IκB. En effet, ce dernier forme un complexe avec le facteur de transcription NF-κB afin de l'inactiver par son maintien dans le cytosol. Cependant, sa dégradation par l'UPS permet la translocation de NF-κB au noyau, où il est responsable de l'induction de gènes impliqués dans la survie et la prolifération de la cellule cancéreuse comme la cycline D (139).

2/MAPK

Les protéines de la famille MAPKs sont impliquées dans divers processus pour le développement et la progression tumorale. L'activation de différentes MAPK, comme JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) ou p38MAPK, est davantage associée à la mort cellulaire, alors que l'activation d'ERK et MEK est davantage associée à la survie. Il a été montré que l'inhibition du protéasome par le bortezomib dans des cellules cancéreuses d'ostéosarcome diminuait de manière dose-dépendante l'activation de p-MEK/ERK et augmentait p-JNK/p38, causant un arrêt du cycle cellulaire, de l'autophagie et de l'apoptose (140).

La voie MAPK est également impliquée dans la tolérance à l'hypoxie. L'hypoxie est une diminution de la quantité d'oxygène dans un tissu et qui est toxique pour les cellules. Les cellules cancéreuses développent une tolérance à l'hypoxie en induisant des facteurs de transcription spécifiques comme HIF-1 α pour une réponse adaptative (angiogenèse, changement du métabolisme etc.). Dans des conditions normoxiques, HIF-1 α est rapidement dégradé par le protéasome (141). Cependant, l'inhibition du protéasome par le bortezomib dans des cellules cancéreuses de prostate a inhibé l'expression d'HIF-1 α , par l'abrogation de la phosphorylation d'ERK1/2 MAPK et d'AKT de la voie PI3K/AKT/mTOR (142).

3/p53

Dans les cellules cancéreuses, p53, un suppresseur de tumeur, est marqué par la protéine MDM2, une E3 ubiquitine ligase pour sa dégradation au protéasome. MDM2 est surexprimée dans de nombreux cancers. L'inhibition du protéasome contribue ainsi à l'accumulation de p53 pour l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (138,143).

4/Rb-E2F :

La protéine du rétinoblastome est également un suppresseur de tumeur dont la dégradation est médiée par le protéasome. Le rôle premier de cette protéine est de lier et de stabiliser le facteur de transcription E2F. Celui-ci n'est alors plus capable d'induire des gènes pour la progression du cycle cellulaire. De plus, E2F1 est également dégradé par le protéasome par le marquage ubiquitine par différentes ligases en fonction du cycle cellulaire. La dégradation de la protéine du rétinoblastome ainsi que la dégradation d'E2F1, à des moments appropriés du cycle cellulaire, contribue ainsi à la progression de celui-ci (144).

2.2.1.6. Protéasome et apoptose

L'inhibition du protéasome, par les différentes molécules décrites dans la littérature, entraîne la mort de la plupart des lignées cellulaires cancéreuses par différents mécanismes. Une cellule cancéreuse présente une balance de protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques dérégulée pour permettre la survie de ces cellules. Il a été montré notamment que dans les cellules cancéreuses Bax et Bim, des protéines pro-apoptotiques, étaient dégradées par le protéasome (145,146). Ainsi, la dégradation de ces protéines impliquées dans la balance mort/survie par le protéasome, met en évidence l'importance du contrôle des protéines substrats du protéasome pour différents processus cellulaires, notamment la survie et la prolifération pour les cellules cancéreuses.

2.2.2. Développement d'inhibiteurs de l'UPS

Le protéasome est une machinerie cellulaire importante pour diverses fonctions physiologiques. Sa manipulation par les cellules cancéreuses en fait une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement du cancer mais également pour d'autres

pathologies. Ainsi, il existe de nombreux inhibiteurs du protéasome (IP) approuvés mais également en développement.

2.2.2.1. Les inhibiteurs du protéasome 20S

Les inhibiteurs du protéasome constituent une classe thérapeutique incontournable pour le traitement du MM. Ainsi, il existe différents inhibiteurs du protéasome, approuvés, en développement, et également utilisés comme outil en recherche (**Tableau 9**). On remarque que certains composés inhibent aussi bien le protéasome constitutif que l'immunoprotéasome. Certains composés comme KZR-616, ONX0914 et UK-101 inhibent spécifiquement l'immunoprotéasome.

Nom	Motif structural	Cible	Type d'inhibition	Statut	Référence(s)
Bortezomib	Boronate	$\beta 5$, $\beta 5i$, $\beta 1i$, $\beta 1$	Réversible	Approuvé	(79–81,147,148)
Carfilzomib	Epoxycéton	$\beta 5$, $\beta 5i$	Irréversible	Approuvé	(79,149)
Ixazomib	Boronate	$\beta 5$, $\beta 1$	Réversible	Approuvé	(80,150)
Oprozomib	Epoxycéton	$\beta 5$, $\beta 5i$	Irréversible	Clinique	(85–87)
Marizomib	B-lactone	$\beta 5$, $\beta 2$, $\beta 1$	Irréversible et passage de la BHE	Clinique	(81,88,89)
Delanzomib	Boronate	$\beta 5$, $\beta 5i$	Réversible	Clinique	(90–92)
KZR-616	Epoxycéton	$\beta 5i$, $\beta 2i$, $\beta 1i$	Irréversible	Clinique	(151)
ONX0914	Epoxycéton	$\beta 5i$	Irréversible	Développement préclinique	(152)
UK-101	Epoxycéton	$\beta 1i$	Irréversible	Développement préclinique	(153)
MG-132	Aldéhyde	$\beta 5$, $\beta 5i$	Réversible	Outil pour la recherche	(154,155)
Epoxomycine	Epoxycéton	$\beta 5$, $\beta 5i$	Irréversible	Outil pour la recherche	(156)
Clasto - Lactacystine	B-lactone	$\beta 5$	Irréversible	Outil pour la recherche	(79)

Tableau 9 : Principales caractéristiques de molécules inhibitrices du protéasome.

2.2.2.2. Les inhibiteurs du protéasome 19S et DUBs

Le protéasome 19S, ses déubiquitinyases comme UCHL5 (*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5*), USP14 (*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase*) et Rpn11, et ses récepteurs à l'ubiquitine comme RPN13, sont des cibles intéressantes pour le développement de nouvelles thérapies dans le cancer. Par exemple, USP14 est surexprimé dans certains cancers et sa surexpression est associée à une prolifération tumorale (155). Un autre exemple, Rpn11, est une metallo-DUB à zinc, dont l'inhibition est favorable pour le traitement du cancer (158). Ainsi, différents inhibiteurs ont été développés. Le **tableau 10** présente une liste non exhaustive de ces composés.

Nom	Cible	Statut	Référence(s)
VLX1570	USP14	Clinique	(159,160)
IU1-47	USP14	Développement	(161)
WP1130	USP9X, USP14, USP5, UCH37	Développement	(162)
RA190	RPN13	Développement	(163)
Capzimin	RPN11	Développement	(158)
Thiolutin	RPN11	Développement	(164)

Tableau 10 : Principales caractéristiques de molécules inhibitrices du protéasome 19S et de DUBs (déubiquitinasés)

2.2.2.3. Les inhibiteurs des enzymes E1, E2 et E3

Une autre manière de cibler l'UPS est de moduler les enzymes E1, E2 et E3 impliquées dans le marquage de protéines pour leurs dégradations au protéasome. Il existe quelques enzymes E1 (par exemple UBA1, UBA6 (*Ubiquitin-like modifier-activating enzyme*)), une cinquantaine d'enzymes E2 et plus de 600 enzymes E3. Ainsi, moduler une enzyme E3 serait plus spécifique d'un substrat (par exemple MDM2 avec son substrat p53 ou encore FBW7 (*F-box/WD repeat-containing protein 7*) avec son substrat c-Myc). Le **tableau 11** présente une liste non exhaustive d'inhibiteurs en développement notamment pour le traitement du cancer.

Nom	Cible	Catégorie	Statut	Référence(s)
PYR-41	UBA1	E1	Développement	(165)
Pevonedistat	NAE (Nedd8-activating enzyme)		Clinique	(166)
CC0651	hCdc34	E2	Développement	(167)
NSC697923	Ubc13		Développement	(168)
Idasanutlin	MDM2	E3	Clinique	(169)
Oridonin	FBW7		Développement	(170)

Tableau 11 : Principales caractéristiques de molécules inhibitrices d'enzymes E1, E2 et E3.

2.2.3. Différences entre les mécanismes d'action du bortezomib et du carfilzomib

Dans la **partie 1.3.3.1 de l'introduction**, nous avons pu constater que le bortezomib (BTZ) et le carfilzomib (CFZ) ne présentaient pas les mêmes profils d'effets indésirables : davantage de neuropathies périphériques pour le BTZ, contre davantage d'effets indésirables cardiaques pour le CFZ. De plus, l'un (BTZ) présente un acide boronique et une inhibition réversible du protéasome ($\beta 5$ et $\beta 1$), alors que l'autre présente une époxycétone et une inhibition irréversible ($\beta 5$). Ainsi, il est raisonnable de penser que, malgré un mécanisme d'action commun (l'inhibition du protéasome), ces molécules puissent avoir des conséquences cellulaires différentes vis-à-vis de cette inhibition, mais aussi vis-à-vis de leurs profils de sélectivité. En effet, une petite molécule ne peut être totalement spécifique d'une cible, elle se lie forcément à d'autres cibles, avec des affinités variables, qui peuvent contribuer ou non à son effet thérapeutique.

2.2.3.1. Des profils de sécurité qui diffèrent

Concernant l'induction de neuropathies périphériques par le bortezomib, cela serait dû à des effets off-targets de cette molécule.

En effet, le BTZ serait un inhibiteur de plusieurs sérine hydrolases comme la cathepsine G, cathepsine A, chymase, dipeptidyl peptidase II (DPPII), et un puissant inhibiteur de la protéase induite par le stress HtrA2/Omi, impliquée dans la survie des cellules neurales (IC₅₀ sur enzymes purifiées de 950nM, 2.5µM, 280nM, 8.7µM et 3nM respectivement). L'inhibition de ces protéases par le BTZ est de puissance proche de celle envers le protéasome, alors que le CFZ n'a montré aucune inhibition de ces protéases. L'inhibition de ces protéases en particulier de HtrA2/Omi pourrait expliquer l'apparition de cet effet indésirable induit par le bortezomib (171).

Une autre hypothèse, pour expliquer les neuropathies périphériques causées par le bortezomib contrairement au carfilzomib, serait que le bortezomib induit plus de dommages du cytosquelette que le carfilzomib, ce qui est important pour l'intégrité de la cellule neuronale. Une carbonylation excessive des protéines, une accumulation de protéines ubiquitinyllées, une déstabilisation des filaments d'actine, mais aussi une augmentation de l'expression de certaines protéines chaperons et de PDI (protéine disulfure isomérase) ont été observés de manière plus importantes avec le bortezomib qu'avec le carfilzomib dans les cellules souches neurales murines (172).

Concernant les effets indésirables cardiaques du carfilzomib par rapport au bortezomib, une première hypothèse portant sur l'irréversibilité de l'inhibition du protéasome par le carfilzomib a été émise. En effet, des effets indésirables ont été aussi reportés pour des patients traités avec le bortezomib notamment lorsque la dose cumulée en bortezomib dépasse 20mg/m² (173,174). Il a été décrit que le protéasome modulait l'activité d'enzyme NOS (*endothelial nitric oxide synthase*), essentielles pour l'homéostasie vasculaire (175). Ainsi cette première hypothèse porte sur l'inhibition irréversible du protéasome par le carfilzomib, qui aurait un impact délétère sur l'homéostasie du NO sur les cellules endothéliales cardiaques, à l'origine des effets indésirables cardiaques de cette molécule en particulier (176).

Une autre hypothèse pour expliquer ces effets indésirables cardiaques induits par le carfilzomib serait la modulation de la voie AMPK (*AMP-activated protein kinase*)/autophagie ainsi que de la voie PI3K/AKT/eNOS par le carfilzomib par rapport au bortezomib (177). En effet, ces voies induisent une cardioprotection (178–180). Ainsi, une diminution de la phosphorylation de l'AMPKα, de Raptor ainsi qu'une diminution de l'expression de LC3-II sans changement de la phosphorylation de mTOR, ont été observés par le traitement du carfilzomib dans le myocarde de souris traitées, alors que le bortezomib n'a pas montré d'impact sur l'expression et l'état de ces protéines. De plus, une réduction de la phosphorylation de PI3K, AKT et eNOS a été décrite par le carfilzomib sans altération de l'expression de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*). Le mécanisme par lequel le CFZ induit une déphosphorylation d'AKT et d'AMPK serait dû à l'activation de PP2A (*protein phosphatase 2A*), une sérine/thréonine phosphatase ubiquitaire (177). Une autre étude a également montré l'implication de la voie de signalisation NF-κB dans l'apparition de ces effets indésirables cardiaques par le carfilzomib (181).

2.2.3.2. Un peptidome qui diffère

Le protéasome clive les protéines intracellulaires en peptides. Cependant, l'inhibition du protéasome par le bortezomib cause une forte augmentation de peptides intracellulaires, à l'inverse du carfilzomib qui en induit moins (182). Il est notamment proposé que les peptides intracellulaires puissent avoir un rôle physiologique cellulaire. Diverses hypothèses ont été ainsi émises par les auteurs de ces observations, comme la modulation allostérique du protéasome par les différentes molécules inhibitrices du protéasome, et/ou par un effet *off-target* sur des enzymes dégradant les peptides.

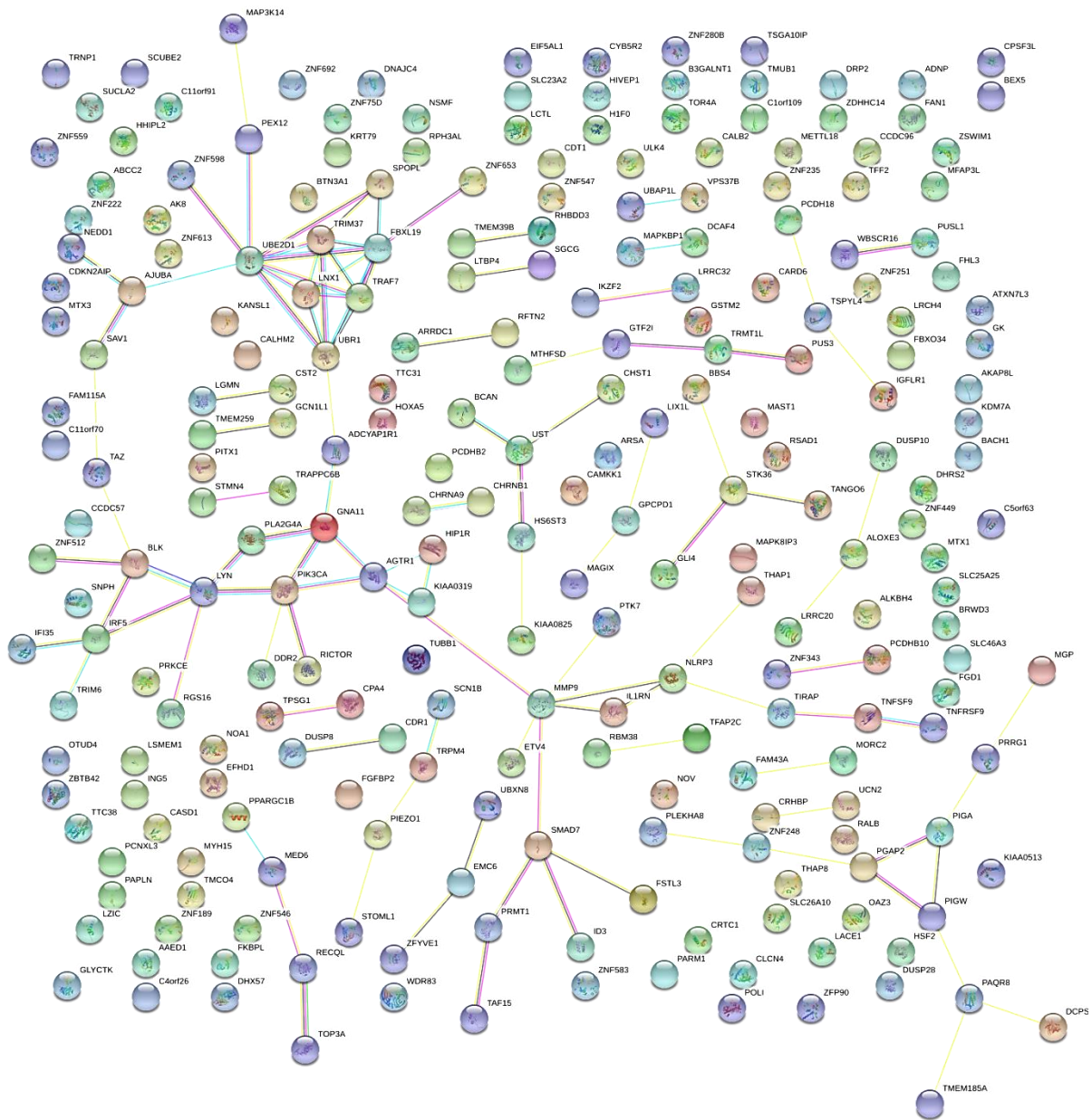
2.2.3.3. Un transcriptome qui diffère

Des données transcriptomiques de cellules U87 de glioblastome traitées pendant 24h avec 10nM de bortezomib ou 3.8nM de carfilzomib sont disponibles sur la base GEO (Gene Expression Omnibus, n°GSE97460). L'analyse de ces données montre des différences transcriptomiques entre le traitement par le bortezomib et le traitement par le carfilzomib.

La **figure 14** montre des gènes modulés de la même façon entre le CFZ et le BTZ.

La **figure 15** montre des gènes modulés (sur et sous exprimés) plus de 4 fois par le bortezomib par rapport au carfilzomib, alors que le carfilzomib ne module pas ces gènes plus de 2 fois par rapport au DMSO. On retrouve notamment un nœud impliquant des gènes du cycle cellulaire.

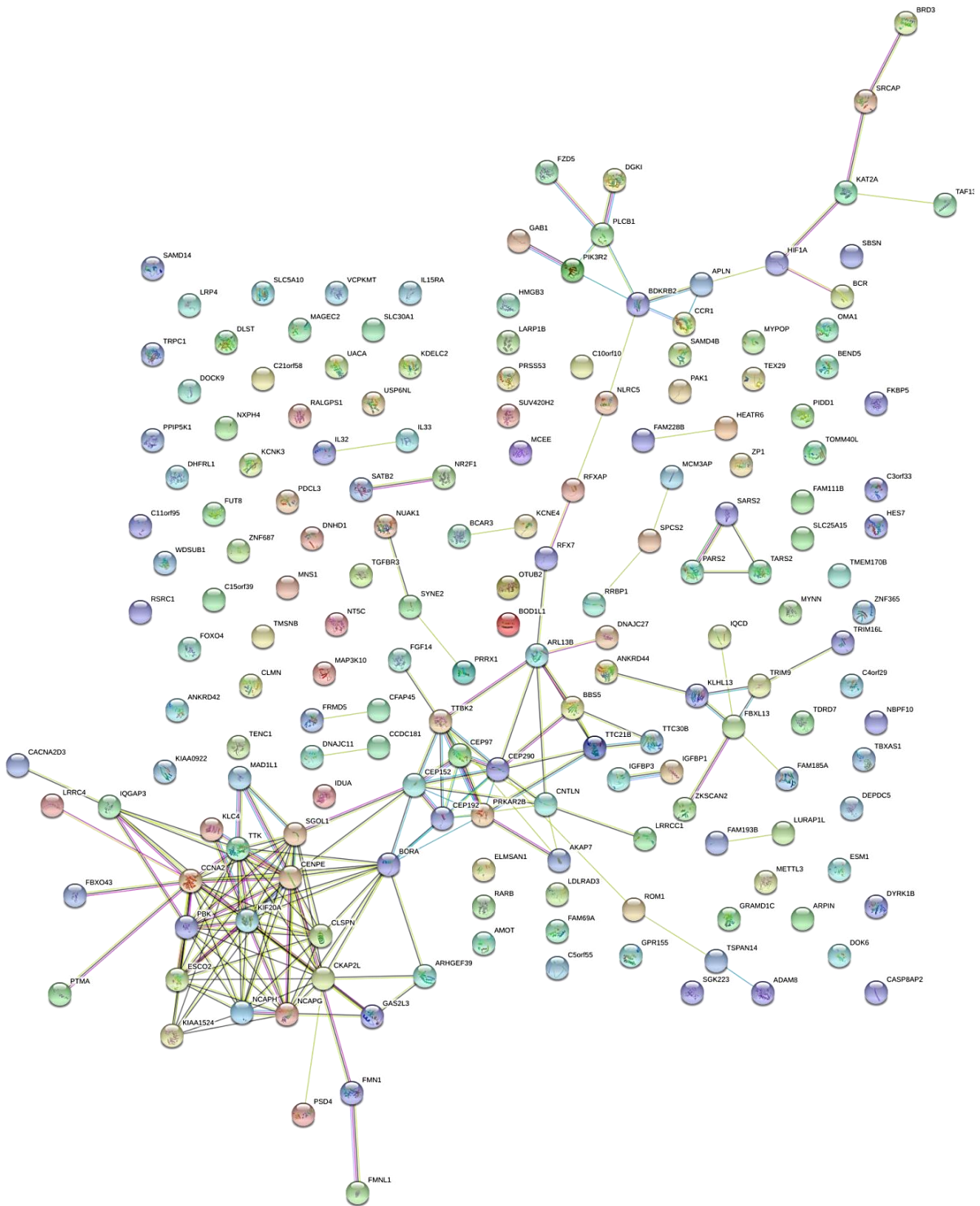
La **figure 16** montre des gènes modulés (sur et sous exprimés) plus de 4 fois par le carfilzomib par rapport au bortezomib alors que le bortezomib ne module pas ces gènes plus de 2 fois par rapport au DMSO. On remarque qu'il y a peu de connexion entre ces gènes.



Edges:

<p>Edges represent protein-protein associations</p> <p><i>associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding each other.</i></p>	<p>Known Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> from curated databases experimentally determined 	<p>Predicted Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> gene neighborhood gene fusions gene co-occurrence 	<p>Others</p> <ul style="list-style-type: none"> textmining co-expression protein homology
---	--	---	---

Figure 14 : Comparaison du nombre de lecture (read counts) par gène normalisé par une condition non traitée, entre le carfilzomib et le bortezomib de l'étude GSE97460. La figure obtenue par String Database montre les gènes régulés de la même façon entre le carfilzomib et le bortezomib de plus de 4 fois sans changement du ratio BTZ/CFZ de plus de 2 fois ($\text{ratio BTZ/CFZ} \geq 0,5$ et $\text{ratio BTZ/CFZ} \leq 2$; ratio DMSO vs CFZ et $\text{ratio DMSO vs BTZ} \geq 4$ et ≤ 0.2 avec des counts supérieurs à 1 pour les conditions BTZ et CFZ). La légende des liens entre les protéines est précisée.



Edges:

<p>Edges represent protein-protein associations</p> <p><i>associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding each other.</i></p>	<p>Known Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> from curated databases experimentally determined 	<p>Predicted Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> gene neighborhood gene fusions gene co-occurrence 	<p>Others</p> <ul style="list-style-type: none"> textmining co-expression protein homology
---	--	---	---

Figure 15 : Comparaison du nombre de lecture (read counts) par gène, normalisé par une condition non traitée, entre le carfilzomib et le bortezomib de l'étude GSE97460. La figure obtenue par String Database montre les gènes régulés plus de 4 fois par le bortezomib (sur et sous exprimé) alors que le carfilzomib ne module pas plus de 2 fois ces gènes par rapport au DMSO (gènes dans l'analyse : $\text{ratio BTZ/CFZ} \geq 4$ ou ≤ 0.2 + $\text{DMSO/CFZ} \geq 0.5$ et ≤ 2 et suppression des 0 count pour la condition BTZ). La légende des liens entre les protéines est précisée.

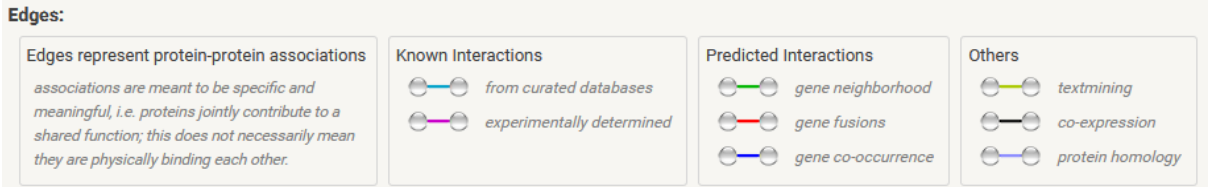
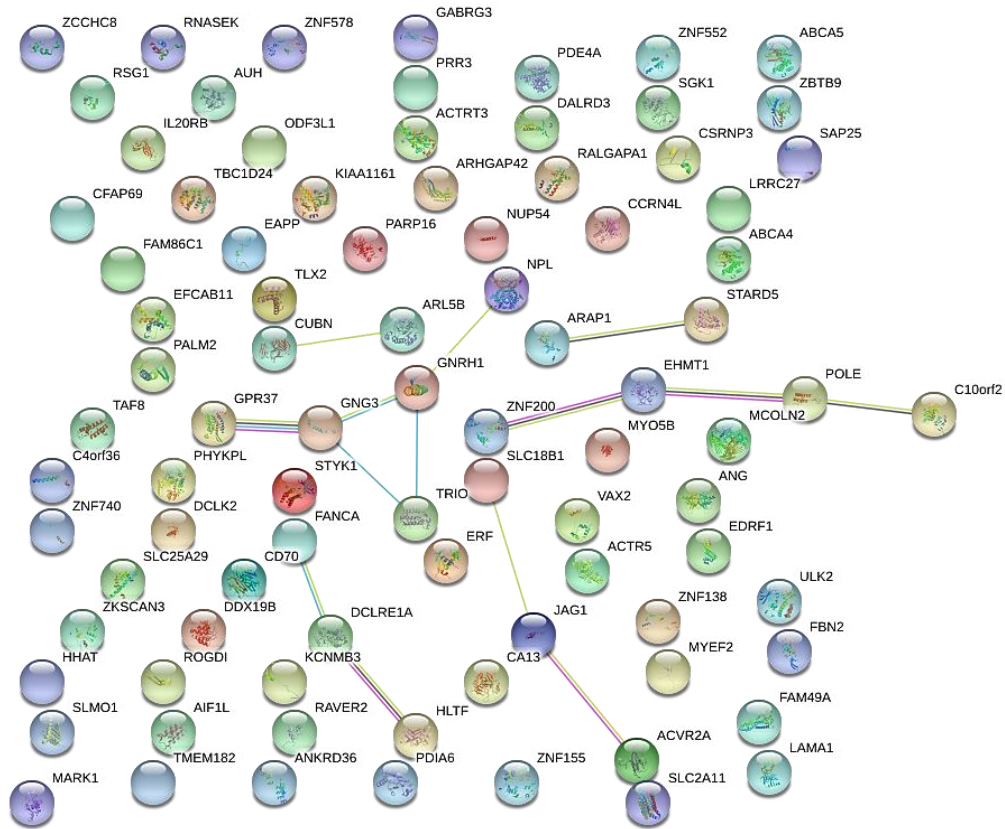


Figure 16 : Comparaison du nombre de lecture (read counts) par gène normalisé par une condition non traitée, entre le carfilzomib et le bortezomib de l'étude GSE97460. La figure obtenue par String Database montre les gènes régulés plus de 4 fois par le carfilzomib (sur et sous exprimé) alors que le bortezomib ne module pas plus de 2 fois ces gènes par rapport au DMSO (gènes dans l'analyse : ratio BTZ/CFZ ≤ 0.2 ou ≥ 4 et DMSO/BTZ ≥ 0.5 et ≤ 2). La légende des liens entre les protéines est précisée.

Ainsi, ces données transcriptomiques montrent des modulations géniques différentes entre le BTZ et le CFZ même s'il est à prendre en compte la différence de doses entre ces deux composés. Ces observations appuient une fois de plus le fait que ces molécules malgré un mécanisme d'action commun d'inhibition du protéasome aient des impacts différents sur la cellule.

3. La réponse intégrée au stress (ISR)

La perturbation de l'homéostasie protéique à la suite de l'inhibition du protéasome est un élément contribuant à l'effet cytotoxique de ces agents thérapeutiques. Face à ce stress mais également à d'autres, comme la privation en nutriments ou encore un stress oxydatif, la cellule répond par l'activation d'une voie de signalisation appelée réponse intégrée au stress (ISR). Celle-ci permet le maintien de l'homéostasie cellulaire ou induit la mort cellulaire programmée par apoptose pour protéger l'organisme contre cette cellule stressée.

3.1. Les différents senseurs de la réponse intégrée au stress

La réponse intégrée au stress (ISR) repose sur un réseau de signalisation cellulaire nécessaire pour l'adaptation à différents stress comme un stress protéique, la privation en nutriments, l'infection virale ou encore un stress oxydatif. Les différents stress sont détectés par différentes kinases : PERK (*PRKR-like endoplasmic reticulum kinase*) pour le stress protéique, GCN2 (*general control nonderepressible 2*) pour le stress nutritionnel et l'exposition aux ultraviolets (UV), PKR (*Protein kinase RNA-activated*) pour l'infection virale et HRI (*Heme-regulated inhibitor*) pour la privation en hème et le stress oxydatif. L'ensemble de ces kinases phosphoryle eIF2 α , une protéine impliquée dans la traduction et qui aura pour conséquences un arrêt global de la synthèse protéique de la cellule, et une traduction sélective de certains ARNm (**Figure 17**). Ainsi, un nouveau programme transcriptionnel se met en place pour maintenir ou rétablir une homéostasie. Cependant, si le stress persiste ou s'il est de durée trop importante, l'ISR conduit à une réponse apoptotique, protégeant l'organisme de ces cellules endommagées (183).

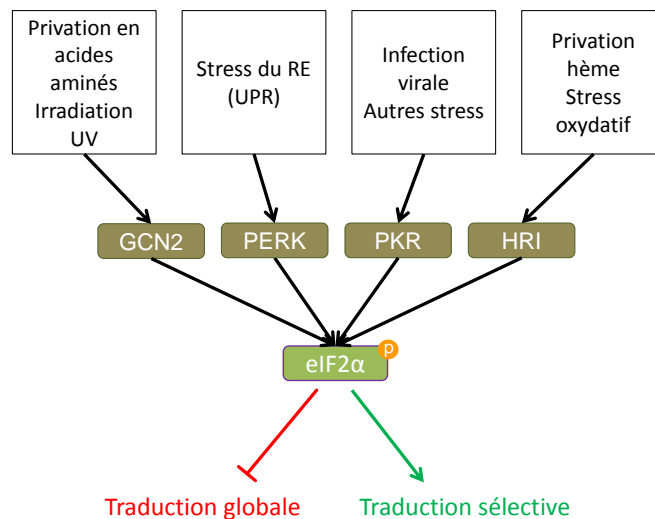


Figure 17 : La réponse intégrée au stress (ISR) est perçue par différentes kinases : GCN2, PERK, PKR et/ou HRI. Ces kinases activées phosphorylent eIF2 α impliquée dans la traduction protéique. Cette modification post-traductionnelle inhibe la traduction globale protéique mais permet la traduction sélective de certains ARNm.

3.2. La convergence des réponses par eIF2 α

La protéine eIF2 α joue un rôle dans la traduction protéique, en particulier dans l'étape d'initiation (**Figure 18**). La protéine eIF2 α lorsqu'elle est liée au GTP peut lier l'ARN de transfert tRNA_i^{Met}, complémentaire au codon d'initiation AUG. La formation de ce complexe ternaire est régulée par eIF2B, qui catalyse la réaction du GDP en GTP, et est nécessaire pour la formation du complexe ribosomal d'initiation. Lorsqu'eIF2 α est phosphorylée cette catalyse du GDP en GTP n'est plus possible, arrêtant ainsi l'initiation de la traduction de tous les ARNm cellulaires (184). Ainsi, la phosphorylation d'eIF2 α est responsable d'un arrêt du cycle cellulaire par l'inhibition de la traduction d'ARNm impliqués dans le cycle cellulaire comme la cycline D1 (185).

Initiation de la traduction protéique

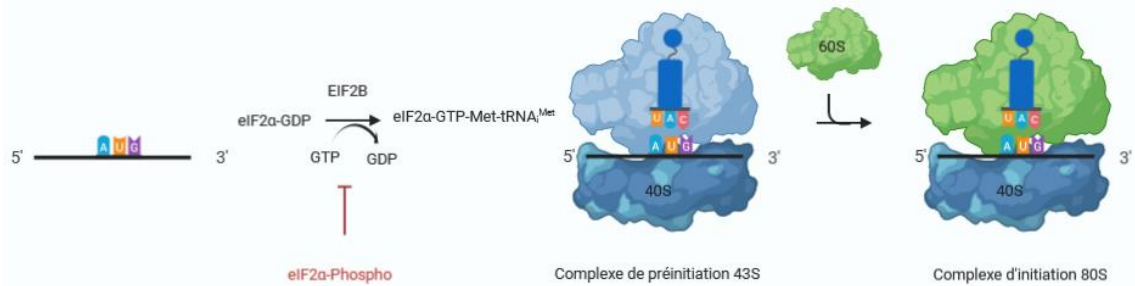


Figure 18 : eIF2 α est impliqué dans l'étape d'initiation de la traduction protéique. L'initiation au niveau du codon AUG se fait par le recrutement du ribosome 40S, puis du complexe ternaire eIF2-GTP-tRNA^{iMet}, dont la régulation est dépendante d'EIF2B, pour la formation du complexe de pré-initiation 43S. Celui-ci s'associe ensuite au ribosome 60S après hydrolyse d'eIF2-GTP pour former le complexe d'initiation 80S nécessaire pour la traduction. L'état de phosphorylation d'eIF2 conditionne l'échange du GDP en GTP nécessaire pour la formation du complexe d'initiation de la traduction.

Cependant, la phosphorylation d'eIF2 α peut permettre la traduction sélective de certains ARNm comme celui codant pour la protéine ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*). La particularité de cet ARNm est qu'il contient deux cadres de lectures situés dans la partie non codante (uORF : *upstream Open Reading Frame*), un court et un long. Dans les conditions normales, l'initiation de la traduction de cet ARNm se réalise au niveau du premier cadre de lecture court (uORF1), où la traduction est rapidement arrêtée par un codon stop, libérant les sous unités ribosomales 60S et 40S. Certaines sous unités ribosomales 40S restent attachées et initient la traduction à partir du deuxième cadre de lecture long uORF2, par le recrutement du complexe ternaire eIF2-GTP-tRNA^{iMet}. Cependant, comme ce deuxième uORF2 est long, le codon d'initiation pour la production de la protéine ATF4 est dépassé et il n'y a pas de traduction d'ATF4. En revanche, dans des conditions où eIF2 α est phosphorylé, le complexe ternaire eIF2-GTP-tRNA^{iMet} se fait très rare et le recrutement de celui-ci au niveau de l'uORF2 par le ribosome 40S ne peut se faire par manque de temps. En revanche, cela laisse plus de temps au ribosome 40S d'acquiescer ce complexe ternaire pour l'initiation de la traduction d'ATF4. Ainsi, dans des conditions de stress, la traduction du facteur de transcription ATF4 se réalise (186,187) (**Figure 19**).

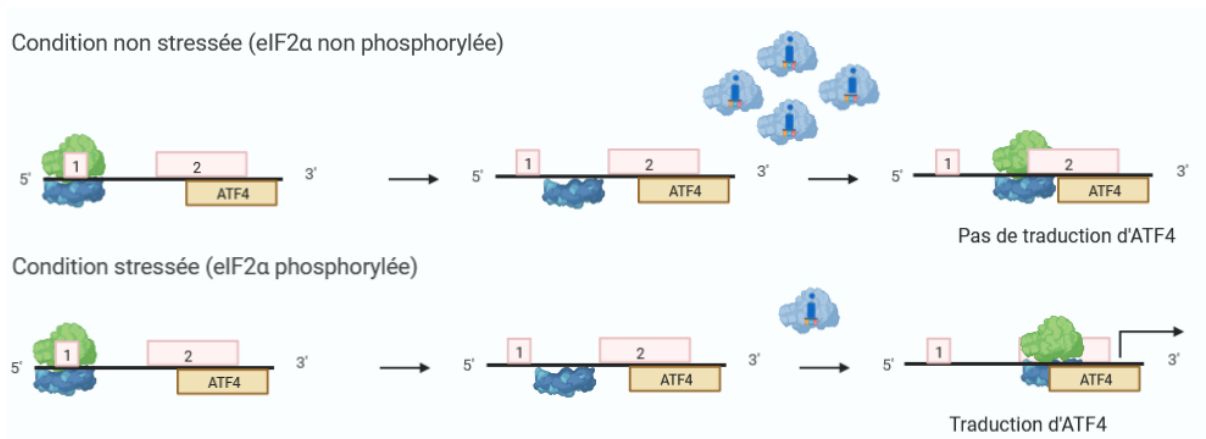


Figure 19 : Traduction sélective d'ATF4 lors d'un stress. En absence de stress, eIF2 α peut se lier au GTP et ainsi permettre la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-tRNAi^{Met}, nécessaire pour la formation du complexe d'initiation 80S. Lors d'un stress réticulaire, eIF2 α est phosphorylé et ne peut plus se lier à l'ARN de transfert initiateur nécessaire à la formation du complexe d'initiation 80S, qui se fait donc rare dans la cellule. ATF4 présente la particularité de présenter 2 cadres de lecture (1, 2), un court et un long. Dans des conditions non stressées, le ribosome initie la traduction au niveau de ces deux cadres de lecture ne permettant pas la production d'ATF4. En revanche, lors d'un stress, du fait de la rareté du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNAiMe, celui-ci a le temps d'être recruté pour induire l'expression d'ATF4.

D'autres ARNm sont également traduits lors de l'ISR comme le facteur de transcription CHOP (188), principalement associé à la mort cellulaire, ou encore GADD34 (*Growth Arrest and DNA Damage Gene 34*) (189). Ce dernier intervient dans une boucle de rétrocontrôle négatif, car en s'associant avec PP1c (*Protein phosphatase 1 cofactor*) il permet la déphosphorylation d'eIF2 α . Il existe une autre phosphatase CREP (*Constitutive Repressor of eIF2 α Phosphorylation*), d'expression constitutive cette fois-ci, responsable également de cette déphosphorylation. Celle-ci est notamment nécessaire pour permettre la traduction d'ARNm cibles en réponse au stress. Cependant, la reprise trop précoce de la synthèse protéique peut aggraver le stress protéique et conduire à la mort cellulaire. L'expression de GADD34 est régulée par ATF4 et CHOP (38,39).

3.3. Les spécificités des différentes réponses au stress

3.3.1. La kinase PERK et réponse au stress protéique (UPR)

La voie de signalisation aux protéines mal-conformées (UPR) se compose de trois branches : IRE1 α (*Inositol-requiring protein 1 α*), PERK et ATF6 (*Activating transcription factor 6*) (192). Ces trois protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique (RE) sont, à l'état basal, associées à une protéine chaperon de la famille des HSP70 (*Heat Shock Protein*) GRP78 (*78 kDa glucose-regulated protein*), aussi appelée BIP (*Binding-immunoglobulin protein*). Cette dernière, lorsque des protéines mal-conformées s'accumulent dans le réticulum endoplasmique, va aider au bon repliement de celles-ci par un mécanisme ATP-dépendant. La dissociation de cette protéine chaperon aux trois protéines senseurs de l'UPR constitue le signal d'activation de cette voie UPR en réponse au stress protéique. D'autres hypothèses d'activation des différentes branches de l'UPR par l'accumulation de protéines sont également émises, ce qui appuie la complexité de la

captation du stress du RE. L'implication et la modulation de cette voie UPR dans le cancer sont détaillées dans cette thèse d'exercice de pharmacie (193).

3.3.1.1. La branche PERK

PERK est une sérine/thréonine kinase qui s'oligomérisse et se transautophosphoryle lors de la dissociation de GRP78. Cette activation va entraîner la phosphorylation de plusieurs protéines cibles : eIF2 α et NRF2 (**Figure 20**). La phosphorylation de NRF2 permet sa dissociation d'un complexe inactif avec Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) (194). NRF2 est capable de s'hétérodimériser avec d'autres facteurs comme les protéines MAF (*MusculoAponeurotic Fibrosarcoma*), Jun, ATF4, pour moduler des gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante ou dans la dégradation des protéines par le protéasome (195–198). NRF2 se lie aux motifs ARE (*Antioxidant Response Element*), MARE (*Maf recognition Element*), SRE (*Stress Response Element*) et NF-E2 (197).

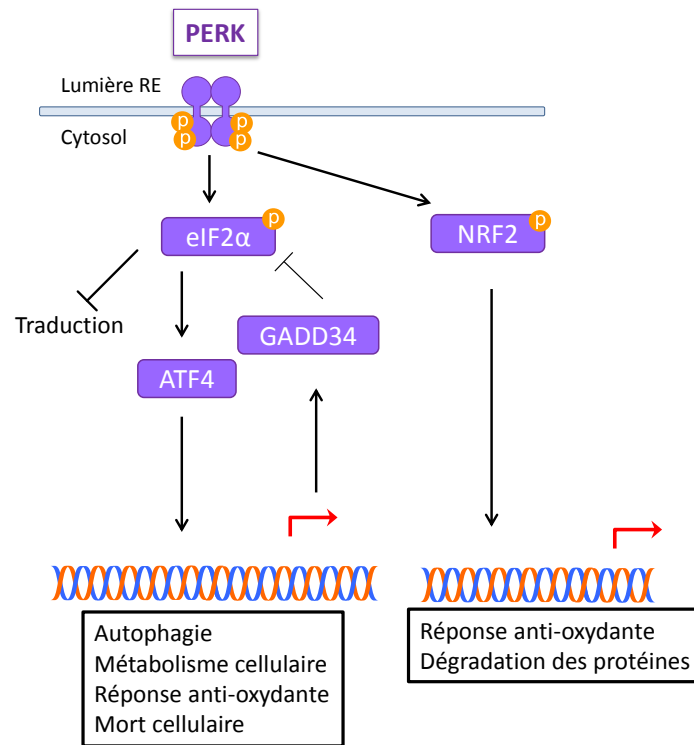


Figure 20 : La branche PERK de l'UPR.

3.3.1.2. La branche IRE1 α

IRE1 α est une sérine/thréonine kinase qui s'oligomérisse et s'autophosphoryle à la suite du détachement de GRP78 lors d'un stress protéique. Cela va permettre l'activation de son domaine RNase, à l'origine de la production du facteur de transcription XBP1s par l'épissage d'un intron de 26 nucléotides dans l'ARNm d'XBP1u, mais également à un processus de dégradation des ARNm appelé RIDD (*Regulated IRE1-Dependent Decay*) (199–201) (**Figure 21**).

Le facteur de transcription XBP1s est principalement impliqué dans l'expression de gènes pour la dégradation et le repliement des protéines, dans la biosynthèse des lipides

ainsi que dans la différenciation des plasmocytes. Cela se fait par sa liaison au motif ERSE (*ER stress Response Element*) et UPRE (*UPR Element*) présents sur les promoteurs des gènes cibles, en collaboration avec le facteur de transcription NF- κ B et ATF6 respectivement (202). Le motif ERSE est également présent sur le promoteur du gène codant pour XBP1, il induit donc sa propre transcription.

Concernant l'activité RIDD d'IRE1 α , elle contribue à la réduction du flux protéique lors d'un stress. Cependant, une augmentation de cette activité a été décrite lors d'un stress prolongé favorisant l'apoptose par la dégradation d'ARNm codant pour des protéines de pro-survie (203–205).

IRE1 α est capable d'interagir avec TRAF2 (*Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor-associated factor 2*) pour l'activation de JNK via ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating kinase 1*). Cette voie est notamment impliquée dans l'inflammation, l'autophagie et la mort cellulaire (206–210).

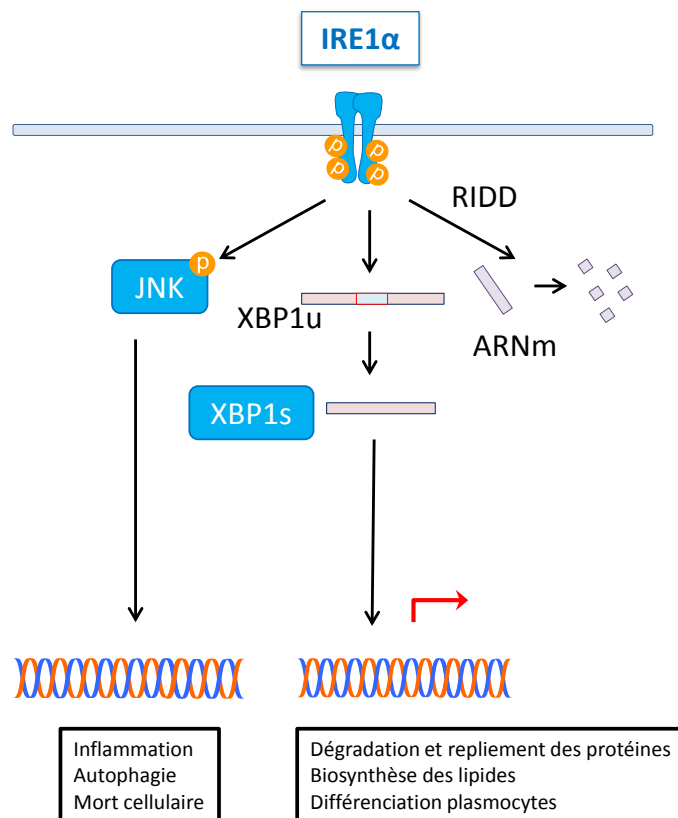


Figure 21 : La branche IRE1 α de l'UPR.

3.3.1.3. La branche ATF6

La dissociation de GRP78 à ATF6 permet de démasquer un signal d'adressage au golgi, où cette protéine se fera cliver par deux protéases résidentes S1P et S2P, permettant la libération d'ATF6f (fragment), un facteur de transcription (**Figure 22**) (211). Le transport et le clivage d'ATF6 est dépendant de son état d'oligomérisation et d'oxydoréduction (212). Ce facteur de transcription est impliqué dans l'induction de gènes pour le repliement, la sécrétion et la dégradation des protéines. Il se lie au motif ERSE de promoteurs en collaboration avec le facteur de transcription NF- κ B (213).

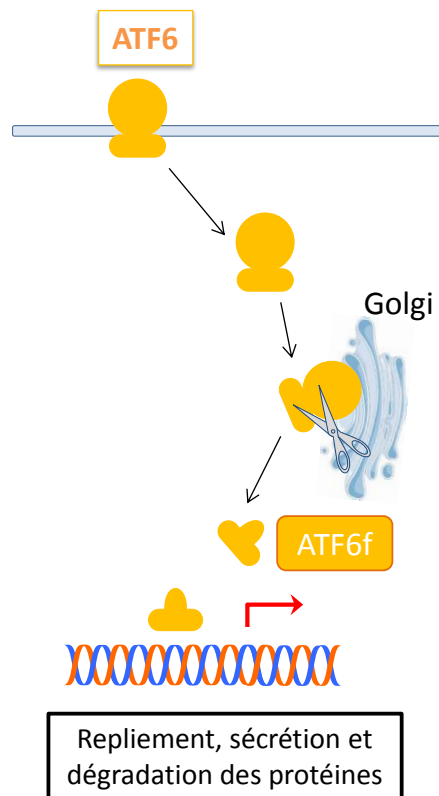


Figure 22 : La branche ATF6 de l'UPR.

3.3.2. La kinase GCN2 et la réponse à la privation en acides aminés (AAR)

Il existe 20 acides aminés communs requis pour la synthèse protéique, dont 9 considérés comme essentiels (Leu, Ile, Val, Lys, Thr, Trp, Phe, Met et His) car ils ne peuvent pas être produits par le métabolisme humain. La cystéine et la tyrosine sont considérées comme semi-essentiels car leurs synthèses, par transsulfuration et hydroxylation respectivement, est dépendante de deux acides aminés essentiels précurseurs Met et Phe respectivement. Un apport continu de tous les acides aminés est nécessaire pour le fonctionnement correct de la synthèse protéique.

3.3.2.1. Le senseur GCN2

La réponse aux acides aminés (AAR) est induite pour répondre à une déficience en acide aminés. GCN2 est une kinase qui est activée lors de faibles niveaux intracellulaires en acides aminés. En effet, la déplétion en acides aminés résulte en une augmentation des ARNt non chargés en acides aminés, qui lient alors le domaine histidyl-ARNt synthetase de GCN2, permettant l'activation du domaine kinase (214). Une étude récente a montré que les ribosomes, en particulier leurs parties P-stalk, pouvaient également activer GCN2 (215). L'activation de GCN2 permet alors la phosphorylation d'eIF2 α permettant l'arrêt de la synthèse protéique pour faire face à la déplétion en matières premières, les acides aminés. La phosphorylation d'eIF2 α permet cependant la traduction sélective d'ARNm comme celui codant pour le facteur de transcription ATF4 impliqué dans l'induction de gènes pour

l'adaptation à la privation en nutriments, comme l'induction de transporteurs d'acides aminés, ou encore d'enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés (**cf. partie 3.4 de l'introduction**).

GCN2 est également activé lors de radiations UV-B et UV-C résultant d'une phosphorylation d'eIF2 α . PERK de la voie UPR joue un rôle secondaire dans la phosphorylation d'eIF2 α en réponse aux UV (216). Cette phosphorylation serait impliquée dans la diminution de la traduction d'I κ B α et contribuerait ainsi à l'activation de la voie NF- κ B (216) (**Figure 23**). Cependant, les UV-C n'induiraient pas l'expression d'ATF4 malgré la phosphorylation d'eIF2 α , cela serait dû à l'induction de CEBP- β , un répresseur transcriptionnel (LIP) d'ATF4 lors de ce stress (217).

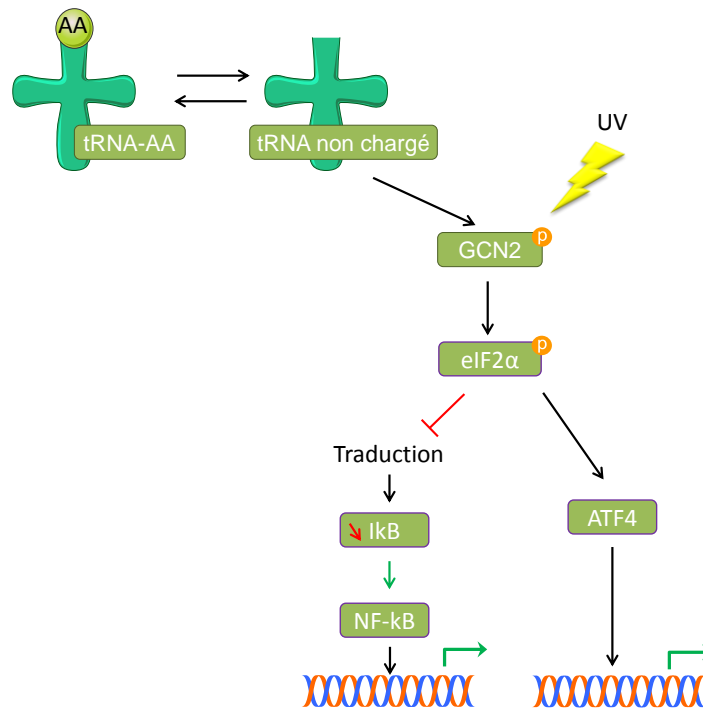


Figure 23 : Activation de la kinase GCN2.

Le facteur de transcription CEBP- β est induit lors d'une privation en acide aminés via ATF4 mais aussi lors d'un stress du RE (218,219). Il existe différents isoformes de CEBP- β dû à la présence de 3 codons d'initiation dans son ARNm : LAP (*liver-enriched transcriptional activated protein*) (35kDa), LAP* (38kDa) et LIP (*liver-enriched transcriptional inhibitory protein*) (20kDa) (**Figure 24**). Ce dernier se dimérise avec d'autres membres de la famille CEBP afin de les réprimer. Le ratio LIP/LAP serait déterminant pour le destin cellulaire. En effet, un faible ratio LIP/LAP serait observé dans les premières heures suivant un stress, et un ratio élevé LIP/LAP serait observé lors d'un stress prolongé et associé à la mort cellulaire (220,221). Ce ratio serait notamment contrôlé par la voie mTOR. Les différents isoformes de CEBP- β auraient une demi-vie courte du fait de leur dégradation par le protéasome cytoplasmique mais la liaison de LIP à CHOP le protégerait de sa dégradation et permettrait le transport nucléaire de CHOP pour effectuer son action sur ses gènes cibles (222,223).

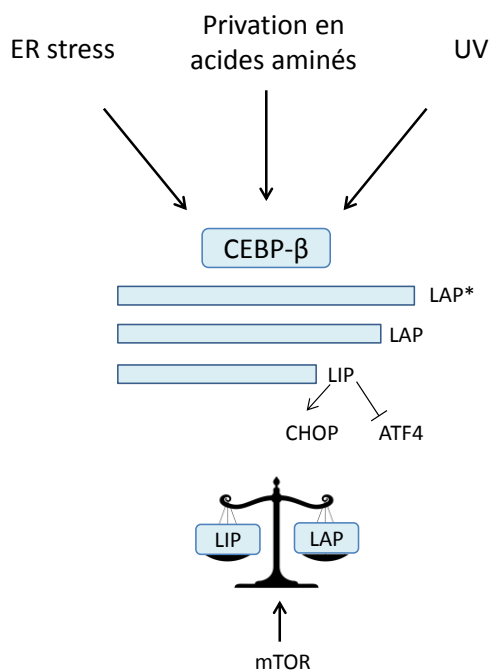


Figure 24 : Le facteur de transcription CEBP-β.

L'induction d'ATF4 lors de la privation en acides aminés par l'activation de GCN2 contribue à l'induction de gènes comme ceux codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés, des transporteurs d'acides aminés mais aussi d'autres facteurs de transcription contribuant à cette réponse AAR. Notamment, ATF4 induit l'expression de facteurs de transcription contribuant également à cette réponse comme le facteur ATF3. Celui-ci peut également être induit par d'autres facteurs de transcription de la famille ATF comme ATF2 ou ATF6. Il existe différents isoformes d'ATF3, tronquées ou non (224,225). L'isoforme non tronquée antagoniserait l'action d'ATF4 alors que l'isoforme tronquée ATF3ΔZIP3 favoriserait la réponse d'ATF4. En effet, les formes tronquées séquestre des corépresseurs de la transcription. De plus, l'induction d'ATF3 différerait entre le type de stress : une induction précoce et transitoire pour la réponse AAR, et une induction stable et continue pour l'UPR (226).

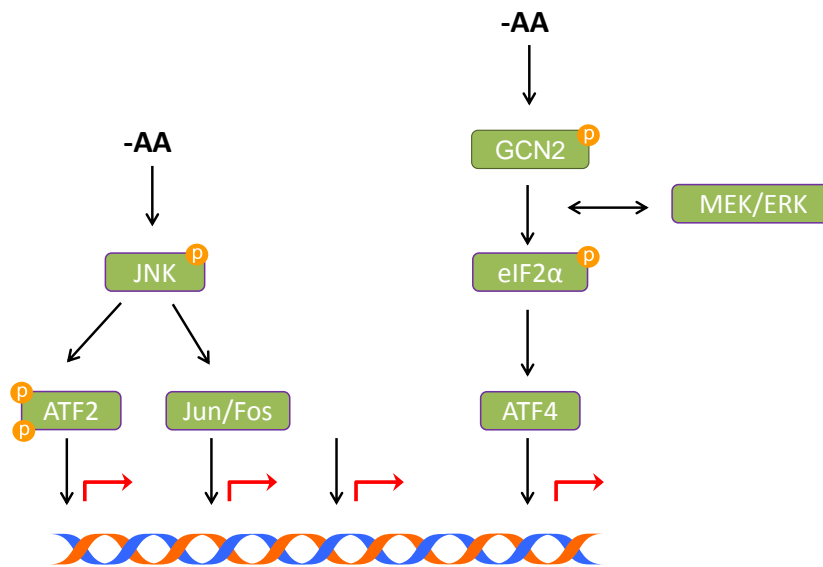
3.3.2.2. Le senseur MEK/ERK

Le système MEK (mitogen-activated protein kinase) / ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) répond également à la privation en acides aminés et aurait un lien étroit avec la voie GCN2-eIF2α. En effet, il a été démontré que l'inhibition de l'activation de MEK à la suite de la privation en acides aminés bloquait la phosphorylation d'eIF2α et la synthèse d'ATF4. De plus, il a été démontré que l'activation d'ERK par phosphorylation à la suite de la privation en acides aminés nécessitait l'activité kinase GCN2 (227).

Aussi, l'activation d'ERK et de JNK de la voie MAPK permet l'induction de facteurs de transcription comme JUN et FOS. L'expression de JUN contribue à une complète activation des gènes de la voie AAR par l'augmentation de l'expression de la protéine ATF4. De plus,

JUN s'hétérodimérise avec ATF2 pour l'activation de gènes, comme l'autorégulation de JUN. ATF2 est un facteur de transcription impliqué dans la réponse AAR en particulier des gènes cibles comme ATF3, CHOP, SARS, 4EBP1 et partiellement des gènes ASNS et YARS (225). Pour que celui-ci soit fonctionnel il doit être phosphorylé. Cette phosphorylation serait dépendante de la détection de la privation en acides aminés par des récepteurs couplés aux protéines G permettant l'activation de la voie Rac1/Cdc42/MEKK1/MKK7/JNK2/ATF2 (225) (**Figure 25**).

Enfin, la privation en acides aminés induit également l'expression du facteur de transcription cFOS (228). cJUN et cFOS appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription AP-1. Les protéines JUN (c-JUN, JUN-B et JUN-D) et les protéines FOS (c-FOS, FOS-B, FRA-1, FRA-2) peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser entre elles, mais aussi avec des protéines de la famille ATF pour activer ou réprimer des gènes cibles. JUN et FOS sont capables de s'hétérodimériser avec un autre facteur de transcription de l'ISR CHOP.



Réponse AAR

Figure 25 : Implication de MAPK dans la détection de la privation en acides aminés.

3.3.2.3. Le senseur mTORC1

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase présente dans deux complexes différents mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 est composé de mTOR, Raptor, PRAS40, Deptor et mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8* aussi appelée GβL) alors que le complexe mTORC2 est composé de mTOR, Rictor, de mLST8 et de mSIN1, Deptor et Protor1/2. C'est le complexe mTORC1 qui est impliqué dans l'intégration de signaux relatifs aux nutriments et est un régulateur clé dans la balance du métabolisme anabolique et catabolique. L'activation de ce complexe promeut la croissance en réponse à la disponibilité en nutriments (229) (**Figure 26**). Ainsi, contrairement à GCN2, mTORC1 est activé par la présence des acides aminés (230).

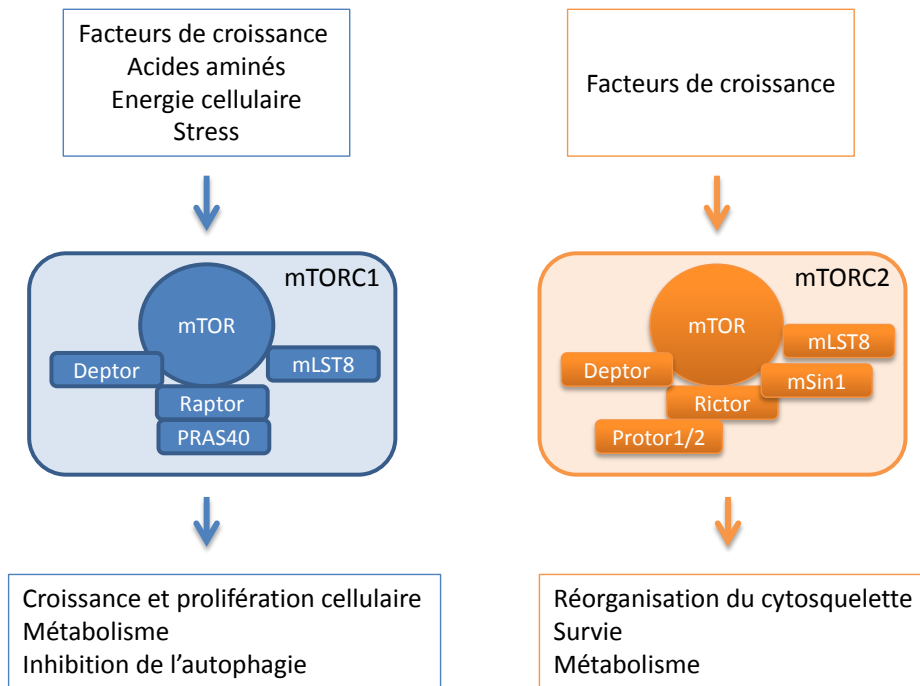


Figure 26 : Complexes mTORC1 et mTORC2.

3.3.2.3.1. Régulation de mTORC1

L'état d'activation du complexe mTORC1 est régulé par Rheb, pour la modulation de l'activité kinase de mTOR, et par des GTPases Rag pour sa localisation intracellulaire. Ainsi, lorsque l'environnement cellulaire est riche en nutriments, Rheb maintient sa liaison au GTP à la surface du lysosome et stimule l'activité kinase de mTORC1. C'est l'hétérodimère Rag qui recrute le complexe mTORC1 du cytosol au lysosome (231).

Activation par les facteurs de croissances

Les signaux de facteurs de croissance, ainsi que ceux de l'insuline ou de l'IGF-I, inhibent les complexes TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*). Ces complexes activent la GTPase de Rheb lysosomale conduisant à la conversion de Rheb-GTP actif en Rheb-GDP inactif. Ainsi, l'intégration de signaux par les facteurs de croissance ou l'insuline permet l'état actif de Rheb et donc contribue à l'activation de mTORC1 (232). Indépendamment de TSC et de Rheb, les facteurs de croissances peuvent moduler l'activité de mTORC1 par PRAS40. Ce dernier s'associe avec Raptor pour inhiber l'activité mTORC1. Les facteurs de croissance, par AKT, induisent une phosphorylation de PRAS40 inhibant son activité et permettant l'activation de l'activité kinase de mTORC1 (Figure 27) (232).

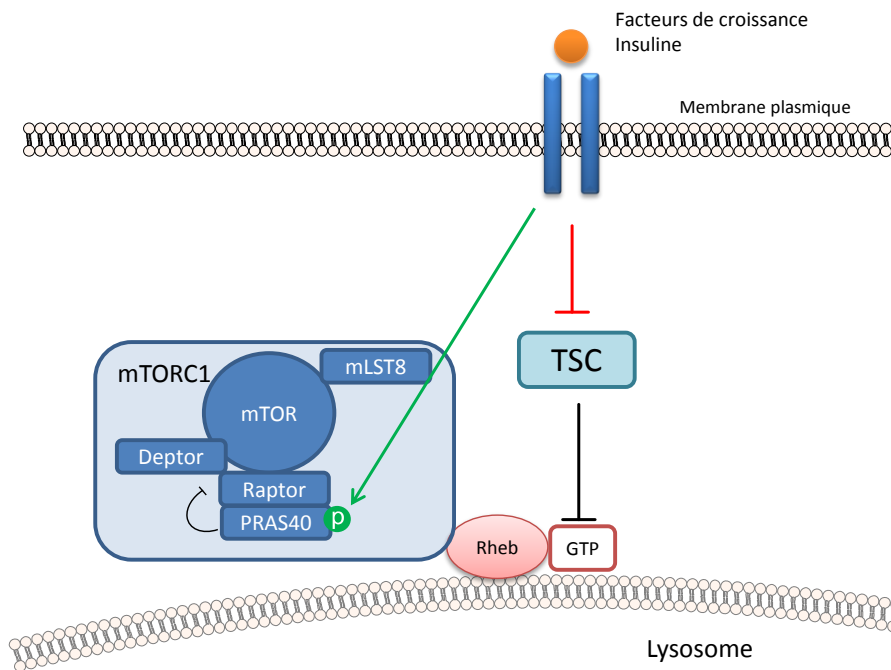


Figure 27 : Activation de mTORC1 par la présence de facteurs de croissance. Ces derniers inhibent les complexes TSC dont le rôle est de favoriser la forme inactive de Rheb au GDP. Cet état ne permet pas l'activation de mTORC1. De plus, les voies de signalisation aux facteurs de croissance permettent la phosphorylation de PRAS40 à l'origine de sa dissociation à Raptor et à l'inhibition de son activité inhibitrice sur l'activité de mTORC1.

Inhibition par la pénurie en énergie ou en oxygène

Lors de stress métabolique intense, la déplétion en ATP est perçue par le complexe AMPK, qui est un inhibiteur de mTORC1 par la phosphorylation de Raptor et d'indirectement TSC2. Le stress oxydatif peut aussi inhiber mTORC1 par l'augmentation de REDD1 (*Protein regulated in development and DNA damage response 1*) une protéine activatrice de TSC (232) (**Figure 28**). Cette sérine/thréonine kinase REDD1 est induite lors de différents stress, comme un stress oxydatif mais aussi lors d'un stress du RE, ou encore un stress nutritionnel. C'est CEBP- β et ATF4 qui contribueraient à l'induction de REDD1 (233–235).

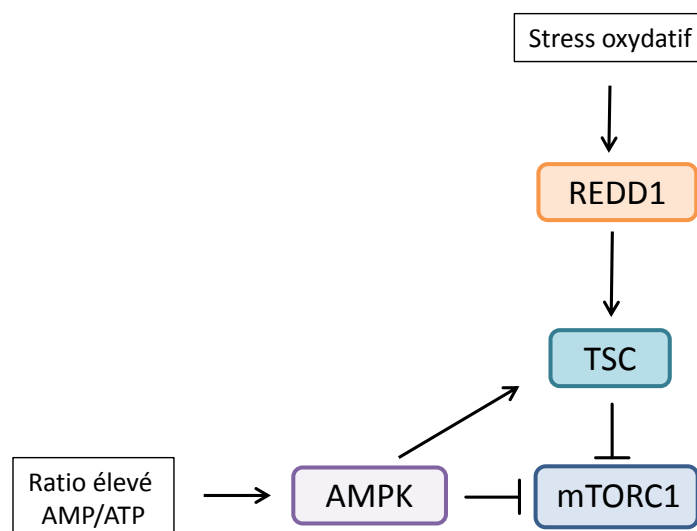


Figure 28 : Inhibition de mTORC1 lors d'une pénurie en énergie ou en oxygène.

Inhibition par la privation en nutriments

Les nutriments (acides aminés, nucléotides, vitamines) constituent des substrats de base pour la biologie. Les acides aminés jouent un rôle important dans la régulation de l'activité mTORC1 notamment via les Rag-GTPases (**Figure 29**) (232). Les protéines Rags sont des hétérodimères (RagA ou RagB est lié à RagC ou RagD) liées au lysosome par le complexe Ragulator. Les acides aminés moduleraient l'activité de Rags par des GAP (*GTPase-activating protein*) ou des facteurs d'échanges du GTP. Parmi les protéines GAP, le complexe GATOR1 (*GAP activity towards the Rags 1*) est le plus décrit. Lors de la baisse du niveau en acides aminés, GATOR1 hydrolyse le GTP lié à RagA/B et inhibe alors mTORC1. Un autre complexe GATOR2 antagonise la fonction de GATOR1.

Lors de la privation en leucine, le senseur cytosolique Sestrin 2 (Sen2), codé par le gène SESN2, lie et inhibe GATOR2, prévenant l'activation de mTORC1 au niveau du lysosome (236–238). Aussi, lors de la privation en leucine, la phosphorylation de la sestrin 2 pour la répression de mTORC1 serait dépendante d'ULK1 (237). La privation en acides aminés mais aussi un stress du RE par différents traitements, dont l'inhibiteur du protéasome bortezomib, serait responsable de l'augmentation de l'expression de la sestrin 2 médiée par ATF4 (239).

Le senseur de l'arginine CASTOR1 (*Cellular Arginine Sensor for mTORC1*) inhibe également GATOR2 en absence d'arginine (240).

Un autre senseur de l'arginine est SLC38A9, un senseur du niveau d'acides aminés dans la lumière lysosomale. Il réside à la membrane lysosomale et transporte les acides aminés neutres en dehors de cette organelle. Cet efflux contribuerait à la réactivation de mTORC1 après une privation prolongée (241,242). SLC38A9 collabore avec Ragulator pour contribuer à l'état actif de Rags.

Enfin, le senseur SAMTOR (S-adenylmethionine) de la méthionine régule négativement mTORC1 par sa liaison à GATOR1 (243).

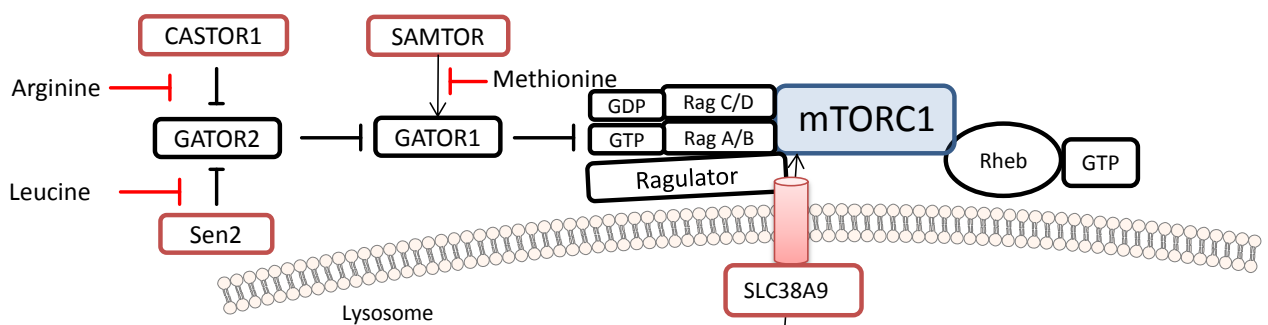


Figure 29 : Inhibition de mTORC1 par la privation en acides aminés perçue par différents senseurs (encadrés en rouge).

3.3.2.3.2. Fonctions de mTORC1

Le complexe mTORC1 joue un rôle dans la synthèse protéique, lipidique, nucléotidique ainsi que dans le métabolisme du glucose et l'autophagie (**Figure 30**). L'activation du complexe mTORC1 permet la prolifération et la croissance cellulaire.

Synthèse protéique

L'activation de mTORC1 permet la phosphorylation de deux protéines S6K1 (*Ribosomal protein S6 kinase beta-1*) et de 4E-BP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) pour permettre la traduction cap-dépendante.

En particulier, la protéine 4E-BP1 codée par le gène EIF4EBP1 est un compétiteur d'EIF4G sur EIF4E du complexe protéique cap-dépendant eIF4F impliqué dans l'initiation de la traduction. L'état de phosphorylation de la protéine 4E-BP1 conditionne son activité : une hypophosphorylation rend la protéine compétitrice d'EIF4E, et donc inhibe la traduction cap-dépendante, alors qu'une hyperphosphorylation rend cette protéine compétitrice inactive, permettant la formation du complexe EIF4F et donc la traduction cap-dépendante. Le complexe mTORC1, lorsqu'il est activé, permet la phosphorylation de 4E-BP1 et ainsi la traduction protéique (244). Ce gène présente un motif CARE dans son promoteur, son induction serait dépendante d'ATF4 (245).

Aussi, la phosphorylation de la protéine S6K1 par mTORC1 permet l'induction de la transcription de gènes impliqués dans la biogénèse ribosomale. De plus S6K1 active eIF4B impliqué dans la synthèse protéique (246).

Synthèse des lipides et des nucléotides

L'activation de mTORC1 contribue à la synthèse des lipides par SREBP1/2 (*Sterol regulatory element-binding protein*) et PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) pour permettre la génération de nouvelles membranes nécessaires pour la croissance cellulaire.

Lorsque les niveaux en stérols sont bas, le facteur SREBP transloque du RE au noyau pour induire des gènes impliqués dans la synthèse de lipides et du cholestérol. L'activation de mTORC1 induit la phosphorylation d'une protéine lipin 1. Cette phosphorylation inhibe ainsi sa fonction d'expulsion de SREBP du noyau (247). De plus, l'activation de mTORC1 contribue à la lipogénèse par le facteur de transcription PPAR γ par un mécanisme impliquant 4EBP1 (248).

De plus, l'activation de mTORC1 contribue à la synthèse nucléotidique, par un mécanisme ATF4 dépendant pour la synthèse des purines, S6K1 dépendant pour la synthèse des pyrimidines (249,250).

Métabolisme du glucose

L'activation de mTORC1 augmente la traduction du facteur de transcription HIF-1 α responsable de l'induction d'enzymes glycolytiques (251).

Autophagie

L'activation de mTORC1 inhibe le catabolisme par l'autophagie. Ainsi, l'activation de ce complexe induit la phosphorylation d'ULK1 (*Unc-51-like kinase 1*), d'ATG13 (*Autophagy-related protein 13*) et d'UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene protein*) inhibant l'autophagie (252,253) (cf. **partie 3.4.1 de l'introduction**).

ULK1 est une sérine/thréonine kinase impliquée dans l'induction de l'autophagosome et qui peut être régulée par de multiples facteurs de transcription comme p53 ou encore ATF4, et à la suite de différents types de stress, comme des dommages à l'ADN, de l'hypoxie, de la privation en nutriments ou encore à la suite d'un traitement par le bortezomib par exemple (233,254–256). L'état de phosphorylation d'ULK1 conditionne son activité. ULK1 peut être phosphorylé par le complexe mTORC1 inhibant son activité autophagique par son association avec AMPK, un senseur de l'énergie intracellulaire impliqué également dans son état de phosphorylation (257). Lors de la privation en nutriments, il a été décrit qu'ULK1 était déphosphorylé au niveau de la sérine 638 et de la sérine 758 et permettait l'activation aigue de l'autophagie (258).

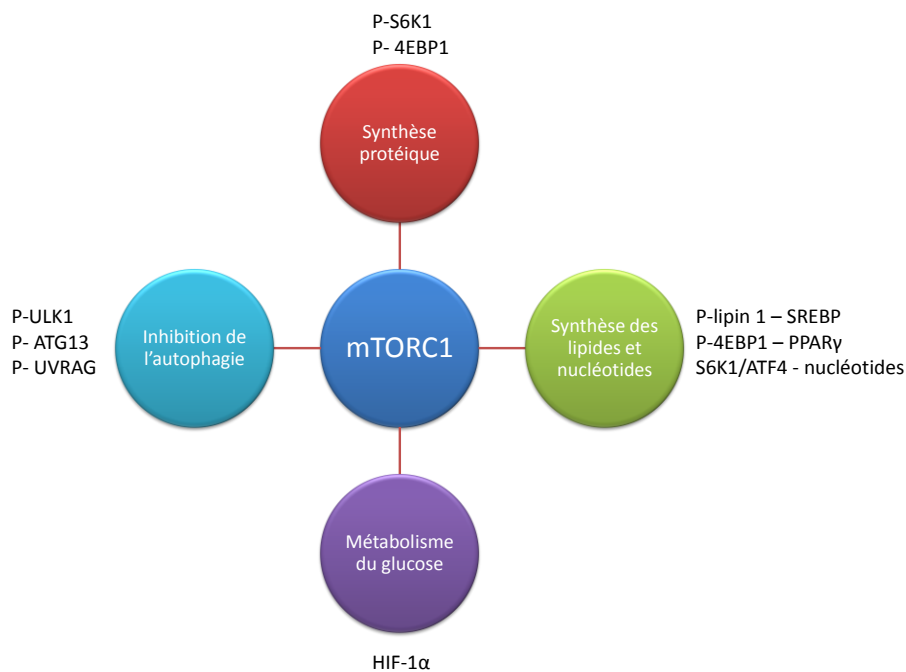


Figure 30 : Implication du complexe mTORC1 dans divers processus cellulaires.

3.3.2.1. Le senseur AMPK

Le système AMPK (*Adenosine 5-Mono-Phosphate-activated protein Kinase*) est un senseur de l'énergie intracellulaire (senseur du ratio ATP/AMP). L'augmentation de la disponibilité en glucose et en acides aminés conduit à une diminution de la phosphorylation d'AMPK (259). AMPK est un répresseur de la voie mTOR et est impliqué dans la régulation de l'autophagie.

Pour conclure, on remarque que des liens existent entre les différents senseurs de la privation en acides aminés comme AMPK, MEK/ERK, GCN2-ATF4 et mTORC1. Cependant, ces mécanismes semblent complexes du fait des différences entre les études, notamment par le type cellulaire étudié, ou encore par les différents traitements de privation ou de surexpression d'acides aminés et leurs cinétiques d'études (260).

3.3.3. PKR et réponse à l'infection virale

La sérine-thréonine kinase PKR (*Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase*) (EIF2AK2) est activée par la présence d'ARN double brins lors d'infections virales. La liaison des doubles brins d'ARN aux domaines de liaisons aux ARN doubles brins de PKR va entraîner son homodimérisation et son autophosphorylation. Cette enzyme activée va ensuite phosphoryler eIF2 α pour arrêter la synthèse protéique cellulaire et virale ainsi que la croissance cellulaire, et éventuellement induire l'apoptose de ces cellules infectées (261,262). Cependant, contrairement à PERK, HRI et GCN2 qui répondent à des stress plus spécifiques, PKR est activé par de nombreux stress, comme l'infection virale, l'infection bactérienne, l'inflammation, le stress mitochondrial, des dommages à l'ADN, la privation en nutriments, des ARN endogènes etc. (262–266). Aussi, contrairement aux autres kinases d'eIF2 α de l'ISR présentes dans le cytoplasme, PKR est également retrouvé dans le noyau.

De plus, PKR peut induire l'arrêt de la synthèse protéique et l'apoptose indépendamment de la phosphorylation d'eIF2 α . En effet, l'activation de PKR induit la phosphorylation de B56 α , qui induit une augmentation de l'activité de PP2A responsable de la déphosphorylation d'eIF4E inhibant ainsi la traduction (267). Aussi, PKR activé peut induire les voies FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*)/caspase-8/caspase-3 et caspase-9/APAF pour l'apoptose (**Figure 31**).

Ainsi, du fait de l'implication de PKR dans de multiples stress cellulaires, PKR régule de nombreuses voies de signalisation comme NF- κ B, p53, c-Myc, PP2A, RNAase A ou encore GSK3 par exemple (262,268,269).

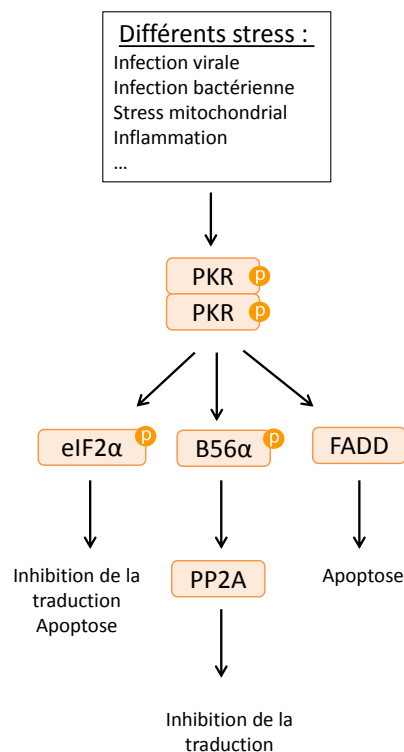


Figure 31 : Liste non exhaustive des effets de l'activation de PKR lors de différents stress.

3.3.4. HRI et réponse au stress oxydatif

La kinase HRI (EIF2AK1) est une kinase capable de lier l'hème (270). Quand la concentration en hème est faible, HRI est activée par autophosphorylation et génère ainsi des dimères. Quand le niveau en hème est important, la liaison de l'hème à HRI empêche sa phosphorylation et son activation. Son expression n'est pas seulement limitée aux érythrocytes car elle est exprimée dans plusieurs types cellulaires. L'induction de la phosphorylation d'eIF2 α permet la réduction globale de la synthèse protéique empêchant la production de chaînes α et β de globines dans les globules rouges, qui si elles sont produites en grandes quantités peuvent précipiter et former des inclusions créant une protéotoxicité. Aussi, HRI peut être également activée par la présence d'espèces réactives de l'oxygène ROS et par des protéines dénaturées. HRI est également nécessaire pour la différenciation de la lignée érythrocytaire. Ainsi, l'induction de la phosphorylation d'eIF2 α et d'ATF4 par cette kinase HRI permet une adaptation au stress oxydatif (271).

3.4. Le facteur de transcription ATF4

ATF4 appartient à la famille des facteurs de transcription ATF de la grande famille des facteurs de transcription AP-1, tout comme les facteurs de transcription de la famille FOS, JUN et MAF. Les facteurs de transcription de la famille ATF possèdent un domaine basic-leucine zipper (bZIP). Ils peuvent former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres facteurs bZIP comme CHOP, NRF2, ATF3 par exemple. Ils sont capables de se lier sur des motifs comme CARE (aussi appelé AARE, *CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF response elements*) présents sur les promoteurs de certains gènes (272). ATF4 est principalement responsable de la modulation de gènes impliqués dans l'autophagie, la réponse anti-oxydante, le métabolisme et la mort cellulaire (**Figure 32**). Ainsi, l'action d'ATF4 entre la survie et la mort est contexte dépendant. La modulation des différents hétérodimères ainsi que des modifications post-traductionnelles pourraient permettre de comprendre sa dualité d'action (273).

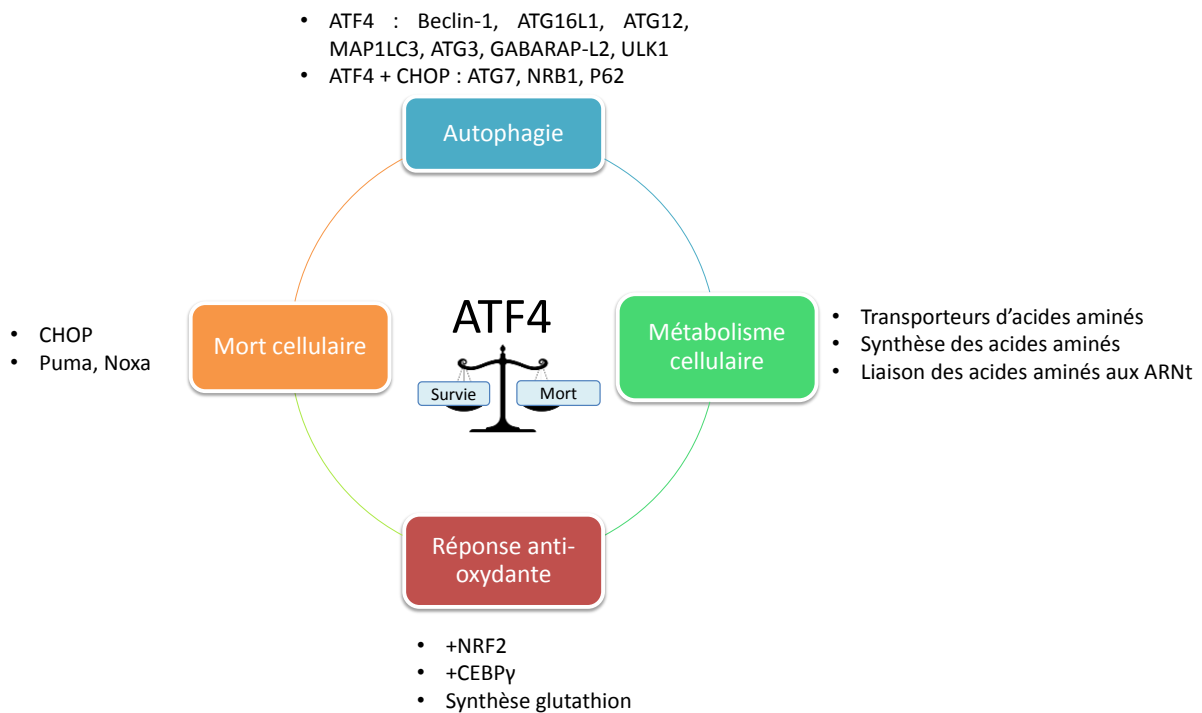


Figure 32 : Principaux rôles du facteur de transcription ATF4.

3.4.1. L'autophagie

L'autophagie est un processus adaptatif qui est induit en réponse à différentes formes de stress comme la privation en nutriments, la déplétion en facteurs de croissance, l'infection ou encore l'hypoxie. L'autophagie est également impliquée dans la dégradation des mitochondries endommagées mais aussi d'agrégats protéiques, comme les agrésomes. L'autophagie comprend différentes étapes, l'initiation, la nucléation du phagophore, l'expansion et l'élongation de la vésicule, ainsi que la maturation et la fusion avec le lysosome (274) (Figure 33).

L'initiation se réalise par le complexe ULK1 – ATG13 – ATG101 – FIP200 qui permet alors l'isolation de la membrane appelée phagophore, et qui avec le complexe PI3KC3 permet la nucléation, l'incurvation du pré-autophagosome, et la formation de l'autophagosome. Le complexe PI3KC3 est composé de VPS34, Beclin-1, AMBRA1, p115 et d'ATG14 (pour le complexe 1 PI3KC3), ou UVRAG (pour le complexe 2 PI3KC3), et permet la formation de PIP3 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*), nécessaire pour le recrutement d'effecteurs. L'expansion de l'autophagosome se réalise par le recrutement de deux systèmes de conjugaison, similaires au système d'ubiquitinylation des protéines. Le premier complexe est formé d'ATG12-ATG5-ATG16L1 qui permet à son tour le recrutement de protéines de la famille ATG8, comme LC3 et GABARAP (*Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*), à un lipide de la membrane de l'autophagosome, la phosphatidylethanolamine. Concernant la conjugaison de LC3, le précurseur proLC3 est clivé par la protéase ATG4B pour produire LC3-I situé dans le cytosol. Ensuite, LC3-I est conjugué de manière covalente à la phosphatidyléthanolamine de la membrane de l'autophagosome par ATG7 et ATG3 (enzyme E2). Cette conversion est une signature caractéristique de la

formation de membranes autophagiques. LC3-II permet le recrutement d'effecteurs pour la capture des substrats à éliminer par l'autophagie comme p62 (*Sequestosome-1*) ou NBR1 (*Next to BRCA1 gene 1 protein*).

Particulièrement, p62 est un adaptateur autophagique agissant comme un récepteur cargo pour la dégradation des substrats ubiquitinylés, et est donc continuellement dégradé par autophagie. Le gène codant pour la protéine p62 présente un motif ARE et un motif AARE dans son promoteur lui permettant d'être induit lors de différents stress (233,275,276). Cette protéine aurait aussi bien un rôle de protection que de promoteur de la mort cellulaire (277).

ATF4 est un facteur de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie comme Beclin-1, ATG16L1, ATG12, MAP1LC3, ATG3, GABARAP-L2, ULK1 (255,275). Son association avec un autre facteur de transcription CHOP permet l'induction de l'expression d'ATG7, NRB1, P62. CHOP est quant à lui responsable de l'induction d'ATG5, ATG10, GABARAP.

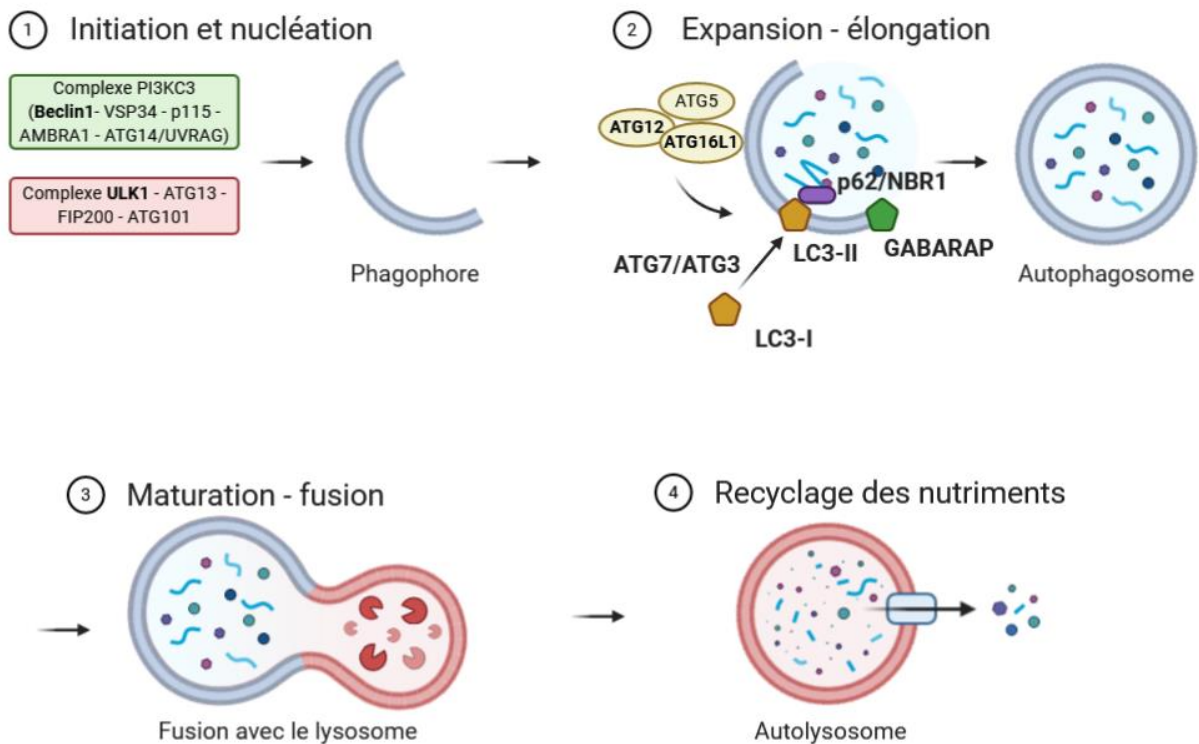


Figure 33 : Les différentes étapes de l'autophagie. Les protéines en gras sont modulées par le facteur de transcription ATF4.

3.4.2. Métabolisme cellulaire

ATF4 est responsable de l'induction de l'expression de transporteurs d'acides aminés, d'enzymes impliquées dans la synthèse d'acides aminés, dans la liaison des acides aminés aux ARNt, mais aussi dans le métabolisme glucidique.

Transporteurs d'acides aminés

Il existe plusieurs types de transporteurs membranaires d'acides aminés : les transporteurs d'acides aminés neutres (famille SNAT), les transporteurs d'acides aminés cationiques (famille CAT) et les transporteurs d'acides aminés anioniques. Par exemple, ATF4 induit l'expression de SLC38A2, SLC7A11 et SLC7A1.

SLC38A2 aussi appelé SNAT2 permet le transport sodium-dépendant d'acides aminés neutres. L'induction de sa transcription par ATF4 a été observée à la suite de la privation en acides aminés. Cependant, il semblerait que l'induction d'ATF4 lors d'un stress du RE n'induirait pas d'augmentation de la transcription de SNAT2 et que l'activation simultanée de l'UPR et de la voie AAR induirait un signal répressif sur la transcription de SNAT2 (278).

SLC7A11 aussi appelé xCT, est un transporteur cystine/glutamate sodium-indépendant. Il permet l'entrée de cystine du compartiment extracellulaire par l'efflux de glutamate. La cystine est alors rapidement convertie dans la cellule en cystéine, servant notamment à la synthèse de glutathion antioxydant. SLC7A11 peut être induit par la privation en acides aminés, excepté la méthionine et la phénylalanine, via ATF4 mais aussi lors d'un stress oxydant par le facteur de transcription NRF2 (195,279,280). C/EBP- γ participerait également avec ATF4 à l'induction de ce transporteur. Les inhibiteurs du protéasome ont été décrits comme étant des inducteurs de la transcription de SLC7A11 (195).

SLC7A1 aussi appelé CAT-1, est un transporteur sodium-indépendant de l'arginine, de la lysine, de l'ornithine et de l'histidine, et dont l'expression est induite par la privation de n'importe quel acide aminé essentiel, notamment par la liaison d'ATF4 sur le motif CARE de son promoteur (281). La transcription de CAT-1 est également augmentée lors de l'activation de l'UPR impliquant ATF4, mais aussi XBP1s par sa liaison sur un motif ressemblant à ERSE-II dans son promoteur (282). ATF3 et CHOP contribuent quant à eux, à l'atténuation de l'induction de CAT-1 (283,284).

Synthèse des acides aminés

Concernant la synthèse des acides aminés, ATF4 induit l'expression d'ASNS (*Asparagine synthetase*). Il s'agit d'une enzyme ubiquitaire qui catalyse la synthèse ATP dépendante de l'asparagine et du glutamate à partir de l'aspartate et de la glutamine (285). L'induction d'ASNS par ATF4 peut aussi bien se faire lors d'un stress du RE, lors d'un stress nutritif que lors d'un stress oxydant. D'autres facteurs de transcription comme CEBP- β , CEBP- γ , c-Jun peuvent également contribuer à cette induction (218,228,272,285,286).

ATF4 est également responsable de l'induction de gènes impliqués dans la transsulfuration, CBS (*Cystathionine beta synthetase*) et CTH (*Cystathionine gamma-lyase*), permettant la formation de cystéine à partir de la sérine et contribuant à la formation de GSH (glutathion). Le GSH est un tripeptide synthétisé à partir de la glycine, de la L-acide glutamique et de la L-cystéine (286–288). CEBP- β contribuerait à l'expression de CTH, alors que le facteur de transcription CEBP- β serait plutôt un répresseur (286).

3.4.4. Mort cellulaire

L'apoptose est une mort cellulaire programmée caractérisée par la condensation nucléaire et cytoplasmique en vésicules dont l'intégrité membranaire est préservée. Ces vésicules sont reconnues et dégradées par les macrophages de l'environnement de l'environnement pour maintenir une homéostasie tissulaire. L'apoptose peut être induite par une voie extrinsèque, activée par des signaux de morts extracellulaires, ou par une voie intrinsèque mitochondriale (**Figure 35**). L'activation de ces voies permet l'activation de la caspase 3 effectrice, une protéine à cystéine qui induit la protéolyse de nombreuses protéines.

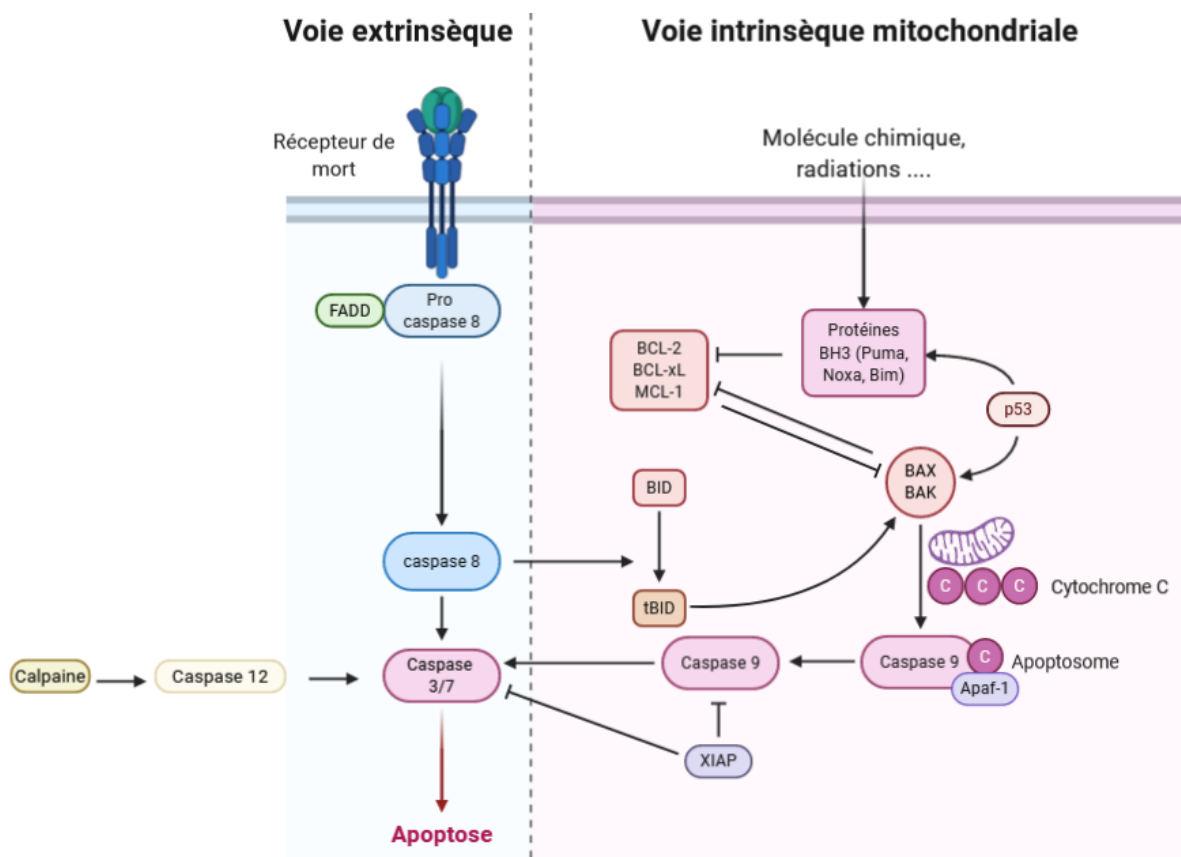


Figure 35 : Présentation schématique de la réponse apoptotique.

ATF4 est responsable de l'induction de CHOP, un facteur de transcription de la famille des facteurs de transcription C/EBPs (*CCAAT-enhancer-binding proteins*). Ces facteurs de transcription possèdent tous un domaine bZIP leur permettant de se lier à l'ADN. Cette famille se compose de 6 membres CEBP α , β , γ , δ , ϵ ainsi que CHOP (C/EBP homologous protein) (295). Le facteur de transcription CHOP possède un motif ERSE et un motif CARE dans son promoteur, il est donc induit lors de l'ISR par d'autres facteurs qu'ATF4 comme ATF2 par exemple (225,296). CHOP a un rôle de répresseur d'ATF4 pour certains gènes, mais aussi d'ATF3 et des facteurs C/EBP par la formation d'hétérodimères inactifs (297).

CHOP est un facteur de transcription impliqué dans le processus de mort cellulaire (298). L'augmentation de son expression importante et persistante dans le temps promeut l'apoptose de la cellule. CHOP inhibe l'expression de gène codant pour des protéines anti-

apoptotiques BCL-2 et augmente l'expression de protéines pro-apoptotiques (299–301). De plus, CHOP active ERO1 α qui peut activer la mort cellulaire induite par le calcium.

CHOP et ATF4 induisent l'expression de GADD34 impliqué dans la boucle de rétrocontrôle négatif d'eIF2 α . Une déphosphorylation trop rapide entraîne un retour de la synthèse protéique trop rapide par rapport à la résolution du stress, qui peut aggraver et contribuer à la mort cellulaire (290).

CHOP et ATF4 contribuent à l'induction de TRIB3 (*Tribbles homolog 3*), par la présence d'un motif AARE dans son promoteur. TRIB3 est une pseudokinase impliquée dans différents processus cellulaires après différents stress métaboliques (302). TRIB3 serait notamment un ligand de p62 de l'autophagie et interférerait avec sa fonction de protéines cargo pour la dégradation par l'autophagie (303). TRIB3 agirait comme un régulateur négatif par la répression de gènes induits par ATF4 comme CHOP ou ASNS (304). Cependant, il serait impliqué dans la mort cellulaire dépendante de CHOP (305). De plus, les produits de clivage de TRIB3 par la caspase 3 sont impliqués dans une boucle de rétrocontrôle positif de l'activation de la caspase 3 et 9. Cependant, cette pseudokinase présenterait une dualité d'action car sa forme non tronquée permettrait la translocation de la procaspase 3 du cytoplasme au noyau afin d'empêcher son activation (268).

CHOP et ATF4 contribuent à l'induction d'ATF5, préférentiellement traduit lors de la phosphorylation d'eIF2 α . Ce facteur de transcription est impliqué dans l'induction de protéines apoptotiques comme Noxa, et APAF-1 (307).

ATF4 est également essentiel à l'induction de protéines pro-apoptotiques comme Puma et Noxa (308,309). ATF4 contribue à la dégradation de la molécule anti-apoptotique XIAP (*X-linked Inhibitors of apoptosis*), contribuant à la mort cellulaire. La phosphorylation d'eIF2 α participe également à la diminution de l'expression de XIAP par l'inhibition de sa traduction (310).

3.5. La réponse intégrée au stress et les inhibiteurs du protéasome

La mort cellulaire induite par les inhibiteurs de protéasome peut être attribuée à l'accumulation de protéines poly-ubiquitinylées dans la cellule, à l'inhibition de la voie NF- κ B ainsi qu'à la pénurie en certains acides aminés, en particulier l'asparagine et la cystéine (116). Ainsi, les inhibiteurs de protéasome sont responsables de l'induction de la réponse au stress intégré (ISR) (307). En particulier, il a été décrit que les inhibiteurs du protéasome étaient responsables de l'induction de l'UPR et en particulier de la voie PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP pour induire la mort cellulaire (66,311). Les inhibiteurs du protéasome sont aussi responsables de l'induction de l'autophagie par cette voie ISR. Cette induction serait un mécanisme de survie par la dégradation de l'accumulation de protéines mal-conformées au sein d'une sous structure appelée agrésome (134,312,313).

4. La série chimique de boosters de l'apoptose induite par des anticancéreux

Le laboratoire U1177 a pour objectif de découvrir et de valider de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'initier des programmes de découverte de médicament. Ainsi, pour répondre au besoin thérapeutique insatisfait du myélome multiple, et du cancer en général, le laboratoire s'est intéressé à la protéine multifonctionnelle IDE et a synthétisé plusieurs séries chimiques d'inhibiteurs de cette enzyme. En effet, cette protéine pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du cancer.

4.1. Insulin-degrading enzyme : une protéine aux multiples facettes

IDE (*Insulin-Degrading Enzyme*), aussi appelée insulysine, est une métalloprotéase ubiquitaire à zinc de 110 kDa appartenant à la famille M16 des métalloprotéases (M16.002, EC 3.4.24.56) (314). Comme son nom l'indique, cette enzyme a été découverte pour sa capacité à dégrader l'insuline (315). IDE est exprimée dans la majorité des tissus et ne présenterait pas de spécificité d'expression tissulaire (316). La séquence d'IDE est remarquablement conservée dans de nombreuses espèces, incluant celles qui ne produisent pas de substrats connus comme la tomate (317,318), suggérant des effets plus larges que sa simple action catalytique (**Figure 36**). De nombreuses études sur cette protéine vont dans ce sens et démontrent qu'IDE est une protéine multifonctionnelle (319).

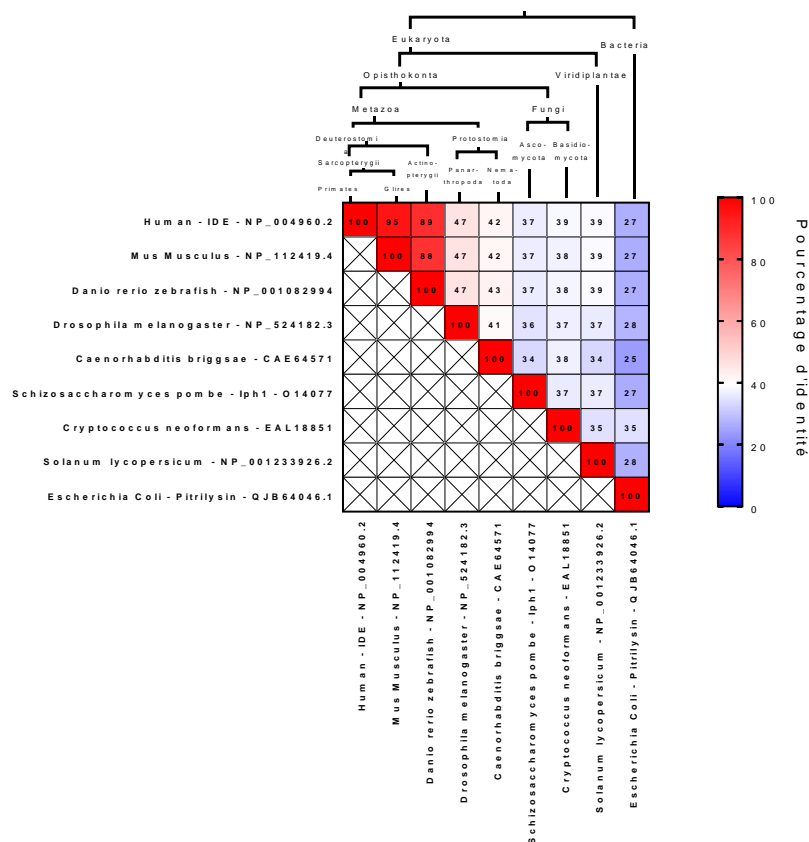


Figure 36 : Pourcentage d'identité des séquences protéiques déterminé par le logiciel BLAST de NCBI entre la protéine IDE humaine et d'autres espèces appartenant à des catégories différentes de l'arbre phylogénétique. L'identifiant des séquences pour chaque protéine est mentionné.

4.1.1. Structure d'IDE

4.1.1.1. Le site catalytique

Le site catalytique d'IDE est constitué d'acides aminés de la partie N-terminale et C-terminale qui coordonnent la liaison au zinc. Le domaine de liaison au zinc d'IDE est formé des acides aminés HXCEH (His108 – X – Cys110 – Glu189 – His112). Les acides aminés Glu111 et Arg824 participent également à la cascade catalytique. Contrairement à la majorité des métalloprotéases qui possèdent un domaine de liaison au zinc « HEXXH », IDE possède un domaine de liaison inversé « HXXEH » (320).

4.1.1.2. L'exosite

IDE possède un exosite, très conservé entre les espèce, situé à 30A° du site catalytique qui permet l'ancrage et le bon positionnement de certains substrats pour leurs dégradations (321,322). Ce fonctionnement n'est cependant pas possible pour les petits substrats de moins de 12 acides aminés comme la bradykinine ou l'enképhaline.

4.1.1.3. Les différentes conformations d'IDE

IDE existe sous deux conformations : une conformation dite fermée où le site catalytique n'est pas accessible, et une conformation dite ouverte qui permet l'internalisation du substrat (**Figure 37**). Une fois ce dernier fixé, l'enzyme adopte la conformation fermée pour permettre la reconstitution du site catalytique et l'hydrolyse du substrat. Les produits de dégradation sont ensuite libérés par l'adoption de la conformation ouverte d'IDE (318,322,323). Aussi, IDE est capable de s'oligomériser en dimère et en tétramère. La forme tétramérique a une activité réduite par rapport à la forme dimérique qui pourrait s'expliquer par une stabilisation de la conformation fermée (318,324,325).

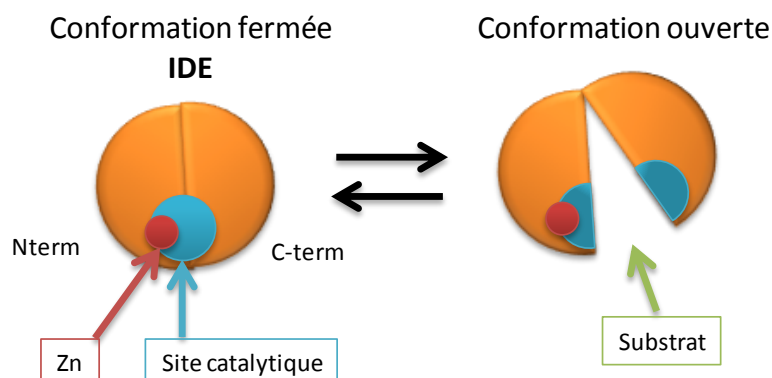


Figure 37 : Représentation schématique des conformations ouvertes et fermées d'IDE inspiré de la publication de Deprez-Poulain et al., Nat Commun. 23 sept 2015;6:8250 (326).

4.1.1.4. Autres particularités structurales

IDE peut lier des anions polyphosphates comme l'ATP sur un site allostérique distinct du site actif. Ce dernier favoriserait la transition de la forme fermée à la forme ouverte d'IDE et serait alors un activateur d'IDE pour les petits substrats (323,327–329). Aussi, treize cystéines sont présentes dans la structure primaire d'IDE humaine, celles-ci ne sont pas forcément conservées entre les espèces. IDE peut ainsi être inactivée par oxydation, par nitrosylation et par alkylolation (330).

4.1.2. Localisation cellulaire d'IDE

IDE est présente principalement dans le cytosol mais est également retrouvée au niveau de l'endosome (331,332), de la mitochondrie (333), du peroxyosome (334), dans le noyau (333,335) ainsi qu'au niveau de la membrane plasmique (336), et serait aussi excrétée mais cela est controversé (337–340). Elle est ainsi impliquée dans l'élimination de protéines oxydées dans le peroxyosome, dans la dégradation de peptides mitochondriaux, dans l'amélioration de la liaison des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux androgènes à l'ADN et sert de récepteur pour le virus de la varicelle (333–335,341).

4.1.3. Les substrats d'IDE

IDE dégrade l'insuline en plusieurs fragments avec une haute affinité ($\sim 100\text{nM}$) (28). IDE est également responsable de la dégradation de nombreux autres peptides physiologiques comme le peptide β amyloïde, le glucagon, la somatostatine, l'amyline, le TGF- α (*Transforming growth factor alpha*), IGF-II, la bradykinine, la β -endorphine, le CGRP (*α -Calcitonin Gene-Related Peptide*), l'ubiquitine, la dynorphine, ou encore le peptide natriurétique atrial (ANP) (322,330,342–348). Les substrats d'IDE seraient donc des substrats amyloïdogéniques, de moins de 70 acides aminés, sans charges positives significatives du côté C-terminal pour éviter la répulsion de charge avec la partie C-terminale d'IDE, et possèderaient une flexibilité conformationnelle (318,321). Ainsi, IDE par l'hydrolyse de ces substrats pourrait être impliquée dans l'homéostasie du glucose, des protéines, dans la nociception ainsi que dans la vasotonie.

4.1.4. Un rôle de protéine chaperon

IDE est surexprimée à la suite de différents stress comme un choc thermique, un stress oxydant, mais aussi à la suite de la privation en sérum dans différentes lignées cellulaires. Cette induction suit celle d'une protéine de choc thermique HSP70, suggérant un rôle de protéine chaperon à IDE (349). Aussi, lors d'un choc thermique IDE est transloquée du cytosol au réticulum endoplasmique (350). Cette observation peut faire écho à l'observation de l'homologue d'IDE de la levure, qui est impliqué dans la réponse à un stress du RE par la tunicamycine par un mécanisme indépendant de son site catalytique et

dépendant du complexe TORC1 (351). De plus, la formation d'un complexe stable entre IDE et le monomère d'Aβ ainsi qu'avec les oligomères d'α-synucléine, indépendamment de sa catalyse, suggèrent qu'IDE pourrait être une chaperon terminale en prévenant l'agrégation toxique de ces derniers (352,353).

4.1.5. Modulation du système ubiquitine-protéasome

Plusieurs études montrent un lien étroit entre IDE et l'UPS. Concernant l'ubiquitine, il est admis que cette protéine est un ligand d'IDE, et qu'elle pourrait être un de ses substrats, mais cette dernière observation est controversée (348,354,355). Aussi, IDE serait capable de former des molécules de di-ubiquitine et aurait ainsi une activité de type E1 (*Ubiquitin-activating enzyme*) mais ne serait pas capable de former des chaînes poly-ubiquitine (356,357). De plus, la quantité de protéines poly-ubiquitinylées est diminuée après la transfection de cellules SHSY5Y avec un siRNA IDE (349). Cette dernière observation pourrait s'expliquer par la modulation du protéasome par IDE.

En effet, IDE interagit avec le protéasome 26S et 20S et serait un compétiteur du protéasome 19S pour la liaison au 20S (349,358,359) (**Figure 38**). L'activité du protéasome 20S est alors impactée par cette liaison de manière bimodale : à faible concentrations d'IDE (<30nM) son activité serait inhibée alors que l'ajout de plus grandes concentrations d'IDE (>50nM) augmenterait son activité (359). D'autres observations de la modulation de l'activité du protéasome par IDE ont été faites. Par exemple, la transfection de cellules SHSY5Y avec un siRNA IDE augmente les trois activités du protéasome 26S, chymotrypsine, trypsine, et caspase, et cette modulation n'implique pas son site catalytique (350). Un autre exemple est l'inhibition du protéasome par l'insuline, qui pourrait s'expliquer par le fait que la liaison de l'insuline à IDE limiterait l'interaction de cette dernière avec le protéasome, réduisant ainsi l'activation du protéasome par IDE (358,360).

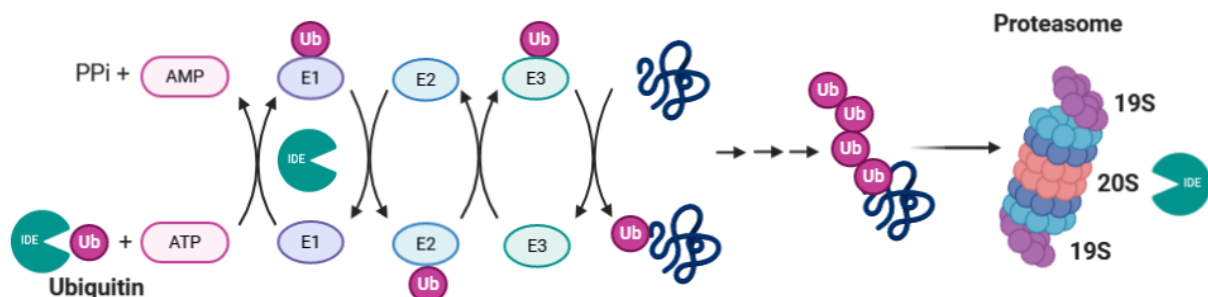


Figure 38 : Schéma représentant les liens entre la protéine IDE et le système ubiquitine-protéasome.

Ainsi, on constate que la modulation du système UPS par IDE semble certaine, mais complexe, et nécessiterait des investigations supplémentaires pour comprendre celle-ci dans des conditions physiologiques et dans des conditions de stress.

4.2. Implication d'IDE dans la physiopathologie du cancer

Tout d'abord, IDE semble être exprimée dans la plupart des cancers (361,362). L'étude de l'expression de l'ARN d'IDE par *The Cancer Atlas Genome* montre une faible spécificité vis-à-vis des 17 types de cancers analysés (**Figure 39**). De plus, une forte expression d'IDE dans le cancer de l'endomètre et du colon aurait un pronostic favorable de survie des patients (363) (**Figure 40**).

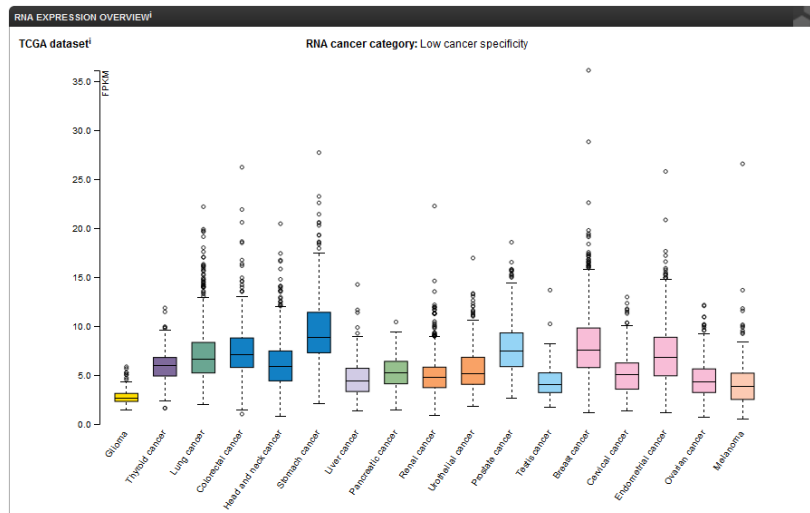


Figure 39 : Niveau d'expression de l'ARN d'IDE en fonction des différents tissus cancéreux déterminé par *The Cancer Atlas Genome* et dont l'aperçu est disponible sur le site de *The Human Protein Atlas*.

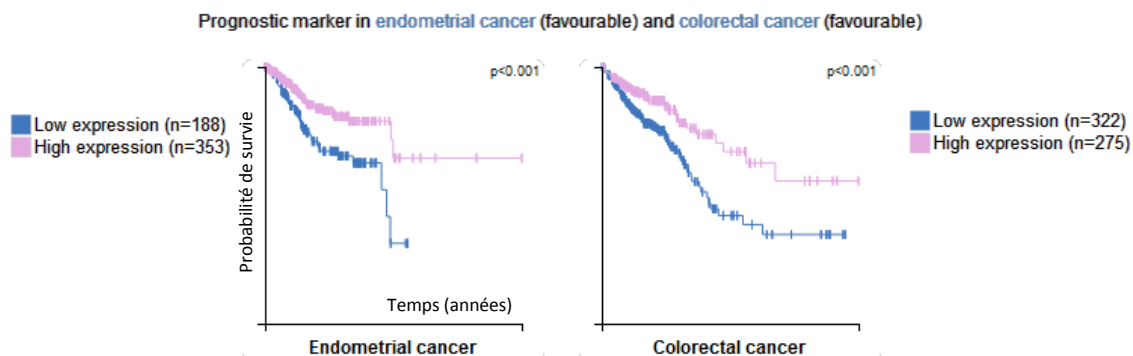


Figure 40 : Analyse de survie de patients atteints d'un cancer de l'endomètre ou d'un cancer colorectal et ayant une forte expression en ARNm d'IDE (rose) ou une faible expression en ARNm d'IDE (bleu) (utilisation du seuil proposé par *The Human Protein Atlas*). Les graphiques montrent la probabilité de survie en fonction du temps de survie (années).

Cependant, l'étude réalisée par le Dr. Moreaux (Institut de génétique humaine, UMR9002, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Montpellier) dans le myélome multiple, cancer non étudié par *The Human Protein Atlas*, montre un fort taux d'expression du gène d'IDE dans ces cellules cancéreuses de patients ($p < 0.01$), ainsi que dans les lignées cellulaires de myélome multiple ($p < 0.01$), par rapport aux cellules saines de plasmocytes ou au stade pré-malin MGUS. De plus, une forte expression d'IDE chez des patients atteints de myélome multiple en rechute, puis traités en monothérapie par le bortezomib, est associée à une plus faible survie dans une cohorte de 188 patients (**Figure 41**) (364). Cette observation rejoint celle décrite dans la littérature où la présence accrue d'IDE est observée dans les tissus mammaires néoplasiques par rapport au tissu sain (365), ainsi que celle où IDE est surexprimée dans des tumeurs du système nerveux central et associée à leurs agressivités (349).

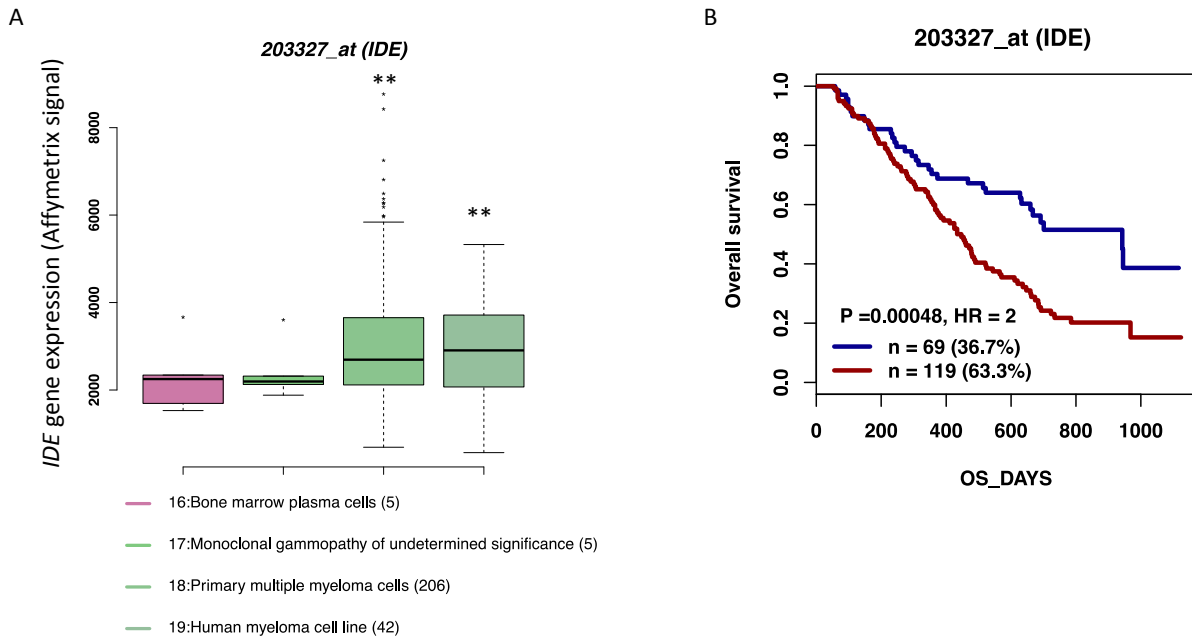


Figure 41 : Valeur pronostique de l'expression génique d'IDE dans le myélome multiple. A. IDE est significativement surexprimée dans les cellules primaires de MM de patients (n=206) et dans les lignées cellulaires de MM (n=42), en comparaison aux plasmocytes sains de la moelle osseuse et au stade pré-malin de gammopathie monoclonale d'origine indéterminée (MGUS) (** : $p < 0.01$). B. Haut niveau d'expression d'IDE dans les cellules de myélome multiple de patients ayant une faible survie globale dans une cohorte de patients en rechute, traités par le bortezomib en monothérapie (cohorte Mulligan, n=188).

Pourquoi IDE est-elle surexprimée dans des cellules cancéreuses ? Est-ce qu'IDE jouerait un rôle dans la croissance et dans la progression tumorale ? Aussi, est-elle mutée et/ou fonctionnelle dans ces cellules cancéreuses qui la sur-expriment ?

Une hypothèse pourrait être que la présence d'IDE serait corrélée à la présence du facteur de croissance insuline, décrit pour ses effets prolifératifs des cellules cancéreuses et qui induit l'expression d'IDE comme régulateur négatif (366–368). Dans ce cas, IDE pourrait ainsi avoir un rôle de suppresseur de tumeurs (365). Une autre explication serait qu'IDE module des facteurs impliqués dans la prolifération comme PTEN (369) ou la protéine du rétinoblastome (370). En effet, IDE serait impliquée dans la dégradation de PTEN lors d'un stress nutritionnel en collaboration avec l'histone déacétylase SIRT4 (*NAD-dependent protein lipoamidase sirtuin-4, mitochondrial*) permettant la survie des cellules cancéreuses (369).

L'inhibition d'IDE dans les cellules cancéreuses pourrait être favorable. En effet, l'inhibition d'IDE par siRNA dans une lignée cellulaire de neuroblastome SHSY5Y diminue leurs proliférations et induit la mort de ces cellules (349). Aussi, l'inhibition enzymatique d'IDE par un complexe de platine [Pt(O,O'-acac)(γ -acac)(DMSO)] réduirait la viabilité de cellules cancéreuses de neuroblastomes (371). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer le lien entre l'inhibition d'IDE et l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses, mais le développement de composés inhibiteurs d'IDE pour le traitement du cancer serait intéressant.

4.3. Des composés inhibiteurs d'IDE

4.3.1. Les composés inhibiteurs d'IDE dans la littérature

Différents inhibiteurs d'IDE ont été décrits dans la littérature mais aucun d'entre eux ne présentent une sélectivité, une puissance ainsi que des propriétés satisfaisantes pour l'étude *in cellulo*. On peut ainsi citer de manière non exhaustive l'ebesen, le cefmetazole, le rabeprazole, li1, 6bk et NTE-1.

Li1 est un inhibiteur peptidomimétique d'IDE (Ki de 1,7nM) mais du fait de sa faible perméabilité il n'a pas été étudié dans des essais cellulaires (372). Il en va de même pour le composé 6bK un peptide macrocyclique qui se lie au niveau de l'exosite d'IDE (IC₅₀ de 50nM) (373,374).

Le cefmetazole et le rabeprazole présentent quant à eux de faibles puissances (IC₅₀ de 7μM et 11μM respectivement) (375).

L'ebesen est un composé sélénorganique qui réalise des liens covalents avec les cystéines. Ce composé est un inhibiteur puissant d'IDE (IC₅₀ de 42nM) mais sa liaison à IDE dans les cellules est très faible, ceci peut s'expliquer par la titration de ce composé par les thiols dans les cellules (375).

Le composé NTE-1 est un inhibiteur d'IDE (IC₅₀ de 4nM) qui se lie aux deux exosites d'IDE et dont l'activité a été évaluée chez l'animal (376).

4.3.2. Le chef de file BDM 44768 et ses analogues

Le laboratoire INSERM U1177 a conçu plusieurs séries chimiques de modulateurs d'IDE, comme des ligands de l'exosite et du site catalytique (377) mais aussi des inhibiteurs se liant dans le site catalytique dont le chef de file est le BDM_44768, découvert par KTGS (*Kinetic Target-guided synthesis*) (326) (**Figure 42**). La fonction acide hydroxamique de ce composé chélate le zinc de l'enzyme. Il s'agit donc d'un inhibiteur du site catalytique d'IDE qui maintient IDE dans sa conformation fermée. Enfin, l'engagement d'IDE par ce composé a été démontré par la phénocopie entre les effets du composé et les effets d'un KO (*knockout*) génétique d'IDE chez la souris, ainsi que par l'absence d'effets du composé chez la souris KO IDE (326).

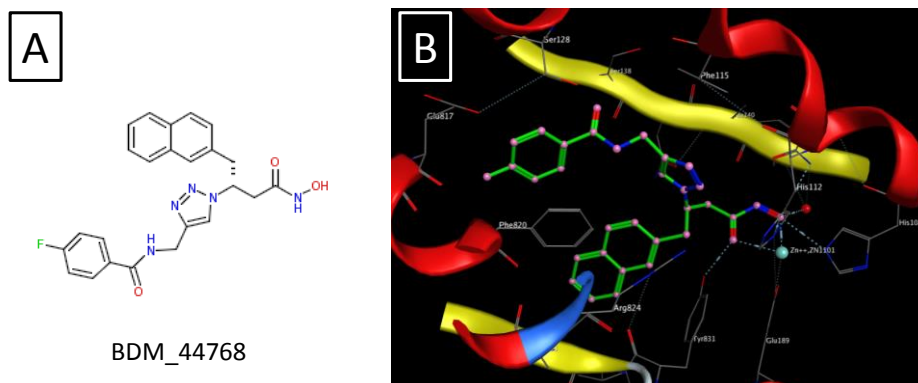


Figure 42 : A. Structure du BDM_44768. B. Co-cristallisation du BDM_44768 et de la protéine IDE (PDB : 4NXO).

De nombreux analogues du BDM_44768 ont été conçus au laboratoire et certains ont été utilisés comme outils pharmacologiques lors de cette thèse pour caractériser le mode d'action de ces petites molécules. Leurs principales caractéristiques sont décrites dans le **tableau 12**. Le composé A est un analogue du BDM_44768 dont la puissance *in vitro* a été améliorée. L'efficacité *in vitro* est détaillée dans la **partie suivante 4.4 de l'introduction**. Le composé B présente également une efficacité *in vitro* améliorée par rapport au BDM_44768 mais surtout des propriétés pharmacocinétiques favorables pour l'étude *in vivo*. Le composé C est un analogue du BDM_44768 mais n'engage pas la protéine IDE (activité enzymatique et mesure de la liaison du composé à IDE dans les cellules par la technique de CETSA (*Cellular Thermal Shift Assay*)), et présente également une efficacité *in vitro*.

		BDM_44768	composé A	composé B	composé C
Engagement d'IDE	Activité enzymatique IC ₅₀ ATTO (nM)	250	100	206	74000
	CETSA ΔTagg (°C)	6.73 ²	7.77 ¹	5.88 ²	0.82 ¹
Propriété physico-chimique	Solubilité (μM)	58	14	200	163
Efficacité <i>in vitro</i>	Ratio CC ₅₀ OPM2 24H CFZ 15μM	1.99 (n=3)	2.98 (n=3)	3.2 (n=1)	1.8 (n=1)
Propriétés ADME/ PK	Stabilité plasmatique (h)	> 6	> 6	> 6	> 6
	Cl _{int} (μL/min/mg)	203	121	881	406
	AUC _{0→4h} (min*ng/mL)	8547	2673	13767	ND
	T _{1/2} (min)	80	82	44	ND

Tableau 12: Principales caractéristiques du BDM_44768 et de ses analogues par rapport à l'engagement d'IDE, aux propriétés physico-chimiques, à l'efficacité *in vitro* et aux propriétés ADME/PK. ¹ 15μM de composé et ² 30μM de composé. Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés après l'injection en intrapéritonéal des composés dans le DMSO, à la dose de 30mpk (mg/kg) pour le BDM_44768, 50 mpk pour le composé A et 37 mpk pour le composé B chez des souris C57Bl6/J pour les composés A et B, et C57Bl6/N pour le BDM_44768. L'AUC (aire sous la courbe) est normalisée par mpk de composé administré. ND = non déterminé. ΔTagg : différence des températures d'agrégations de la protéine IDE dans les cellules OPM2 traitées pendant 2h avec le composé d'intérêt ou du DMSO. Clint : clairance intrinsèque (dose / AUC).

4.4. Utilisation de ces composés pour le traitement du cancer

Au vu de la littérature et de l'éventuelle implication d'IDE dans le cancer, le BDM_44768 et ses analogues ont été testés sur des lignées cellulaires cancéreuses, seuls, ou en association avec des agents cytotoxiques. Il s'est révélé que les composés de la série chimique ne présentent pas d'effets cytotoxiques seuls, mais boostent la cytotoxicité d'agents anticancéreux. On parle d'effet boost car les composés seuls n'ont pas d'effets, on ne peut donc pas parler d'effet synergique ou d'effet additif. Ainsi, dans ce contexte, l'évaluation d'un effet boost peut s'apprécier par la mesure des ratios des concentrations efficaces 50 (EC₅₀, concentration responsable de 50% de l'effet), qui dans notre cas s'appelle « CC₅₀ » (concentration cytotoxique 50) car l'effet correspond à de la cytotoxicité, ou par le ratio des aires sous la courbe (AUC) à l'issue d'expérience dose-réponse avec le cytotoxique (**Figure 43**).

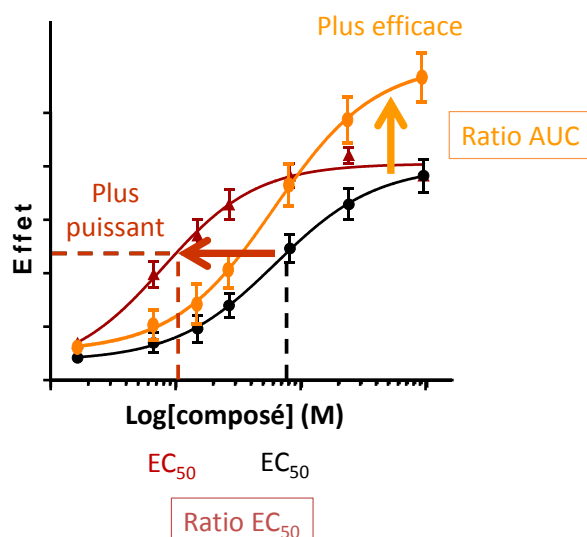


Figure 43 : Graphique présentant le terme « boost » lors de la combinaison d'un agent inactif dit « booster » et d'un agent actif. La courbe d'efficacité de l'agent actif par rapport au log de sa concentration montre une courbe sigmoïde. Lorsque cet agent actif est combiné à un agent dit « booster » la sigmoïde peut être décalée vers la gauche (la puissance est améliorée) et/ou décalée vers le haut (l'efficacité est améliorée). La mesure d'un effet « booster » s'apprécie par le ratio des EC_{50} (concentration efficace 50) et/ou du ratio des aires sous la courbe (AUC).

En particulier, nous quantifions les cellules en apoptose par l'utilisation du NucView™ 488, un substrat de la caspase 3, perméable et non toxique, et qui, lorsqu'il est clivé, libère une partie capable de se fixer à l'ADN dans le noyau, à l'origine de l'émission d'une fluorescence. Cette dernière est mesurée à l'aide d'un microscope à fluorescence InCell 6000, et la quantification est réalisée à l'aide du logiciel d'analyse d'images Columbus™. Ainsi, l'apoptose est suivie en cinétique.

4.4.1. Boost du carfilzomib dans différentes lignées cellulaires cancéreuses

Tout d'abord, ces composés chimiques ont été testés en combinaison avec le carfilzomib, un inhibiteur du protéasome, sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, de myélome multiple (humain : OPM2, U266, LP1 et murin : 5T33MMvt, MOPC315), du cancer de l'utérus (HeLa), du cancer du sein (MDA-MB231-LUC, MCF-7), de glioblastome (U87) et de mélanome de chien (TLM-1). La **figure 44** présente la combinaison du carfilzomib avec le composé A à différentes doses. Ce dernier ne présente pas de toxicité seul sur l'ensemble des lignées cellulaires, sauf sur les cellules OPM2 à la concentration la plus forte de 15 μ M. On constate que le composé A booste de manière dose dépendante le carfilzomib sur l'ensemble des lignées cellulaires testées. L'évaluation du boost mesuré par le ratio des CC_{50} met en évidence des boosts allant de 2 à 5 pour ce composé en fonction des lignées de cellules cancéreuses (**Tableau 13** :).

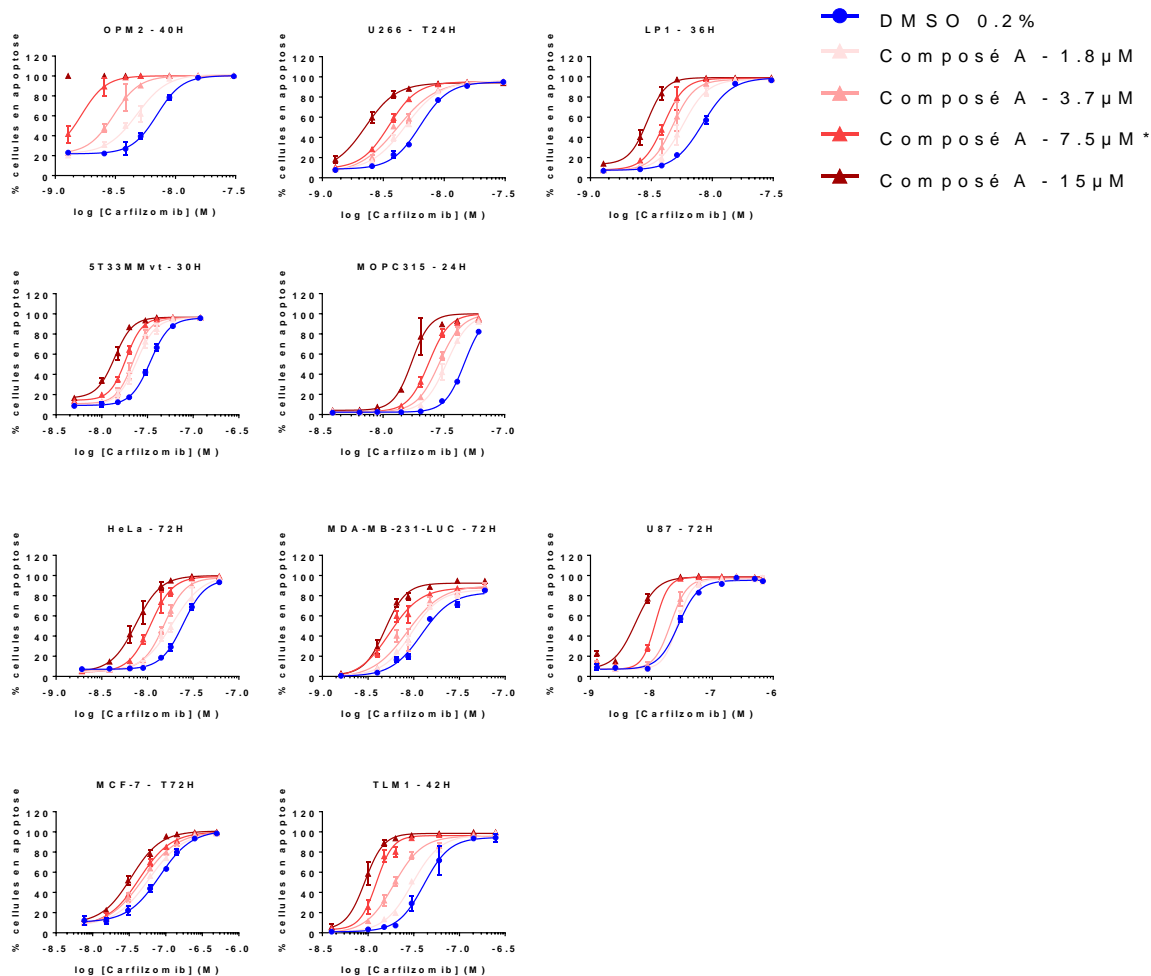


Figure 44 : Pourcentage de cellules en apoptose du carfilzomib seul ou associé à différentes concentrations en composé A sur différentes lignées cellulaires à différents temps de cinétique. * : 7.1μM en composé A pour les lignées HeLa et MCF-7 et 7.8μM pour les lignées TLM-1, U87, MOPC315, 5T33, MDA-MB-231-LUC.

Lignée cellulaire	CC ₅₀ CFZ (nM)	CC ₅₀ CFZ + composé A (nM)	Ratio des CC ₅₀
U87	27.84 [26.23 à 29.46]	5.49 ^{b,d} [4.78 à 6.28]	5.07
TLM-1	40.82 [35.82 à 46.59]	9.24 ^b [8.21 à 9.85]	4.42
OPM2	7.03 [6.70 à 7.37]	1.65 ^{a,d} [1.53 à 1.79]	4.26
HeLa	24.51 [23.64 à 25.45]	7.51 ^b [6.9 à 8.13]	3.26
LP1	8.32 [7.98 à 8.66]	2.93 ^b [2.81 à 3.06]	2.84
U266	6.36 [6.10 à 6.65]	2.26 ^b [1.89 à 2.46]	2.82
MOPC315	46.74 ^c [46.2 à 47.29]	17.23 ^b [16.17 à 18.35]	2.71
MDA-MB231-LUC	12.17 [10.98 à 13.76]	4.87 ^b [4.52 à 5.23]	2.5
5T33MMvt	34.01 [33.12 à 34.93]	13.84 ^b [13.18 à 14.5]	2.46
MCF-7	82.38 [75.89 à 89.42]	33.81 ^b [30.96 à 36.73]	2.44

Tableau 13 : Concentration cytotoxique 50 (CC₅₀) du carfilzomib seul et du carfilzomib associé au composé A à 15μM pour toutes les lignées, excepté pour la lignée cellulaire OPM2 où la CC₅₀ a été déterminée lors de la combinaison du carfilzomib au composé A à 7.5μM. Les intervalles de confiance à 95% des CC₅₀ sont indiqués. L'ensemble de ces expériences a été réalisé une fois en utilisant des triplicats techniques. Les CC₅₀ ont été déterminées par le logiciel GraphPad Prism après une régression non linéaire à 4 paramètres. ^a : combinaison du carfilzomib avec 7.5μM de composé A ; ^b : combinaison du carfilzomib avec 15μM de composé A ; ^c : seuil haut fixé à 100% ; ^d : seuil bas fixé à la valeur du véhicule.

Ainsi, ces résultats présentent un boost de l'apoptose du carfilzomib sur l'ensemble des lignées testées, nous sommes donc en mesure d'émettre l'hypothèse que les particularités génétiques de ces lignées ne sont pas impliquées ou peu impliquées dans le mécanisme de boost apoptotique du carfilzomib par nos composés.

4.4.2. Comparaison du boost de deux inhibiteurs de protéasome

Le BDM_44768 boost le carfilzomib sur l'ensemble des lignées présentes à la **figure 45**. Cependant, on constate que la toxicité du bortezomib n'est pas boostée par ce composé sur certaines lignées, en particulier les lignées cellulaires de myélome multiple (U266, 5T33MMvt et OPM2), où les intervalles de confiance de la CC_{50} du BTZ seul et du BTZ associé au composé se chevauchent. Sur l'ensemble des lignées cellulaires testées, le boost du bortezomib est inférieur au boost du carfilzomib (**Tableau 14**).

Au vu de ces résultats et des différences décrites dans la littérature entre le bortezomib et le carfilzomib (**partie 2.2.3 de l'introduction**), on peut émettre l'hypothèse qu'une explication du mécanisme d'action des composés boosters de la série chimique des inhibiteurs d'IDE réside dans ces différences de mécanisme d'action entre le bortezomib et le carfilzomib.

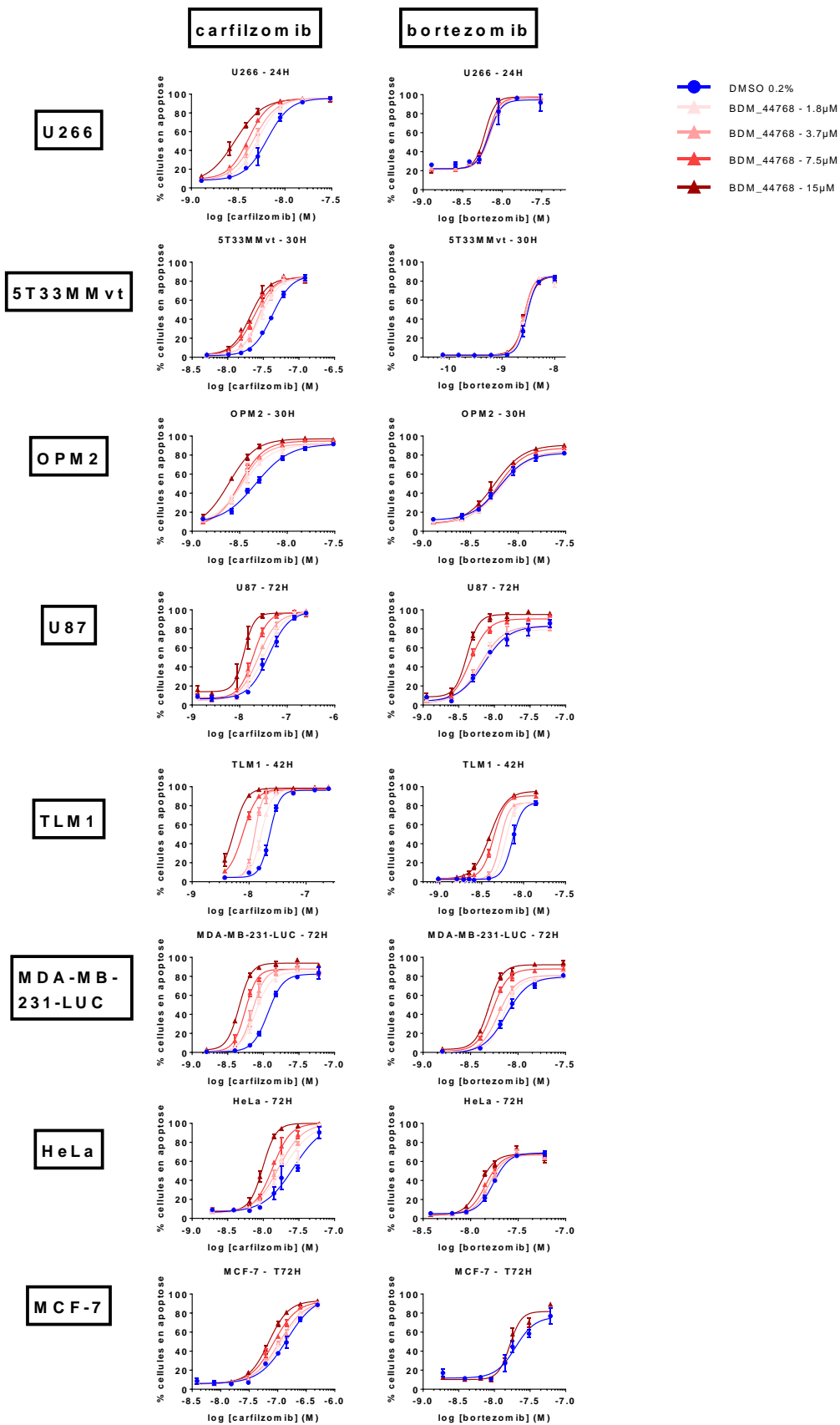


Figure 45 : Pourcentage de cellules en apoptose du carfilzomib seul ou du bortezomib seul, associés à différentes concentrations en BDM_44768 sur différentes lignées cellulaires à différents temps de cinétique. Les graphiques présentent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats techniques.

		U266	5T33MMvt	OPM2	U87	TLM1	MDA-MB-231-LUC	HeLa	MCF-7
CFZ	CC ₅₀ CFZ nM	6.47 [6.04 à 6.94]	42.18 [40.74 à 43.76]	4.67 [4.32 à 5.05]	33.05 [30.19 à 36.36]	23.06 [22.42 à 23.73]	11.63 [11.1 à 12.19]	26.54 [23.22 à 30.41]	145.4 [126.7 à 175.8]
	CC ₅₀ CFZ + BDM_44768 nM	2.93 [2.64 à 3.16]	20.72 [19.17 à 22.35]	2.43 [2.22 à 2.58]	12.39 [11.23 à 13.65]	5.40 [5.12 à 5.67]	4.58 [4.42 à 5.93]	9.86 [9.58 à 10.14]	70.11 [67.12 à 73.19]
	Ratio CC ₅₀	2.21	2.04	1.92	2.67	4.27	2.54	2.69	2.07
BTZ	CC ₅₀ BTZ nM	6.84 [6.13 à 7.59]	2.96 [2.86 à 3.06]	6.35 [5.91 à 6.84]	7.07 [6.18 à 8.15]	7.33 [6.98 à 7.57]	7.51 [7.1 à 7.96]	17.35 [16.94 à 17.8]	19.75 [16.44 à 25.87]
	CC ₅₀ BTZ + BDM_44768 nM	6.08 [5.84 à 6.32]	2.78 [2.65 à 2.94]	5.61 [5.25 à 6.02]	4.12 [3.84 à 4.54]	3.98 [3.89 à 4.08]	4.92 [4.73 à 5.13]	12.48 [11.53 à 13.42]	16.41 [15.29 à 19.06]
	Ratio CC ₅₀	1.13	1.06	1.13	1.72	1.84	1.53	1.39	1.20

Tableau 14 : CC₅₀ du carfilzomib (CFZ) seul et du carfilzomib associé au BDM_44768 à 15µM avec l'intervalle de confiance à 95%. CC₅₀ du bortezomib (BTZ) seul et du bortezomib associé au BDM_44768 à 15µM avec l'intervalle de confiance à 95%. L'ensemble de ces expériences a été réalisé une fois (n=1) en utilisant des triplicats techniques. Les CC₅₀ ont été déterminées par le logiciel GraphPad Prism après une régression non linéaire à 4 paramètres.

4.4.3. Combinaison avec d'autres agents anti-cancéreux

4.4.3.1. Des inhibiteurs d'HDAC

Le composé A est capable de booster l'apoptose induite par des inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC) dans des cellules de myélome multiple humaines OPM2. En particulier, une augmentation de l'efficacité de ces inhibiteurs est observée, qui seuls n'induisent pas à la concentration maximale testée plus de 72.5%, 54.5% et 43.5% de cellules en apoptose pour le panobinostat, quisinostat et CAY10603 respectivement. Alors que quasiment 100% de cellules en apoptose sont retrouvées lors de l'association avec 7.5µM de composé A (**Figure 46**).

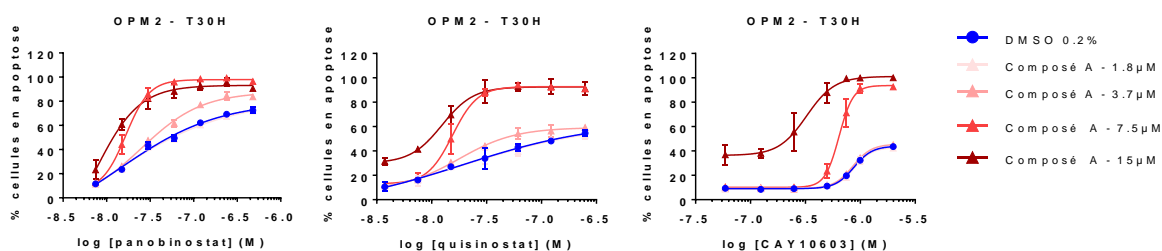


Figure 46 : Pourcentage de cellules OPM2 en apoptose traitées pendant 30h avec différents inhibiteurs d'HDAC, associés à différentes concentrations en composé A. Les graphiques présentent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats techniques

4.4.3.2. Un agent stressant du réticulum endoplasmique

Le composé A est capable de booster l'apoptose induite par la tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation et décrit comme étant un agent stressant du RE. Une augmentation de la puissance et de l'efficacité de la tunicamycine est observée lors de l'association avec le composé A. En effet, seule la tunicamycine à la dose maximale testée est responsable de 40.6% de cellules en apoptose alors que l'association avec le composé A à 7.5µM est responsable de 88.6% de cellules en apoptose pour cette même dose en tunicamycine (**Figure 47**).

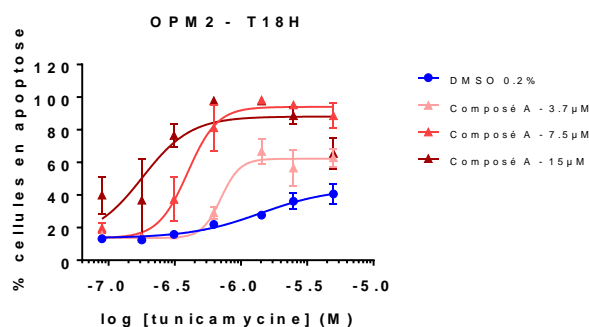


Figure 47 : Pourcentage de cellules OPM2 en apoptose après un traitement pendant 18H avec la tunicamycine seule ou associée à différentes doses en composé A. Le graphique présente la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats techniques. Le graphique a été obtenu après une régression non linéaire à 4 paramètres par le logiciel GraphPad Prism et dont le plateau bas a été fixé au pourcentage de cellules en apoptose pour la condition DMSO et dont la pente est inférieure à 6.

4.4.3.3. Des agents immunomodulateurs

Le lenalidomide et la dexaméthasone sont deux agents immunomodulateurs utilisés dans le traitement du myélome multiple. La mesure de l'apoptose dans les cellules OPM2 de ces agents en combinaison avec le BDM_44768 à 15µM a été évaluée (**Figure 48**). Ces agents n'ont pas induit d'apoptose de ces cellules, ce qui est cohérent avec leurs mécanismes d'actions. Ainsi, dans ces expériences nous n'avons pas non plus observé d'effet de combinaison avec le BDM_44768. L'effet combinatoire des composés de la série chimique avec ces agents immunomodulateurs pourrait s'évaluer par d'autres mesures *in vitro*, comme par exemple la sécrétion de molécules inflammatoires et/ou dans des modèles animaux.

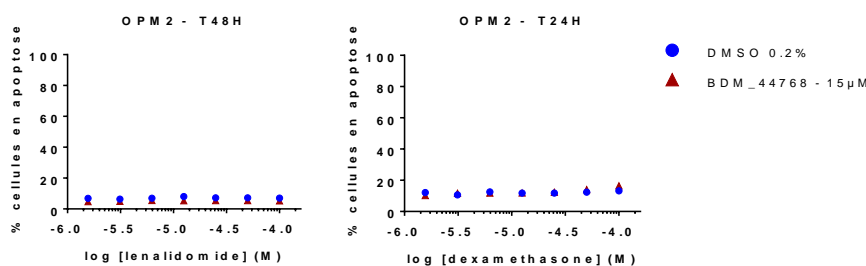


Figure 48 : Pourcentage de cellules OPM2 en apoptose après un traitement pendant 48H ou 24H avec le lenalidomide ou la dexaméthasone seuls ou associés à 15µM en BDM_44768 respectivement. Les graphiques présentent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats techniques.

4.4.3.4. Triple combinaison

Une triple combinaison entre le composé A, le panobinostat et le carfilzomib a été réalisée sur les cellules OPM2. On remarque qu'aux doses testées les trois agents seuls présentent peu ou pas de toxicité sur ces cellules après 24h de traitement. Les doubles combinaisons induisent un léger effet cytotoxique alors que la triple combinaison induit fortement l'apoptose de ces cellules (**Figure 49**).

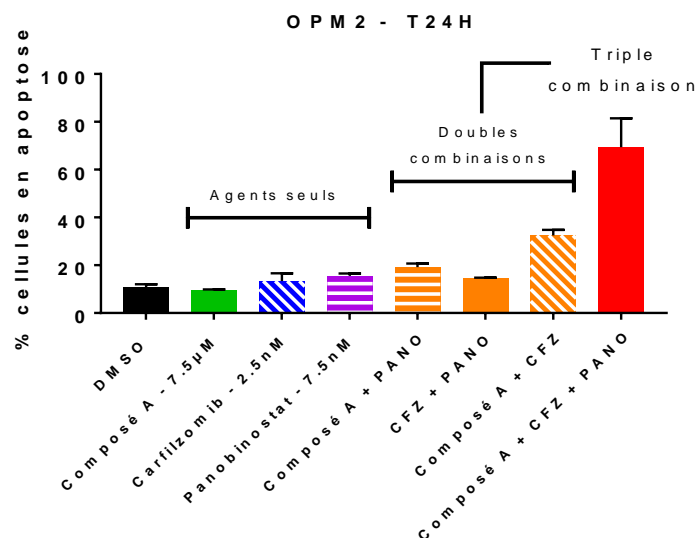


Figure 49 : Pourcentage de cellules OPM2 en apoptose après 24H de traitement avec le composé A à 7,5µM, le carfilzomib à 2,5 nM et le panobinostat à 7,5nM seuls ou associés entre eux. L'histogramme présente la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats techniques.

Objectifs de la thèse

Au regard des éléments développés dans **la partie 4 de l'introduction**, les molécules de la série chimique des inhibiteurs d'IDE présentent un intérêt thérapeutique pour le traitement du cancer en association avec des agents cytotoxiques. En particulier, le développement de ces molécules pour le traitement du myélome multiple où le besoin médical est insatisfait représente un enjeu thérapeutique majeur. L'effet booster d'inhibiteurs du protéasome et d'autres agents cytotoxiques pourrait permettre la réduction des doses de ces agents, pour une efficacité similaire ou améliorée, et peut-être une réduction des effets indésirables.

L'objectif de ce projet de thèse a donc été la caractérisation du mécanisme d'action des molécules de cette série chimique, qui augmentent la puissance d'agents anticancéreux, en particulier l'inhibiteur de protéasome carfilzomib. Pour cela, différentes approches ont été utilisées pour élucider ce mécanisme d'action : l'exploration de phénotypes, la modulation de l'expression de cibles et l'identification du réactome de ces molécules. C'est l'étude de ces expériences en cinétique, en dose-réponse, associée à la comparaison des effets des différents analogues de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE, qui nous permettra alors d'émettre des explications sur le mécanisme d'action et sur les liens de causalité entre les différents effets (**Figure 50**).

En l'état actuel des connaissances, la principale difficulté réside dans l'absence de phénotype induit par les composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE seuls. En effet, c'est l'association du carfilzomib avec ces composés qui présente le phénotype d'intérêt thérapeutique, c'est-à-dire le boost de l'apoptose de cet inhibiteur du protéasome. Ainsi, il est nécessaire de comprendre comment ces composés fonctionnent seuls mais surtout lors de leurs associations, tout en essayant de distinguer les mécanismes d'action des agents respectifs.

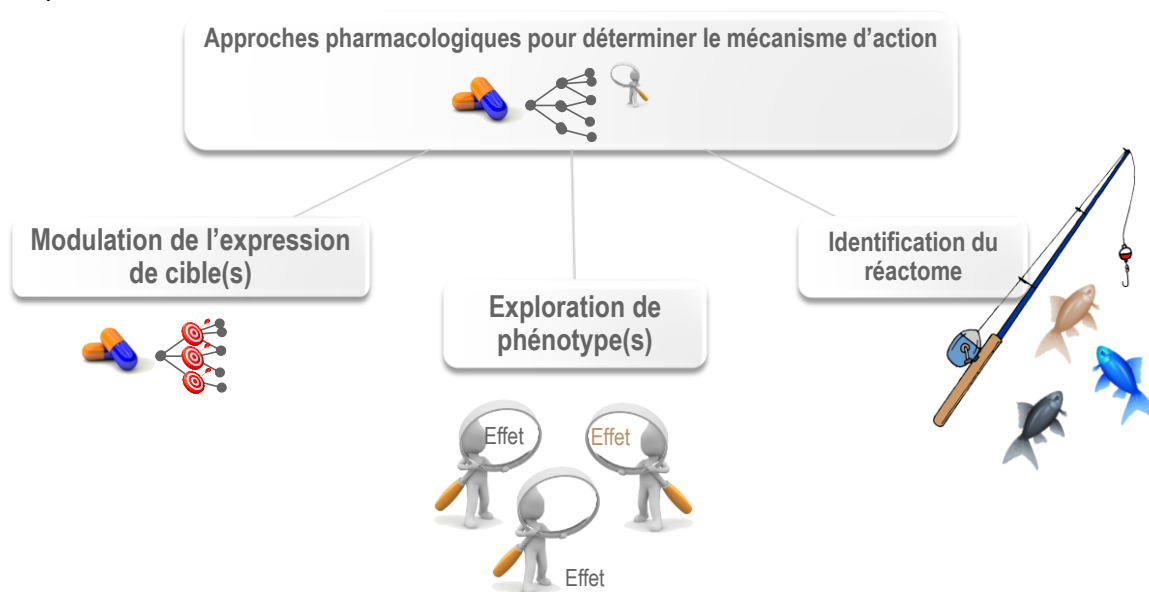


Figure 50 : Représentation schématique des travaux de thèse pour la compréhension du mécanisme d'action des composés boosters de la cytotoxicité de l'inhibiteur du protéasome carfilzomib.

Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

OPM2

Les cellules OPM2 (DSMZ Leibniz Institute, ACC 50) sont des cellules de myélome multiple humaines en suspension collectées à partir du sang périphérique d'une patiente de 56 ans. Elles sont entretenues dans du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 – GlutaMAX™-I (Gibco Life Technologies, réf 61870), contenant 10% de SVF décomplémenté (Life Technologies, réf 10270-106) et 1% de pénicilline/streptomycine (5 unités par mL de Pénicilline et 5µg/mL de Streptomycine, Life Technologies, réf 15070-063) à 37°C, 5% CO₂.

HeLa

Les cellules HeLa (ATCC® CCL-2™) sont des cellules humaines de cancer du col de l'utérus adhérentes. Elles sont entretenues dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) + GlutaMAX™-I (life technologie, réf 31966-021,), contenant 10% de SVF décomplémenté (Life Technologies, réf 10270-106) et 1% de pénicilline/streptomycine (5 unités par mL de Pénicilline et 5µg/mL de Streptomycine, Life Technologies, réf 15070-063) à 37°C, 5% CO₂.

TLM-1

Les cellules TLM-1 sont des cellules de mélanome de chien adhérentes (Kerafast, EMN005). Elles sont entretenues dans du milieu DMEM + Glutamax™-I (life technologie, réf 31966-021,), contenant 10% de SVF décomplémenté (Life Technologies, réf 10270-106), 1X HEPES (Life technologies, 15630-056), et 1% de pénicilline/streptomycine (5 unités par mL de Pénicilline et 5µg/mL de Streptomycine, Life Technologies, réf 15070-063) à 37°C, 5% CO₂.

MEFs

Les cellules MEFs IDE WT et KO sont des fibroblastes embryonnaires de souris fournis par le Pr. Peter Van Endert. Elles sont entretenues dans du milieu DMEM + Glutamax™-I (Life technologie, réf 31966-021), 10% de SVF décomplémenté (Life Technologies, réf 10270-106), 1% de MEM NEAA (Minimum Essential Medium non-Essential Amino Acids) (Life Technologies, réf 11140-050), 1% HEPES (Life Technologies, réf 15630-056) et 1% de pénicilline/streptomycine (5 unités par mL de Pénicilline et 5µg/mL de Streptomycine, Life Technologies, réf 15070-063) à 37°C, 5% CO₂.

5T33MMvt

Les cellules 5T33MMvt sont des cellules de MM murines (fournies par le Dr. Elke Debruyne, Lab of Hematology and Immunology - Myeloma Center Brussels). Elles sont entretenues dans du milieu RPMI-1640 – GlutaMAX™-I (Gibco Life Technologies, réf 61870), contenant 10% de SVF décomplémenté (Biochrom, réf S0115), 1% de pénicilline/streptomycine (5 unités par mL de Pénicilline et 5µg/mL de Streptomycine, Life Technologies, réf 15070-063), 1mM de sodium pyruvate (Lonza, BE13-115E), 1% de MEM NEAA (Life technologies, réf 11140-035), 2mM de L-glutamine (Life Technologies, réf 25030-024) à 37°C, 5% CO₂.

2. Traitements

Les traitements utilisés sont le carfilzomib (Selleckchem, S2853 ou Cliniscience, réf HY10455), bortezomib (Selleckchem, réf S1013 ou SantaCruz, sc-217785), tosédostat (Medchemexpress, HY-14807), cycloheximide (Sigma Aldrich, C7698-1G). Les composés de la série chimique (BDM_44768, composé A, composé B, composé C) ont été préparés et contrôlés (structure, activité) au sein du laboratoire et ont été remis en solution dans du DMSO (Sigma Aldrich, réf 34869).

3. Expérience *in vivo* (modèle 5T33MM)

L'expérience a été réalisée par le Dr. Elke De Bruyne au sein du laboratoire d'hématologie et d'immunologie – Myeloma Center Brussels (*Vrije Universiteit Brussel VUB*). Les souris C57BL/KalwRij ont été achetées chez Envigo (Horst, the Netherlands) et hébergées et traitées selon les conditions approuvées par le comité d'éthique (Licence n ° LA1230281). Le modèle 5T33MM de myélome multiple se caractérise par le développement spontané de ce cancer chez des souris âgées C57BL / KalwRij, et dont celui-ci a été propagé par transfert intraveineux de la moelle malade chez de jeunes souris syngéniques. Pour l'expérience *in vivo*, des cellules 5T33MMv ont été purifiées à partir de souris malades comme décrit précédemment et injectées par voie intraveineuse (5×10^5 cellules dans 100 μ L) à des souris naïves C57BL / KalwRij. Les souris ont été traitées à partir du jour 2 avec 0,6 mg/kg de bortezomib (par voie sous-cutanée, 2 fois par semaine) et/ou 50 mg/kg de composé B (par voie intrapéritonéale, quotidiennement). Lorsque la première souris a montré des signes évidents de morbidité (paralysie des pattes postérieures), toutes les souris ont été sacrifiées et l'effet sur la charge tumorale a été évalué en déterminant le pourcentage de plasmocytose dans la moelle osseuse, les taux sériques de la protéine M et le poids de la rate. La plasmocytose dans la moelle osseuse a été comptée manuellement en utilisant une coloration au May-Grünwald-Giemsa, tandis que les niveaux de pic M ont été mesurés par électrophorèse sérique.

4. Suivi de l'apoptose par imagerie quantitative

Culture cellulaire et traitements

Pour des cellules adhérentes, ces dernières sont ensemencées en plaque 384 puits (Greiner, réf 781091) à la densité cellulaire optimisée (1500 cellules par puits pour des HeLa) dans 40 μ L. Le lendemain, les cellules sont traitées avec les composés à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) à la concentration finale désirée pour un volume final de 70 μ L. A la suite du dépôt des composés, 30 μ L de milieu de culture contenant du NucView488™ (Ozyme, réf BTM10403), permettant le marquage des noyaux des cellules en apoptose, et du Hoechst (Life Technologies, réf H3570), permettant le marquage de tous les noyaux, est ajouté dans

chaque puits. La concentration finale en NucView488™ est de 0.8µM et en Hoechst 33342 de 40ng/mL. Les cellules sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C, 5% CO₂. La concentration finale en DMSO sur les cellules est de 0,2%.

Pour des cellules en suspension, les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (Greiner, réf 781091) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 70 µL de cellules. Les cellules OPM2 sontensemencées à une concentration de 17.10⁴cellules/mL avec 0.8µM de NucView488 (Ozyme, réf BTM10403), et 20ng/mL de Hoechst 33342 (Life Technologies, réf H3570). Les cellules sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C, 5% CO₂. La concentration finale en DMSO sur les cellules est de 0,2%.

Mesure de la fluorescence

La fluorescence des différents marqueurs est mesurée à chaque temps de cinétique à l'aide du microscope confocal à fluorescence InCell 6000, utilisé en mode non confocal à l'objectif 20X (General Electrics, InCell Analyzer 6000), en utilisant les lasers appropriés (canal DAPI pour le Hoechst 33342 ex/em de 405/455nm, canal FITC pour le NucView488™ ex/em de 488/525nm).

Analyse des images

Les images sont analysées à l'aide du logiciel Columbus™ de Perkin Elmer. Dans un premier temps nous dénombrons les noyaux grâce à la fluorescence du Hoechst, puis nous calculons l'aire des noyaux ainsi que l'intensité de cette fluorescence (marqueurs de l'apoptose). A partir de la population de noyaux sélectionnés, nous sélectionnons ceux présentant une intensité de fluorescence en NucView488™ supérieure à un seuil défini par rapport à la fluorescence des contrôles DMSO ; il s'agit ainsi de notre population de cellules en apoptose. Enfin, le logiciel permet de déterminer le pourcentage de cellules en apoptose.

Analyse des résultats

La concentration cytotoxique 50 (CC₅₀) qui permet d'induire 50% d'apoptose est déterminée par une régression non linéaire à 4 paramètres à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

5. Suivi de la toxicité induite par des radiations

UV-C

Les cellules TLM-1 ont étéensemencées dans une plaque 384 puits (Greiner, réf 781091) à raison de 3000 cellules dans 50µL de milieu de culture. Le lendemain les cellules ont été traitées avec les composés d'intérêt (prétraitement) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte). Après 24h de prétraitement, les cellules ont été lavées avec du PBS à l'aide du laveur de plaque Hydrospeed (Tecan) et soumises à différentes doses en UV-C à l'aide du Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene). Un post-traitement identique au prétraitement est ensuite réalisé à

l'aide de l'Echo (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte), puis 50µL de milieu de culture est ajouté par puits. Les cellules sont marquées quelques heures avant la lecture par le Hoechst 33342 (Life Technologies, réf H3570) à la concentration finale de 80ng/mL et par l'iodure de propidium (Life technologies, réf P3566) à la concentration finale de 1µg/mL.

La fluorescence des différents marqueurs est mesurée à l'aide du microscope confocal à fluorescence InCell 6000 utilisé en mode non confocal, à l'objectif 10X (General Electrics, InCell Analyzer 6000) en utilisant les lasers appropriés (DAPI 405/455nm pour le Hoechst et DsRed 561/605nm pour l'iodure de propidium).

Les images sont analysées à l'aide du logiciel Columbus™ de Perkin Elmer. Dans un premier temps nous dénombrons les noyaux grâce à la fluorescence du Hoechst, puis nous calculons l'aire des noyaux ainsi que l'intensité de cette fluorescence. A partir de la population de noyaux sélectionnés, nous sélectionnons ceux présentant une intensité de fluorescence en iodure de propidium supérieure à un seuil défini par rapport à la fluorescence des contrôles DMSO ; il s'agit ainsi de notre population de cellules mortes. Enfin, le logiciel permet de déterminer le pourcentage de cellules mortes.

Rayons X

Dans une expérience les cellules TLM-1 à la concentration de 43000 cellules/mL dans 37mL ont été irradiées en suspension dans le milieu de culture, **décrit à la partie 1 du matériel et méthodes**, mais sans rouge de phénol (Life technologie ; réf 21063-029) dans un falcon de 50mL (Corning, réf 430828) par différentes doses en rayonnements X au sein d'Oncovet Clinical Research (OCR, Villeneuve d'Ascq). A la suite de cela, du Hoechst 33342 (Life Technologies, réf H3570) à la concentration finale de 40ng/mL et du Nucview488™ (Ozyme, BTM10403) à la concentration finale de 0.8µM ont été ajoutés dans les solutions cellulaires. Ensuite, les cellules de chaque falcon, correspondant à une dose de rayonnements X, ont été ensuiteensemencées à raison de 70µL par puits sur des plaques 384 puits (Greiner, réf 781091) où les composés ont été préalablement dispensés à l'aide du dispenseur à énergie acoustique (Echo liquid Handler 550, Labcyte). Les cellules ont été ensuite incubées à l'étuve à 37°C, 5% CO₂. La mesure de fluorescence et l'analyse des images est identique à **la partie 4 du matériel et méthodes**.

Dans une seconde expérience, les cellules TLM-1 ont étéensemencées dans une plaque 384 puits (Greiner, réf 781091) à raison de 1000 cellules par puits dans 50µL de milieu de culture décrit **en partie 1 du matériel et méthodes**. 2h après, les cellules ont été traitées avec les composés d'intérêt (prétraitement) à l'aide du nanodispenseur à énergie acoustique (Echo liquid Handler 550, Labcyte). Après 24h de prétraitement, les cellules ont été lavées avec du milieu de culture sans rouge de phénol (Life Technologies, réf 21063-029) à l'aide du laveur de plaque Hydrospeed (Techan) (40µL restant par puits) et soumises à différentes doses de rayonnements X au sein d'OCR (Villeneuve d'Ascq). Un post-traitement identique au prétraitement est ensuite réalisé à l'aide de l'Echo et du bravo (Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform) dans du milieu de culture contenant de l'iodure de propidium (ThermoFisher Scientific, réf P3566) à la concentration finale de 1µg/mL et du Hoechst 33342 (Life Technologies, H3570) à la concentration finale de 40ng/mL. A 72h de

post-traitement, 20µL de milieu de culture contenant les composés et les marqueurs aux concentrations identiques au post-traitement est ajouté par puits. La fluorescence des différents marqueurs est mesurée toutes les 24h à l'aide du microscope confocal à fluorescence InCell 6000 utilisé en mode non confocal, à l'objectif 20X (General Electrics, InCell Analyzer 6000) en utilisant les lasers appropriés (DAPI 405/455nm pour le Hoechst 33342 et DsRed 561/605nm pour l'iodure de propidium). Les images sont analysées à l'aide du logiciel Columbus™ de Perkin Elmer. Dans un premier temps nous dénombrons les noyaux grâce à la fluorescence du Hoechst 33342, puis nous calculons l'aire des noyaux ainsi que l'intensité de cette fluorescence. A partir de la population de noyaux sélectionnés, nous sélectionnons ceux présentant une intensité de fluorescence en iodure de propidium supérieure à un seuil défini par rapport à la fluorescence des contrôles DMSO ; il s'agit ainsi de notre population de cellules mortes. Enfin, le logiciel permet de déterminer le pourcentage de cellules mortes.

6. Mesure de l'activité chymotrypsine du protéasome

Préparation des cellules et traitements

Les cellules sont préparées à la concentration désirée (320000 cellules/mL pour les OPM2, 180000 cellules/mL pour les HeLa et MEFs) etensemencées sur une plaque 384 puits (Greiner, réf 781080) à raison de 10µL par puits. Une condition (en triplicat) sans cellules, contenant du milieu de culture, est également réalisée sur la plaque. Ces puits nous serviront à déterminer le bruit de fond causé par le milieu de culture et à le déduire du signal des conditions cellulaires. Les cellules sont ensuite incubées pendant 2h30 à 37°C, 5% CO₂. Ensuite, les composés à tester sont déposés à la concentration désirée en triplicat sur cette plaque 384 puits à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid handler 550, Labcyte). La concentration finale en DMSO est de 0.2%. Après centrifugation à 300rpm 1 minute, la plaque est incubée 2h à 37°C, 5% CO₂.

Préparation du réactif et lecture

La plaque est placée 30 min à température ambiante avant l'ajout du mélange réactionnel (*Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay, Promega*, réf G8660). Les réactifs sont mis à température ambiante et une dilution (1/200) du substrat Suc-LLVY aminoluciférine dans le tampon, contenant entre autres la luciférase, l'ATP et Mg²⁺, est réalisée. Ce mélange est incubé 30 min à température ambiante. Après cette incubation, 10µL de ce mix est déposé dans chacun des puits. La plaque est ensuite agitée pendant 2 minutes à 700rpm. La lecture de la luminescence est effectuée 15 minutes après l'ajout du mélange réactionnel grâce au lecteur Victor V3 de Perkin Elmer.

Analyse des résultats

Le signal luminescent est corrigé par la moyenne du signal obtenu dans les puits contenant le milieu de culture sans cellules. L'activité du protéasome est calculée sur l'hypothèse que 100% d'activité du protéasome est présente pour la condition contrôle (cellules traitées par le véhicule).

7. Etude de la morphologie cellulaire par microscopie électronique

Traitement des cellules

Les cellules OPM2 ont étéensemencées en flasque de culture à raison de 500000 cellules/mL dans 10mL et traitées avec les composés aux concentrations désirées pendant 24h. Ensuite, les cellules ont été lavées au PBS puis une solution de fixation a été ajoutée.

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans une flasque de culture de 25cm² à raison de 500.000 cellules dans 5mL. Le lendemain les cellules ont été traitées avec les composés pendant 48h. Après un lavage au PBS, une solution de fixation a été ajoutée.

Fixation et analyses des échantillons

Les échantillons ont été fixés avec 1% de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 6,8, à 4°C pendant une nuit. Ils ont été post-fixés avec 1% de tétroxyde d'osmium et 1,5% de ferricyanure de potassium puis avec 1% d'acétate d'uranyle, tous deux dans de l'eau distillée à température ambiante à l'obscurité, pendant 1 heure. Après lavage, les échantillons ont été déshydratés avec des solutions de concentration d'éthanol croissantes. Les échantillons ont finalement été infiltrés avec de la résine époxy et durcis à 60°C pendant 24 heures. Des coupes d'épaisseur 70-80 nm déposées sur des grilles revêtues de formvar ont été observées à 80 kV avec un Hitachi H7500 TEM (Milexia, France), et les images ont été acquises avec un appareil photo numérique 1 Mpixel d'AMT (Milexia, France).

8. Quantification des agrésomes

Traitement des cellules

Les cellules HeLa sontensemencées en plaque 384 puits (Perkin, réf 6007550) à raison de 1500 cellules par puits dans un volume de 40µL. Le lendemain, les cellules sont traitées avec les composés à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) à la concentration finale désirée pour un volume final de 70µL. A la suite du dépôt des composés, 30µL de milieu de culture est ajouté. Les cellules sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C, 5% CO₂. La concentration finale en DMSO sur les cellules est de 0,2%.

Fixation, perméabilisation et marquage

Les cellules sont fixées par l'ajout de 8µL d'une solution de formaldéhyde à 37% (Sigma Aldrich, réf 252549) pour obtenir une concentration finale de 3.8% pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS à l'aide d'un laveur de plaque Hydrospeed (Tecan). 20µL d'une solution de perméabilisation (0.5% Triton X-100 (Sigma Aldrich, réf T8787), 3mM EDTA, pH 8.0 (Sigma Aldrich, réf 03690-100mL)) est ensuite ajoutée dans chaque puits et la plaque est ensuite incubée pendant 30 minutes sur de la glace. Après 4 lavages au PBS par le laveur de plaque Hydrospeed (Tecan), 20µL d'une solution de marquage (réactif Protéostat dilué au 1/1000ème dans une solution de PBS/BSA à 0.5% contenant du Hoeschst 33342 à la concentration finale de 500ng/mL) est ajoutée pendant 30

minutes à l'abri de la lumière (Proteostat aggresome detection kit, Enzo, ENZ-51035). Enfin, trois lavages au PBS sont réalisés à l'aide du laveur de plaque Hydrospeed (Tecan).

Analyse d'images et quantification des agrésomes

La fluorescence des différents marqueurs est mesurée à chaque temps de cinétique à l'aide du microscope confocal à fluorescence InCell 6000 utilisé en mode non confocal, à l'objectif 60X (General Electric, InCell Analyzer 6000) en utilisant les lasers appropriés. Le Hoechst 33342 absorbe dans l'ultraviolet (350 nm) et émet dans le bleu (460 nm) lorsqu'il est lié aux acides nucléiques. Le réactif Protéostat absorbe (488nm) et émet (605nm) dans le rouge lorsqu'il est lié aux agrésomes.

Les images sont analysées à l'aide du logiciel Columbus™ de Perkin Elmer. Dans un premier temps nous dénombrons les noyaux grâce à la fluorescence du Hoechst et nous calculons l'aire des noyaux ainsi que l'intensité de cette fluorescence. Le cytoplasme est ensuite détecté sur le canal du réactif Protéostat, et des informations sur son intensité sont collectées. Dans les cellules, le logiciel détecte ensuite des spots dans le canal du réactif protéostat, et des informations sur leurs aires et leurs intensités sont collectées. Les spots intenses (intensité corrigée du spot supérieure à un seuil défini par rapport au contrôle négatif) dont l'aire est supérieure à 15µm² sont considérés comme des agrésomes. Le pourcentage de cellules avec agrésome est ensuite déterminé.

9. Etude du transcriptome

9.1. RT-qPCR sur les cellules OPM2

Extraction des ARN :

Les cellules OPM2 sontensemencées dans des plaques 6 puits (Corning, réf 3516) à la concentration de 1000000 cellules/mL dans 2mL, puis traitées avec les composés à tester en triplicat. La concentration finale en DMSO sur les cellules est de 0,2%. A chaque temps de cinétique, 2 mL contenant 2000000 de cellules sont récupérées dans des tubes eppendorfs, puis centrifugées pendant 5 minutes à 1200 rpm à 4°C. Après aspiration du surnageant, nous ajoutons 300µL de TRIzol (Invitrogen, réf 15596018) afin de lyser les cellules. Les tubes sont ensuite congelés à -20°C. Après décongélation, nous ajoutons 60µL de chloroforme, puis les tubes sont vortexés et centrifugés 20 min à 13000 rpm (4°C). La phase supérieure aqueuse contenant les ARN est ainsi récupérée dans un nouveau tube. Nous ajoutons 150µL d'isopropanol 100% dans chaque tube et nous laissons précipiter toute la nuit. Le lendemain, après une centrifugation de 20 min à 13000 rpm à 4°C, le surnageant est éliminé afin de ne garder que le culot d'ARN. Les culots sont repris dans 40µL d'eau PPI. Une étape de purification est ensuite réalisée par l'ajout de 100 µL d'éthanol absolu et 4 µL d'acétate de sodium (3M - pH 5,2) par tube. Après avoir vortexé les tubes, ces derniers sont incubés à -20°C toute la nuit. Le lendemain, les tubes sont centrifugés pendant 15 min à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots d'ARN sont lavés par 300 µL d'éthanol à 75 % puis séchés au speed-vac pendant 5 minutes. Les culots d'ARN sont repris dans 30 µL d'eau PPI

puis laissés au -20°C au moins 1h. Ensuite, nous effectuons un choc thermique pendant 10 min à 65°C au bain marie. Le dosage des ARN s'effectue à l'aide du spectrophotomètre DropSense™16 de Trinean : 2µL de chaque échantillon est déposé sur une barrette adaptée.

DNase et rétro-transcription (RT) :

Afin de dégrader l'ADN génomique contaminant, nous incubons 1µg d'ARN dans 8µL d'eau en présence de 1µL de DNase I (Thermo Scientific, réf #EN0521) et de 1µL du tampon de fonctionnement (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂) à 37°C pendant 30 minutes au thermocycleur Eppendorf. Afin d'arrêter la réaction enzymatique, nous ajoutons 1µL d'EDTA à 50mM dans le mélange de 10µL, puis nous incubons 10 minutes à 65°C. La rétro-transcription (RT) de l'ARNm en ADN complémentaire est réalisée par le kit « high-capacity cDNA reverse transcription » (Thermo Fisher Scientific, réf 4368813). Le programme thermique de la RT comprend 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C et 5 minutes à 85°C puis un maintien à 4°C. Nous réalisons des contrôles négatifs lors de cette étape par la réalisation d'une condition n'ayant pas subi de RT et d'une condition contenant de l'eau PPI ayant subi le traitement DNase et RT.

PCR

L'ADN complémentaire est quantifié grâce au kit Brilliant II SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix (Agilent Technologies, réf #600882) suivant les recommandations du fabricant. Au moyen des amorces spécifiques (**Tableau 15**) validées par une étude d'efficacité sur la lignée cellulaire, le gène d'intérêt est amplifié par la Taq polymérase grâce au programme thermique suivant : 15 minutes à 95°C pour activer la polymérase, suivi de 40 cycles alternant 10 secondes à 95°C pour dénaturer l'ADN double-brin et 30 secondes à 60°C pour hybrider les amorces et opérer l'élongation, sur l'appareil Agilent Mx3000P (**Figure 51**).

Gène étudié	Amorce sens 5' → 3'	Amorce anti-sens 5' → 3'
36B4	CATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCC	GGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAG
PERK	GTGGGACCAAGACCGTGAAA	CGACAACCCAGAGCTGAACA
IRE1a	AGCAGTTAGAGAGAGGGCGGG	CTGGAGGGGGACAGTGATGT
IDE	TGCCCTAGACAGGTTTGAC	TTCCCTGTAGCTTTTCCAA
XBP1u	GGAGTTAAGACAGCGCTTGG	ACTGGGTCCAAGTTGTCCAG
XBP1s	CTGAGTCCGCAGCAGGTG	GCTGATGACGTCCCACTGA
GADD34	ATGTACCTGGAGAGAAGCCACC	AGCGCACCTTTCTGGCCTTT
CHOP	GAACCAGGAAACGGAAACAGA	TCTCCTTCATGCGCTGCTT
ATF4	TCAAACCTCATGGGTTCTCC	GTGTCATCCAACGTGGTCAG
ATF6	TCGAAGGGATCACCTGCTGTT	CATCACTCGTAGTCTGCCCA
GRP78	TAGCGTATGGTGCTGCTGTC	TTTGTGAGGGGTCTTTCACC

Tableau 15: Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt par PCR quantitative.

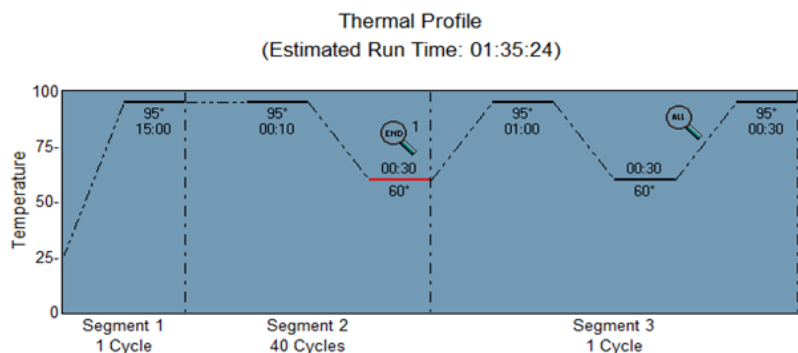


Figure 51 : Profil thermique utilisé pour l'amplification des gènes d'intérêt par RT-qPCR par la Taq polymérase

Analyse quantitative des résultats

Pour chaque échantillon, une valeur appelée Ct est déterminée, correspondant au cycle d'amplification pour lequel la fluorescence dépasse le seuil de positivité. Nous normalisons l'expression du gène étudié par rapport à un gène exprimé de façon ubiquitaire et équivalente quel que soit le traitement : 36B4, un gène codant pour une protéine ribosomale. On parlera donc d'expression relative du gène. Enfin, nous normalisons tous les résultats par rapport à la condition témoin correspondant aux cellules traitées par le DMSO à 0.2% au temps de cinétique voulu. Les résultats sont ainsi exprimés en fold relatif d'expression par rapport à cette condition.

9.2. RNAseq sur les cellules HeLa

Extraction de l'ARN

Les cellules HeLa sont ensemencées à la concentration de 100000 cellules /mL dans des plaques 6 puits à raison de 2mL par puits. Le lendemain les cellules sont traitées avec les composés à la concentration désirée. La concentration finale en DMSO sur les cellules est de 0,1%. A chaque temps de cinétique, le milieu de culture est enlevé, les cellules sont lavées avec du PBS, et 350µL d'un mélange de tampon de lyse contenant du guanidinium thiocyanate et 15mM de DTT est ajouté. Les ARN sont extraits selon le protocole d'extraction des ARN du kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, NucleoSpin® RNA, réf 740955.50). Ce protocole contient une étape de DNase.

Contrôle qualité

Le dosage des ARN s'effectue à l'aide du spectrophotomètre DropSense™16 de Trinean : 2µL de chaque échantillon est déposé sur une barrette adaptée. La détermination de l'intégrité des ARN a été réalisée grâce à l'appareil 2100 bioanalyzer (Agilent) :

- Une valeur du ratio 28S/18S supérieur à 1
- Une valeur du RIN (*RNA Integrity Number*) supérieure à 7
- Un profil électrophorétique avec une ligne de base plate

Les tubes contenant les ARN avec une concentration de plus de 20ng/µL dans un volume de 55µL au minimum ont été envoyés à la société Macrogen.

RNAseq

Macrogen a reçu 36 échantillons d'ARN total humain. Un contrôle de la qualité de l'ARN total a été effectué (intégrité et pureté). Le RIN et la proportion de (S28, 18S) ont été déterminés par Agilent Bioanalyzer 2100. La préparation de la librairie a été réalisée en utilisant le protocole du kit de préparation d'échantillons Illumina TruSeq Stranded mRNA LT (le processus est détaillé dans le lien suivant: <https://www.utsouthwestern.edu/labs/next-generation-sequencing-core/assets/truseq-stranded-mrna-sample-prep-guide.pdf>). Pour vérifier la taille des fragments enrichis par PCR, Macrogen a vérifié la distribution de la taille du modèle sur un bioanalyseur Agilent Technologies 2100 à l'aide d'une puce DNA 1000. Pour quantifier les librairies préparées, afin d'obtenir la plus haute qualité de données sur les plateformes de séquençage Illumina, en créant des densités de clusters optimales sur chaque ligne de chaque Flow Cell, Macrogen a utilisé la qPCR conformément au Guide du protocole de quantification Illumina qPCR: les protocoles de préparation d'échantillons Illumina® et système de PCR en temps réel Eco™. Le séquençage a été lancé en utilisant la plateforme Illumina NovaSeq 6000 et la Flow Cell S4 avec le kit de réactifs 2 * 100bp (PE) ref 20027466. Le démultiplexage des données et le contrôle qualité ont été effectués et les lectures FASTQ ont été envoyées dans des fichiers zip.

Analyse des données

A partir des fichiers FASTQ, les reads/séquences ont été aligné(e)s au génome humain (Hg38) via STAR (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*). Le package bioconductor Deseq2 (<https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/manuals/DESeq2/man/DESeq2.pdf>) a été utilisé pour analyser l'expression différentielle des gènes. Tout d'abord, une normalisation a été réalisée par rapport au nombre total de reads par échantillon. Les gènes présentant une faible expression, inférieure à 50 reads ont été exclus. L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin d'identifier les cofacteurs à inclure dans le modèle statistique. Pour chaque gène, nous avons obtenu un fold-change entre condition "traitée" et condition "non traitée" ainsi qu'une p value ajustée par le nombre d'observations. Les analyses des voies de signalisation ont été réalisées à partir du site <https://gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp> en utilisant différentes bases de données comme CGP (Chemical and Genetic Perturbations), Hallmark, Reactome et/ou Kegg. Le logiciel Cytoscape et l'application Iregulon ont été utilisés pour la prédiction des facteurs de transcription.

Confirmations par RT-qPCR

La rétro-transcription (RT) de l'ARNm en ADN complémentaire est réalisée par le kit « high-capacity cDNA reverse transcription » (Thermo Fisher Scientific, réf 4368813) à partir de 900ng d'ARN. Le programme thermique de la RT comprend 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C et 5 minutes à 85°C puis un maintien à 4°C. Nous réalisons des contrôles négatifs lors de cette étape par la réalisation d'une condition n'ayant pas subi de RT et d'une condition contenant de l'eau PPI ayant subi la RT.

L'ADN complémentaire est quantifié grâce au kit Takyon Low ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP (Eurogenetec, réf UF-LSMT-B0701) suivant les recommandations du fabricant. Au moyen des amorces spécifiques (**Tableau 16**) validées par une étude d'efficacité sur la lignée cellulaire, le gène d'intérêt est amplifié par la Takyon™ ADN polymérase grâce au programme thermique suivant : 3 minutes à 95°C pour activer la polymérase, suivi de 40 cycles alternant 10 secondes à 95°C pour dénaturer l'ADN double-brin et 30 secondes à 60°C pour hybrider les amorces et opérer l'élongation, sur l'appareil Agilent Mx3000P (**Figure 52**).

Gène étudié	Amorce sens 5' → 3'	Amorce anti-sens 5' → 3'
DDIT3	GAACCAGGAAACGAAACAGA	TCTCCTTCATGCGCTGCTT
ATF4	TCAAACCTCATGGGTTCTCC	GTGTCATCCAACGTGGTCAG
ATF3	CCTCGGGGTGTCCATCACAA	TCTCCGACTCTTCTGCAGGC
CEBPB	AGCGACGAGTACAAGATCC	AGCTGCTTGAACAAGTCC
PPP1R15A	ATGTACTTGAGAGAAGCCACC	AGCGCACCTTCTGGCCTTT
PSAT1	CTGCCGCACTCAGTGTGTGTT	ACAGCTAGCAATTCCCAC
PSPH	TTGATGAGACGCAGCCAACA	CCAATGAAAGCATCAGCAGGAGG
ASNS	TGTC AATGGATACACCAACT	GTTGCATCTTCTTATGGTTG
CBS	TGCAGCCGTCAGACCAAGTT	TGCTGTGGTACTGGATCTGCT
CTH	TGATGTTGTAATGGCCTGGTGTC	AGTCTTCAGACCTCGATTGCAGAG
ASS1	GTCCTCAAGGGCCAGGTGTA	CTTCAGCCTGAGGGAATTGATGT
SARS1	GCGAGTGGCGACGATGTAGA	ACTCAGCACATTCTCTGGGACA
CARS1	ATGGCAGATTCTCCGGGCA	ACACTTCCTTGTCTGGTGAGG
WARS	CCTGGACTACATGGGGATGAGC	AGCCTGGATGGCAGGAAAAC
MARS	AGTGTGACAAGTGTGGCAAGC	TCCAGTCGCTTCTCCAGCTTA
CDKN1A	TACCCTTGTGCCTCGCTCAG	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCTGT
SLC7A11	GCTGGCTGGTTTTACCTCAACT	GTAGGCCACATTTGTCAGACA
SLC38A2	TGGGCAGTGGAATCCTTGGG	AAAGACCCTCCTTCATTGGCAGT
TRIB3	CCGTGAGAGGAAGAAGCTGGT	TGCCTTGCCGAGTATGAGG
IGF1	TATTTCAACAAGCCCACAGGT	GCTTGAGGGGTGCGCAATAC
IGF1R	AGCAAAGGGGACATAAACAC	TAAAGGGTGCTTCTTGTAGTA
GDF15	TCCAGATTCCGAGAGTTGCG	CGAGGTCGGTGTTCGAATCT
NIBAN1	GGCAAGTGCCTTACATCCG	GCGCACGTGATTGCAGAAAG
TBP	TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT	CCTGAATCCCTTAGAATAGGGTAGA

Tableau 16 : Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt par PCR quantitative.

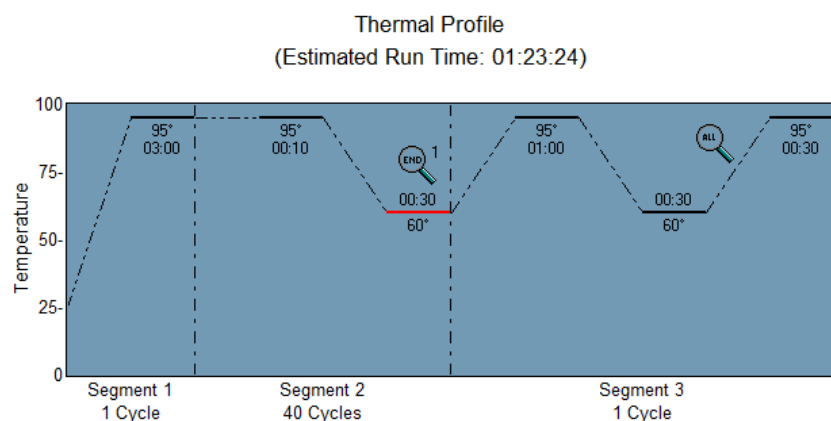


Figure 52 : Profil thermique utilisé pour l'amplification des gènes d'intérêt par RT-qPCR par la Takyon™ ADN polymérase.

Pour chaque échantillon, une valeur appelée Ct est déterminée, correspondant au cycle d'amplification pour lequel la fluorescence dépasse le seuil de positivité. Nous normalisons l'expression du gène étudié par rapport à un gène de ménage TBP (TATA-binding protein). On parlera donc d'expression relative du gène. Enfin, nous normalisons tous les résultats par rapport à la condition témoin correspondant aux cellules non traitées (TOH). Les résultats sont ainsi exprimés en fold relatif d'expression par rapport à cette condition.

10. Etude de l'expression protéique par la technique de Western-Blot

Extraction et dosage protéique

Les cellules sont ensemencées et traitées aux concentrations désirées. A chaque temps de cinétique et pour chaque condition de traitement, les cellules sont récupérées et lavées deux fois avec du PBS. Elles sont ensuite lysées par l'ajout de tampon de lyse RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, réf 89900) permettant l'extraction des protéines membranaires, nucléaires et cytoplasmiques, auquel est ajouté un inhibiteur de phosphatase/protéase (Thermo Fisher Scientific, réf 78441). Pour améliorer l'étape d'extraction, les échantillons peuvent être passés dans une seringue à insuline de 29G (BD Medical, réf 324892). Ensuite, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 14 000rpm à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines, est ensuite transféré dans un nouveau tube et sa concentration est déterminée par un kit de dosage protéique microBCA (ThermoFisher, réf 23235).

Electrophorèse et transfert

20µg de protéines (cette quantité peut varier selon les expériences) sont repris dans une solution dénaturante contenant du tampon NuPAGE LDS (Life Technologies, réf NP0007), permettant la dénaturation des protéines, ainsi qu'un agent réducteur NuPAGE (Life Technologies, réf NP0009), permettant de casser les liaisons disulfures. Cette solution est incubée 10 minutes à 70°C. Nous transférons ensuite 15µL de cette solution sur un gel adapté de 15 puits, ainsi que 3µL de marqueur de taille (Life Technologies, réf 26635). Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaires (PM) sur un gel de 4-12% Bis/Tris Acetate (si les protéines d'intérêt sont de PM<100kDa, Life Technologies, réf NP0323BOX)

dans du tampon MOPs (Life Technologies, réf NP0001) ou du tampon MES (Life Technologies, réf NP0002) ou sur un gel polyacrylamide 3-8% Tris Acetate (pour des protéines d'intérêt de PM>100kDa, Life Technologies, EA03755BOX) dans du tampon Tris Acétate (Life Technologies, réf LA0041) pendant 1h15 environ, à 150 Volts. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à l'appareil iBlot2™ de ThermoFisher selon un programme de 7 minutes (1 min à 20V, 4 minutes à 23V, 2 min à 25V) pour les petites protéines d'intérêt de PM<100 kDa ou un programme de 7 minutes à 25V pour les plus grosses protéines. Une coloration au Rouge Ponceau de la membrane permet de s'assurer du transfert correct des protéines.

Immuno-détection, révélation et quantification

La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée dans du TBS 1X (Euromedex, réf ET220) - 0,1% tween 20 (Sigma Aldrich, réf P1379) (TBST), 5% de BSA pendant 1h, afin de saturer les sites non spécifiques de fixation de l'anticorps primaire. Nous mettons ensuite en contact l'anticorps primaire avec la membrane à la concentration détaillée dans le **tableau 17** à 4°C, sous une agitation orbitale douce toute la nuit, ou à température ambiante pendant 1h30. Après 3 lavages de 10 minutes par le TBST, nous incubons la membrane avec l'anticorps secondaire (**Tableau 18**) approprié pendant 1h30 à température ambiante dans du TBST, 5% BSA. 3 lavages de 10 minutes par le TBST sont ensuite réalisés. L'anticorps de ménage utilisé est la vinculine, une protéine du cytosquelette. La fluorescence en infra-rouge des anticorps secondaires est mesurée à l'aide de l'imageur Odyssey CLx de Licor permettant la détection de deux canaux : 700 et 800nm. Nous mesurons l'intensité des bandes à l'aide du logiciel d'analyse Image Studio Lite. Cette dernière est normalisée par l'intensité de la bande de l'anticorps de ménage (vinculine). Nous normalisons ensuite les résultats par rapport à la condition non traitée (DMSO 0,2%) de chaque temps de cinétique.

Anticorps primaire				Poids moléculaire (kDa)
Référence	Organisme	Protéine cible	Dilution	
Abcam, ab18058	Souris	Vinculine	1/1000	130
Santa Cruz Biotechnology, Sc-393887	Souris	IDE	1/1000	110
Abcam, ab108310	Lapin	CD13 (APN)	1/500	110
Abcam, ab133512	Lapin	LTA4H	1/10000	69
Abcam, ab124953	Lapin	MetAP2	1/1000	67
Abcam, ab241289	Lapin	AP-B	1/1000	73
Abcam, ab96066	Lapin	NPEPPS	1/1000	103
Cell Signaling, 9722	Lapin	EiF2 α	1/1000	38
Cell Signaling, 3398	Lapin	EiF2 α P	1/1000	38
Proteintech, 10835-1-AP	Lapin	ATF4	1/500	55
Cell Signaling, 28955	Souris	CHOP	1/1000	27
Abcam, ab54692	Souris	IRE1	1/1000	110
Abcam, ab124945	Lapin	IRE1-P	1/1000	110
Proteintech, 18420-1-AP	Lapin	P62	1/2000	62
Proteintech, 14600-1-AP	Lapin	LC3	1/500	15

Tableau 17 : Caractéristiques des anticorps primaires utilisés

Anticorps secondaire		
Référence	Description	Dilution
Licor, 926-32210	Anti-souris 800	1/20000
Licor, 926-68073	Anti-lapin 680	1/20000
ThermoFisher, SA5-10170	Anti-souris 680	1/20000
ThermoFisher, SA5-10044	Anti-lapin 800	1/20000
ThermoFisher, SA5-10042	Anti-lapin 680	1/20000

Tableau 18 : Caractéristiques des anticorps secondaires utilisés

11. Expériences de siRNA

Les cellules HeLa sontensemencées à 75 000 cellules/mL dans 2 mL dans des plaques 6 puits (Corning réf 3516). Le lendemain, les cellules sont transfectées selon les conditions d'étude par l'ajout du pool de siRNA approprié (SiRNA IDE, Dharmacon™, réf SMARTpool On-Targetplus Human IDE (3416) SiRNA -L-005899-00-0005, ou siRNA CTL, Dharmacon™, réf On-Targetplus non-targeting pool, D-001810-10-05) dilué à 50 nM dans du tampon de transfection et du réactif de transfection jetPRIME® (Polyplus transfection®). Après 48h d'incubation à 37°C, 5% CO₂, les cellules sont lavées et récupérées. Elles sont ensuiteensemencées d'une part à 100000 cellules/mL dans 2mL dans des plaques 6 puits pour l'analyse de l'expression protéique d'IDE par la technique de western-blot (**cf. partie 10 du matériel et méthodes**) et d'autre part dans une plaque 384 puits pour l'étude du phénotype d'intérêt (**cf. partie 4 du matériel et méthodes** pour l'apoptose, **cf. partie 6 du matériel et méthodes** pour la mesure de l'activité chymotrypsine et **cf. partie 8 du matériel et méthodes** pour la quantification des agrésomes).

12. Mesure de la synthèse protéique

Culture cellulaire et traitements :

Les cellules HeLa sontensemencées en plaque 384 puits (Greiner, réf 781091) à raison de 1500 cellules par puits dans un volume de 40µL de milieu de culture habituel. Le lendemain, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS à l'aide du laveur de plaque Hydrospeed (Tecan). Les cellules sont ensuite traitées avec les composés à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) à la concentration finale désirée pour un volume final de 30µL. A la suite du dépôt des composés, 25µL de milieu de culture (ThermoFisher Scientific, réf 21013-024) supplémenté par du glutaMAX™-I (ThermoFisher, réf 35050-038) à la concentration finale de 4mM, de la cystéine (Fluka AG, réf 30130) à la concentration finale de 200µM, du sodium pyruvate (ThermoFisher, réf 11360-039) à la concentration finale de 1mM, de 10% de SVF (ThermoFisher, réf 10270-106), de 1% de pénicilline/streptomycine (ThermoFisher Scientific, réf 15070-063) et de l'HPG (ThermoFisher Scientific, réf C10429) à la concentration finale de 50µM est ajouté dans chaque puits. Des puits contrôles contenant du milieu de culture habituel ont également été réalisés. Les cellules sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C, 5% CO₂.

Fixation, perméabilisation et marquage

Après 3 lavages au PBS à l'aide du laveur de plaque Hydrospeed (Tecan), les cellules sont fixées par l'ajout d'une solution de formaldéhyde à la concentration finale de 3.7% (Sigma Aldrich, réf 252549) dans du PBS pendant 15 minutes (volume final dans les puits de 25µL). Après deux lavages par une solution de PBS / BSA à 3 %, les cellules sont perméabilisées par une solution de 0.5% de triton X-100 (Sigma Aldrich, réf T8787) dans du PBS pendant 20 minutes (20µL par puits). Après deux lavages par une solution de PBS / BSA à 3%, les cellules sont marquées par une solution contenant un tampon, l'AlexaFluor® 594 azide et du CuSO₄ (25µL par puits) dans les proportions recommandées par le fabricant (ThermoFisher Scientific, réf C10429) pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Après un lavage avec la solution de rinçage, les noyaux des cellules sont marqués avec une solution contenant un marqueur du noyau dilué dans le PBS au 1/2000ème pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec le liquide de rinçage.

Mesure de la fluorescence

La fluorescence des différents marqueurs est mesurée à l'aide du microscope à fluorescence InCell 6000 utilisé en mode non confocal, à l'objectif 20X (General Electrics, InCell Analyzer 6000) en utilisant les lasers appropriés (DAPI 405/455nm et DsRed 561/605nm).

Analyse des images

Les images sont analysées à l'aide du logiciel Columbus™ de Perkin Elmer. Les noyaux sont dénombrés grâce à la fluorescence dans le canal DAPI, puis sont calculés l'aire des noyaux ainsi que l'intensité de cette fluorescence. Le logiciel permet ensuite de détecter le cytoplasme à partir du canal DsRed et de mesurer l'intensité de la fluorescence dans la cellule.

Analyse des résultats

L'intensité de fluorescence est normalisée par rapport à la condition DMSO.

13. Quantification de di et tri-peptides

Peptides

Les di et tri-peptides (R-M ; S-L-S ; P-E-P ; P-I-L) ont été synthétisés et purifiés (>95%) par la société Proteogenix.

Traitement

Les cellules OPM2 ont été mises à la concentration de 1000000 cellules /mL dans 15 mL en flasque de culture et traitées avec la concentration désirée en composé pendant 24h à 37°C, 5% CO₂. La concentration finale en DMSO est de 0.1%. Après cette incubation les cellules ont été lavées avec du PBS foied et re-suspendues dans 800µL d'acétonitrile puis stockées à -20°C.

Analyses en spectrométrie de masse

Après une centrifugation de 10 minutes à 4000rpm à 4°C, les surnageant ont été séchés à 35°C pendant 2h au Genevac et resuspendus dans 100µL d'eau acidifiée (0.1% acide formique), agités dynamiquement puis à nouveau centrifugés (12000rpm, 10', 4°C). Le surnageant est transféré en tubes Matrix pour analyses. Les analyses LC-MS/MS sont réalisées sur un système UPLC Acquity I Class (Waters[®]) couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Xevo TQD (Waters[®]). La colonne UPLC, placée à 40°C, une Acquity BEH C8 50*2.1mm, 1.7µm (Waters[®]) est associée au système de phase mobile suivant : H₂O 0.1% HCOOH (A) et CH₃CN 0.1% HCOOH (B). A un débit de 600µL.min⁻¹, la méthode analytique débute à 98% de (A) pendant 10s puis le pourcentage de (B) augmente progressivement à 98% jusqu'à 2 min ; ce pourcentage de (B) est maintenu pendant 30s avant de revenir aux conditions initiales. Les échantillons sont maintenus à 10°C, le volume d'injection est de 2µL.

Le spectromètre de masse est équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI) ; les analyses sont effectuées en mode MRM, avec les paramètres suivants (**Tableau 19**) :

Composé	ESI	Tension de capillaire (kV)	Ion parent (m/z)	Tension de cône (V)	Ion fils (m/z)	Energie de collision (eV)	Temps de rétention
PIL	(+)	0,5	342,11	28	70,1	30	0'99
RM	(+)	0,5	305,99	38	70,1	30	0'29
PEP	(+)	1,5	341,99	28	70,1	28	0'69
SLS	(+)	2,5	306,08	18	173,1	14	0'66

Tableau 19 : Paramètres utilisés sur le spectromètre de masse

Le gaz de collision est de l'argon. La température de la source est fixée à 150°C, la température de désolvation à 600°C, le débit de gaz de désolvation à 1200 L.h⁻¹ et le débit de gaz de cône à 50 L.h⁻¹. Le pilotage de l'équipement ainsi que l'acquisition et le retraitement des données est réalisé à l'aide du logiciel MassLynx 4.0 (Waters[®]).

Quantification

La quantification de chaque peptide dans les échantillons est réalisée à l'aide d'une gamme de calibration de chaque composé préparée dans H₂O 0,1% HCOOH, avec des concentrations finales de 3 à 300nM.

14. Mesure d'activités enzymatiques

14.1. Protocole expérimental pour chaque enzyme

IDE

L'enzyme IDE humaine fournie par le « *Ben-May Department for Cancer research* » de l'Université de Chicago, est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (50mM Hepes, 100mM NaCl, pH 7.4), à température ambiante pendant 10 minutes dans un volume final de 20µL. La réaction enzymatique est démarrée par l'ajout de 20µL de substrat. Le substrat est le peptide Cys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Trp couplé avec le fluorophore ATTO655 ; où Cys est linker et Trp quencher. En présence d'IDE, ce peptide est clivé au

niveau de Phe-Phe. Ce clivage augmente la distance entre le fluorophore et le quencher, et restaure l'émission d'ATTO 655 à 750 nm après une excitation à 635nm. La concentration finale dans les puits en IDE est de 2.8µg/mL et en substrat de 5µM. La détection se fait par mesure de la fluorescence sur le Victor 3V avec une excitation à 655 nm et une émission à 750 nm pendant une cinétique de 45 minutes.

Aminopeptidase B

Les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (corning 4514) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 20 µL. L'enzyme AP-B humaine (R&D Systems, 8084-ZN-010), est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (NaCl 100 mM et Hepes 50 mM, pH 7, 0.1% BSA), à température ambiante (TA) pendant 30 minutes dans un volume de 10µL. Ensuite, un substrat fluorogénique R-AMC (L-Arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ; excitation : 380 nm, émission : 450 nm) (Sigma, réf A2027) est mis en contact de l'enzyme (10µL). La lecture de fluorescence est réalisée en cinétique pendant une heure, sur le lecteur Victor (Perkin Elmer). La concentration finale en substrat est de 100µM et la concentration finale en enzyme est de 15.92 ng/mL.

LTA4H

Les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (corning 4514) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 20 µL. L'enzyme LTA4H humaine (R&D Systems, 4008-ZN-010), est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (NaCl 100 mM et Hepes 50 mM, pH 7, 0.1% BSA), à TA pendant 30 minutes dans un volume de 10µL. Ensuite, un substrat fluorogénique R-AMC (L-Arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ; excitation : 380 nm, émission : 450 nm) (Sigma, réf A2027) est mis en contact de l'enzyme (10µL). La lecture de fluorescence est réalisée en cinétique pendant une heure, sur le lecteur Victor (Perkin Elmer). La concentration finale en substrat est de 900µM et la concentration finale en enzyme est de 781.25 ng/mL.

NPEPPS

Les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (corning 4514) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 20 µL. L'enzyme NPEPPS humaine (R&D Systems, 6410-ZN-010), est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (NaCl 100 mM et Hepes 50 mM, pH 7, 0.1% BSA), à TA pendant 30 minutes dans un volume de 10µL. Ensuite, un substrat fluorogénique L-AMC (L-Leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ; excitation : 380 nm, émission : 450 nm) (Sigma Aldrich, réf L2145) est mis en contact de l'enzyme (10µL). La lecture de fluorescence est réalisée en cinétique pendant une heure, sur le lecteur Victor (Perkin Elmer). La concentration finale en substrat est de 10µM et la concentration finale en enzyme est de 187.5 ng/mL.

MetAP-2

Les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (corning 4514) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 20 µL. L'enzyme MetAP-2 humaine (R&D Systems, 3795-ZN-020), est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (NaCl 100 mM et Hepes 50 mM, pH 7, 0.1% BSA), à température ambiante pendant 30 minutes dans un volume de 10µL. Ensuite, une solution contenant l'enzyme DPPIV auxiliaire (R&D Systems, 9168-SE-010) et un substrat fluorogénique MGP-AMC (H-Met-Gly-Pro-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ; excitation : 380 nm, émission : 450 nm) (R&D Systems, réf ES017) est mis en contact de l'enzyme (10µL). La lecture de fluorescence est réalisée en cinétique pendant une heure, sur le lecteur Victor (Perkin Elmer). La concentration finale en substrat est de 250µM et la concentration finale en enzyme MetAP-2 est de 6.25 µg/mL et en DPPIV de 1.25µg/mL.

IRAP

Les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (corning 4514) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 20 µL. L'enzyme IRAP humaine fournie par Efstratos Stratikos (Demokritos center – Athens - Greece), est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (NaCl 100 mM et Hepes 50 mM, pH 7), à température ambiante pendant 30 minutes dans un volume de 10µL. Ensuite, un substrat fluorogénique L-AMC (L-Leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ; excitation : 380 nm, émission : 450 nm) (Sigma Aldrich, L2145) est mis en contact de l'enzyme (10µL). La lecture de fluorescence est réalisée en cinétique pendant une heure, sur le lecteur Victor (Perkin Elmer). La concentration finale en substrat est de 50µM et la concentration finale en enzyme est de 0.02µg/mL.

ERAP-1

Les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (corning 4514) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 20 µL. L'enzyme ERAP-1 humaine fournie par Efstratos Stratikos (Demokritos center – Athens - Greece) ou achetée chez R&D Systems (ref. 2334-ZN-010), est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (NaCl 100 mM et Hepes 50 mM, pH 7), à température ambiante pendant 30 minutes dans un volume de 10µL. Ensuite, un substrat fluorogénique L-AMC (L-Leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ; excitation : 380 nm, émission : 450 nm) (Sigma Aldrich, L2145) est mis en contact de l'enzyme (10µL). La lecture de fluorescence est réalisée en cinétique pendant une heure, sur le lecteur Victor (Perkin Elmer). La concentration finale en substrat est de 50µM et la concentration finale en enzyme est de 0.8µg/mL pour ERAP1 de R&D systems et de 0.1µg/mL pour ERAP1 fournie par Efstratos Stratikos.

ERAP-2

Les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (*corning 4514*) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 20 µL. L'enzyme ERAP-2 humaine fournie par Efstratos Stratikos (Demokritos center – Athens - Greece), est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (NaCl 100 mM et Hepes 50 mM, pH 7), à température ambiante pendant 30 minutes dans un volume de 10µL. Ensuite, un substrat fluorogénique R-AMC (L-Arginine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ; excitation : 380 nm, émission : 450 nm) (Sigma Aldrich, réf A2027) est mis en contact de l'enzyme (10µL). La lecture de fluorescence est réalisée en cinétique pendant une heure, sur le lecteur Victor (Perkin Elmer). La concentration finale en substrat est de 5µM et la concentration finale en enzyme est de 0.5µg/mL.

APN

Les composés sont préalablement déposés dans une plaque 384 puits (*corning 4514*) à l'aide d'un distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO Liquid Handler 550, Labcyte) de manière à obtenir la concentration désirée dans un volume final de 20 µL. L'enzyme APN (Leucine Aminopeptidase, microsomal from porcine kidney, EC 3.4.11.2, Sigma Aldrich, L5006), est pré-incubée avec le produit à tester ou du tampon (NaCl 100 mM et Hepes 50 mM, pH 7), à température ambiante pendant 30 minutes dans un volume de 10µL. Ensuite, un substrat fluorogénique L-AMC (L-Leucine-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride ; excitation : 380 nm, émission : 450 nm) (Sigma Aldrich, L2145) est mis en contact de l'enzyme (10µL). La lecture de fluorescence est réalisée en cinétique pendant une heure, sur le lecteur Victor (Perkin Elmer). La concentration finale en substrat est de 50µM et la concentration finale en enzyme est de 0.1µg/mL.

14.2. Analyse des résultats enzymatiques

Pour chaque puits testés, la valeur moyenne des contrôles négatifs aux temps correspondants est retranchée. Ensuite, la pente est calculée dans la phase linéaire initiale de la réaction enzymatique ainsi que le R². Le facteur Z' est calculé selon cette formule et doit être supérieur à 0.5 pour valider les résultats :

$$Z' = 1 - \frac{(3SD_{c+} + 3SD_{c-})}{|moyenne_{c+} - moyenne_{c-}|}$$

Avec C+ : contrôle positif (enzyme + substrat) et C- : contrôle négatif (tampon + substrat).

Le pourcentage d'inhibition de chaque point est calculé :

$$Inhibition (\%) = 100 - \left(\frac{X * 100}{Moyenne X_{Contrôle positif}} \right)$$

Le calcul des IC₅₀ est réalisé, avec le logiciel XLFit après une régression non linéaire à 4 paramètres.

15. CETSA (Cellular Thermal Shift Assay)

Préparation des cellules et traitements :

Les cellules OPM2 sont préparées à la concentration de 1000000 cellules/mL en flasque de culture. Le traitement est ajouté dans la flasque à la concentration désirée. Après une incubation de 2h à 37°C, 5% de CO₂, les cellules sont récupérées et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS avant d'être reprises dans du PBS puis réparties dans des microtubes PCR à la concentration de 60 millions de cellules/mL.

Choc thermique :

Après 3 minutes à température ambiante, les cellules sont chauffées au thermocycleur (SureCycler 8800, Agilent Technologies) à la température désirée pendant 3 minutes. Après 3 minutes à température ambiante, les cellules sont plongées dans l'azote liquide.

Extraction protéique :

Trois boucles d'un cycle congélation / décongélation / agitation comprenant les actions suivantes sont réalisées :

- Immersion dans un bain d'azote liquide pour la congélation
- Retour à température de 25°C (2 min dans le thermocycleur réglé à 25°C)
- Agitation en vortexant les microtubes une dizaine de secondes

Les microtubes PCR sont ensuite centrifugés à 20000G pendant 20 minutes à 4°C afin de culoter les protéines dénaturées et agrégées. Les surnageants contenant les protéines solubles sont récupérés.

Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose :

Deux techniques peuvent être utilisées pour la détection et la quantification de l'expression de la protéine d'intérêt : le western-blot ou le Dot Blot. Dans la technique du Dot Blot, les protéines ne sont pas séparées par électrophorèse et l'anticorps primaire doit être spécifique. Dans la technique du western-blot, les protéines sont réduites, dénaturées et séparées par électrophorèse.

- Transfert par la technique de Dot Blot :

13µL de chaque échantillon de surnageant sont mis dans une plaque source Echo 384 LDV. Celle-ci est ensuite centrifugée à 1500 G, décélération 5, pendant 2 min. 20nL de chaque échantillon, en triplicat, sont ensuite transférés grâce à l'aide du distributeur de liquide à énergie acoustique (ECHO liquid Handler 550, Labcyte) sur une membrane de nitrocellulose déposée sur une lame de verre. La membrane de nitrocellulose est ensuite laissée à température ambiante pendant 2h et conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

- Transfert par la technique de western-blot :

10µL d'échantillon sont mélangés dans une solution dénaturante contenant du tampon NuPAGE LDS (Life Technologies, réf NP0007) et un agent réducteur NuPAGE (Life Technologies, réf NP0009) dans un volume final de 15µL. L'électrophorèse et le transfert sur une membrane de nitrocellulose est décrite à la **partie 10 du matériel et méthodes**.

Immunodétection, révélation et quantification :

Ces étapes sont décrites dans la **partie 10 du matériel et méthodes**.

Interprétation des résultats :

A l'aide d'image Studio, les signaux identifiés par l'anticorps primaire et secondaire sont quantifiés. Chaque signal correspond à l'ensemble des intensités des pixels contenu dans la zone analysée, auquel le bruit de fond de la zone analysée est soustrait.

Chaque intensité est convertie en pourcentage de l'intensité mesurée de l'échantillon à 40°C pour la condition de traitement considérée.

Une régression non linéaire sigmoïdale est réalisée avec Graph Pad Prism sur la base des points expérimentaux obtenus en utilisant l'équation de la théorie de dénaturation chimique définie par l'équation suivante :

$$f(T) = \frac{1 - \text{plateau}}{1 + e^{-\frac{a}{T-b}}} + \text{plateau}$$

T correspond à la température et a, b et plateau sont des constantes. La valeur f(T) à la température T_{min} est fixée à 100. Le point de fusion de la protéine est défini comme la température T_{Agg} pour laquelle la moitié de la quantité de protéine a été dénaturée.

La différence des T_{Agg} est appelée ΔT_{Agg}.

16. Thermal Proteome Profiling – Temperature Range (TPP-TR)

CETSA :

Une expérience de CETSA selon le protocole décrit en **partie 15 du matériel et méthodes** a été réalisée. Le choc thermique a été réalisé à 6 températures : 40°C – 45.3°C – 50.9°C – 56.2°C – 61.5°C – 67.1°C. L'expression protéique d'IDE a été quantifiée par la technique de Dot-Blot.

Dosage :

La concentration protéique des tubes à 40°C a été déterminée par le kit de dosage protéique microBCA (ThermoFisher, réf 23235).

Analyse protéomique par spectrométrie de masse:

Après dénaturation à 100°C dans 5% de SDS, 5% de βmercaptoéthanol, 1 mM d'EDTA, 10% de glycérol, 10 mM de tampon Tris pH 8 pendant 3 min, 40µg d'échantillons de protéines ont été fractionnés sur un gel SDS-PAGE d'acrylamide à 10%. La migration électrophorétique a été arrêtée dès que l'échantillon de protéine est entré de 0,2 cm dans le gel de séparation. Le gel a été brièvement coloré avec du bleu de Coomassie, et une bande, contenant l'ensemble de l'échantillon, a été coupée. Dans le gel, la digestion des coupes de gel a été effectuée comme décrit précédemment (378). Les peptides digérés séchés ont été solubilisés dans 50 µl de bicarbonate d'ammonium à 50 mM et marqués avec du Tandem Mass Tags -6plexTMT (Thermo Scientific). L'étape de quenching a été directement suivie

d'un fractionnement peptidique en utilisant le kit de fractionnement peptidique en phase inversée Pierce High pH (Thermo Scientific).

Un système UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) a été utilisé pour la séparation des différentes éluions. Les peptides ont été automatiquement fractionnés sur une colonne commerciale à phase inversée C18 (75µm x 500 mm, particule de 2µm, colonne PepMap100 RSLC, Thermo Fisher Scientific, température 55°C). Le trapping a été réalisé pendant 4 min à 5µL/min, avec le solvant A (98% H₂O, 2% ACN et 0,1% FA). L'éluion a été réalisée en utilisant deux solvants A (0,1% FA dans l'eau) et B (0,1% FA dans ACN) à un débit de 300 nL/min. La séparation des gradients était de 3 min à 3% B, 170 min de 3% B à 20% B, 20 min de 20% B à 80% B et maintenue pendant 15 min à 80% B. La colonne a été équilibrée pendant 17 min avec 3 % de tampon B avant la prochaine analyse d'échantillon.

Les peptides élués de la colonne C18 ont été analysés par des instruments Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). La tension d'électrospray était de 1,9 kV et la température capillaire était de 275°C. Des scans MS complets ont été acquis dans l'analyseur de masse Orbitrap sur un rang m/z 400–1200 avec une résolution de 70,000 (m/z 200). La valeur cible était de 3,00E+06. Quinze pics les plus intenses avec un état de charge compris entre 2 et 5 ont été fragmentés dans la cellule de collision HCD avec une énergie de collision normalisée de 27%, et le spectre de masse en tandem a été acquis dans l'analyseur de masse Orbitrap avec une résolution de 17,500 à m/z 200. La valeur cible était 1,00E + 05. Le seuil de sélection d'ions était de 5,0E+04 counts, et les temps d'accumulation d'ions maximum autorisés étaient de 250 ms pour les scans MS complets et de 100 ms pour le spectre de masse en tandem. L'exclusion dynamique a été fixée à 30 s.

Analyse des données protéomiques :

Les données brutes collectées lors des analyses nanoLC-MS / MS ont été traitées comme décrit précédemment (379).

Normalisation et courbes de dénaturation :

Tout d'abord, l'ensemble des protéines en commun entre la condition contrôle et la condition traitée a été déterminé. Pour chaque expérience, toutes les protéines identifiées préalablement et répondant aux critères suivants ont été collectées (= normP) :

- Le fold change à la 3^{ème} température la plus élevée par rapport à la plus basse température (40°C) doit être compris entre 0.4 et 0.6
- Le fold change à la 5^{ème} température la plus élevée par rapport à la plus basse température (40°C) doit être compris entre 0.0 et 0.3
- Le fold change à la 6^{ème} température la plus élevée par rapport à la plus basse température (40°C) doit être compris entre 0.0 et 0.2.

Le fold change median pour toutes les protéines « normP » pour chaque température a été calculé. Une courbe de dénaturation a été tracée. La courbe tracée avec le meilleur R² a été utilisée pour normaliser les deux expériences. Pour chaque expérience, des facteurs de correction ont été calculés en utilisant les FC médians des protéines « normP » (380).

Après normalisation, des courbes de dénaturation ont été tracées pour toutes les protéines identifiées dans chaque condition. Les températures d'agrégation et les pentes de ces courbes ont été calculées pour toutes les protéines répondant à ces critères :

- $R^2 > 0.8$
- La courbe de la condition contrôle possède un plateau bas inférieur à 0.3.

Une p-value sur la différence des températures d'agrégation a été calculée selon les critères décrits par Savitski et al. (380). La pente est ainsi prise en compte dans ce calcul.

Résultats : Caractérisation du mécanisme d'action

1. Efficacité dans le modèle 5T33MM de myélome multiple murin

1.1. Le modèle animal 5T33MM

Une minorité (0,5%) de souris âgées de plus de 2 ans, C57BL/KalwRij, développe un myélome multiple. Différentes lignées cellulaires de myélome multiple murin ont été ainsi développées à partir de ce cancer spontané dont les 5T33MM (43,44,46). L'inoculation de ces cellules 5T33MM dans la veine de la queue d'une souris jeune immunocompétente syngénique C57BL/KALwRij, permet de reproduire chez la souris les caractéristiques du myélome multiple humain : niche des cellules de MM dans la moelle osseuse, hypercalcémie, angiogenèse, résorption osseuse ostéoclastique associée à une gammopathie monoclonale. Dans ce modèle, les cellules de MM se retrouvent principalement dans les organes hématopoïétiques de la souris comme la moelle osseuse, la rate et le foie. Une augmentation de la taille de la rate est ainsi observée. La résidence des cellules dans la moelle osseuse est due à la chimio-attraction et l'adhésion de ces cellules au niveau des cellules endothéliales de la moelle osseuse. Ces dernières contribuent alors à l'augmentation de l'expression de molécules impliquées dans l'invasion (par exemple MMP-9, CD44v6, IGF-1R) des cellules de MM au niveau des fibroblastes de la moelle osseuse. L'expression de RANK-L par ces cellules de MM permet l'activation des ostéoclastes. Une lignée cellulaire 5T33MMvt (*vitro*) capable d'être cultivée *in vitro* sans la dépendance du stroma (elles n'expriment pas notamment IGF-1R ni CD44v6) est disponible et identique à la lignée 5T33MMvv (*vivo*), mais dont la croissance est dépendante du stroma pour cette dernière (381).

1.2. Efficacité *in vitro*

Les combinaisons du composé B avec le bortezomib et le carfilzomib ont été évaluées sur les cellules 5T33MMvt du modèle animal de myélome multiple étudié. Dans l'expérience, le composé B présente un boost plus important de la cytotoxicité du carfilzomib par rapport au bortezomib, en cohérence avec les données présentées dans la **partie 4.4.2 de l'introduction (Figure 53)**. Cependant, dans cette expérience les intervalles de confiance à 95% de la CC₅₀ entre le bortezomib seul et le bortezomib associé au composé B à 15µM ne se chevauchent pas, ce qui laisse penser que le boost est présent (**Tableau 20**).

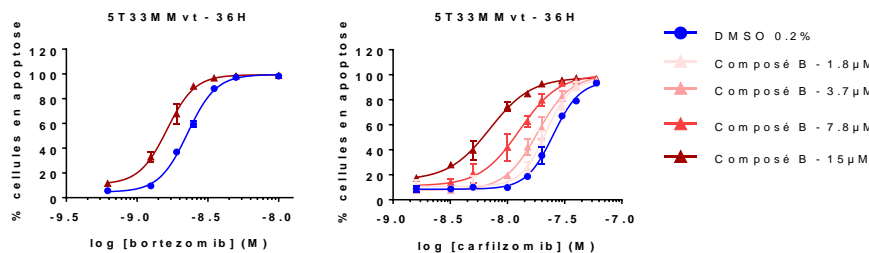


Figure 53 : Pourcentage de cellules 5T33MMvt en apoptose après 36h de traitement avec des doses croissantes en bortezomib ou en carfilzomib seuls, ou associés à des doses croissantes en composé B. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de triplicats obtenus lors d'une expérience.

		5T33MMvt
CFZ	CC ₅₀ CFZ (nM)	25.12 [23.82 à 26.64]
	CC ₅₀ CFZ + composé B à 15μM (nM)	7.02 [6.43 à 7.63]
	Ratio CC ₅₀	3.58
BTZ	CC ₅₀ BTZ (nM)	2.27 [2.21 à 2.33]
	CC ₅₀ BTZ + composé B à 15μM (nM)	1.63 [1.54 à 1.71]
	Ratio CC ₅₀	1.39

Tableau 20 : Tableau présentant les valeurs de CC₅₀ et les intervalles de confiance à 95% du carfilzomib (CFZ) seul, du bortezomib (BTZ) seul ou associés à 15μM de composé B. Ces valeurs ont été obtenues par le logiciel GraphPad Prism 7 par l'utilisation d'une régression non linéaire à 4 paramètres. Les valeurs présentées sont la résultante d'une expérience réalisée en triplicats.

1.3. Protocole expérimental

L'expérience *in vivo* a été réalisée par le Dr Elke De Bruyne et son équipe au sein du département d'hématologie et d'immunologie du myélome de Bruxelles Centre (*Vrije Universiteit Brussel* VUB). L'objectif de la manipulation est de mesurer l'efficacité d'un composé de la série chimique, le composé B en association avec le bortezomib. Leurs expériences personnelles sur ce modèle ne permettent pas d'atteindre une dose tolérable en carfilzomib pour observer une activité anticancéreuse, c'est pourquoi l'inhibiteur du protéasome bortezomib a été évalué.

Ainsi, des cellules 5T33MMvt ont été purifiées de souris malades et injectées en intraveineux dans une souris naïve C57BL/KALwRij de 7 semaines. Les souris ont été traitées à partir du deuxième jour après l'inoculation, avec 0,6mg/kg de bortezomib (il s'agit d'une dose sous-optimale) en sous-cutanée, 2 fois par semaine, plus ou moins associé avec le composé B à 50 mg/kg en intrapéritonéal tous les jours. Les groupes véhicules, bortezomib et la combinaison du bortezomib et du composé B étaient composés de treize souris, douze souris pour le groupe du composé B seul. Lorsqu'une souris présentait des signes de morbidités, les souris ont été sacrifiées. Pour mesurer l'efficacité du traitement, le pourcentage de plasmocytose dans la moelle osseuse par coloration avec le May-Grünwald-Giemsa, la quantité de protéines anormales M dans le sérum par électrophorèse, ainsi que le poids de la rate ont été déterminés. L'expérience a duré 21 jours (**Figure 54**).

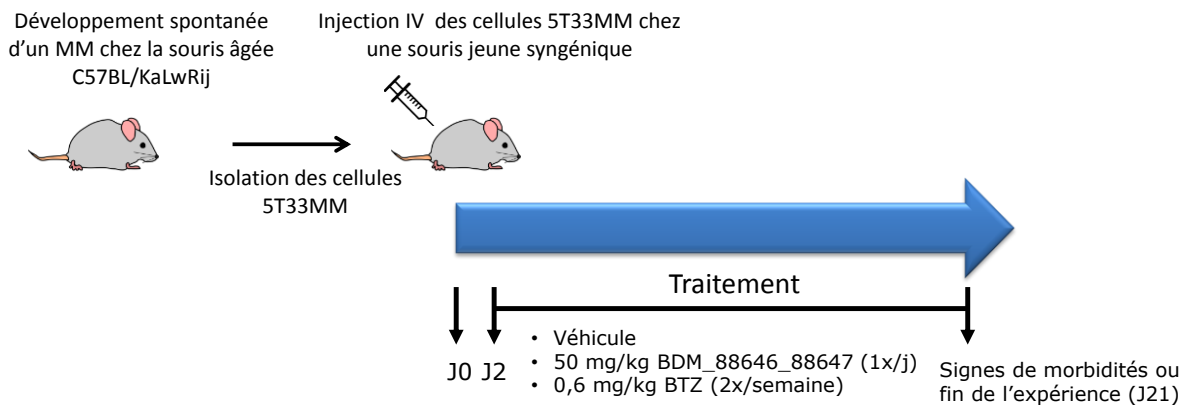


Figure 54 : Schéma du protocole expérimental de la mesure de l'efficacité de la combinaison du composé B avec le bortezomib dans le modèle murin 5T33MM de myélome multiple.

1.4. Résultats

Dans ce modèle, le bortezomib à la dose sous-optimale utilisée, a montré une réduction significative de la plasmocytose dans la moelle osseuse (* : $p \leq 0.05$) mais n'a pas montré de changements significatifs sur la quantité de protéine M anormale dans le sérum (immunoglobuline monoclonale), ni sur le poids de la rate. Le composé B n'a induit aucun changement significatif sur ces 3 paramètres tumoraux. En revanche, la combinaison du composé B avec le bortezomib a provoqué une diminution plus importante de la plasmocytose dans la moelle osseuse par rapport au bortezomib seul (§§ : $p \leq 0.005$), ainsi qu'une diminution significative de la quantité de protéine M anormale dans le sérum (§§ : $p \leq 0.005$) et du poids de la rate (§§§ : $p \leq 0.001$) par rapport aux composés seuls (**Figure 55**).

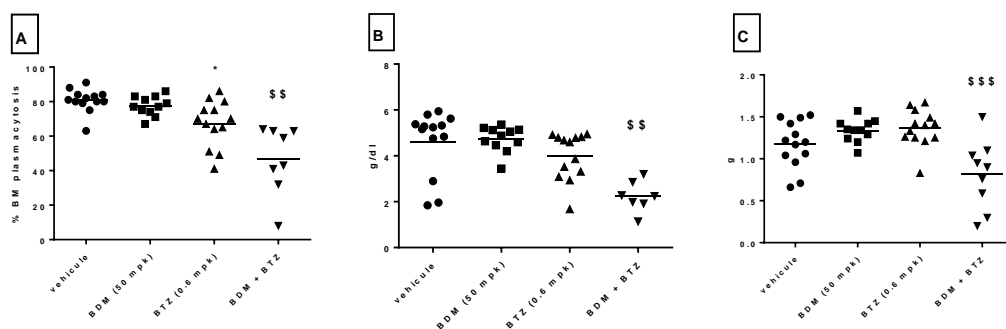


Figure 55 : Effet du bortezomib (BTZ) seul ou en association avec le composé B (BDM) sur différents paramètres tumoraux : le pourcentage de plasmocytose dans la moelle osseuse (A), la quantification de la protéine M anormale dans le sérum (B), et le poids de la rate (C). Pour la comparaison des groupes entre eux le logiciel GraphPad Prism a été utilisé et une ANOVA à 1 voie avec un post-test Tukey a été utilisé (*: $p \leq 0.05$ par rapport au véhicule ; §§ : $p \leq 0.005$ et §§§ : $p \leq 0.001$ par rapport aux agents seuls).

Ainsi, la démonstration de l'efficacité de la combinaison d'un composé de la série chimique avec un inhibiteur du protéasome dans un modèle murin de myélome multiple soutient l'ensemble des résultats *in vitro* obtenus sur ces composés, mais surtout l'intérêt thérapeutique du développement de ces petites molécules pour le traitement du myélome multiple.

2. Caractérisations phénotypiques

2.1. Rationnel pour le choix des phénotypes

Au vu de l'ensemble des données bibliographiques et de l'activité des composés de la série chimique comme booster d'agents anti-cancéreux, en particulier de l'inhibiteur du protéasome carfilzomib, nous avons voulu décrire plus complètement le mécanisme d'action des composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE en s'intéressant à d'autres phénotypes que l'apoptose cellulaire. Ainsi, l'observation de phénotypes, autres que le boost apoptotique, peut nous permettre de comprendre l'action de ces composés par comparaison entre les effets des différents traitements (carfilzomib seul, composé de la série chimique seul et l'association des deux). Le choix de ces phénotypes s'est fait de manière rationnelle en se focalisant tout d'abord sur le mécanisme d'action du carfilzomib (inhibition du protéasome, induction d'un stress du RE, induction d'aggrésomes). Aussi, un collaborateur, le Pr. Peter Van Endert, a observé que des souris IDE KO (knock-out) présentaient une sensibilité accrue aux rayonnements γ , nous avons ainsi exploré les combinaisons de nos composés avec d'autres rayonnements (UV-C et rayonnements X) (**Figure 56**).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la modulation de l'activité chymotrypsine du protéasome par les différents traitements sur les cellules OPM2. En effet, cette activité est décrite pour être inhibée par les inhibiteurs du protéasome, en particulier du carfilzomib (79), mais également pour être modulée par la protéine IDE (359). Cette activité chymotrypsine du protéasome a été étudiée en utilisant le kit *Proteasome-Glo-Chymotrypsine-Like Cell-Based Assay* de Promega. Ce test est basé sur la lecture de luminescence induite par l'ajout d'un substrat perméable (Suc-LLVY aminoluciferin) présentant un motif clivable par l'activité chymotrypsine du protéasome. Le clivage de ce substrat par le protéasome permet la libération du substrat de l'enzyme luciférase, générant ainsi un signal luminescent. Ainsi, l'intensité de luminescence est proportionnelle à l'activité du protéasome.

Dans un second temps, nous avons voulu connaître l'effet des différentes conditions de traitement sur la morphologie cellulaire et subcellulaire des cellules OPM2 puis HeLa, par l'utilisation de la microscopie électronique. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'ingénieur de recherche Nicolas Barois du plateau de microscopie électronique de la Plateforme BICeL située au sein de l'Institut Pasteur de Lille. La microscopie électronique est notamment une technique de référence pour la visualisation d'un stress du RE qui se caractérise par une dilatation de ce dernier (382).

Dans un troisième temps, nous avons voulu connaître l'impact des différents traitements sur la voie de signalisation de l'UPR. En effet, les inhibiteurs de protéasome sont décrits pour impacter cette voie de signalisation impliquée dans la survie et la mort cellulaire (**cf. partie 3.5 de l'introduction**). L'étude de cette voie a été réalisée par une étude

transcriptomique en RT-qPCR de gènes impliqués dans cette voie de signalisation, en cinétique sur des cellules OPM2.

Dans un quatrième temps, nous nous sommes intéressés à l'effet des différents traitements sur la formation des agrésomes. Les agrésomes sont des sous-structures cellulaires où les protéines mal-conformées s'accumulent et s'agrègent. Cette structure est surmontée d'une cage de filaments intermédiaires (vimentine) et se situe au niveau du centre d'organisation des microtubules (MTOC) à proximité du noyau (383,384). Les protéines sont transportées vers l'agrésome via un transport rétrograde sur les microtubules impliquant diverses protéines comme la dynéine, GRP78 ou encore HDAC6 (134,385). Cette dernière servirait de « pont » entre les protéines ubiquitinylées et la dynéine. La formation des agrésomes se ferait lorsque la capacité du protéasome est excédée, par exemple lorsque le protéasome est inhibé, et aurait une fonction protectrice du fait qu'ils puissent être dégradés par autophagie (386,387). La détermination du pourcentage de cellules avec agrésomes a été réalisée par l'utilisation du *Protéostat® Aggresome detection kit* d'Enzo Life Sciences. Le réactif permettant la détection des agrésomes est une molécule rotor non fluorescente, c'est-à-dire que sa rotation intramoléculaire de deux portions aromatiques autour d'une liaison simple carbone-carbone prévient sa fluorescence. En revanche, lorsque cette molécule s'intercale dans les feuilletts β de structures quaternaires de protéines, notamment lorsqu'elles sont mal-conformées et agrégées, la rotation de cette molécule est inhibée et permet l'émission d'une fluorescence (388). Cet essai est initialement développé par le fournisseur pour de l'analyse cellulaire en cytométrie en flux ou en microscopie à fluorescence en lames. Nous avons optimisé et miniaturisé cet essai en plaques 384 puits et développé un script d'analyse d'image qui nous permet de quantifier ces agrésomes afin de tester rapidement et simultanément de nombreuses conditions. Nous avons apporté et démontré une application de criblage pour la quantification des agrésomes à cet essai et cela a fait l'objet d'une publication (**cf. annexe 1**). L'étude de l'effet des différentes conditions de traitements sur ce phénotype a été réalisée sur les cellules HeLa.

Enfin, nous nous sommes intéressés au phénotype de mort cellulaire lors de rayonnements UV-C et de rayons X en association avec les composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE. En effet, le projet IDE dans le cancer a débuté par l'observation du Pr. Peter Van Endert que des souris KO IDE étaient plus sensibles aux irradiations que des souris WT (*wild-type*). Au regard de cette observation initiale, nous avons voulu savoir dans un premier temps si nos composés étaient capables de booster une toxicité induite par des UV-C, puis dans un second temps par des rayons X de la radiothérapie. Ainsi, cet enjeu thérapeutique d'améliorer l'effet de la radiothérapie avec nos composés a été envisagée en collaboration avec la clinique vétérinaire lilloise Oncovet sur des cellules de mélanome de chien TLM-1.

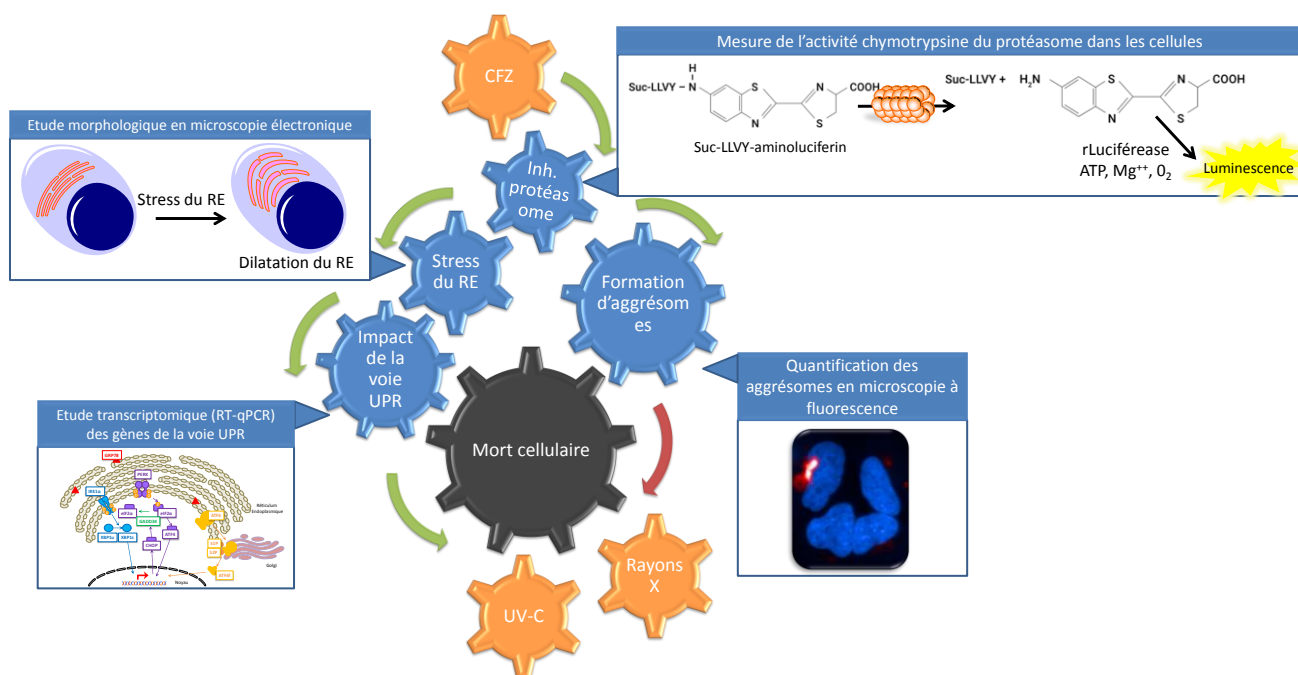


Figure 56 : Schéma représentant le rationnel pour le choix des différentes observations phénotypiques. Ce rationnel est basé sur le mécanisme d'action du carfilzomib (CFZ) (inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome, induction d'un stress du réticulum endoplasmique (RE), impact de la voie UPR (*Unfolded Protein Response*) et formations d'agrégomes) mais également sur l'étude de la combinaison des composés chimiques des inhibiteurs d'IDE avec différents rayonnements, UV-C et rayons X.

2.2. Mesure de l'activité chymotrypsine du protéasome

Après 2h de traitement, on remarque que le carfilzomib à 2,5 nM induit une inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome d'environ 35% dans les cellules OPM2. Le composé A seul quant à lui n'a pas d'effet sur cette activité enzymatique. En revanche, la combinaison du composé A à 15µM et du carfilzomib à 2,5nM inhibe davantage l'activité chymotrypsine du protéasome (environ 56%) et cela est significatif sur les deux expériences réalisées ($p < 0.01$) (**Figure 57**). Ainsi, l'effet boost apoptotique observé lors de la combinaison pourrait dépendre de l'amplification de l'inhibition de l'activité du protéasome par la combinaison.

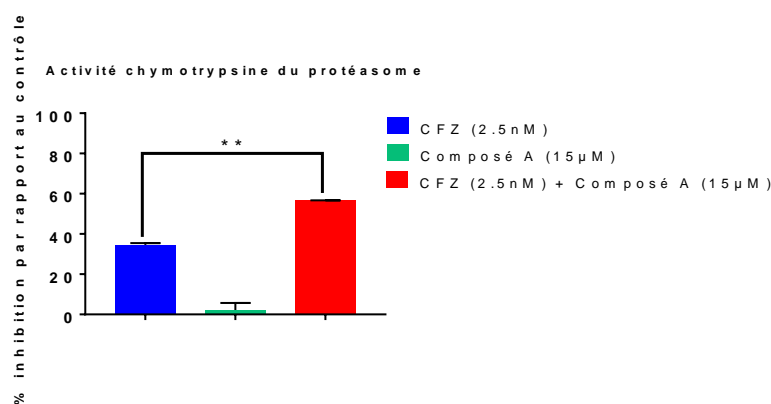


Figure 57 : Pourcentage d'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome dans les cellules OPM2 traitées pendant 2h avec du DMSO, du carfilzomib à 2,5nM, du composé A à 15µM et la combinaison du carfilzomib à 2,5nM et du composé A à 15µM. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de deux expériences indépendantes, réalisées chacune en triplicats techniques. Une analyse statistique par ANOVA à 1 voie suivie d'un post-test Tukey a été réalisée pour déterminer la différence significative entre le carfilzomib seul et le carfilzomib associé au composé A (** : $p < 0.01$).

Cependant, ce renforcement de l'inhibition de l'activité du protéasome par la combinaison est-il assez important et suffisant pour être responsable du boost apoptotique ? Est-ce que cet effet est visible avec d'autres inhibiteurs du protéasome comme le bortezomib ? Est-ce que les combinaisons avec d'autres agents anti-cancéreux comme le panobinostat inhibent le protéasome ? Aussi, par quel mécanisme pouvons-nous expliquer ce boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome ? Est-ce que ce renforcement de l'inhibition de cette activité du protéasome lors de la combinaison peut s'expliquer par l'inhibition d'IDE par le composé ? Pour répondre à ces questions, de plus amples investigations seraient nécessaires.

2.3. Etude de la morphologie cellulaire par microscopie électronique

Une expérience de microscopie électronique sur les cellules OPM2 traitées pendant 24h avec du DMSO 0,2%, du BDM_44768 à 15 μ M, du carfilzomib à 5nM et la combinaison du BDM_44768 à 15 μ M et du carfilzomib à 5nM a été réalisée. L'objectif de cette expérience était d'observer les changements de morphologie cellulaire opérés lors du traitement par notre composé seul, et lors de son association avec le carfilzomib.

Un stress du réticulum endoplasmique se visualise en microscopie électronique par un réticulum endoplasmique dilaté (382). Plusieurs observations en microscopie électronique ont été réalisées avec le bortezomib et montrent un réticulum endoplasmique gonflé et discontinu, ainsi qu'une induction d'autophagosomes (389,390). Une autre étude de microscopie électronique, cette fois-ci avec le carfilzomib, décrit l'induction d'autophagosome mais ne décrit cependant pas l'aspect du réticulum endoplasmique (391).

On remarque ainsi que les cellules OPM2 traitées avec le véhicule présentent un réticulum endoplasmique long, fin, et continu, tout comme les cellules traitées avec le BDM_44768 à 15 μ M pendant 24h (**Figure 58 A et B**). Le nombre de contacts entre le RE et les mitochondries est identique entre la condition contrôle et la condition BDM_44768 à 15 μ M (19,8% pour le contrôle et 19,4% pour le BDM_44768). Les cellules traitées par 5nM de carfilzomib présentent un RE gonflé, moins long avec la présence d'inclusions, également présentes dans la membrane nucléaire (**Figure 58 C et C'**). Ainsi, par ces observations nous confirmons l'induction d'un stress du RE par le carfilzomib. En revanche, les cellules traitées avec la combinaison du carfilzomib avec le BDM_44768 présentent majoritairement un RE fin, long, et continu, comme le contrôle (**Figure 58 D**).

Lors de l'analyse des cellules mourantes, il n'y a pas eu de différences entre celles traitées par le carfilzomib et celles traitées par la combinaison. On remarque ainsi une condensation du noyau, les cellules sont plus denses aux électrons (noyau, cytoplasme, mitochondrie) et la présence de vacuoles (**Figure 59**). Davantage de cellules en stade avancé de la mort cellulaire ont été observées lors de la combinaison, en cohérence avec le boost apoptotique mesuré par l'activation de la caspase 3.

La limite de la microscopie électronique réside dans la direction non maîtrisée des coupes des cellules qui font que nous pouvons passer à côté d'observations

morphologiques. Ainsi, ce qui n'a pas été vu lors d'une expérience ne signifie pas que cela n'existe pas.

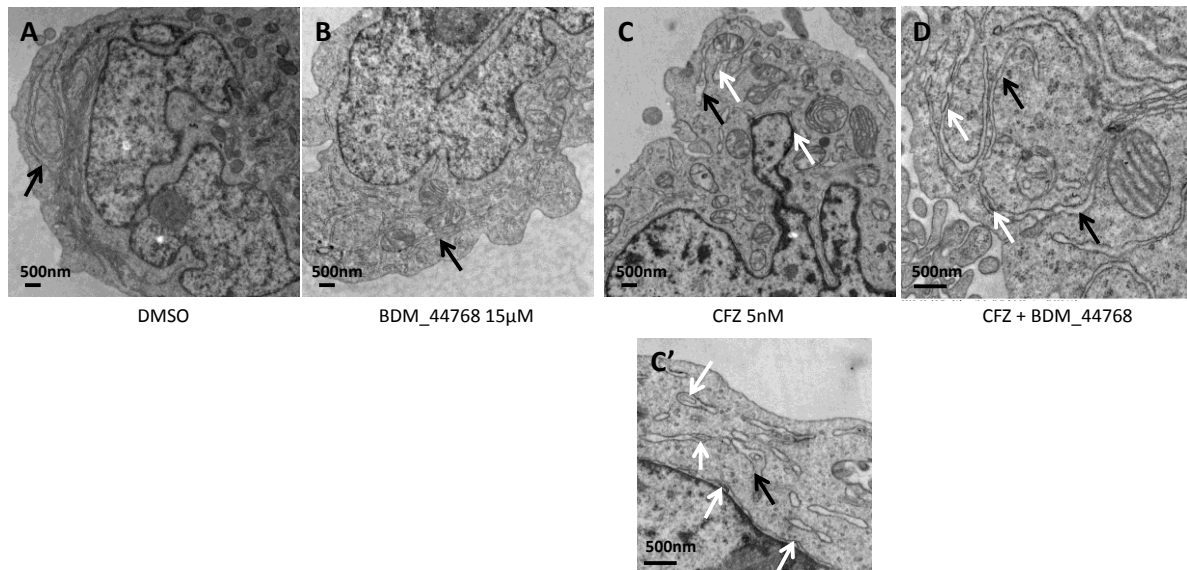


Figure 58 : Observation en microscopie électronique de cellules OPM2 traitées pendant 24h avec du DMSO (A), du BDM_44768 à 15µM (B), du carfilzomib à 5nM (C et C') et de la combinaison du carfilzomib avec le BDM_44768 (D). Les flèches noires indiquent le réticulum endoplasmique et les flèches blanches la présence d'inclusions dans le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire. La barre d'échelle est précisée sur chaque image.

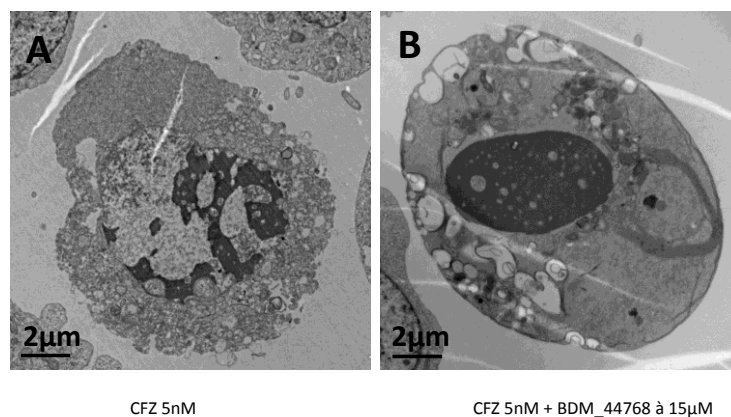


Figure 59 : Observation en microscopie électronique de cellules OPM2 mourantes traitées pendant 24h avec du carfilzomib à 5nM (A) et de la combinaison du carfilzomib avec le BDM_44768 à 15µM (B). La barre d'échelle est précisée sur chaque image.

Une autre expérience de microscopie électronique sur les cellules HeLa a été réalisée dans le but de savoir si ce phénotype est reproductible sur une autre lignée cellulaire. Pour cela, les cellules HeLa ont été traitées pendant 48h avec 10nM de carfilzomib seul ou en association avec plusieurs molécules de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE. Cependant, le réticulum endoplasmique n'a pas montré d'anormalités entre les différentes conditions (**Figure 60**). Plusieurs hypothèses peuvent être émises : 1/ la dose en carfilzomib n'était pas assez importante, 2/ les lignées cellulaires HeLa et OPM2 ne réagissent pas de la même façon, 3/ le phénotype n'a pas été observé.

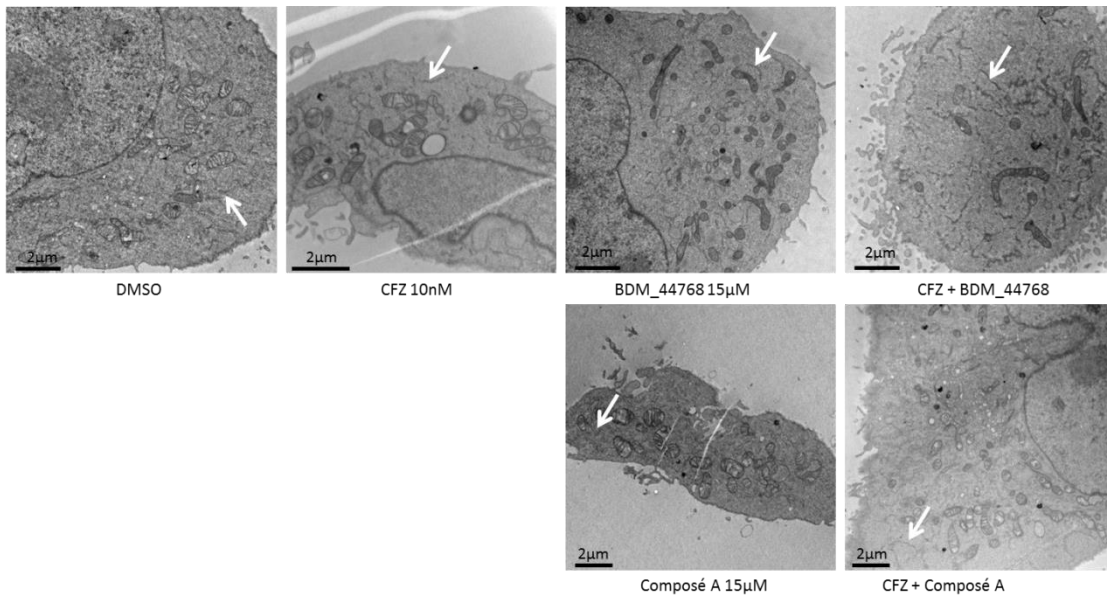


Figure 60 : Observations en microscopie électronique de cellules HeLa traitées pendant 48h avec du DMSO, du BDM_44768 à 15µM, du composé A à 15µM, du carfilzomib à 10nM, la combinaison du carfilzomib avec le BDM_44768 et le composé A. Les flèches blanches indiquent le réticulum endoplasmique. La barre d'échelle est précisée sur chaque image.

De plus, l'observation de cellules mourantes de chacune de ces conditions a permis de visualiser des structures de type membranaire très denses notamment lors de l'association du composé A au carfilzomib (**Figure 61**). L'osmium ayant une affinité plus importante pour les lipides insaturés il se pourrait que ces structures soient membranaires. Aussi, des agrégats protéiques ont été observés.

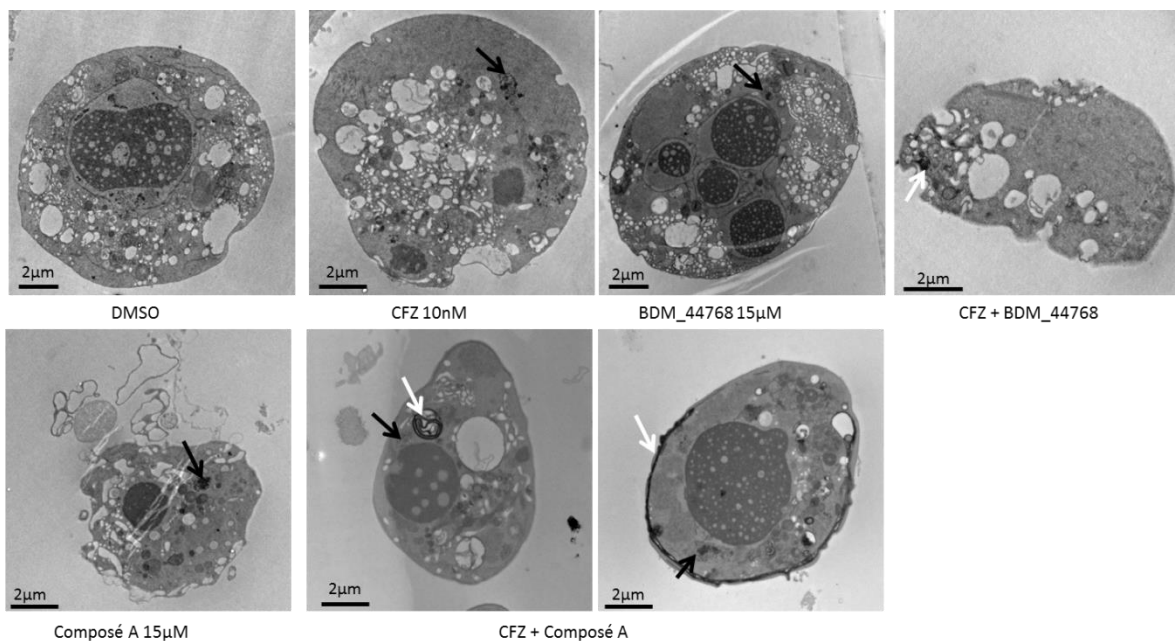


Figure 61 : Observations en microscopie électronique de cellules HeLa mourantes traitées pendant 48h avec du DMSO, du BDM_44768 à 15µM, du composé A à 15µM, du carfilzomib à 10nM, la combinaison du carfilzomib avec le BDM_44768 et le composé A. Les flèches blanches indiquent les structures denses et les flèches noires des agrégats protéiques. La barre d'échelle est précisée sur chaque image.

Ainsi, il serait nécessaire de répéter l'expérience sur les OPM2, pour savoir si l'observation des différences de morphologies du RE se reproduit, et sur les HeLa, avec plusieurs concentrations en carfilzomib, pour confirmer les observations et émettre des hypothèses.

2.4. Etude transcriptomique de gènes impliqués dans l'UPR

Les cellules OPM2 ont été traitées pendant différents temps de cinétique (3h, 7h, 16h et 24h) avec du DMSO 0,2%, du carfilzomib à 3.8nM, du BDM_44768 à 15µM, ou la combinaison des deux. L'expression en ARNm de certains gènes impliqués dans la voie UPR a été étudiée. Ces concentrations ont été choisies parce qu'il existe un boost apoptotique à ces concentrations par la combinaison. Le BDM_44768 à 15µM seul n'induit pas l'apoptose des cellules jusqu'à 36h de traitement, et le carfilzomib seul à 3.8nM induit peu d'apoptose, il s'agit donc d'une dose peu efficace (**Figure 62**).

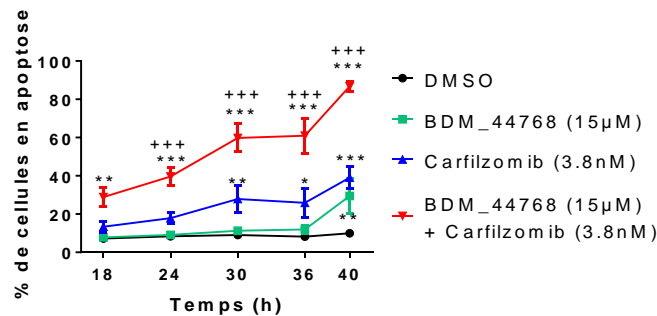


Figure 62 : Pourcentage de cellules OPM2 en apoptose après 18h, 24h, 30h, 36h, 40h de traitement avec du DMSO 0,2%, du carfilzomib à 3.8nM, du BDM_44768 à 15µM et la combinaison des deux. Les résultats montrent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes au minimum. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Bonferroni correspondent à $p < 0.001$: ***, $p < 0.01$: **, $p < 0.05$ par rapport au véhicule et $p < 0.001$: +, $p < 0.01$: ++, $p < 0.05$: + par rapport au carfilzomib seul.

Concernant la branche PERK de l'UPR, on remarque que l'expression en ARNm de ce dernier n'est pas impactée de manière significative par les composés seuls à tous les temps de cinétique étudiés. En revanche, une diminution significative ($p < 0.05$) après 24h de traitement par la combinaison est observée. Le facteur de transcription ATF4 de cette branche n'est pas modulé par le BDM_44768 seul aux temps de cinétique étudiés. Le carfilzomib seul diminue l'expression de ce facteur de transcription après 24h de traitement ($p < 0.05$). Une courbe en cloche de l'expression d'ATF4 est observée lors de la combinaison, avec un pic d'expression à T7H ($p < 0.001$), qui est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$). De plus, GADD34 impliqué dans la boucle de rétrocontrôle négatif de cette branche PERK par l'induction de la déphosphorylation d'eIF2α n'est pas modulé significativement par les composés seuls. En revanche, la combinaison induit significativement son expression dès 16h de traitement ($p < 0.01$ à t16h et $p < 0.001$ à t24h) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p < 0.01$) (**Figure 63**).

Concernant la branche IRE1 α de l'UPR, on remarque que l'expression en ARNm de ce dernier n'est pas significativement impactée par les différents traitements aux temps de cinétique étudiés. Aussi, l'expression du facteur de transcription XBP1s n'est pas modulée par les composés carfilzomib et BDM_44768 seuls aux temps de cinétique étudiés. En revanche, son expression est induite significativement par la combinaison après 7h de traitement uniquement ($p < 0.05$). Concernant la forme non épissée XBP1u, son expression n'est pas impactée par le carfilzomib et le BDM_44768 seuls aux temps de cinétique étudiés. En revanche, une diminution significative de l'expression d'XBP1u est observée par la combinaison dès 7h ($p < 0.01$ à 7h, $p < 0.001$ à 16h et 24h) et cela devient significativement différent du carfilzomib seul après 16h de traitement ($p < 0.05$ à 16h, $p < 0.001$ à 24h). L'étude du ratio XBP1s/XBP1u confirme l'induction d'XBP1s après 7h de traitement par la combinaison ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.01$) (**Figure 63**).

Concernant la branche ATF6 de l'UPR, les composés seuls ne modulent pas de manière significative l'expression de ce gène. En revanche, la combinaison induit une légère mais significative augmentation de l'expression en ARNm d'ATF6 après 16h ($p < 0.01$) et 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p < 0.01$) (**Figure 63**).

Aussi, d'autres gènes sont impliqués dans cette voie UPR comme la protéine chaperon GRP78. Le gène codant pour cette protéine n'est pas modulé significativement par les composés seuls aux temps de cinétique et aux concentrations étudiés. En revanche, la combinaison induit significativement ce gène dès 16h de traitement ($p < 0.001$ après 16h de traitement et $p < 0.05$ après 24h de traitement) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$). Aussi, le facteur de transcription CHOP n'est pas modulé significativement par les composés seuls aux temps de cinétique et aux concentrations étudiés. Cependant, la combinaison induit fortement et significativement ce gène dès 7h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$).

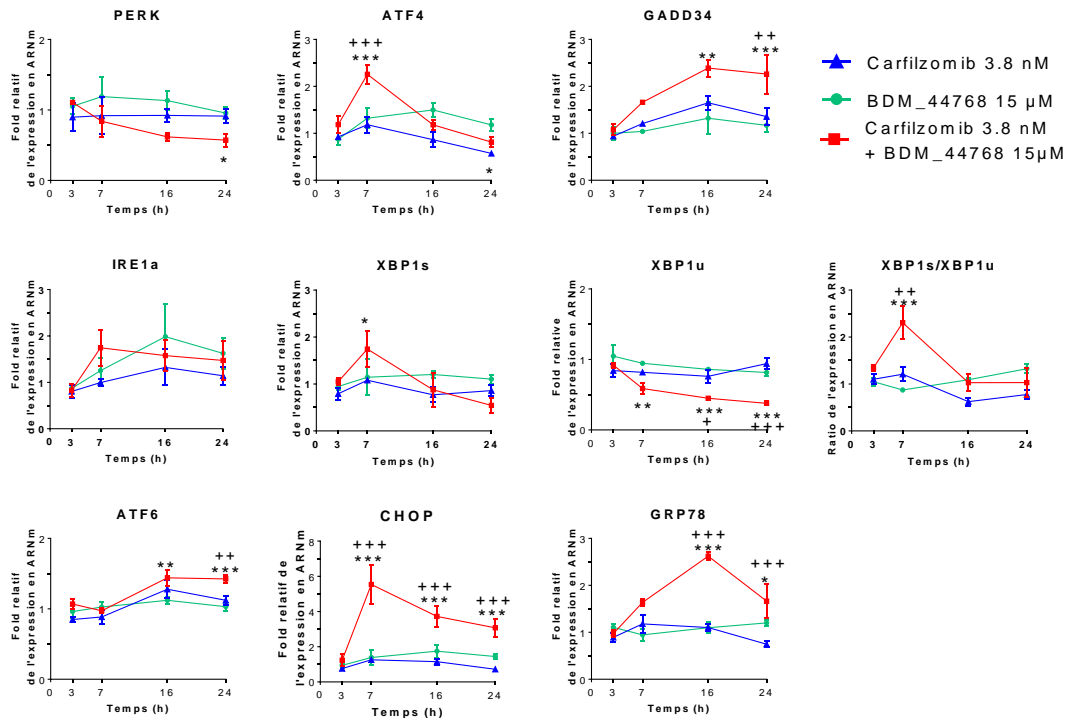


Figure 63 : Quantification de l'ARNm de différents gènes de l'UPR dans les cellules OPM2 par RT-qPCR après 3h, 7h, 16h et 24h de traitement par le véhicule DMSO 0,2%, le BDM_44768 à 15µM, le carfilzomib à 3,8nM ou l'association des deux. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle de chaque temps. Les valeurs reportées représentent la moyenne et l'écart-type d'expériences indépendantes (n=2 pour t3h, t7h et t16h et n=4 pour t24h) réalisées chacune en triplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 voies (post-test Bonferroni) par rapport au contrôle correspondent à p<0,001 : *** ; p<0,01 : ** ; et p<0,05 : * ; par rapport au carfilzomib : p<0,001 : +++ ; p<0,01 : ++ et p<0,05 : +

Pour conclure, le BDM_44768 seul ne module pas l'expression des gènes de la voie UPR à la dose de 15µM dans les cellules OPM2 aux temps de cinétique étudiés. Le carfilzomib n'a pas montré de modulation de la majorité des gènes étudiés à la dose de 3,8nM, qui est une dose peu efficace sur l'induction de l'apoptose. En effet, on aurait pu s'attendre à une induction des gènes de l'UPR par l'inhibiteur de protéasome, comme il est décrit dans la littérature, mais peut-être à une dose plus élevée (392). Aussi, on constate que les facteurs de transcription de la voie PERK (ATF4), de la voie IRE1α (XBP1s) ainsi que CHOP sont induits par la combinaison. On remarque que ces gènes sont modulés au cours du temps, avec un pic d'expression pour ATF4 et XBP1s à 7h et une induction constante dès 7h pour CHOP. Le gène ATF6 est également induit par la combinaison dès 16h de traitement. Ainsi, l'ensemble de ces résultats converge vers une activation des 3 branches de la voie UPR par la combinaison du carfilzomib à 3.8nM et du BDM_44768 à 15µM. Cependant, l'étude du niveau d'expression protéique et des états de phosphorylation de ces protéines impliquées dans cette voie UPR par la technique de Western-Blot serait complémentaire et nécessaire pour confirmer cette induction.

Lors de l'étude de l'expression des gènes de la voie UPR, l'expression en ARNm d'IDE a été également étudiée du fait de l'inhibition de cette protéine par le BDM_44768 et de son rôle possible de protéine chaperon, en lien peut être avec l'UPR (349) (**Figure 64**). On

remarque que le BDM_44768 seul ne module pas l'expression de ce gène. En revanche, le carfilzomib seul induit significativement son expression après 16h de traitement uniquement ($p < 0.05$). La combinaison des deux induit significativement son expression dès 16h de traitement ($p < 0.01$ à t16h et $p < 0.001$ à t24h) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p < 0.05$). Ainsi, l'induction de ce gène par l'inhibiteur de protéasome et par la combinaison pourrait conforter l'idée qu'IDE ait un rôle de protéine chaperon.

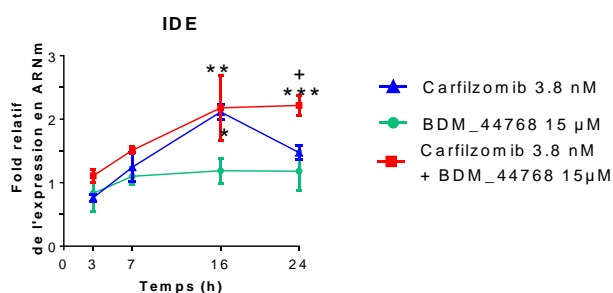


Figure 64 : Quantification de l'ARNm d'IDE dans les cellules OPM2 par RT-qPCR après 3h, 7h, 16h et 24h de traitement par le véhicule DMSO 0,2%, le BDM_44768 à 15µM, le carfilzomib à 3,8nM ou l'association des deux. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle de chaque temps. Les valeurs reportées représentent la moyenne et l'écart-type d'expériences indépendantes (n=2 pour t3h, t7h et t16h et n=4 pour t24h) réalisées chacune en triplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 voies (post-test Bonferroni) par rapport au contrôle correspondent à $p < 0,001$: *** ; $p < 0,01$: ** ; et $p < 0,05$: * ; par rapport au carfilzomib : $p < 0,001$: +++ ; $p < 0,01$: ++ et $p < 0,05$: +

2.5. Quantification des agrésomes

2.5.1. Publication de l'optimisation de l'essai

Comme précisé dans la **partie 2.1 des résultats**, nous avons optimisé et miniaturisé en plaques 384 puits l'utilisation du réactif Protéostat® pour la détection des agrésomes, et développé un script d'analyse d'image afin de les quantifier. Ce développement fut nécessaire pour tester rapidement et simultanément de nombreuses conditions. La robustesse de cet essai a été démontrée par le criblage de la chimiothèque Prestwick. Le manuscrit accepté par le journal SLAS Discovery associé à ce développement est présenté en **annexe 1** (393).

2.5.2. Etude de l'effet des composés sur la formation des agrésomes

Le carfilzomib à 20nM pendant 72h sur des cellules HeLa induit fortement des agrésomes (78.7% +/- 10.3, $p < 0.001$) alors que 10nM en carfilzomib induit peu d'agrésomes (28,1% +/- 10.6) par rapport au véhicule (21.4% +/- 3.1) ou encore au composé A à 15µM seul (21.2% +/- 7.3) (**Figure 65**). La combinaison du carfilzomib à 10nM avec le composé A à 15µM est responsable d'une forte induction des agrésomes (87.7% +/- 8.1, $p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$). Ainsi, le composé A booste la présence des agrésomes induite par le carfilzomib. Ce phénotype est observé à des temps longs (t48h ou t72h) comme l'apoptose cellulaire.

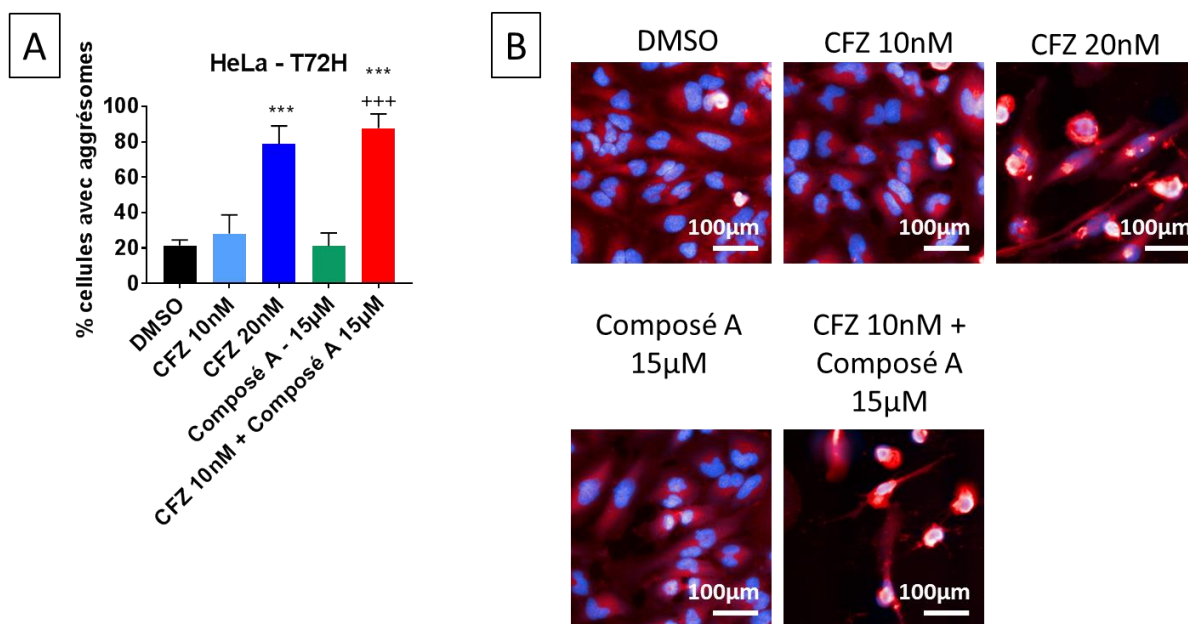


Figure 65 : A. Pourcentage de cellules HeLa avec agrégomes après 72h de traitement par du DMSO 0.2%, le carfilzomib à 10 et 20nM, le composé A à 15µM, ou l'association du carfilzomib à 10nM et du composé A à 15µM. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes réalisées chacune en triplicats techniques. L'analyse statistique a été réalisée avec GraphPad Prism 7 par une analyse ANOVA à 1 voie suivie d'un post-test Tukey. B. Images représentatives des résultats présentés en A. avec le même contraste. Barre d'échelle : 100µm (60X).

2.6. Etude de la mort cellulaire lors de l'association avec des radiations

2.6.1. Les rayonnements UV-C

Les rayons UV-C (200-280nm) sont les rayonnements UV les plus énergétiques. Ceux-ci sont principalement responsables de dommages à l'ADN par la formation de photoproduits 6-4 pyrimidine-pyrimidones et de dimères de pyrimidine (394,395). Les UV-A et les UV-B seraient quant à eux davantage responsables d'un stress oxydatif, de la dénaturation des protéines et de la peroxydation des lipides. Cependant, il a été aussi démontré que les UV-C pouvaient induire la production de ROS (396). L'ensemble de ces dommages induits par les UV-C vont conduire à la réparation de l'ADN, à l'arrêt du cycle cellulaire et/ou à l'apoptose des cellules. Différentes voies de signalisation sont ainsi induites par les UV-C notamment ATR/Chk1 (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein/Checkpoint kinase-1*), JNK, la kinase p38, p53, NF-κB et AP1 (394,397,398). Aussi, eIF2α serait également phosphorylé à la suite de radiations UV-C par un mécanisme GCN2 dépendant (216). PERK pourrait également jouer un rôle dans cette phosphorylation d'eIF2α par les UV-C mais à un degré moindre. Cette phosphorylation serait impliquée dans l'activation de la voie NF-κB (216), et n'induirait pas l'expression d'ATF4 (217). Cependant, des réponses transcriptionnelles très différentes ont été observées entre des doses faibles et des doses élevées en UV-C (394). On peut également supposer que ces réponses varient entre les lignées cellulaires.

Nous avons réalisé des combinaisons de nos composés avec différentes doses en UV-C et avons suivi la mortalité cellulaire des cellules TLM-1 par imagerie avec un marquage par l'iodure de propidium. L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques qui permet le marquage des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Nous constatons que le composé A est capable de booster la toxicité induite par les UV-C de manière significative ($p < 0.001$ avec 400 J/m^2 d'UV-C) et cet effet est dose-dépendant (**Figure 66** et **Figure 67**). Aussi, le BDM_44768 boost également la toxicité des UV-C mais il semblerait que celui-ci soit moindre qu'avec le composé A (**Figure 67**). Cela rejoint l'observation sur le boost apoptotique, qui est meilleur avec le composé A qu'avec le BDM_44768.

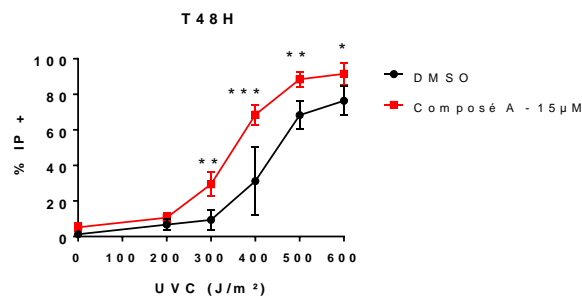


Figure 66 : Les cellules TLM-1 ont étéensemencées et traitées le lendemain avec $15 \mu\text{M}$ de composé A ou du DMSO. Après 24h de prétraitement, les cellules ont été lavées et soumises à différentes doses en UV-C suivi d'un post-traitement identique au prétraitement par du DMSO ou du composé A à $15 \mu\text{M}$. Le pourcentage de cellules TLM1 marquées à l'iodure de propidium (IP) 48h après les UV-C est présenté comme la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Bonferroni correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0,05$: * par rapport à la condition DMSO de la dose en UV-C correspondante.

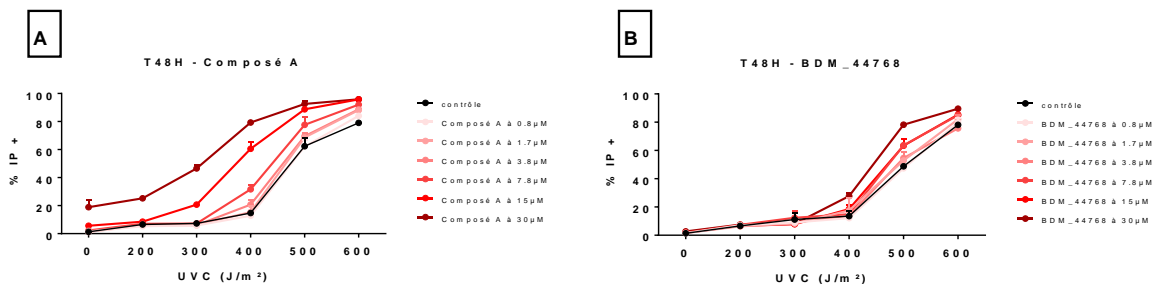


Figure 67 : Les cellules TLM-1 ont étéensemencées, et traitées le lendemain avec le véhicule ou différentes doses en composé A (A) ou BDM_44768 (B). Après 24h de prétraitement, les cellules ont été lavées et soumises à différentes doses en UV-C suivi d'un post-traitement identique au prétraitement. Le pourcentage de cellules TLM1 marquées à l'iodure de propidium 48h après les UV-C est présenté comme la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats.

Comment expliquer ainsi que les composés soient capables de booster des rayonnements UV-C et des inhibiteurs de protéasome ? Est-ce par des voies de signalisation communes entre ces traitements ou est-ce plutôt par l'ajout d'un stress supplémentaire ? On remarque que des voies de signalisation induites par les UV-C pourraient être communes avec celles induites par les inhibiteurs de protéasome comme la voie NF- κ B mais aussi la phosphorylation d'eIF2 α . Ainsi, des études de l'expression de protéines impliquées dans ces voies de signalisation seraient nécessaires pour approfondir la caractérisation de ce phénotype.

2.6.2. Rayons X

Des expériences d'irradiations sur les cellules de mélanome de chien TLM-1 par des rayons X ont déjà fait l'objet d'une publication dans laquelle l'apoptose par un marquage Annexin-V et la mortalité par l'iodure de propidium ont été suivis (399).

Nous avons donc étudié dans une première expérience l'apoptose par le marquage NucView™ 488 de ces cellules TLM1 traitées, dans un premier temps en suspension par des rayons X, puis dans un second temps par certains composés de la série chimique (post-traitement). Après 72h de traitement, nous n'avons pas observé de boost de l'apoptose induite par les rayonnements X en association avec les composés de la série chimique dans cette expérience (**Figure 68**).

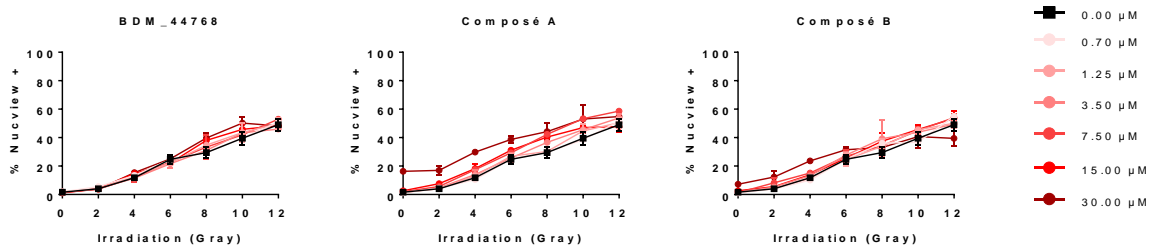


Figure 68 : Les cellules TLM-1 ont été irradiées en suspension par différentes doses en rayonnements X, puis traitées avec différentes doses en BDM_44768, composé A ou composé B. Le pourcentage de cellules marquées au NucView™ 488 correspond au pourcentage de cellules en apoptose 72h après les irradiations. Les résultats montrent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en duplicat.

Dans une seconde expérience, le protocole a été modifié sur plusieurs points par rapport à la première expérience : les modalités de traitement par les composés ont été changées, les cellules ont été traitées 24h avant les irradiations et juste après les irradiations (pré-post-traitement) dans cette nouvelle expérience contre un post-traitement uniquement lors de la première expérience ; une irradiation sur cellules adhérentes contre une irradiation sur cellules en suspension ; des doses en rayonnements plus importantes jusque 24Gy contre 12 Gy ; un marquage par l'iodure de propidium contre un marquage au NucView™488 ; et un suivi en cinétique plus long jusque 144h contre 72h. Nous observons ainsi dans cette deuxième expérience un boost de la toxicité induite par les irradiations par l'ajout de nos composés (**Figure 69**). Ce boost s'apprécie par la mesure du ratio des AUC corrigées. En effet celui-ci est, après 120h de traitement, de 1,83 pour le composé A à 15μM et le composé B à 15μM et de 1,39 pour le BDM_44768 à 15μM. Cela se rapproche de l'observation faite lors de la combinaison avec les UV-C où le BDM_44768 semblait être un moins bon booster de la toxicité des UV-C que le composé A. Cependant, du fait de changements importants dans le protocole expérimental entre la première et la deuxième expérience, il est difficile de savoir pourquoi les composés ont été plus efficaces dans les conditions de cette deuxième expérience.

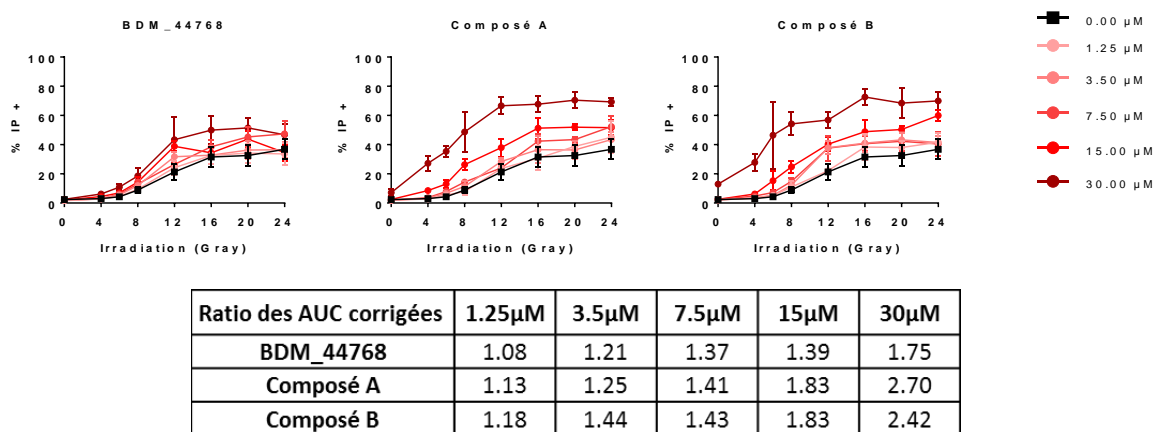


Figure 69 : Les cellules TLM-1 ont étéensemencées, et traitées 2h après, par du DMSO ou différentes doses en composés BDM_44768, composé A ou composé B (prétraitement). Le lendemain, les cellules ont été lavées et irradiées en plaque par différentes doses en rayonnements X, suivi d'un post-traitement identique au prétraitement. Le pourcentage de cellules marquées à l'iode de propidium après 120h de traitement a été déterminé et montre la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats. Le ratio des AUC corrigés après 120h de traitement est également présenté.

Pour conclure, ces résultats convergent vers le fait que les composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE soient capables de booster la toxicité de rayonnements, UV-C et rayons X (les résultats en combinaison avec les rayons X doivent être confirmés par la répétition de l'expérience). Cela est en cohérence avec l'observation du Pr. Van Endert sur le fait que des souris IDE KO soient plus sensibles aux irradiations. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'observation *in vitro* que nous avons faite puisse être indépendante de l'inhibition d'IDE.

2.7. Conclusions sur ces observations phénotypiques

Les différentes observations phénotypiques réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE lorsqu'ils ont utilisés seuls. En revanche, ces observations ont permis de montrer que l'association de ces composés avec le carfilzomib boostait l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome, la présence des agrésomes et induisait l'UPR. Les composés peuvent également booster la toxicité induite par des rayonnements UV-C et rayons X.

Nous ne sommes cependant pas en mesure de conclure sur les liens de causalité entre ces différentes observations d'une part, et entre l'inhibition d'IDE et ces observations d'autre part (**Figure 70**). Des études supplémentaires sont nécessaires pour approfondir ces observations.

Est-ce que le boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine peut être à l'origine de l'induction de la voie UPR et ainsi d'induire la mort à l'origine du boost apoptotique ?

Est-ce que le boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine peut être à l'origine du boost de la présence d'agrésomes et ainsi du boost apoptotique ?

Est-ce que le boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine est suffisant pour expliquer les effets ? Par quel(s) mécanisme(s) pouvons-nous expliquer ce boost ? Existe-t-il un lien entre l'induction de la voie UPR et la formation d'agrésomes ?

Est-ce que le carfilzomib, les UV-C et les rayons X induisent un effet commun dont dépendent les composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE ? Ou est-ce l'addition des effets de ces agents avec ceux de la série chimique qui peut expliquer le boost de la toxicité ? Ou est-ce que ces boosts s'expliquent par des effets différents ?

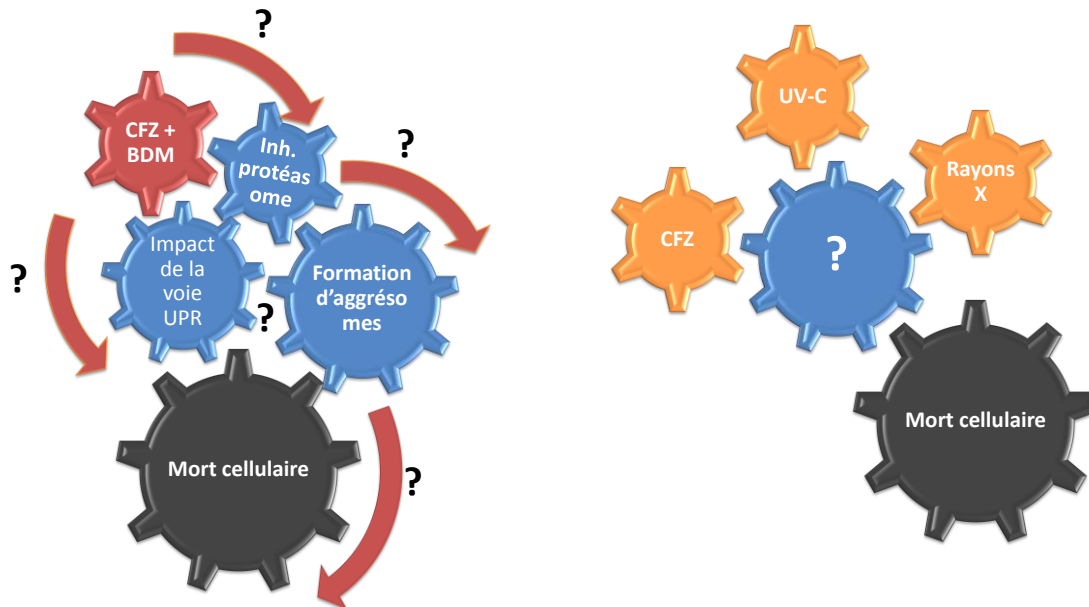


Figure 70 : Questionnement sur les différentes observations réalisées

3. Etude du transcriptome

3.1. Design de l'expérience

Une étude du séquençage du transcriptome entier de cellules (RNAseq), a été réalisée pour tenter d'établir des chaînes causales et identifier parmi ces changements ceux qui pourraient être à l'origine de l'effet boost apoptotique induit par les petites molécules lors de l'association avec le carfilzomib. Le choix de la lignée cellulaire s'est porté sur les cellules HeLa dans la perspective de réaliser des confirmations de l'implication de certains gènes par des expériences de siRNA facilement. Nous avons choisi également de réaliser cette expérience en cinétique afin d'ordonner les observations dans le temps et d'établir des hypothèses de causalité des changements transcriptomiques par rapport au phénotype apoptotique.

3.1.1. Expériences de prétraitement

Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si une cellule prétraitée avec les boosters pouvaient être modifiée, la rendant ainsi plus sensible au carfilzomib, et si oui, à partir de quand. Pour cela des expériences de prétraitement avec le BDM_44768 et le composé A ont été réalisées sur des cellules HeLa pendant différents temps de cinétique. Les cellules ont été ensuite lavées et traitées avec le carfilzomib. L'apoptose de ces cellules a été mesurée 72h après (Figure 71).

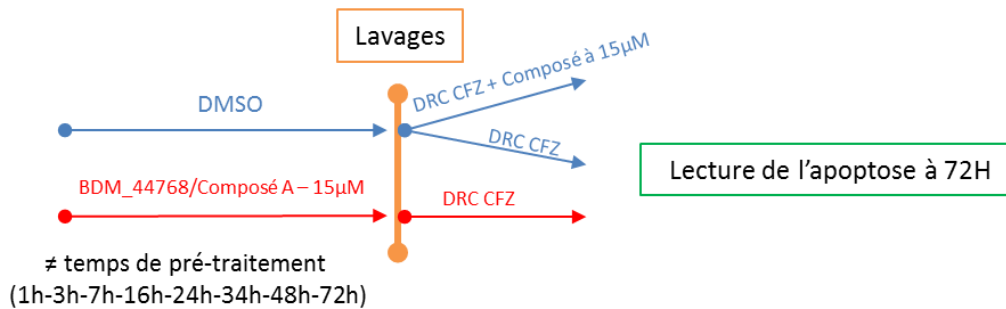


Figure 71 : Schéma représentant le déroulement des expériences de prétraitement par les composés sur les cellules HeLa. Les cellules HeLa ont été ensemencées puis traitées le lendemain par du BDM_44768 à 15µM, du composé A à 15µM ou du DMSO pendant différents temps de cinétique. Après cette pré-incubation les cellules sont lavées et une gamme de concentration (DRC : dose response curve) en carfilzomib seul ou en association avec 15µM de composé a été ajouté en même temps que le NucView488™ et le Hoechst, pour la lecture de l'apoptose 72h après par imagerie à fluorescence.

Il semblerait ainsi que le boost apoptotique du carfilzomib par le BDM_44768 nécessite un co-traitement quel que soit le temps de prétraitement. En effet, les cellules ne semblent pas être sensibilisées pour la réponse au carfilzomib. Concernant le composé A, on pourrait se questionner quant aux temps longs de prétraitement. Il semblerait cependant que même pour ces temps longs cela n'égalerait pas le boost obtenu lors du co-traitement, nous choisissons donc de réaliser le RNAseq en co-traitement (**Figure 72**). Les résultats de cette expérience ne convergent pas vers une modification transcriptomique irréversible et délétère induite par les composés pour les cellules traitées par le carfilzomib.

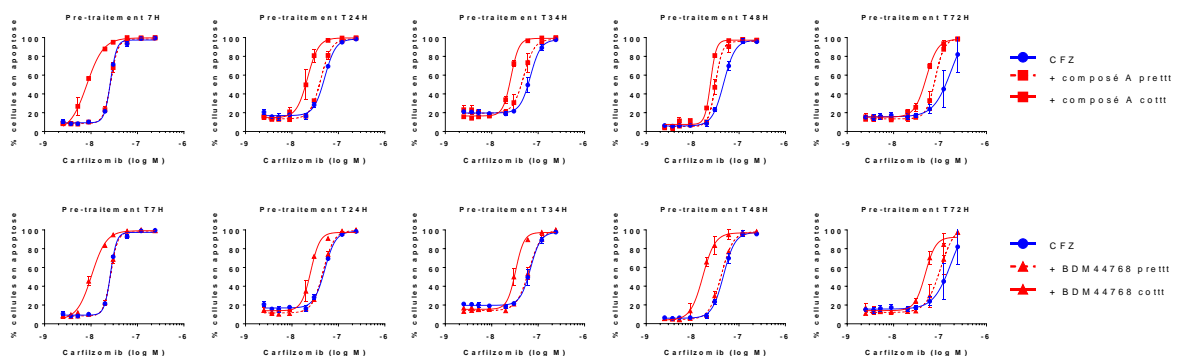


Figure 72 : Les cellules HeLa ont été ensemencées puis traitées le lendemain par du BDM_44768 à 15µM, du composé A à 15µM ou du DMSO pendant différents temps de cinétique (7h, 24h, 34h, 48h, 72h). Après cette pré-incubation, les cellules sont lavées et une gamme de carfilzomib seul ou en association avec 15µM de composé a été ajouté en même temps que le NucView488™ et le Hoechst pour la lecture de l'apoptose 72h après par imagerie à fluorescence. Les résultats présentent la moyenne et l'écart-type de réplicats techniques d'une expérience.

3.1.2. Choix des temps de cinétique

Nous souhaitons connaître les gènes impliqués dans le boost apoptotique. Pour cela nous devons nous positionner avant le phénotype apoptotique d'activation des caspases qui apparaît plus tardivement à partir de 48h dans les cellules HeLa. Nous avons choisi de réaliser l'expérience avec la concentration de 20nM de carfilzomib responsable de moins de 50% d'apoptose à 48h et avec laquelle un effet boost est visible (**Figure 73**).

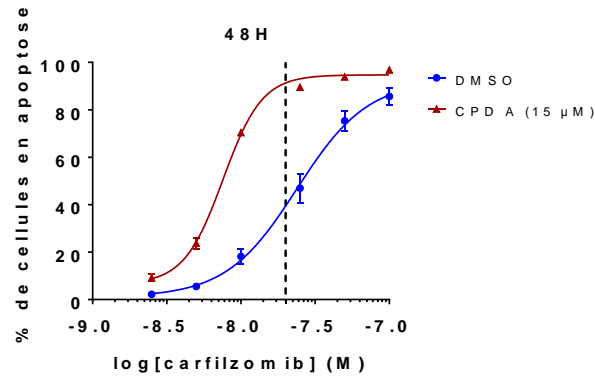


Figure 73 : Pourcentage de cellules HeLa en apoptose après 48h de traitement avec une gamme de concentration en carfilzomib seul ou en association avec le composé A à 15µM. Les résultats montrent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats. Le trait en pointillé vertical représente la concentration en carfilzomib de 20nM.

Afin de faire notre choix sur les temps de cinétique, nous avons choisi de suivre l'expression transcriptomique de CHOP à différents temps : 3h, 7h, 16h et 24h. CHOP étant un facteur de transcription fortement induit et précocement lors de la combinaison entre le BDM_44768 et le carfilzomib dans les cellules OPM2 (cf. **partie 2.4 des résultats**). Différentes conditions de traitement ont été explorées : le carfilzomib à 20 nM seul ou en association avec le composé A à 15µM ou le BDM_44768 à 15µM.

On remarque que CHOP est fortement induit par la combinaison dès 3h dans une expérience et dès 7h dans une autre expérience. Il ne semble pas y avoir de différence entre le BDM_44768 et le composé A (**Figure 74**).

Ainsi, nous avons choisi de réaliser l'expérience de RNAseq avec la combinaison du carfilzomib et du composé A du fait que le boost apoptotique est meilleur qu'avec le BDM_44768. Nous avons également décidé de le réaliser à T0h, T8h et T24h car nous souhaitons être en amont de l'apoptose dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents à la mort cellulaire. En effet, après 8h et 24h de co-traitement nous sommes certains que l'activité transcriptomique est modifiée, comme en témoigne l'expression génique de CHOP.

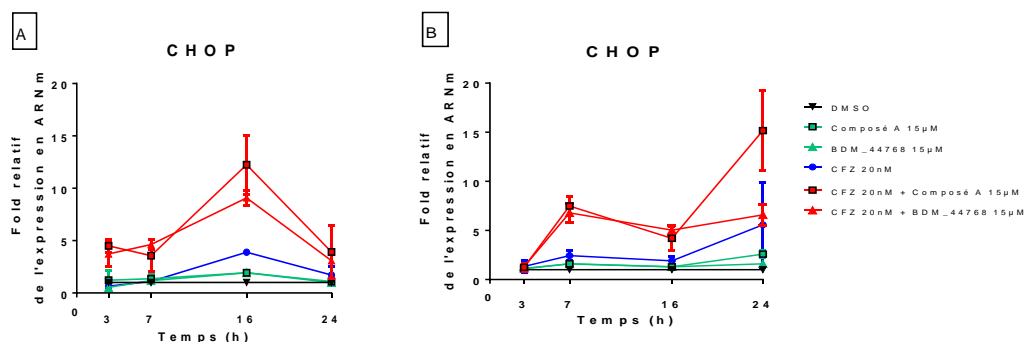


Figure 74 : Quantification de l'ARNm de CHOP dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 3h, 7h, 16h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A ou de BDM_44768 dans deux expériences indépendantes (A et B). L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle de chaque temps. Chaque graphique (A et B) présente les résultats obtenus lors d'une expérience avec la moyenne et l'écart-type de réplicats techniques.

Quatre expériences indépendantes d'extraction d'ARN de cellules HeLa ont été ainsi réalisées avec les conditions de traitement évoquées précédemment. Les ARN ont été ensuite envoyés à la société Macrogen pour le séquençage entier après vérification de leurs qualités. Avant l'envoi des échantillons nous avons vérifié l'expression de l'ARNm de CHOP dans ces 4 expériences indépendantes. On remarque que les résultats sont assez homogènes sauf peut-être pour l'expérience n°3 où l'expression de CHOP augmente entre 8h et 24h de traitement par la combinaison, alors qu'elle stagne ou diminue légèrement dans les autres expériences (**Figure 75**).

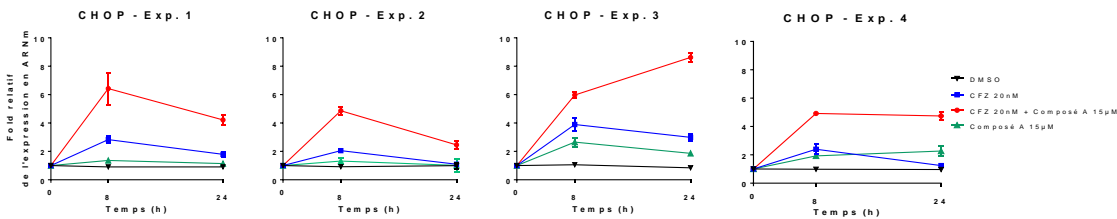


Figure 75 : Quantification de l'ARNm de CHOP dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Chaque graphique présente les résultats obtenus lors d'une expérience avec la moyenne et l'écart-type de réplicats.

3.2. Les changements transcriptomiques mis en évidence

3.2.1. La démarche de l'analyse transcriptomique

A la réception des données de RNAseq et en collaboration avec le Dr. Fabien Delahaye, une analyse de l'homogénéité des différents réplicats a été réalisée. Celle-ci permet de connaître l'homogénéité des réplicats biologiques et ainsi d'éventuellement exclure un échantillon si celui-ci diffère de manière importante. Dans un second temps, une analyse des voies de signalisation (pathways) à partir de bases de données a été réalisée, en fixant des seuils arbitraires sur l'amplitude des changements transcriptionnels (*fold change FC*) et sur la significativité de ceux-ci (*p value* ajustée par le nombre d'observations *padj*). Une confirmation de la modulation de gènes impliqués dans ces voies de signalisation a été réalisée par la technique de RT-qPCR, et est nécessaire pour confirmer les observations du RNAseq. Ensuite, un approfondissement des données de RNAseq obtenues a été réalisé, notamment par l'analyse des gènes les plus modulés et qui ne sont pas forcément connectés aux analyses des voies de signalisation. De plus, des logiciels de prédiction des facteurs de transcription pouvant être à l'origine des changements transcriptomiques sont disponibles et ont été utilisés notamment pour établir une chaîne de causalité (**Figure 76**).

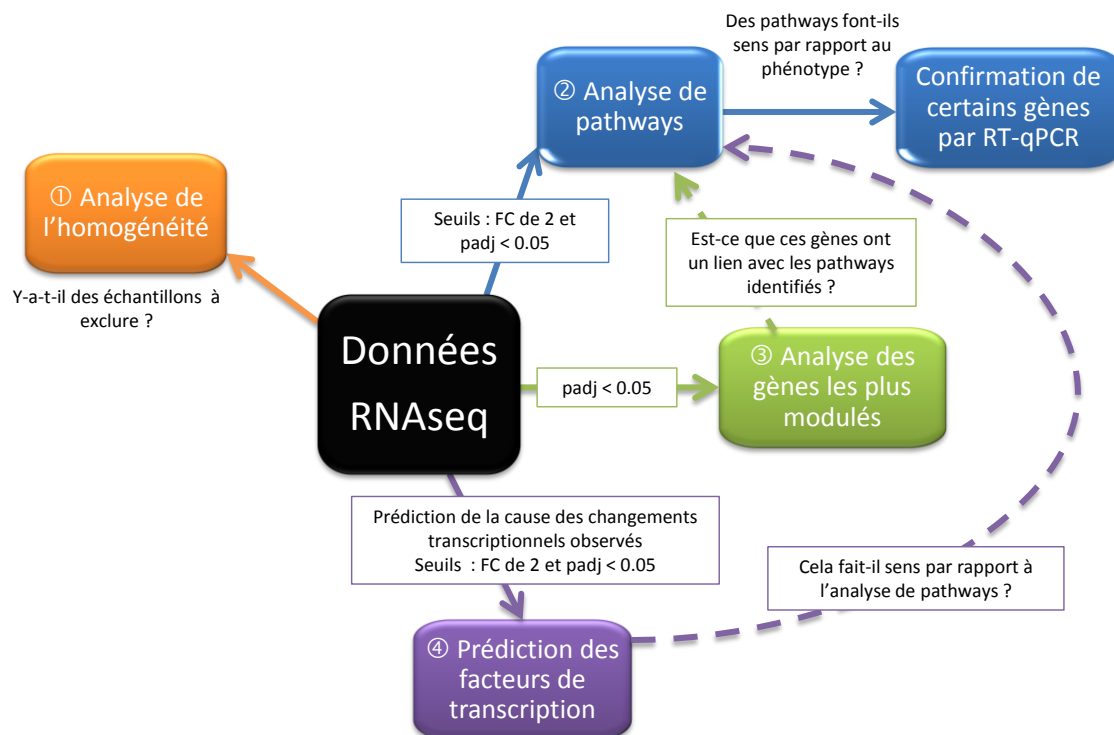


Figure 76 : Schéma de la démarche pour l'analyse des données transcriptomiques obtenues.

3.2.2. Homogénéité de la réponse

L'analyse en composantes principales permet de caractériser les sources de variabilité parmi l'ensemble des données. La contribution de chaque composante est représentée en pourcentage de la variance. Les composantes principales 1 et 2 mettent en exergue les variabilités dues aux temps de cinétique et les variabilités dues aux conditions de traitement. Par ce graphique (**Figure 77**), nous pouvons voir que la réponse entre les expériences indépendantes est assez homogène, sauf peut-être pour l'échantillon n°3 qui semble avoir répondu de manière un peu différente. Cette observation est en cohérence avec les résultats de RT-qPCR obtenus sur CHOP avant envoi. Nous avons effectué des analyses différentielles des gènes modulés significativement lorsque nous éliminons cet échantillon n°3 ou non. Les résultats montrent que nous obtenons davantage d'informations lorsque cet échantillon n°3 est conservé lors de l'analyse (**Tableau 21**). Ainsi, l'ensemble des analyses présentées ensuite ont été réalisées sur la moyenne des 4 échantillons indépendants.

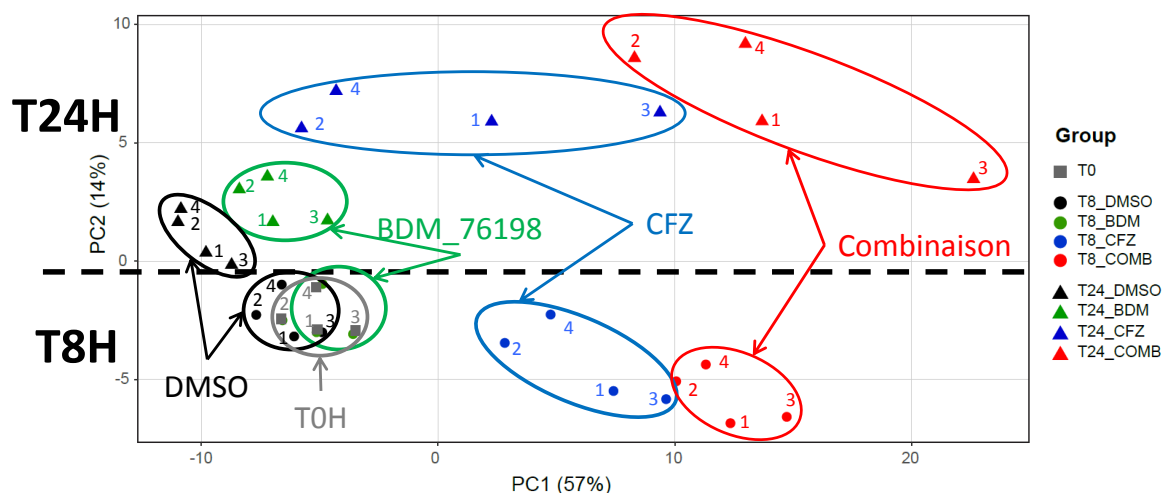


Figure 77 : Plot des composantes principales représentées en pourcentage de la variance pour caractériser les sources de variabilité des résultats de RNAseq obtenus sur les échantillons de 4 expériences indépendantes sur des cellules HeLa traitées pendant 0h, 8h et 24h avec du DMSO, du carfilzomib à 20nM, du composé A à 15µM et la combinaison des deux.

FC \geq 2 et padj <0.05	N=3 (exclusion de l'échantillon n°3)	N=4 (sans exclusion d'échantillons)
CFZ vs COMB T8H	47 gènes	82 (42 communs avec n=3)
CFZ vs COMB T24H	546 gènes	1037 (509 communs avec n=3)

Tableau 21 : Tableau représentant le nombre de gènes dont les changements transcriptionnels sont supérieurs (sur et sous-expression) ou égaux à 2 et significatifs (p-value ajustée par le nombre d'observations inférieure à 5%, padj < 0.05) pour le traitement par le carfilzomib associé au composé A par rapport au carfilzomib seul. Le tableau compare le nombre de gènes obtenus si l'échantillon n°3 est gardé (N=4) ou exclu (N=3).

3.2.3. Analyses des voies de signalisation de la réponse transcriptomique

Différentes bases de données ont été utilisées à partir du site GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) afin d'analyser la réponse transcriptomique induite par les différentes conditions : les bases de données Kegg, Réactome, CGP (*Chemical and Genetic Perturbations*) et Hallmark (400). La base de données CGP regroupe des données de la littérature de l'analyse de gènes modulés par des composés chimiques ou des modifications génétiques. La limite de cette base est son contenu qui ne peut contenir que des données pour des modifications chimiques ou génétiques étudiées et publiées par des auteurs. L'ensemble des analyses a été réalisé sur un changement transcriptomique au moins égal à 2 fois (sur et sous expression) entre les conditions et sur une p-value ajustée par le nombre d'observations inférieure à 5% (**Tableau 22**).

Temps de cinétique	Condition étudiée	Condition de comparaison	Nombre de gènes
T8H	composé A	DMSO	0
	CFZ	DMSO	472
	Combinaison	DMSO	1769
	Combinaison	CFZ	82
T24H	composé A	DMSO	65
	CFZ	DMSO	536
	Combinaison	DMSO	3416
	Combinaison	CFZ	1037

Tableau 22 : Nombre de gènes dont les changements transcriptionnels sont supérieurs ou égaux à 2 (sur et sous expression) et significatifs (padj < 0.05) pour les conditions présentées dans le tableau.

On remarque alors que le composé A seul module peu de gènes et seulement après 24h de traitement, alors que la combinaison induit de nombreux changements transcriptionnels. Cela est en corrélation avec l'absence d'observation de phénotype lorsqu'on utilise le composé A seul, mais par contre l'existence de nombreux phénotypes lorsqu'il est en combinaison avec des IPs. Il faut cependant noter que les changements transcriptionnels ne sont pas toujours corrélés au niveau d'expression protéique (401).

3.2.3.1. Transcriptome du composé A

Tout d'abord, le composé A après 8h de traitement sur les cellules HeLa ne conduit pas à des changements transcriptionnels significatifs comparé au véhicule DMSO. Cependant, après 24h de traitement 65 gènes ont été impactés (**Tableau 22**). L'analyse des voies de signalisation montre que parmi ces gènes plusieurs sont reliés à des voies de métabolisme des acides aminés, quelle que soit la base de données utilisée (**Figure 78**).

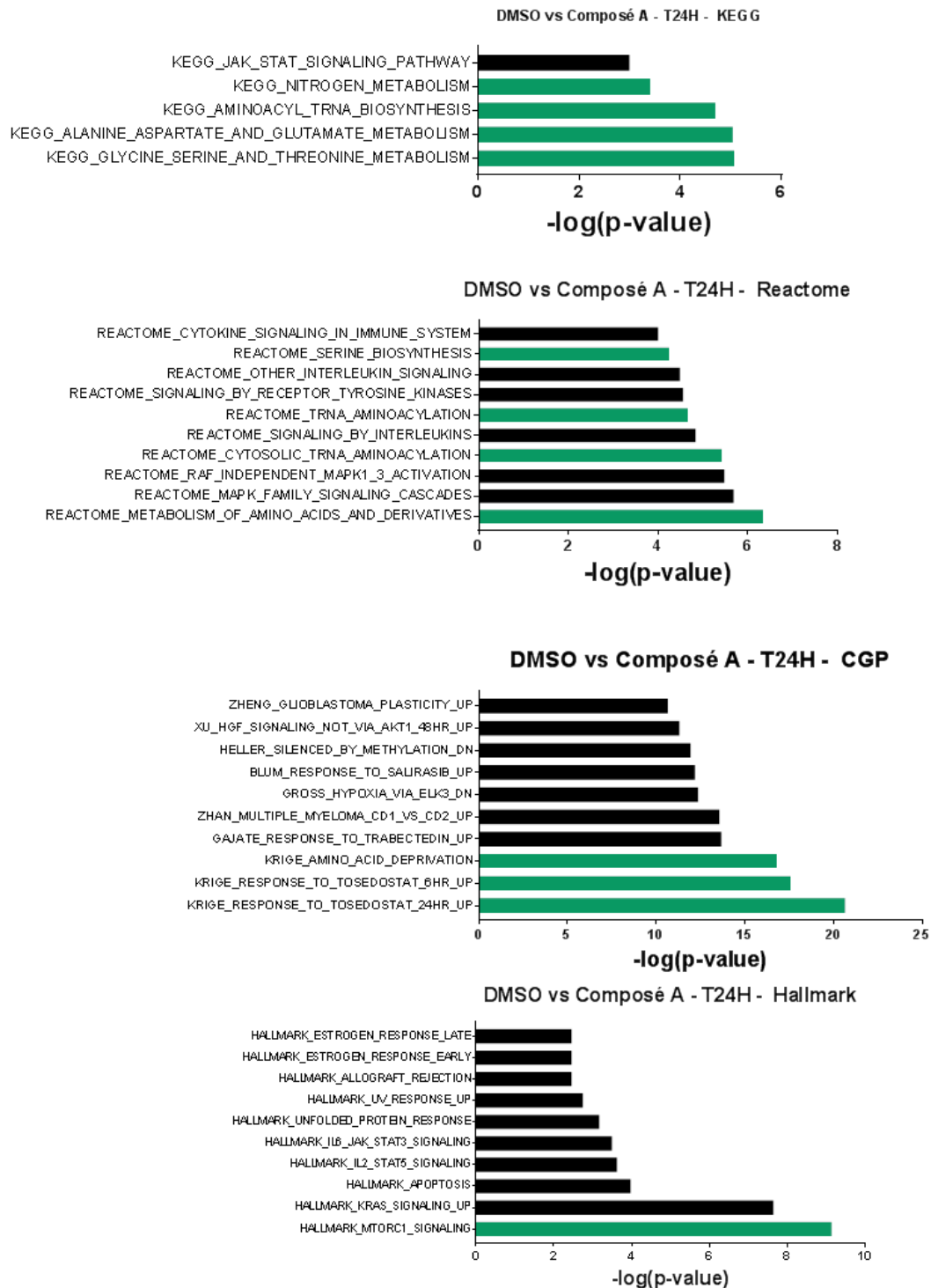


Figure 78 : Analyse des voies de signalisation des gènes dont les changements transcriptionnels sont supérieurs ou égaux à 2 et significatifs ($p_{adj} < 0.05$), pour le traitement par le composé A à $15\mu\text{M}$ pendant 24h par rapport au traitement de 24h par le DMSO, par différentes bases de données Kegg, Réactome, CGP et Hallmark. Sont représentés en vert les voies de signalisation en lien avec les acides aminés.

L'analyse des voies de signalisation par la base de données CGP montre que le composé A module des gènes qui sont communs avec ceux modulés par le tosédostat, un inhibiteur de plusieurs aminopeptidases à zinc (402). La comparaison entre le tosédostat et le composé A est décrite dans la **partie 4.1 des résultats**.

3.2.3.2. Transcriptome du carfilzomib

L'analyse des voies de signalisation par la base de données Kegg des gènes induits par le carfilzomib après 8h ou 24h de traitement met en évidence des gènes associés au fonctionnement du protéasome, ce qui est cohérent avec le mécanisme d'action de ce produit (**Figure 79**). La base de données CGP montre que le carfilzomib module des gènes communs avec l'epoxomycine, un inhibiteur du protéasome (403). Cela est donc cohérent avec le mécanisme d'action décrit du carfilzomib.

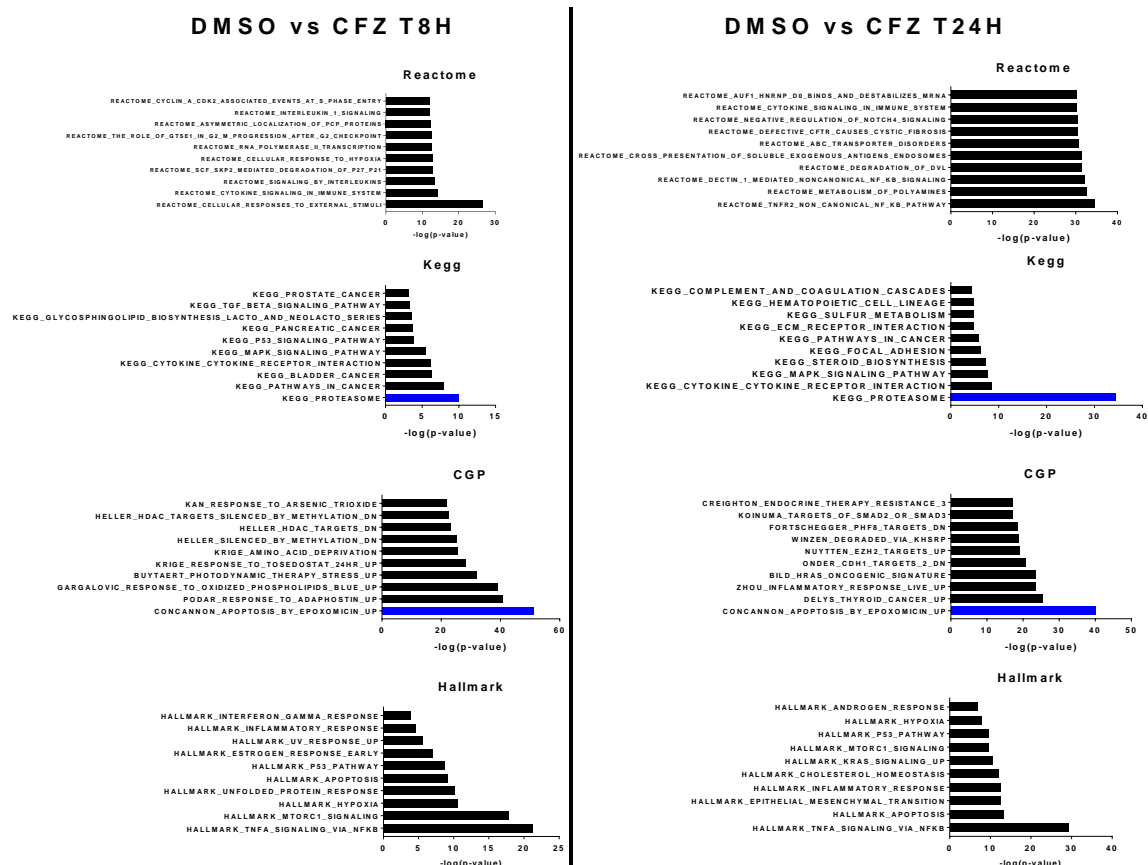


Figure 79 : Analyse des voies de signalisation des gènes dont les changements transcriptionnels sont supérieurs ou égaux à 2 (sur et sous expression) et significatifs ($padj < 0.05$) pour la condition carfilzomib 20nM après 8H et 24H de traitement par rapport à la condition DMSO du temps de cinétique, par différentes bases de données Réactome, Kegg, CGP et Hallmark. Sont représentés en bleu les voies de signalisation en lien avec le protéasome.

3.2.3.3. Transcriptome de la combinaison

Le site GSEA permet de comparer au maximum 2026 gènes. Ainsi, pour l'analyse après 24h de traitement, seuls les gènes présentant une sur- ou sous-expression de plus de 2.5 fois par rapport au véhicule DMSO ainsi qu'une significativité inférieure à 1% ($padj < 0.01$) ont été analysés.

On constate que de nombreuses voies de signalisation sont attribuables à l'effet du carfilzomib seul, d'autres au composé A seul, ce qui nous suggère une addition des effets des composés pris séparément. Aussi, on remarque que de nouvelles voies de signalisation sont

identifiées avec une grande certitude et n'étaient pas visibles avec les composés seuls. Notamment après 24h de traitement par la combinaison, ce sont des voies de signalisation notamment reliées au cycle cellulaire qui sont identifiées. Après 8h de traitement, la voie de signalisation WNT est identifiée par les bases de données Réactome et Kegg (**Figure 80**).

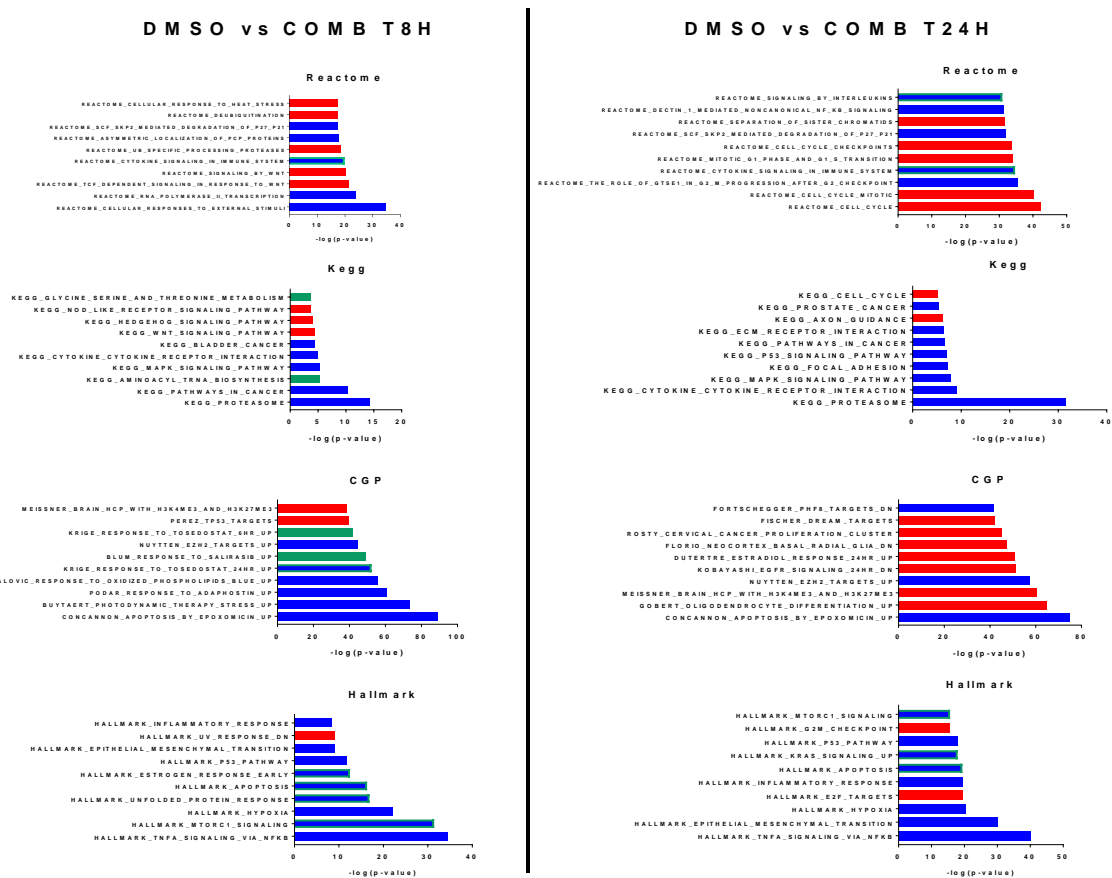


Figure 80 : Analyse des voies de signalisation des gènes dont les changements transcriptionnels sont supérieurs ou égaux à 2 (sur- et sous-expression) et significatifs (padj < 0.05), entre la condition DMSO et la combinaison du carfilzomib et du composé A après 8h de traitement, et supérieurs ou égaux à 2.5 (sur- et sous-expression) et significatifs (padj < 0.01) entre la condition DMSO et la combinaison du carfilzomib et du composé A après 24h de traitement, par différentes bases de données Réactome, Kegg, CGP et Hallmark. Sont représentés en bleu les voies de signalisation identifiées lors de l'analyse DMSO vs CFZ, en vert celles identifiées par l'analyse DMSO vs composé A, en bleu encadré en vert les voies de signalisation identifiées lors de l'analyse DMSO vs CFZ et DMSO vs composé A, et en rouge les nouvelles voies de signalisation identifiées.

3.2.3.4. Différence de transcriptome entre le carfilzomib seul et la combinaison avec le composé A

Les analyses des voies de signalisation convergent vers une transcription de gènes impliqués dans les voies des acides aminés et de l'UPR après 8h de traitement entre le carfilzomib seul et la combinaison avec le composé A. Après 24h de traitement, les gènes qui se différencient entre le carfilzomib seul et la combinaison sont principalement impliqués dans des voies du cycle cellulaire et de l'apoptose, ce qui est cohérent avec l'activation de la caspase 3 observée après 48h de traitement (**Figure 81**).

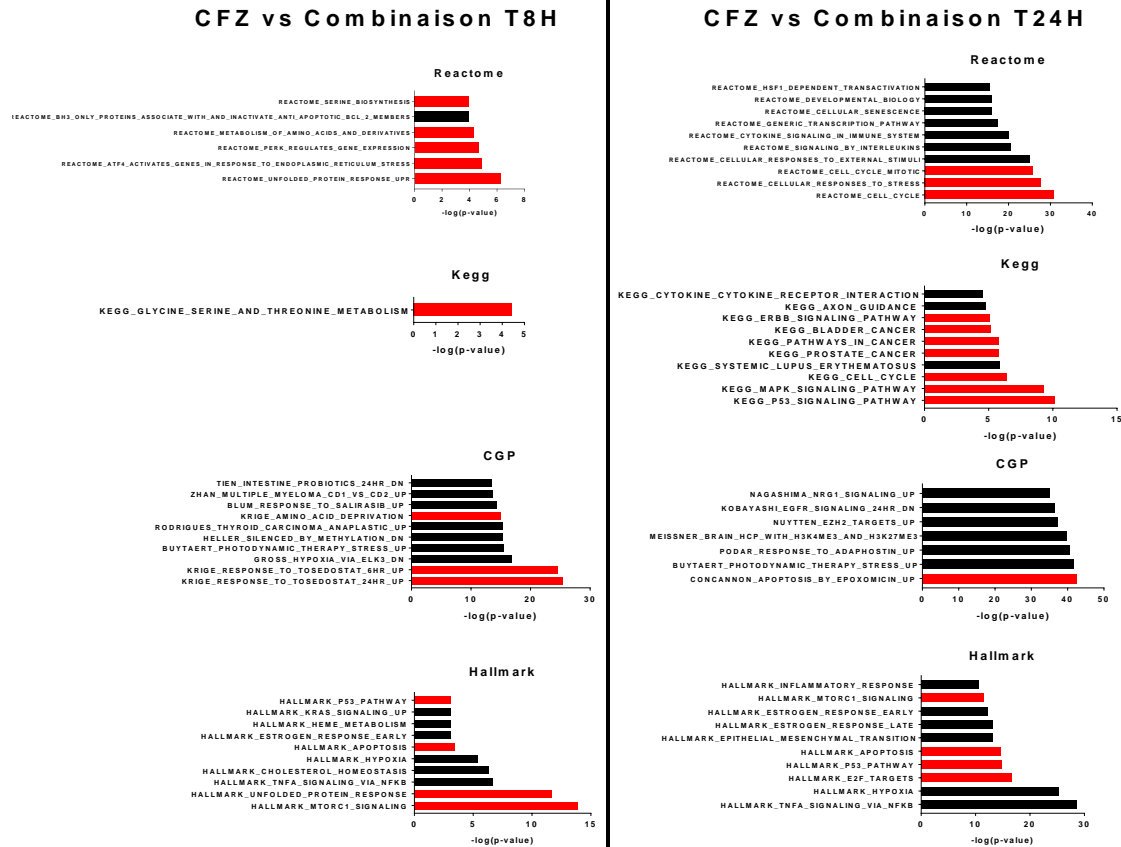


Figure 81 : Analyse des voies de signalisation des gènes dont les changements transcriptionnels sont supérieurs ou égaux à 2 (sur- et sous-expression) et significatifs (padj <0.05), pour le traitement par la combinaison du carfilzomib 20nM et du composé A à 15µM à T8H et 24H par rapport au traitement par le carfilzomib à 20nM, par différentes bases de données Réactome, Kegg, CGP et Hallmark. Sont représentés en rouge les voies de signalisation en lien avec les acides aminés, l'UPR, le cycle cellulaire et l'apoptose.

3.2.3.5. Conclusion des analyses des voies de signalisation

Pour la première fois, un effet du composé A seul a été observé, ce dernier induit des changements transcriptomiques significatifs notamment au niveau du métabolisme des acides aminés. La comparaison du carfilzomib seul avec la combinaison du carfilzomib et du composé A met également en évidence des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés. Lors de cette comparaison des gènes impliqués dans la réponse aux protéines mal-conformées (UPR) ont également été identifiés.

Le boost apoptotique observé lors de la combinaison du carfilzomib et du composé A pourrait s'expliquer par l'addition de l'effet du composé A au carfilzomib. Cet effet pourrait impacter le métabolisme des acides aminés. Aussi, la combinaison du composé A et du carfilzomib pourrait provoquer un nouvel effet, non observable par les composés seuls mais seulement lors de l'association par une dépendance des mécanismes d'action et qui serait délétère pour la cellule.

3.2.4. Etude de l'expression de gènes impliqués dans la différence de transcriptome entre le carfilzomib seul et la combinaison avec le composé A

Les analyses des voies de signalisation (DMSO vs composé A et CFZ vs COMB) nous poussent donc à explorer les gènes impliqués dans la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) et AAR (*Amino Acid Response*), et à les valider par la technique de RT-qPCR.

Une vingtaine de gènes d'intérêts ont été ainsi confirmés par la technique de RT-qPCR (**Tableau 23**). Ceux-ci ont été sélectionnés pour leurs appartenances aux voies de signalisation identifiées par les bases de données Réactome, Hallmark et CGP lors de la comparaison DMSO vs BDM et CFZ vs COMB. Deux gènes IGF1 et IGF1R ne font pas partie de ces voies de signalisation et ont été sélectionnés pour leurs implications dans la pathogénèse du myélome multiple et dans la voie mTOR.

Gènes	Reactome_Unfolded_Protein_Response_UPR	Reactome_metabolism_of_amino_acids_and_derivatives	Reactome_tRNA_aminocyclation	Reactome_ATF4_activates_genes_in_response_to_endoplasmic_reticulum_stress	CGP_Krige_response_to_tostated_24hr_up	Hallmark_mtorc1_signaling
DDIT3	X	X		X		X
ATF4	X			X		
ATF3	X			X	X	
CEBPB	X			X	X	
PPP1R15A					X	X
PSAT1		X			X	X
PSPH		X			X	X
ASNS	X	X		X	X	X
CBS		X			X	
CTH		X			X	X
ASS1		X			X	
SARS		X	X			
CARS			X		X	
WARS			X		X	X
MARS		X	X		X	
CDKN1A					X	X
SLC7A11					X	X
SLC38A2					X	
TRIB3					X	X
IGF1						
IGF1R						

Tableau 23 : Liste des gènes sélectionnés en fonction de leurs appartenances dans les différentes voies de signalisation des bases de données Réactome, CGP et Hallmark identifiés lors de la comparaison DMSO vs composé A et CFZ vs COMB.

Nous constatons que la corrélation entre les changements transcriptionnels obtenus par RNAseq et par RT-qPCR de ces gènes sélectionnés est bonne ($R^2 = 0.72$ avec une p -value < 0.001), ce qui nous permettra de discuter également des variations transcriptionnelles déterminées par la technique de RNAseq (**Figure 82**).

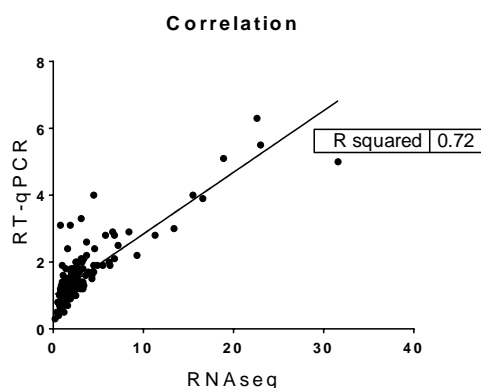


Figure 82 : Mesure de la corrélation de Pearson entre les fold relatif de l'expression en ARNm de 21 gènes mesurés par RT-qPCR et par RNAseq pour chaque condition. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel graphpad prism 7 par une régression linéaire : $R^2=0.72$ avec une p-value <0.0001 .

3.2.4.1. Des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription ont un rôle important dans la modulation de la réponse génique et constituent un point de convergence de multiples voies de signalisation. Leurs niveaux d'expressions sont hautement régulés en réponse à un stimulus. Cette régulation peut se réaliser au niveau protéique et/ou au niveau génique. L'étude de l'expression de ces facteurs de transcription constitue alors un point important dans l'établissement d'une chaîne causale. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression génique de facteurs de transcription impliqués dans les voies AAR et UPR comme ATF4, CHOP, CEBP- β ou encore ATF3 pour la confirmation en RT-qPCR (**Figure 83** et **Tableau 24**). De plus, du fait de la bonne corrélation entre les données de RT-qPCR et les données de RNAseq, l'expression génique de d'autres facteurs de transcription de ces voies AAR et UPR a été étudiée comme CEBP- γ , E2F8, E2F1, Jun, FOS, NRF2 et ATF2 (**Figure 84** et **Tableau 25**).

Confirmations en RT-qPCR de l'expression génique de facteurs de transcription

ATF4 :

ATF4 est un facteur de transcription central à la réponse AAR et UPR. Le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus son expression aux deux temps de cinétiques étudiés. Dans le même sens, la combinaison du carfilzomib et du composé A ne module pas significativement l'expression génique de ce facteur de transcription ni à T8h ni à T24h (**Figure 83** et **Tableau 24**).

Il est décrit dans la littérature que la synthèse d'ATF4 est très rapide dans les 30 minutes à la suite de la privation en nutriments à partir d'ARNm préexistant. Aussi, l'induction de sa transcription connaîtrait un pic dans les premières heures (404). Ainsi, l'absence de modulation génique par les différents traitements de ce facteur de transcription aux deux temps de cinétique étudiés n'exclut pas la modulation de celui-ci à d'autres temps de cinétique. En effet, l'induction transcriptomique d'ATF4 sur les cellules OPM2 par le traitement du carfilzomib et du BDM_44768 était transitoire (**cf. partie 2.4 des résultats**).

ATF3 :

On constate que le composé A ne module pas l'expression génique d'ATF3 de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le carfilzomib induit ATF3 de manière significative ($p < 0.001$) après 8h de traitement uniquement. La combinaison augmente également de manière transitoire l'expression de ce gène avec une induction uniquement après 8h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$). Ainsi, il semblerait que l'induction de la transcription d'ATF3 par la combinaison soit transitoire comme la réponse AAR observée dans la littérature (226) (**Figure 83** et **Tableau 24**).

CHOP :

On constate que le composé A ne module pas l'expression génique de CHOP de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le carfilzomib ne module pas non plus significativement son expression aux temps de cinétiques étudiés. Cependant, la combinaison induit significativement l'expression de ce gène aux deux temps de cinétique ($p < 0.001$ pour t8h et t24h) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.01$ pour t8h et $p < 0.001$ pour t24h) (**Figure 83** et **Tableau 24**). Du fait de l'implication de CHOP dans la mort cellulaire, cela est ainsi cohérent avec le phénotype apoptotique observé après 48h de traitement sur les cellules HeLa.

CEBP- β :

On constate que le composé A ne module pas l'expression de CEBP- β de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus son expression aux deux temps de cinétiques étudiés. Dans le même sens, la combinaison du carfilzomib et du composé A ne module pas significativement l'expression génique de ce facteur de transcription, ni à T8h ni à T24h (**Figure 83** et **Tableau 24**). Cependant, une étude du niveau d'expression des différents isoformes de CEBP- β serait complémentaire à ces données.

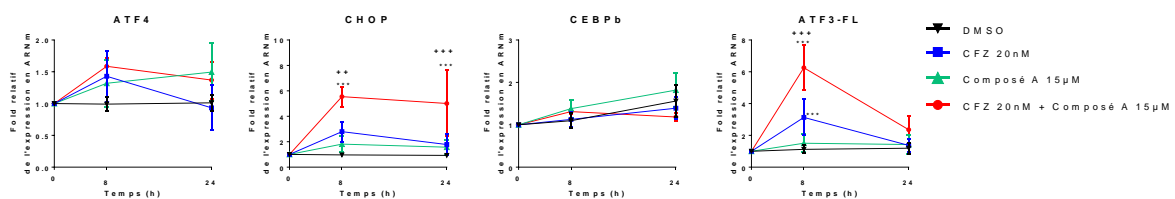


Figure 83 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15 μ M de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Chaque graphique présente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
ATF4	8H	0.99	1.32	1.43	1.59
	24H	1.01	1.50	0.93	1.37
CHOP	8H	0.97	1.82	2.80	5.55 (***) (+++)
	24H	0.93	1.57	1.78	5.01 (***) (+++)
CEBP-β	8H	1.10	1.38	1.13	1.31
	24H	1.56	1.82	1.39	1.18
ATF3	8H	1.13	1.51	3.13 (***)	6.26 (***) (+++)
	24H	1.19	1.43	1.37	2.36

Tableau 24 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition au temps T0h obtenus lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à p<0.001 : *** ; p<0.01 : ** ; p<0.05 : * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : p<0.001 : +++ ; p<0.01 : ++ ; p<0.05 : +.

Etude de l'expression de facteurs de transcription par les données de RNAseq :

ATF2 :

On constate que le composé A ne module pas l'expression d'ATF2 de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus son expression aux deux temps de cinétiques étudiés. Cependant, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 8h de traitement uniquement (padj<0.001) et cela est significativement différent du carfilzomib seul (padj<0.05) (**Figure 84** et **Tableau 25**). Pour approfondir cette observation, il serait intéressant d'étudier la phosphorylation d'ATF2.

CEBP-γ :

On constate que le composé A ne module pas l'expression de CEBP-γ de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit son expression de manière significative après 8h de traitement uniquement (padj<0.001). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 8h et 24h de traitement (padj<0.001) et cela est significativement différent du carfilzomib seul (padj<0.01 à T8H, padj<0.001 à T24H) (**Figure 84** et **Tableau 25**).

Famille FOS/JUN :

Concernant JUN, on constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus son expression de manière significative aux temps de cinétique étudiés. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 8h et 24h de traitement (padj<0.001) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement (padj<0.01) (**Figure 84** et **Tableau 25**).

Concernant FOS, on constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit son expression de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.05$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 8h et 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$ à T8H, $p_{adj} < 0.05$ à T24H) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.01$) (**Figure 84** et **Tableau 25**).

NRF2 :

On constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus son expression de manière significative aux temps de cinétique étudiés. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.01$) (**Figure 84** et **Tableau 25**).

Famille E2F :

Les facteurs de transcription E2F induisent l'expression de gènes présentant le motif E2 dans leurs promoteurs, et sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réplication de l'ADN. Cette famille comprend 8 membres E2F1 à 8.

Concernant E2F1, il est décrit que sa répression serait un point de non-retour de l'UPR pour conduire à la mort cellulaire (309). Plus précisément, lors d'un stress du RE, XBP1s induirait l'expression d'E2F7, qui, avec ATF6, réprimerait l'expression d'E2F1. Cela aurait pour conséquences d'augmenter l'expression de facteurs pro-apoptotiques comme NOXA et PUMA.

On constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus son expression de manière significative aux temps de cinétique étudiés. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A réprime de manière significative son expression après 24h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 84** et **Tableau 25**). Ainsi, cette répression est cohérente avec les données de la littérature et le phénotype apoptotique associé au traitement par la combinaison.

Concernant E2F8, il s'agit d'un facteur de transcription impliqué dans la progression du cycle cellulaire. Il est décrit que dans plusieurs types de cancer, sa surexpression favorisait la prolifération des cellules cancéreuses et était associée à une faible survie des patients (405,406).

On constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib réprime son expression de manière significative aux temps de cinétique étudiés ($p_{adj} < 0.05$). De plus, la

combinaison du carfilzomib et du composé A réprime également de manière significative son expression aux deux temps de cinétique étudiés ($p_{adj} < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 84** et **Tableau 25**). Cette modulation est ainsi en cohérence avec l'analyse des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison après 24h de traitement, identifiant davantage de gènes impliqués dans le cycle et la mort cellulaire.

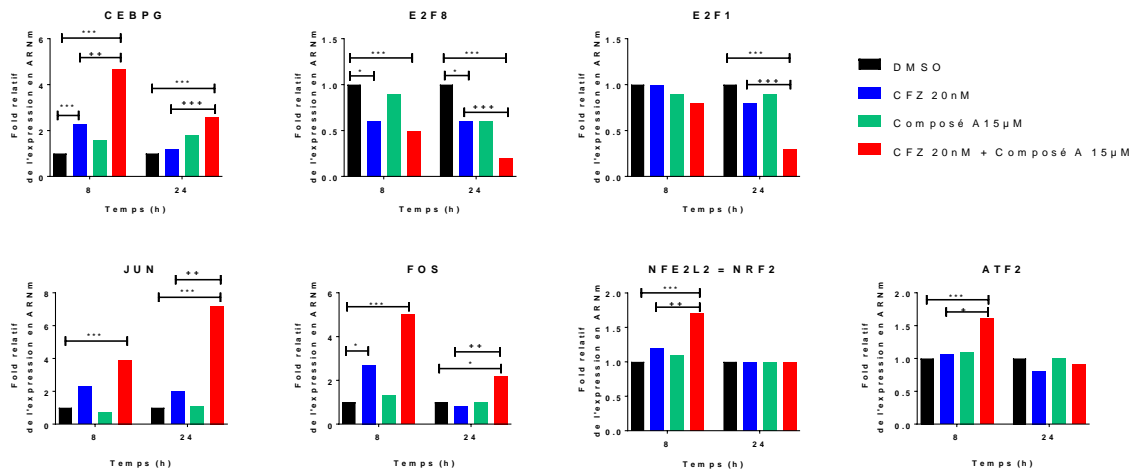


Figure 84 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Chaque graphique présente la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
CEBP-γ	8H	1.6	2.3 (***)	4.7 (***) (++)
	24H	1.8	1.2	2.6 (***) (+++)
E2F8	8H	0.9	0.6 (*)	0.5 (***)
	24H	0.6	0.6 (*)	0.2 (***) (+++)
E2F1	8H	0.9	1.0	0.8
	24H	0.9	0.8	0.3 (***) (+++)
JUN	8H	0.7	2.3	3.9 (***)
	24H	1.1	2.0	7.2 (***) (++)
FOS	8H	1.3	2.7 (*)	5.0 (***)
	24H	1.0	0.8	2.2 (*) (++)
NRF2	8H	1.1	1.2	1.7 (***) (++)
	24H	1.0	1.0	1.0
ATF2	8H	1.1	1.1	1.6 (***) (+)
	24H	1.0	0.8	0.9

Tableau 25 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Pour conclure, l'expression génique de certains facteurs de transcription comme ATF4, CEBP- β n'est pas modulée significativement par les différents traitements. Seulement cela n'exclut pas le fait qu'elle ait pu être modulée à un autre temps de cinétique et/ou que l'expression génique de ces facteurs n'est pas corrélée à l'expression protéique. Le composé A ne module pas significativement l'ensemble des facteurs de transcription étudiés.

Les facteurs de transcriptions ATF2, ATF3 et NRF2 sont modulés significativement par la combinaison qu'après 8h de traitement. Il s'agit ainsi d'une modulation transitoire. L'expression protéique ainsi que les modifications post-transcriptionnelles sont nécessaires pour approfondir ces observations. Cet effet transitoire de l'induction d'ATF3 lors d'une réponse AAR avait été déjà observé (226). L'induction transitoire de NRF2 pourrait être associée à un stress oxydant (196).

Les facteurs de transcriptions E2F8 et E2F1 sont sous-exprimés avec la combinaison. Leur implication dans le cycle cellulaire corrèle avec un arrêt du cycle cellulaire induit par la combinaison, en probable relation avec la mort cellulaire (309,405,406).

Les facteurs de transcription CHOP, CEBP- γ , JUN et FOS sont induits dès 8h de traitement par la combinaison et cela persiste encore après 24h de traitement. L'induction de ces facteurs de transcription pourrait être reliée à une réponse AAR et/ou UPR (225,228,286,296). L'induction de CHOP par exemple peut être imputée à ATF4 ou ATF2 (225,296) et est cohérente avec le phénotype apoptotique observé après 48h de traitement par la combinaison.

L'hétérodimérisation des différents facteurs de transcription crée une complexité supplémentaire à l'interprétation de ces résultats. Par exemple CEBP- γ s'hétérodimérise avec ATF4 pour induire une réponse anti-oxydante (286). Aussi, JUN, FOS, ATF4, ATF3, CEBP- β sont capables de s'hétérodimériser avec CHOP et induisent des réponses transcriptionnelles diverses.

3.2.4.2. Gènes du cycle cellulaire

L'analyse des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison après 24h de traitement a mis en évidence des gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Ainsi par RT-qPCR, la modulation du gène CDKN1A a été confirmée (**Figure 85** et **Tableau 26**) et l'étude du gène CCND1 codant pour la cycline D1 par les données RNAseq a été réalisée (**Figure 86** et **Tableau 27**).

Confirmation en RT-qPCR de la modulation du gène CDKN1A :

La protéine p21 codée par le gène CDKN1A est un régulateur de CDK2, et est donc impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire. Ce gène CDKN1A est transcriptionnellement induit par différents facteurs comme p53, lors de la répression d'E2F8 ou encore lors de la privation en nutriment (407–409).

On constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit son expression

de manière significative après 24h de traitement uniquement ($p < 0.01$). De la même manière, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit également de manière significative son expression après 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$) (**Figure 85** et **Tableau 26**). Ainsi, cette induction nous laisse penser qu'un arrêt du cycle cellulaire est induit par la combinaison. L'arrêt du cycle cellulaire est également décrit lors de l'activation de la voie UPR, mais aussi de la voie AAR, par la diminution de la traduction de régulateurs du cycle cellulaire suite à la phosphorylation d'eIF2 α (185).

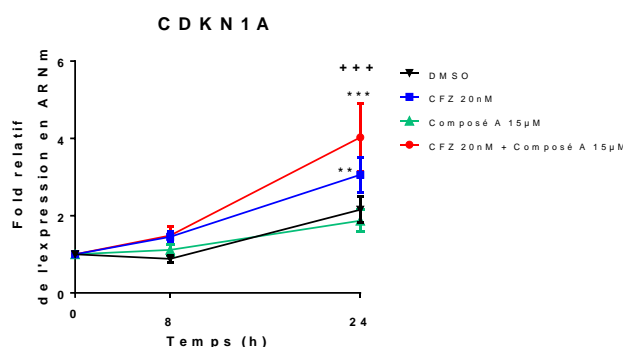


Figure 85 : Quantification de l'ARNm de CDKN1A dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Le graphique présente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats techniques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
CDKN1A	8H	0.88	1.12	1.45	1.49
	24H	2.16	1.87	3.06 (**)	4.03 (***) (+++)

Tableau 26 : Quantification de l'ARNm de CDKN1A dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition au temps T0h obtenus lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Analyse de l'expression de CCND1 par les données RNAseq :

Le gène CCND1 code pour la cycline D1 impliquée dans la progression du cycle cellulaire. La phosphorylation d'eIF2 α lors de différents stress inhibe la traduction de ce régulateur du cycle cellulaire permettant l'arrêt de la prolifération (185).

On constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib réprime son expression de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.05$). De la même manière, la combinaison du carfilzomib et du composé A réprime également de manière significative son expression après 8h de traitement ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 86** et

Tableau 27). Cette répression par la combinaison est ainsi en cohérence avec l'hypothèse qu'un arrêt du cycle cellulaire est observé lors du traitement par la combinaison. Cependant, cette répression transcriptionnelle est transitoire, il serait intéressant d'étudier son niveau d'expression protéique.

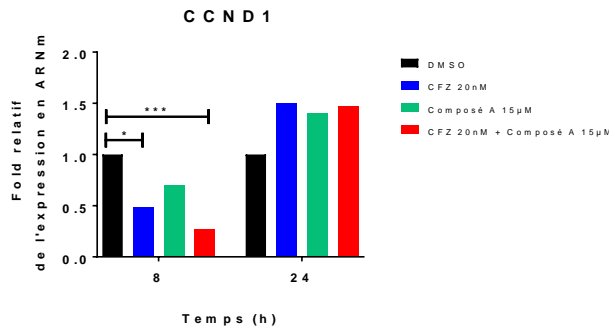


Figure 86 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de CCND1 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Le graphique présente la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
CCND1	8H	0.7	0.5 (*)	0.3 (***)
	24H	1.4	1.5	1.5

Tableau 27 : Quantification de l'ARNm de CCND1 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Pour conclure, l'induction transcriptionnelle de CDKN1A et la répression de CCND1 est cohérente avec un arrêt du cycle cellulaire induit par la combinaison. Ces gènes sont également modulés par le carfilzomib seul mais à un degré moindre.

3.2.4.3. La voie UPR

L'analyse des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison après 8h de traitement a mis en évidence des gènes impliqués dans la réponse UPR induite par la production de protéines mal-conformées dans le réticulum endoplasmique. Ainsi, par RT-qPCR, la modulation du gène PPP1R15A codant pour la protéine GADD34 a été confirmée (**Figure 87** et **Tableau 28**), et l'étude des gènes HSPA5 et XBP1 par les données RNAseq a été réalisée (**Figure 88** et **Tableau 29**).

Confirmation en RT-qPCR de la modulation du gène codant pour GADD34 :

On constate que le composé A ne module pas l'expression de PPP1R15A de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus son expression de manière significative aux temps de cinétique étudiés.

Cependant, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 8h et 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.05$ à T8H, $p < 0.001$ à T24H) (**Figure 87** et **Tableau 28**). L'induction dès T8h de ce gène par la combinaison nous laisse penser qu'ATF4 et CHOP sont induits dans les 8 premières heures de traitement par la combinaison.

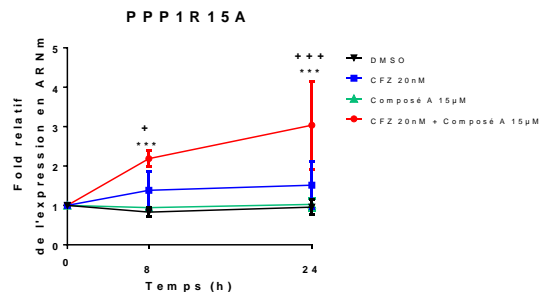


Figure 87 : Quantification de l'ARNm de PPP1R15A dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Le graphique présente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats techniques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
PPP1R15A	8H	0.83	0.94	1.38	2.19 (***) (+)
	24H	0.96	1.03	1.51	3.04 (***) (+++)

Tableau 28 : Quantification de l'ARNm de PPP1R15A dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression du gène étudié par rapport à la condition au temps T0h obtenus lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Analyse de l'expression génique de HSPA5 et XBP1 par les données RNAseq :

Le gène HSPA5 code pour la protéine chaperon GRP78/BIP, qui est un marqueur de l'activation de la voie UPR. L'induction de sa transcription lors de l'activation de la voie UPR est attribuée à ATF6f et à XBP1s (410).

On constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus son expression de manière significative. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 8h et 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 88** et **Tableau 29**).

Concernant le facteur de transcription XBP1 de la branche IRE1α de l'UPR, on constate que le composé A ne module pas son expression de manière significative aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit son expression de

manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit également de manière significative son expression après 8h et 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 88** et **Tableau 29**). Il serait cependant intéressant de quantifier le ratio XBP1s/XBP1u en RT-qPCR pour connaître la production du facteur de transcription XBP1s de cette branche de l'UPR.

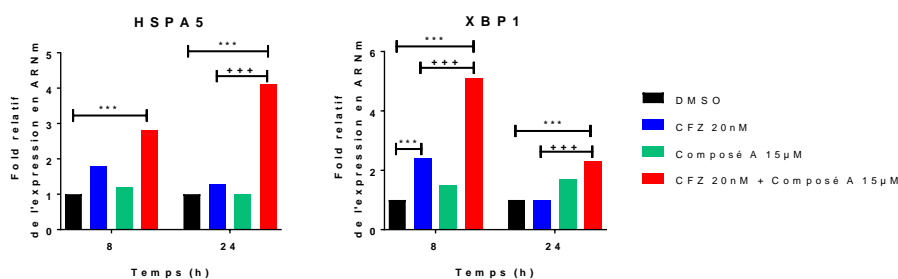


Figure 88 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de HSPA5 et de XBP1 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Les graphiques présentent la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
HSPA5	8H	1.2	1.8	2.8 (***)
	24H	1.0	1.3	4.1 (***) (+++)
XBP1	8H	1.5	2.4 (***)	5.1 (***) (+++)
	24H	1.7	1.0	2.3 (***) (+++)

Tableau 29 : Quantification de l'ARNm d'HSPA5 et XBP1 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Pour conclure, par l'étude transcriptomique de gènes impliqués dans la voie UPR, nous confirmons l'activation de cette voie de signalisation par la combinaison du carfilzomib et du composé A dans les cellules HeLa. Cependant, la modulation de ces gènes suit des cinétiques et des intensités variables entre les gènes, il serait intéressant d'étudier leurs expressions protéiques au cours du temps également. Ces observations transcriptomiques font écho aux données transcriptomiques obtenues dans les cellules OPM2 avec l'analogue BDM_44768 où une induction de plusieurs gènes de la voie UPR par la combinaison avec le carfilzomib a été observée (**cf. partie 2.4 des résultats**).

3.2.4.4. Les aminoacyl ARNt synthetases

L'analyse des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison après 8h de traitement a mis en évidence des gènes impliqués dans les voies des acides aminés et en

particulier, l'analyse des voies de signalisation entre le contrôle et le composé A a mis en évidence la voie de biosynthèse des ARN de transferts (ARNt). Ainsi, par RT-qPCR, la modulation des gènes MARS, CARS, WARS et SARS a été confirmée (**Figure 89** et **Tableau 30**), et l'étude des gènes YARS et GARS par les données RNAseq a été réalisée (**Figure 90** et **Tableau 31**).

Confirmation en RT-qPCR de la modulation de gènes impliqués dans la biosynthèse des ARNt :

Concernant MARS (*Methionyl tRNA synthetase*), on constate que le composé A induit significativement son expression aux deux temps de cinétiques étudiés ($p < 0.05$ à T8H, $p < 0.001$ à T24H). Le traitement par le carfilzomib ne module pas l'expression de MARS de manière significative aux temps de cinétique étudiés. La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 8h de traitement uniquement ($p < 0.01$) (**Figure 89** et **Tableau 30**).

Concernant CARS (*cysteinylyl tRNA synthetase*), on constate que le composé A induit significativement son expression aux deux temps de cinétiques étudiés ($p < 0.01$ à T8H, $p < 0.001$ à T24H). Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de CARS de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p < 0.01$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression aux deux temps de cinétique étudiés ($p < 0.001$ à T8H et $p < 0.01$ à T24H) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$ à T8H et $p < 0.05$ à T24H) (**Figure 89** et **Tableau 30**).

Concernant WARS (*tryptophanyl-tRNA synthetase*), on constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p < 0.05$). Le traitement par le carfilzomib induit également l'expression de WARS de manière significative après 24h de traitement uniquement ($p < 0.05$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative son expression après 24h de traitement ($p < 0.01$) (**Figure 89** et **Tableau 30**).

Concernant SARS (*Seryl-tRNA synthetase*), on constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p < 0.01$). Le traitement par le carfilzomib ne module pas l'expression de SARS de manière significative aux temps de cinétiques étudiés. La combinaison du carfilzomib et du composé A ne module pas non plus de manière significative ce gène aux temps de cinétique étudiés (**Figure 89** et **Tableau 30**).

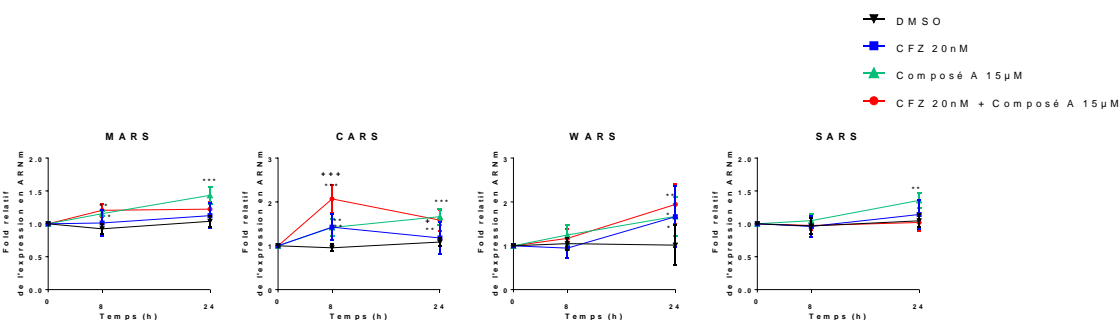


Figure 89 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Chaque graphique présente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats techniques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
MARS	8H	0.93	1.16 (*)	1.01	1.20 (**)
	24H	1.04	1.43 (***)	1.13	1.22
CARS	8H	0.95	1.42 (**)	1.43 (**)	2.07 (***) (+++)
	24H	1.08	1.66 (***)	1.18	1.58 (**) (+)
WARS	8H	1.05	1.25	0.95	1.17
	24H	1.02	1.67 (*)	1.66 (*)	1.94 (**)
SARS	8H	0.97	1.05	0.96	0.97
	24H	1.05	1.36 (**)	1.14	1.02

Tableau 30 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition au temps T0h obtenus lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Analyse de l'expression génique de YARS et GARS par les données RNAseq :

Concernant YARS (*Tyrosyl-tRNA synthetase*), on constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.01$). Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de YARS de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.05$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétique étudiés ($p_{adj} < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.05$ à T8H et $p_{adj} < 0.001$ à T24H) (**Figure 90 et Tableau 31**).

Concernant GARS (*glycyl tRNA synthetase*), on constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.01$). Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de GARS de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétique étudiés ($p_{adj} < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.01$ à T8H et $p_{adj} < 0.001$ à T24H) (**Figure 90 et Tableau 31**).

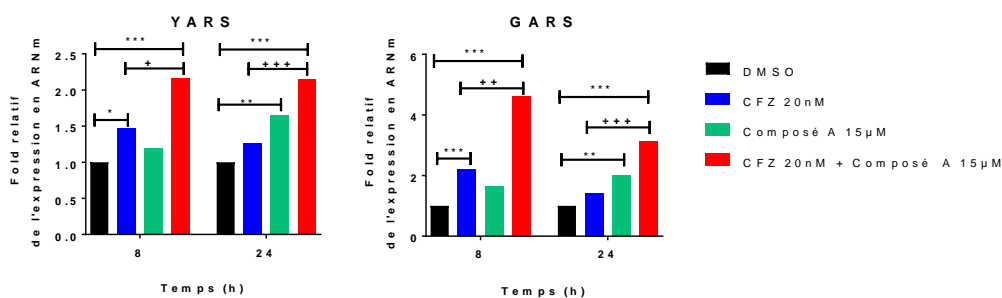


Figure 90 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de YARS et GARS dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Les graphiques présentent la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
YARS	8H	1.2	1.5 (*)	2.2 (***) (+)
	24H	1.6 (**)	1.3	2.1 (***) (+++)
GARS	8H	1.6	2.2 (***)	4.6 (***) (++)
	24H	2.0 (**)	1.4	3.1 (***) (+++)

Tableau 31 : Quantification de l'ARNm de YARS et GARS dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Pour conclure, le composé A est responsable de l'induction significative de toutes les ARNt synthetase présentées après 24h de traitement, et de MARS et CARS après 8h de traitement. Le carfilzomib seul est également responsable de l'induction significative de toutes ces ARS excepté SARS (YARS, GARS, MARS, CARS après 8h de traitement et WARS seulement après 24h de traitement). La combinaison quant à elle induit significativement l'ensemble de ces gènes (MARS, CARS, YARS, GARS après 8h de traitement et CARS, WARS, YARS, GARS après 24h de traitement) sauf SARS.

L'induction de ces amino acyl tRNA synthetase (ARS) pourrait être imputée à ATF4 et partiellement à CHOP (290,291). Ainsi, il serait nécessaire de connaître le niveau d'expression protéique d'ATF4 et de CHOP après un traitement par le composé A, et/ou d'étudier l'expression transcriptomique de ces facteurs de transcription à d'autres temps de cinétique. En effet, il serait intéressant de savoir si l'induction de ces ARS par le composé A peut être due à ces facteurs de transcription ou par un autre mécanisme.

3.2.4.4. Les transporteurs d'acides aminés

Les analyses des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison après 8h de traitement ainsi qu'entre le contrôle et le composé A ont mis en évidence des gènes impliqués dans les voies des acides aminés comme des transporteurs d'acides aminés. Ainsi, par RT-qPCR, la modulation des gènes SLC38A2 (famille SNAT) et SLC7A11 a été confirmée

(Figure 91 et Tableau 32), et l'étude du gène SLC7A1 (famille CAT) par les données RNAseq a été réalisée (Figure 92 et Tableau 33).

Confirmation en RT-qPCR de la modulation de gènes impliqués dans le transport d'acides aminés :

Concernant le transporteur sodium-dépendant d'acides aminés neutres SLC38A2 (SNAT2), le composé A ne module pas significativement son expression aux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus l'expression de ce gène de manière significative. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A réprime de manière significative ce gène après 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.05$) (Figure 91 et Tableau 32).

Le transporteur cystine/glutamate sodium-indépendant SLC7A11 (xCT) est induit significativement par le composé A aux deux temps de cinétiques étudiés ($p < 0.05$ à T8H et $p < 0.01$ à T24H). Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement ($p < 0.05$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit également de manière significative ce gène après 8h de traitement ($p < 0.001$) (Figure 91 et Tableau 32).

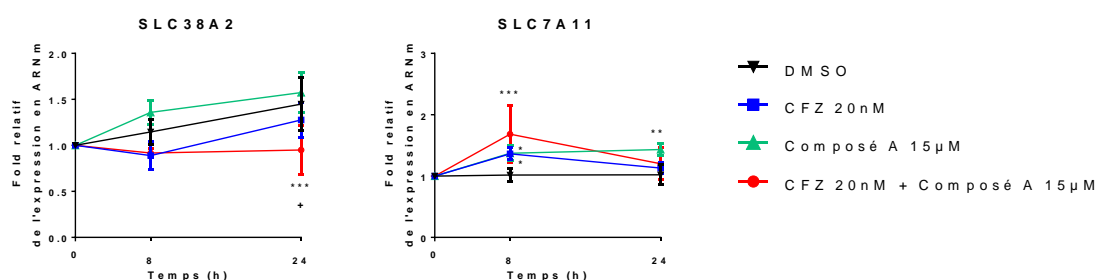


Figure 91 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Chaque graphique présente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats techniques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
SLC38A2	8H	1.15	1.36	0.89	0.92
	24H	1.45	1.57	1.28	0.95 (***) (+)
SLC7A11	8H	1.02	1.37 (*)	1.36 (*)	1.68 (***)
	24H	1.02	1.43 (**)	1.13	1.20

Tableau 32 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition au temps T0h obtenu lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Analyse de l'expression génique de SLC7A1 par les données RNAseq :

Concernant le transporteur sodium-indépendant de l'arginine, de la lysine, de l'ornithine et de l'histidine SLC7A1 (CAT-1), on constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de ce transporteur aux deux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.01$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$ à T8H $p_{adj} < 0.01$ à T24H) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 92** et **Tableau 33**). Cette induction par la combinaison avec un pic d'expression à T8H est ainsi cohérente avec l'activation temporelle décrite après un stress (281,282).

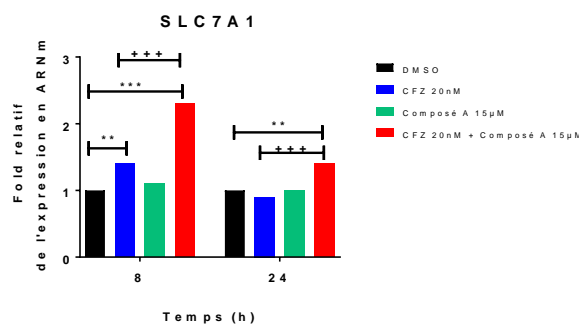


Figure 92 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de SLC7A1 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Le graphique présente la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
SLC7A1	8H	1.1	1.4 (**)	2.3 (***) (+++)
	24H	1.0	0.9	1.4 (**) (+++)

Tableau 33 : Quantification de l'ARNm de SLC7A1 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Pour conclure, ces trois transporteurs qui ont des spécificités de substrats différents, sont modulés différemment par la combinaison : une répression pour SLC38A2, une induction transitoire pour SLC7A11 et une induction précoce et durable pour SLC7A1, malgré une tendance à l'atténuation après 24h de traitement. La répression de SLC38A2 est cohérente avec une induction simultanée de la voie UPR et AAR (278). L'induction transitoire de SLC7A11 suit celle de NRF2, ces deux gènes étant impliqués dans la réponse antioxydante (195,279,280). Ce transporteur peut être également induit par la privation en acides aminés, excepté la privation en méthionine (279). Enfin, l'atténuation de l'induction de SLC7A1 peut être attribuée à ATF3 et CHOP, en cohérence avec l'induction de ces deux gènes par la combinaison après 8h de traitement (283,284).

3.2.4.5. Des enzymes impliquées dans la voie des acides aminés

Les analyses des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison après 8h de traitement ainsi qu'entre le contrôle et le composé A ont mis en évidence des gènes impliqués dans les voies des acides aminés. Ainsi, par RT-qPCR, la modulation des gènes ASNS, ASS1, CBS, CTH, PSPH, PSAT1 (**Figure 93** et **Tableau 34**) codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés a été confirmée, et l'étude du gène PHGDH par les données RNAseq a été réalisée (**Figure 94** et **Tableau 35** et cf. **partie 3.4.2 de l'introduction**).

Confirmation en RT-qPCR de la modulation de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse d'acides aminés :

ASNS est l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'asparagine et du glutamate. On constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p < 0.001$). Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 24h de traitement également ($p < 0.01$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 8h de traitement ($p < 0.05$) (**Figure 93** et **Tableau 34**).

ASS1 (*Argininosuccinate synthetase*) une enzyme du cycle de l'urée impliquée dans la synthèse de l'arginine (411). L'induction d'ASS1 pourrait être attribuée à l'induction de c-Myc et à la diminution d'HIF1 α (412). Son induction lors de la privation en acides aminés n'a pas été décrite, mais l'on remarque que le tosédoestat, un inhibiteur de plusieurs aminopeptidases, induit ce gène (402).

On constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p < 0.001$). Le traitement par le carfilzomib ne module pas l'expression de ce gène de manière significative aux temps de cinétique étudiés. La combinaison du carfilzomib et du composé A ne module pas non plus de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement (**Figure 93** et **Tableau 34**).

Les gènes impliqués dans la transsulfuration, CBS (*Cystathionine beta synthetase*) et CTH (*Cystathionine gamma-lyase*), permettent la formation de cystéine et contribuent à la formation de GSH.

Concernant CBS, on constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p < 0.001$). Le traitement par le carfilzomib ne module pas l'expression de ce gène de manière significative aux temps de cinétique étudiés. A l'inverse du composé A, la combinaison du carfilzomib et du composé A réprime de manière significative ce gène après 24h de traitement ($p < 0.001$) (**Figure 93** et **Tableau 34**).

Concernant CTH, on constate que le composé A induit significativement son expression après 8h de traitement ($p < 0.05$). Le traitement par le carfilzomib induit

également l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement ($p < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$ à T8H et $p < 0.05$ à T24H) (**Figure 93** et **Tableau 34**).

Les gènes PSAT1 et PSPH codent pour des enzymes impliquées dans la synthèse de la sérine.

Concernant PSAT1, on constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p < 0.001$). Le traitement par le carfilzomib ne module pas l'expression de ce gène de manière significative aux temps de cinétique étudiés. La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.05$) (**Figure 93** et **Tableau 34**).

Concernant PSPH, on constate que le composé A induit significativement son expression après 8h et 24h de traitement ($p < 0.05$ à T8H et $p < 0.01$ à T24H). Le traitement par le carfilzomib ne module pas l'expression de ce gène de manière significative aux temps de cinétique étudiés. La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.05$). Ainsi, l'augmentation de ces deux enzymes de la synthèse de la sérine par la combinaison semble transitoire (**Figure 93** et **Tableau 34**).

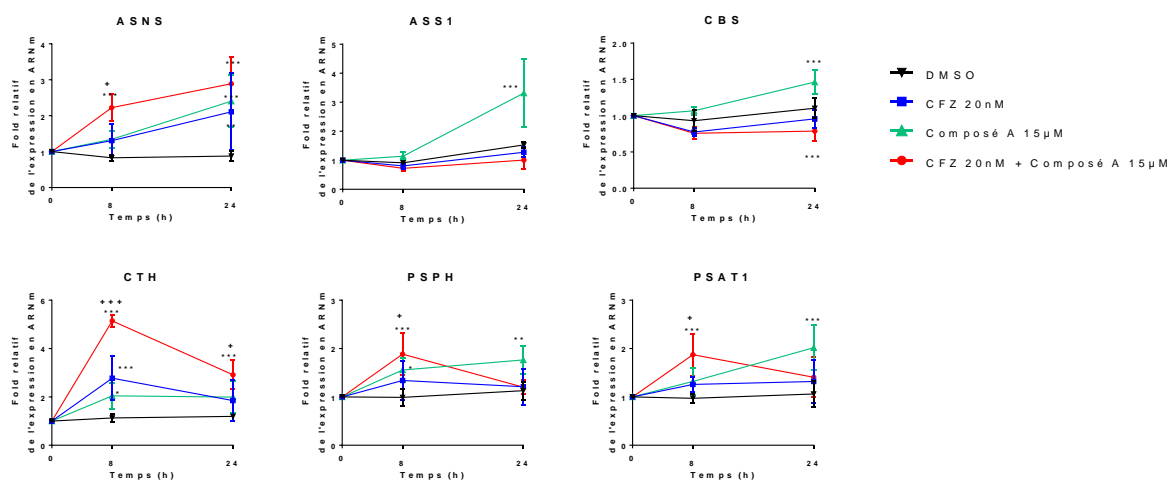


Figure 93 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Chaque graphique présente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats techniques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
ASNS	8H	0.83	1.34	1.30	2.22 (***) (+)
	24H	0.88	2.40 (***)	2.11 (**)	2.89 (***)
ASS1	8H	0.91	1.14	0.81	0.72
	24H	1.53	3.32 (***)	1.28	1.01
CBS	8H	0.93	1.07	0.77	0.76
	24H	1.10	1.46 (***)	0.96	0.79 (***)
CTH	8H	1.13	2.04 (*)	2.77 (***)	5.15 (***) (+++)
	24H	1.20	1.99	1.85	2.91 (***) (+)
PSPH	8H	0.99	1.56 (*)	1.34	1.88 (***) (+)
	24H	1.13	1.77 (**)	1.21	1.20
PSAT1	8H	0.97	1.32	1.26	1.87 (***) (+)
	24H	1.06	2.02 (***)	1.32	1.41

Tableau 34 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition au temps T0h obtenus lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Analyse de l'expression génique de PHGDH par les données RNAseq :

PHGDH est également une enzyme impliquée dans la synthèse de la sérine. On constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.01$). Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.05$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 94** et **Tableau 35**).

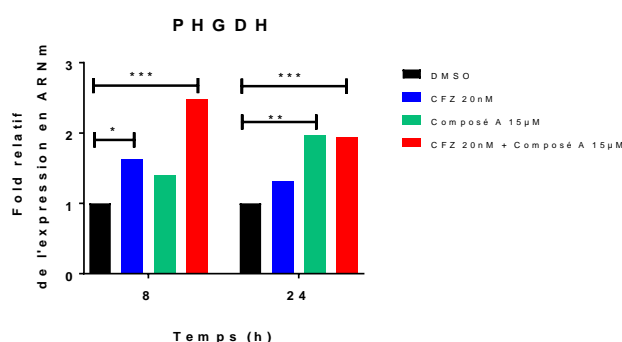


Figure 94 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de PHGDH dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Le graphique présente la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
PHGDH	8H	1.4	1.6 (*)	2.5 (***)
	24H	2.0 (**)	1.3	1.9 (***)

Tableau 35 : Quantification de l'ARNm de PHGDH dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Pour conclure, le composé A induit significativement après 24h de traitement les gènes PHGDH, PSAT1 et PSPH impliqués dans la synthèse de la sérine. Le gène codant pour SARS était également augmenté par le composé A. Ainsi, ces observations sont cohérentes avec l'analyse des voies de signalisation indiquant le métabolisme de la sérine. Il se pourrait ainsi que le composé A impacte la disponibilité en sérine. CBS et CTH impliqués dans la synthèse de la cystéine et du glutathion ainsi qu'ASS1 impliqué dans la synthèse de l'arginine sont également significativement induits par le composé A. L'induction d'ASNS par l'ensemble des traitements est cohérente avec l'induction d'un stress (218,228,272,285,286). La combinaison module significativement l'ensemble de ces gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés, excepté ASS1.

3.2.4.6. TRIB3, une pseudokinase

On constate que le composé A induit significativement l'expression de TRIB3 après 24h de traitement ($p < 0.001$). Le traitement par le carfilzomib induit également l'expression de TRIB3 de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p < 0.05$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$) (**Figure 95** et **Tableau 36**).

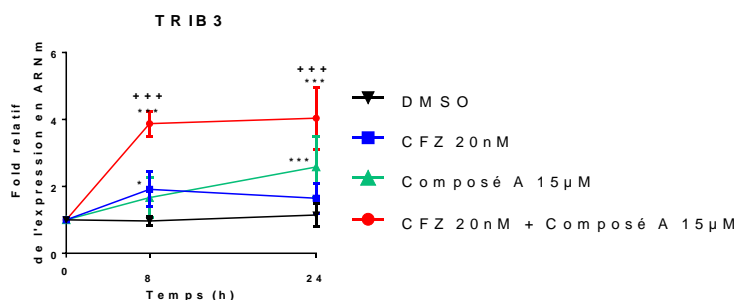


Figure 95 : Quantification de l'ARNm de TRIB3 dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Le graphique présente la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats techniques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
TRIB3	8H	0.97	1.66	1.91 (*)	3.88 (***) (+++)
	24H	1.15	2.58 (***)	1.64	4.04 (***) (+++)

Tableau 36 : Quantification de l'ARNm de TRIB3 dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression du gène étudié par rapport à la condition au temps T0h obtenus lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à p<0.001 : *** ; p<0.01 : ** ; p<0.05 : * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : p<0.001 : +++ ; p<0.01 : ++ ; p<0.05 : +.

Pour conclure, l'ensemble des traitements induisent TRIB3 de manière significative, avec une amplitude plus importante pour la combinaison. L'induction de TRIB3 est une réponse à différents stress et qui peut être imputée à ATF4 et CHOP, ce qui semble cohérent avec les autres observations transcriptomiques (297,302).

3.2.4.7. Facteurs de croissance

L'analyse des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison après 8h de traitement met en exergue des voies de signalisation liées au métabolisme des acides aminés. Lors de la privation en acides aminés l'expression de facteurs de croissance peut être impactée. Ainsi, par RT-qPCR, la modulation des gènes IGF1, IGF1-R a été confirmée (**Figure 96 et Tableau 37**), et l'étude des gènes IGFBP1 et VEGF-A par les données RNAseq a été réalisée (**Figure 97 et Tableau 38**).

Confirmation en RT-qPCR de la modulation du facteur de croissance insulino-mimétique IGF-1 et de son récepteur IGF1R :

Le facteur de croissance insulino-mimétique IGF-1 et son récepteur IGF-1R modulent une voie de signalisation impliquant la voie PI3K/AKT/mTOR et contribuent à la prolifération cellulaire. Le récepteur IGF1-R est surexprimé dans de nombreux types de cancer et contribue à une faible survie des patients (413). Il a été démontré que la diminution de son expression inhibait la prolifération cellulaire et sensibilisait des cellules cancéreuses du colon à des agents cytotoxiques comme le 5-FU (5-fluorouracile) (414). De plus, lors de la privation en nutriments, par un mécanisme non élucidé, une diminution de l'expression d'IGF-1 est constatée (415).

Concernant IGF-1, on constate que le composé A réprime significativement son expression après 24h de traitement (p<0.001). Le traitement par le carfilzomib réprime également son expression de manière significative après 8h et 24h de traitement (p<0.001). La combinaison du carfilzomib et du composé A réprime de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement (p<0.001) et cela est significativement différent du carfilzomib seul (p<0.05 à T8H, p<0.001 à T24H) (**Figure 96 et Tableau 37**).

Concernant IGF-1R, on constate que le composé A ne module pas significativement son expression aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib réprime son expression de manière significative après 8h de traitement uniquement (p<0.001). La

combinaison du carfilzomib et du composé A réprime de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.01$ à T8H, $p < 0.001$ à T24H) (**Figure 96** et **Tableau 37**).

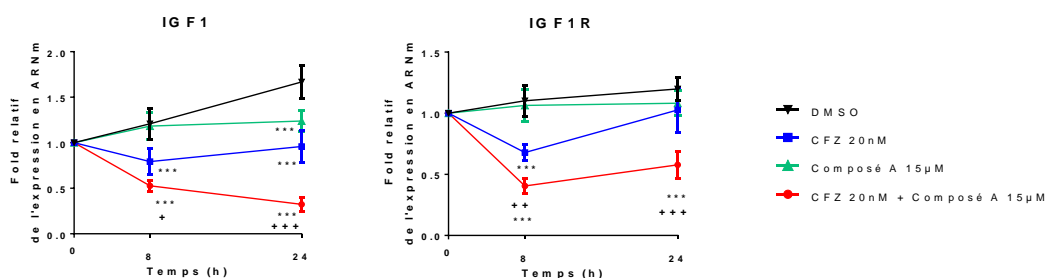


Figure 96 : Quantification de l'ARNm d'IGF1 et IGF1R dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Les graphiques présentent la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats techniques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
IGF1	8H	1.21	1.18	0.79 (***)	0.53 (***) (+)
	24H	1.68	1.24 (***)	0.96 (***)	0.32 (***) (+++)
IGF1R	8H	1.10	1.06	0.68 (***)	0.41 (***) (++)
	24H	1.20	1.08	1.03	0.58 (***) (+++)

Tableau 37 : Quantification de l'ARNm d'IGF1 et IGF1R dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression du gène étudié par rapport à la condition au temps T0h obtenus lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Ainsi, la répression transcriptionnelle, précoce et durable, d'IGF-1R mais aussi d'IGF-1 par la combinaison est un profil transcriptomique intéressant appuyant l'intérêt thérapeutique de celle-ci. En effet, l'expression d'IGF-1 et d'IGF-1R est associée à la prolifération cellulaire *in vitro* mais surtout associée à une faible survie des patients (413,414). On peut alors émettre l'hypothèse que la présentation de ce profil transcriptomique *in vitro* par la combinaison se traduise par une meilleure survie des patients en clinique.

Analyse de l'expression génique d'IGFBP-1 et du VEGF-A par les données RNAseq :

IGFBP-1 est un ligand d'IGF-1, et qui part cette liaison, l'empêche de se fixer à son récepteur. Lors de la privation en acides aminés, essentiels uniquement, une augmentation de l'expression d'IGFBP-1 est observée (416).

On constate que le composé A ne module pas significativement son expression aux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus l'expression de ce gène de manière significative. Cela est également le cas pour la combinaison du carfilzomib et du composé A qui ne module pas non plus de manière significative ce gène aux temps de cinétiques étudiés (**Figure 97** et **Tableau 38**).

Le VEGF-A est un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et est impliqué dans l'angiogenèse tumorale. L'expression de VEGF-A est augmentée à la suite de différents stress, comme un stress du RE (par des agents stressants ou la privation en glucose) via l'activation de l'UPR, lors d'un stress hypoxique par HIF-1 α , ou lors de la privation en acides aminés (417–420). L'activation de l'angiogenèse par des cellules cancéreuses face à ces différents stress se justifie par l'augmentation de son apport en nutriments et en oxygène par la création de nouveaux vaisseaux. Les 3 branches de l'UPR, PERK via ATF4, IRE1 α via XBP1s et ATF6 via ATF6f seraient impliqués dans cette induction (421–423).

On constate que le composé A ne module pas significativement son expression aux temps de cinétiques étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement uniquement (padj<0.01). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit également de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés (padj<0.001) et cette induction est significativement différente du carfilzomib seul (padj<0.05 à T8H et padj<0.001 à T24H) (**Figure 97** et **Tableau 38**).

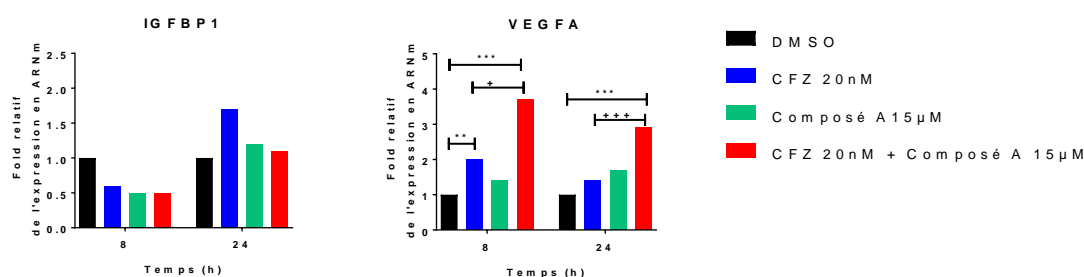


Figure 97 : Changement transcriptionnel de l'ARNm d'IGFBP1 et de VEGFA dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Les graphiques présentent la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la padj correspondent à p<0.001 : *** ; p<0.01 : ** ; p<0.05 : * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : p<0.001 : +++ ; p<0.01 : ++ ; p<0.05 : +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + composé A
IGFBP1	8H	0.5	0.6	0.5
	24H	1.2	1.7	1.1
VEGFA	8H	1.4	2.0 (**)	3.7 (***) (+)
	24H	1.7	1.4	2.9 (***) (+++)

Tableau 38 : Quantification de l'ARNm d'IGFBP1 et de VEGFA dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à p<0.001 : *** ; p<0.01 : ** ; p<0.05 : * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : p<0.001 : +++ ; p<0.01 : ++ ; p<0.05 : +.

Pour conclure, la répression de l'expression d'IGF1 et de son récepteur par la combinaison pourrait être corrélée avec la mort cellulaire et la réponse à un stress métabolique. L'absence de modulation significative d'IGFBP1 par les différents traitements pourrait nous orienter vers une absence de privation en acides aminés essentiels. L'induction du VEGF-A par la combinaison est également en lien avec la réponse à un stress.

3.2.4.8. Cytokines

L'analyse comparée des voies de signalisation, entre le contrôle et le composé A ainsi qu'entre le contrôle et le carfilzomib, a mis en évidence des voies de signalisation aux interleukines. Ainsi, l'étude des gènes IL-6 et IL6-R par les données RNAseq a été réalisée (**Figure 98** et **Tableau 39**).

IL-6 est une cytokine qui, lorsqu'elle se lie à son récepteur IL6-R, peut induire différentes voies de signalisation comme JAK/STAT3, Ras/MAPK ou encore PI3K/AKT. Cette réponse est stress et type cellulaire dépendant, et peut donc avoir un effet anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire (424). Il est décrit qu'un stress du RE ou un stress nutritionnel induit l'expression de l'IL-6 (425,426). Les mécanismes par lequel l'augmentation de l'expression de cette cytokine est induite lors d'un stress peuvent être multiples. L'augmentation de son expression impliquerait la voie IRE1 via XBP1s et/ou PERK via la phosphorylation d'eIF2 α /ATF4 et/ou encore la formation d'un hétérodimère entre CHOP et LIP, un répresseur de la transcription de l'IL-6, contribuant ainsi à l'augmentation de l'expression d'IL6 (223,426–429).

Concernant IL-6, on constate que le composé A induit significativement son expression après 24h de traitement uniquement (padj<0.05). Le traitement par le carfilzomib induit également l'expression de ce gène de manière significative après 24h de traitement uniquement (padj<0.001). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés (padj<0.001) et cette induction est significativement différente du carfilzomib seul après 24h de traitement (padj<0.001) (**Figure 98** et **Tableau 39**).

Concernant IL6R, on constate que le composé A ne module pas significativement son expression aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement uniquement (padj<0.001). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés (padj<0.001) et cette induction est significativement différente du carfilzomib seul après 24h de traitement (padj<0.05) (**Figure 98** et **Tableau 39**).

Ainsi, l'induction de cette cytokine et de son récepteur par la combinaison dès 8h de traitement corrèle avec la présence d'un stress cellulaire.

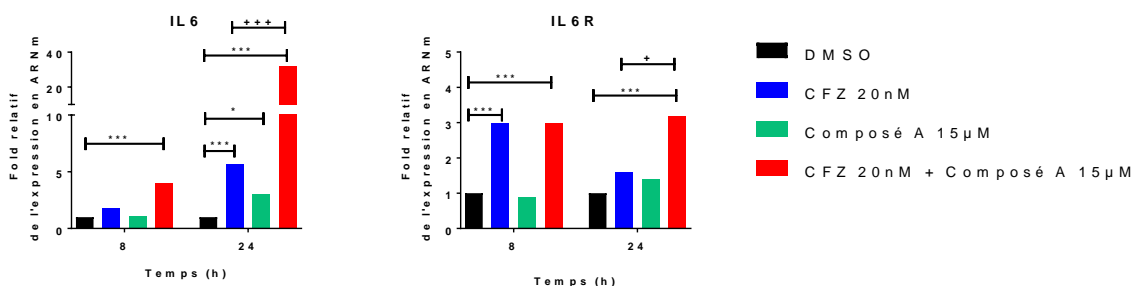


Figure 98 : Changement transcriptionnel de l'ARNm d'IL6 et IL6R dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Les graphiques présentent la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
IL6	8H	1.1	1.8	4.0 (***)
	24H	3.0 (*)	5.7 (***)	32.0 (***) (+++)
IL6-R	8H	0.9	3.0 (***)	3.0 (***)
	24H	1.4	1.6	3.2 (***) (+)

Tableau 39 : Quantification de l'ARNm d'IL6 et IL6R dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

3.2.4.9. La voie mTOR et autophagie

L'analyse des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison met en évidence la voie de signalisation mTORC1. Cette voie de signalisation est impliquée dans le métabolisme anabolique et catabolique cellulaire, ce qui est cohérent avec les autres voies de signalisation identifiées. Ainsi, l'étude de gènes impliqués dans cette voie de signalisation comme EIF4EBP1, DDIT4, SQSTM1, ULK1, SESN2 par les données RNAseq a été réalisée (**Figure 99, Figure 100 et Tableau 40**).

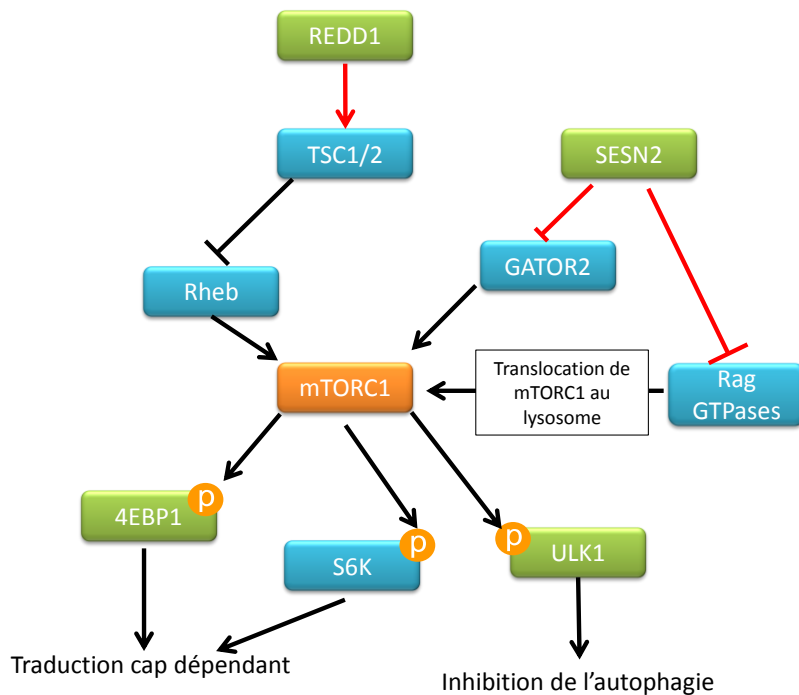


Figure 99 : Schéma représentant la voie mTORC1 de manière non exhaustive. Les gènes présentés dans cette partie de la thèse sont en vert.

EIF4EBP1 :

On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression d'EIF4EBP1 aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus l'expression de ce gène de manière significative. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés ($p_{adj} < 0.001$) et cette induction est significativement différente du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.01$) (**Figure 100** et **Tableau 40**). L'étude de la phosphorylation de la protéine codée par ce gène serait ainsi complémentaire à cette observation transcriptomique.

REDD1 :

On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de REDD1 aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus l'expression de ce gène de manière significative. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 100** et **Tableau 40**).

Du fait de l'induction transitoire de ce gène par la combinaison, il serait intéressant de connaître l'expression protéique de REDD1, car cela pourrait être associé à une inhibition de mTORC1 dans un premier temps, puis à une activation de mTORC1 qui serait délétère pour la cellule. Il est décrit que l'induction de REDD1 lors d'un stress nutritionnel, comme la privation en sérum, était nécessaire pour maintenir la survie des cellules lors d'un stress prolongé, alors que son inhibition était associée à la mort cellulaire (235).

SESN2 :

On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de SESN2 aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés ($p_{adj} < 0.001$) et cette induction est significativement différente du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.01$ à T8H et $p_{adj} < 0.001$ à T24H) (**Figure 100** et **Tableau 40**).

ULK1 :

On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression d'ULK1 aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés ($p_{adj} < 0.001$) et cette induction est significativement différente du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.01$) (**Figure 100** et **Tableau 40**). Ainsi, il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression et le statut de phosphorylation d'ULK1, conditionnant son activité, pour approfondir cette observation transcriptomique.

SQSTM1 :

Pour approfondir l'étude de la voie autophagique, l'expression génique de SQSTM1 codant pour la protéine p62 a été réalisée par l'utilisation des données RNAseq.

On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de SQSTM1 aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative aux deux temps de cinétique étudiés ($p_{adj} < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit également de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés ($p_{adj} < 0.001$) et cette induction est significativement différente du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 100** et **Tableau 40**). Pour compléter cette observation transcriptomique, il serait intéressant de connaître le niveau d'expression de cette protéine décrite pour être dégradée lors de l'autophagie.

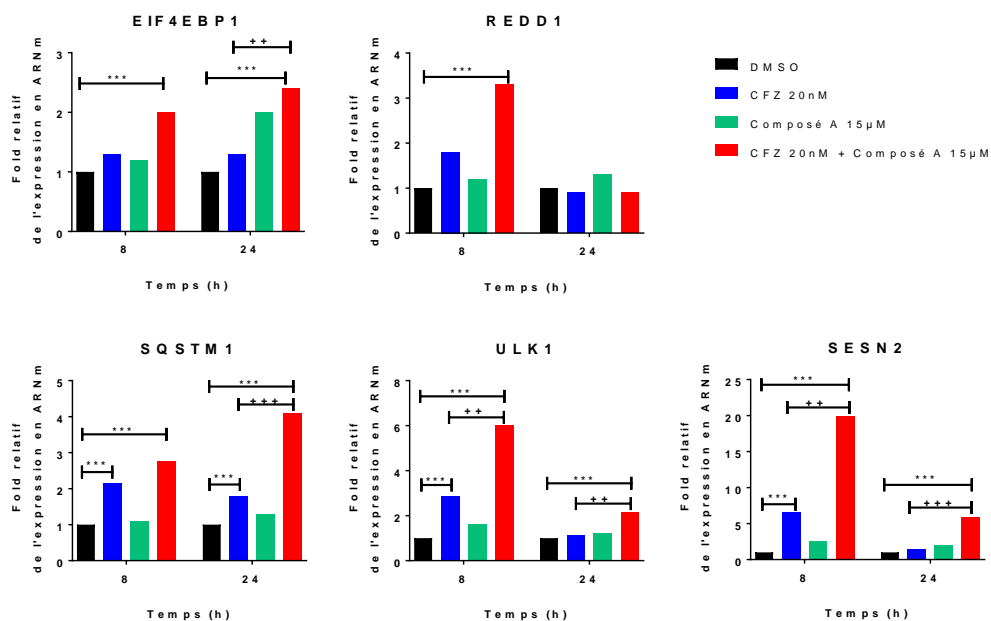


Figure 100 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Les graphiques présentent la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à p<0.001 : *** ; p<0.01 : ** ; p<0.05 : * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : p<0.001 : +++ ; p<0.01 : ++ ; p<0.05 : +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
EIF4EBP1	8H	1.2	1.3	2.0 (***)
	24H	2.0	1.3	2.4 (***) (++)
REDD1	8H	1.2	1.8	3.3 (***)
	24H	1.3	0.9	0.9
SQSTM1	8H	1.1	2.2 (***)	2.8 (***)
	24H	1.3	1.8 (***)	4.1 (***) (+++)
ULK1	8H	1.6	2.9 (***)	6.0 (***) (++)
	24H	1.2	1.1	2.2 (***) (++)
SESN2	8H	2.6	6.6 (***)	19.9 (***) (++)
	24H	2.0	1.4	5.9 (***) (+++)

Tableau 40 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la p_{adj} correspondent à p<0.001 : *** ; p<0.01 : ** ; p<0.05 : * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : p<0.001 : +++ ; p<0.01 : ++ ; p<0.05 : +.

Pour conclure, le composé A ne module pas significativement l'expression de gènes impliqués dans la voie mTORC1. En revanche, sa combinaison avec le carfilzomib module significativement l'ensemble des gènes étudiés dont des gènes de l'autophagie. Il serait intéressant d'approfondir ces résultats par une étude de l'expression protéique et des modifications post-traductionnelles de ces gènes impliqués dans cette voie mTORC1 (cf. **partie 3.3.2.3 de l'introduction**).

3.2.4.10. Apoptose

L'analyse des voies de signalisation entre le carfilzomib et la combinaison après 24h de traitement met en évidence davantage de voies de signalisation reliées à la mort cellulaire. Ainsi, l'étude de gènes impliqués dans la mort cellulaire comme PMAIP1, BCL2L11 et BBC3, codant pour les protéines NOXA, BIM et PUMA respectivement, a été réalisée par les données RNAseq (**Figure 101** et **Tableau 41** et cf. **partie 3.4.4 de l'introduction**).

De multiples facteurs peuvent causer l'augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques. En particulier, la mort cellulaire associée à un stress du RE pourrait être la résultante de l'augmentation de protéines pro-apoptotiques comme PUMA et NOXA (309). CHOP est un facteur de transcription contribuant à l'induction de l'apoptose par l'augmentation de protéines pro-apoptotiques comme BIM ou PUMA et par la diminution de l'expression de protéines anti-apoptotiques BCL2 (299,300).

Concernant le gène PMAIP1 codant pour la protéine NOXA, on constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de ce gène aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 8h de traitement uniquement ($p_{adj} < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit également de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés ($p_{adj} < 0.001$) et cette induction est significativement différente du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.05$) (**Figure 101** et **Tableau 41**).

L'induction de NOXA à 8h par la combinaison ne semble pas correspondre à la cinétique de diminution d'E2F1 observée après 24h de traitement, suggérant un autre mécanisme. Cette induction de NOXA pourrait ainsi être la résultante d'ATF4 (309).

Concernant le gène BBC3 codant pour la protéine PUMA, on constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de ce gène aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus l'expression de ce gène de manière significative. La combinaison du carfilzomib et du composé A ne module pas non plus de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés malgré la tendance à l'augmentation (**Figure 101** et **Tableau 41**). Il serait intéressant de confirmer cette observation par la technique de RT-qPCR et d'étudier l'expression protéique de cette protéine.

Concernant le gène BCL2L11 codant pour la protéine BIM, on constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de ce gène aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus l'expression de ce gène de manière significative. La combinaison du carfilzomib et du composé A réprime de manière significative ce gène après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.01$) et cette répression est significativement différente du carfilzomib seul ($p_{adj} < 0.05$) (**Figure 101** et **Tableau 41**). Il serait nécessaire de connaître le niveau d'expression de cette protéine du fait que celle-ci subit une dégradation par le protéasome, qui serait normalement inhibée lors de la combinaison avec le carfilzomib.

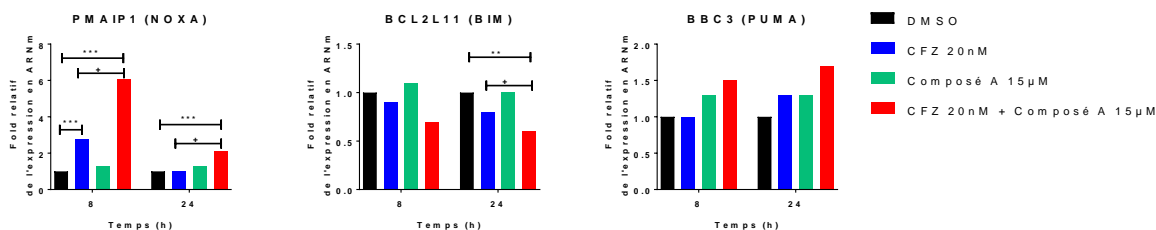


Figure 101 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Les graphiques présentent la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
PMAIP1 (NOXA)	8H	1.3	2.8 (***)	6.1 (***) (+)
	24H	1.3	1.0	2.1 (***) (+)
BCL2L11 (BIM)	8H	1.1	0.9	0.7
	24H	1.0	0.8	0.6 (**)(+)
BBC3 (PUMA)	8H	1.3	1.0	1.5
	24H	1.3	1.3	1.7

Tableau 41 : Quantification de l'ARNm de différents gènes dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression des gènes étudiés par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

3.2.4.11. IDE

L'inhibition d'IDE par le composé A et l'induction de ce gène par la combinaison du BDM_44768 au carfilzomib dans les cellules OPM2, nous pousse à connaître l'expression génique d'IDE, cette fois-ci dans les cellules HeLa avec le composé A à partir des données RNAseq.

On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression d'IDE aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative aux deux temps de cinétiques ($p < 0.05$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène après 8h et 24h de traitement ($padj < 0.001$) (**Figure 102** et **Tableau 42**).

Ces résultats sont en cohérence avec les résultats obtenus sur les cellules OPM2 (**cf. partie 2.4 des résultats**) avec le BDM_44768, où le carfilzomib a induit significativement l'expression génique d'IDE après 16h de traitement et où la combinaison du BDM_44768 et du carfilzomib a induit significativement l'expression d'IDE après 16h et 24h de traitement. Cette observation appuie le fait qu'IDE pourrait avoir un rôle de protéine chaperon dans un stress du RE.

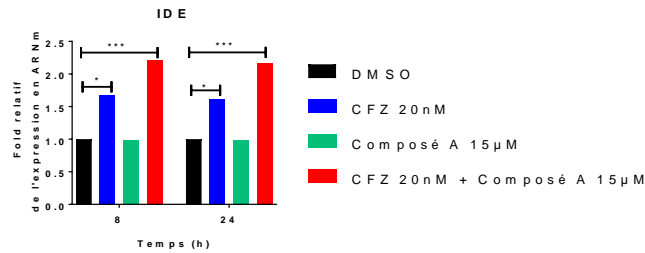


Figure 102 : Changement transcriptionnel de l'ARNm d'IDE dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Le graphique présente la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
IDE	8H	1.0	1.7 (*)	2.2 (***)
	24H	1.0	1.6 (*)	2.2 (***)

Tableau 42 : Quantification de l'ARNm d'IDE dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression du gène étudié par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au Carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

3.2.4.12. Conclusion

Pour conclure, l'analyse de l'ensemble de ces données transcriptomiques convergent vers une activation des voies de signalisation liées aux acides aminés, à l'UPR, à la voie mTORC1, à l'autophagie, au cycle et à la mort cellulaire par la combinaison du carfilzomib et du composé A. Ces données transcriptomiques appuient également le fait qu'un stress est présent lors de la combinaison. La répression transcriptionnelle de SLC38A2 par la combinaison est cohérente avec une induction simultanée d'un stress du RE (UPR) et d'une réponse à la privation en acides aminés. Aussi, l'induction de l'IL-6 par la combinaison témoigne également d'un stress. Cette interleukine est importante pour la survie des cellules cancéreuses et est très souvent associée à une faible survie des patients. Cependant, dans notre cas le phénotype de mort cellulaire est présent malgré l'induction de celle-ci, on peut donc émettre l'hypothèse qu'il n'a pas été possible pour la cellule de faire face à la cytotoxicité de la combinaison. De plus, la répression transcriptionnelle du facteur de croissance IGF-1 et de son récepteur IGF-1R appuie l'intérêt thérapeutique de cette combinaison pour le traitement du cancer, où une répression de ces protéines serait favorable pour la survie des patients. Enfin, concernant le composé A seul, celui-ci montre une modulation significative des gènes liés aux acides aminés comme les aminoacyl ARNt synthetases, des transporteurs d'acides aminés et des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés. Une étude des niveaux d'expressions protéiques serait complémentaire à ces observations transcriptionnelles, qui ne sont pas forcément toujours corrélées (401). S'ajoute à cela des modifications post-traductionnelles sur certaines protéines qui déterminent leurs activités.

3.2.5. Gènes aux plus grandes amplitudes

Certains gènes semblent être particulièrement impactés par l'ajout du composé A au carfilzomib après 8h de traitement. Le **tableau 43** présente les gènes induits plus de 2,5 fois pour la combinaison par rapport au carfilzomib seul après 8h de traitement avec une $p_{adj} < 0.05$.

ID	Symbole	String Database description	FC
ENSG00000130513	GDF15	Growth differentiation factor 15; Belongs to the TGF-beta family (308 aa)	3.94
ENSG00000101255	TRIB3	Triebbles homolog 3; Disrupts insulin signaling by binding directly to Akt kinases and blocking their activation. May bind directly to and mask the 'Thr-308' phosphorylation site in AKT1. Binds to ATF4 and inhibits its transcriptional activation activity. Interacts with the NF-kappa-B transactivator p65 RELA and inhibits its phosphorylation and thus its transcriptional activation activity. Interacts with MAPK kinases and regulates activation of MAP kinases. May play a role in programmed neuronal cell death but does not appear to affect non-neuronal cells. Does not display kinase activit [...] (358 aa)	3.71
ENSG00000135842	NIBAN1	Protein Niban; Regulates phosphorylation of a number of proteins involved in translation regulation including EIF2A, EIF4EBP1 and RPS6KB1. May be involved in the endoplasmic reticulum stress response (By similarity) (928 aa)	3.56
ENSG00000116761	CTH	Cystathionine gamma-lyase; Catalyzes the last step in the trans-sulfuration pathway from methionine to cysteine. Has broad substrate specificity. Converts cystathionine to cysteine, ammonia and 2-oxobutanoate. Converts two cysteine molecules to lantionine and hydrogen sulfide. Can also accept homocysteine as substrate. Specificity depends on the levels of the endogenous substrates. Generates the endogenous signaling molecule hydrogen sulfide (H2S), and so contributes to the regulation of blood pressure. Acts as a cysteine-protein sulfhydrase by mediating sulfhydrylation of target protei [...] (405 aa)	3.23
ENSG00000162772	ATF3	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3; This protein binds the cAMP response element (CRE) (consensus- 5'-GTGACGT[AC][AG]-3'), a sequence present in many viral and cellular promoters. Represses transcription from promoters with ATF sites. It may repress transcription by stabilizing the binding of inhibitory cofactors at the promoter. Isoform 2 activates transcription presumably by sequestering inhibitory cofactors away from the promoters; Basic leucine zipper proteins (181 aa)	3.16
ENSG00000244405	ETV5	ETS translocation variant 5; Binds to DNA sequences containing the consensus nucleotide core sequence 5'-GGAA-3'; Belongs to the ETS family (510 aa)	3.03
ENSG00000130766	SESN2	Sestrin-2; Functions as an intracellular leucine sensor that negatively regulates the TORC1 signaling pathway through the GATOR complex. In absence of leucine, binds the GATOR subcomplex GATOR2 and prevents TORC1 signaling. Binding of leucine to SESN2 disrupts its interaction with GATOR2 thereby activating the TORC1 signaling pathway. This stress-inducible metabolic regulator also plays a role in protection against oxidative and genotoxic stresses. May negatively regulate protein translation in response to endoplasmic reticulum stress, via TORC1. May positively regulate the transcripti [...] (480 aa)	3.00
ENSG00000120738	EGR1	Early growth response protein 1; Transcriptional regulator. Recognizes and binds to the DNA sequence 5'-GCG(T/G)GGGCGG-3'(EGR-site) in the promoter region of target genes (By similarity). Binds double-stranded target DNA, irrespective of the cytosine methylation status. Regulates the transcription of numerous target genes, and thereby plays an important role in regulating the response to growth factors, DNA damage, and ischemia. Plays a role in the regulation of cell survival, proliferation and cell death. Activates expression of p53/TP53 and TGFβ1, and thereby helps prevent tumor form [...] (543 aa)	2.98
ENSG00000087074	PPP1R15A	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A; Recruits the serine/threonine-protein phosphatase PP1 to dephosphorylate the translation initiation factor eIF-2A/EIF2S1, thereby reversing the shut-off of protein synthesis initiated by stress-inducible kinases and facilitating recovery of cells from stress. Down-regulates the TGF-beta signaling pathway by promoting dephosphorylation of TGFβ1 by PP1. May promote apoptosis by inducing TP53 phosphorylation on 'Ser-15' (674 aa)	2.86
ENSG00000251192	ZNF674	Zinc finger protein 674; May be involved in transcriptional regulation; X-linked mental retardation (581 aa)	2.73
ENSG00000070669	ASNS	Asparagine synthetase (561 aa)	2.70
ENSG00000157514	TSC22D3	TSC22 domain family protein 3; Protects T-cells from IL2 deprivation-induced apoptosis through the inhibition of FOXO3A transcriptional activity that leads to the down-regulation of the pro-apoptotic factor BCL2L11. In macrophages, plays a role in the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids and IL10. In T-cells, inhibits anti-CD3-induced NFKB1 nuclear translocation. In vitro, suppresses AP1 and NFKB1 DNA-binding activities (By similarity). Isoform 1 inhibits myogenic differentiation and mediates anti-myogenic effects of glucocorticoids by binding and regulat [...] (200 aa)	2.62
ENSG00000116285	ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1; Negative regulator of EGFR signaling in skin morphogenesis. Acts as a negative regulator for several EGFR family members, including ERBB2, ERBB3 and ERBB4. Inhibits EGFR catalytic activity by interfering with its dimerization. Inhibits autophosphorylation of EGFR, ERBB2 and ERBB4. Important for normal keratinocyte proliferation and differentiation. Plays a role in modulating the response to steroid hormones in the uterus. Required for normal response to progesterone in the uterus and for fertility. Mediates epithelial estrogen responses in the uterus [...] (462 aa)	2.60
ENSG00000073756	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2; Converts arachidonate to prostaglandin H2 (PGH2), a committed step in prostanoid synthesis. Constitutively expressed in some tissues in physiological conditions, such as the endothelium, kidney and brain, and in pathological conditions, such as in cancer. PTGS2 is responsible for production of inflammatory prostaglandins. Up-regulation of PTGS2 is also associated with increased cell adhesion, phenotypic changes, resistance to apoptosis and tumor angiogenesis. In cancer cells, PTGS2 is a key step in the production of prostaglandin E2 (PGE2), which plays imp [...] (604 aa)	2.59
ENSG00000088826	SMOX	Spermine oxidase; Flavoenzyme which catalyzes the oxidation of spermine to spermidine. Can also use N(1)-acetylspermine and spermidine as substrates, with different affinity depending on the isoform (isozyme) and on the experimental conditions. Plays an important role in the regulation of polyamine intracellular concentration and has the potential to act as a determinant of cellular sensitivity to the antitumor polyamine analogs. May contribute to beta-alanine production via aldehyde dehydrogenase conversion of 3-amino-propanal; Belongs to the flavin monoamine oxidase family (585 aa)	2.58
ENSG00000100889	PCK2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial; Catalyzes the conversion of oxaloacetate (OAA) to phosphoenolpyruvate (PEP), the rate-limiting step in the metabolic pathway that produces glucose from lactate and other precursors derived from the citric acid cycle; Belongs to the phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP] family (640 aa)	2.57
ENSG00000165030	NFIL3	Nuclear factor interleukin-3-regulated protein; Acts as a transcriptional regulator that recognizes and binds to the sequence 5'-[GA]TTA[CT]GTAA[CT]-3', a sequence present in many cellular and viral promoters. Represses transcription from promoters with activating transcription factor (ATF) sites. Represses promoter activity in osteoblasts (By similarity). Represses transcriptional activity of PER1 (By similarity). Represses transcriptional activity of PER2 via the B- site on the promoter (By similarity). Activates transcription from the interleukin-3 promoter in T-cells. Competes for [...] (462 aa)	2.55

Tableau 43 : Gènes dont l'expression est augmentée par l'ajout du composé A au carfilzomib (combinaison VS carfilzomib) après 8h de traitement par l'analyse RNAseq. Le tableau présente l'identifiant ENSEMBL du gène (ID), son nom (symbole), une description de sa fonction par la base de données STRING ainsi que le fold change associé (FC). L'ensemble des gènes présentés dans ce tableau ont un fold change supérieur ou égal à 2.5 (surexpression) et une padj < 0.05. En gras apparaissent les gènes commentés précédemment dans cette thèse.

On remarque que l'expression d'une partie de ces gènes a été étudiée dans cette thèse pour leurs implications décrites et connues dans les réponses AAR et UPR (gènes apparaissant en gras dans le **tableau 43**). Cependant, d'autres gènes voient leurs expressions fortement impactées, et qui, au premier abord, ne semblent pas être reliés à la réponse ISR comme NIBAN1 et GDF15. Ainsi, dans un premier temps l'étude de l'expression de ces gènes à partir des données RNAseq a été réalisée (**Figure 103** et **Tableau 44**) et une confirmation par RT-qPCR a été réalisée (**Figure 104** et **Tableau 45**).

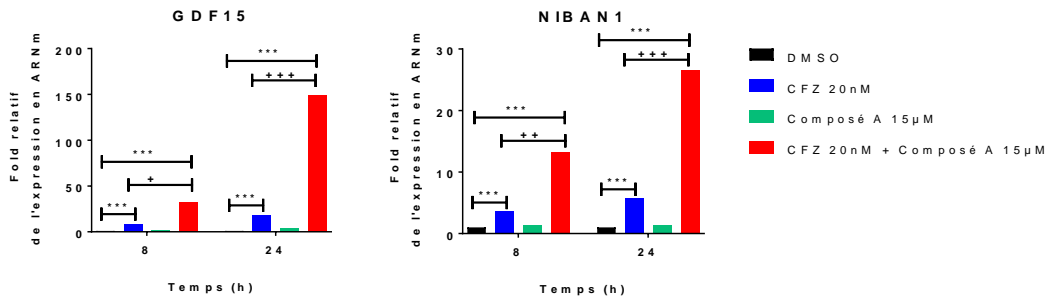


Figure 103 : Changement transcriptionnel de l'ARNm de GDF15 et NIBAN1 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Les graphiques présentent la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
GDF15	8H	1.9	8.2 (***)	32.4 (***) (+)
	24H	4.1	18.1 (***)	148.5 (***) (+++)
NIBAN1	8H	1.4	3.7 (***)	13.2 (***) (++)
	24H	1.4	5.8 (***)	26.6 (***) (+++)

Tableau 44 : Quantification de l'ARNm de GDF15 et NIBAN1 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression du gène étudié par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

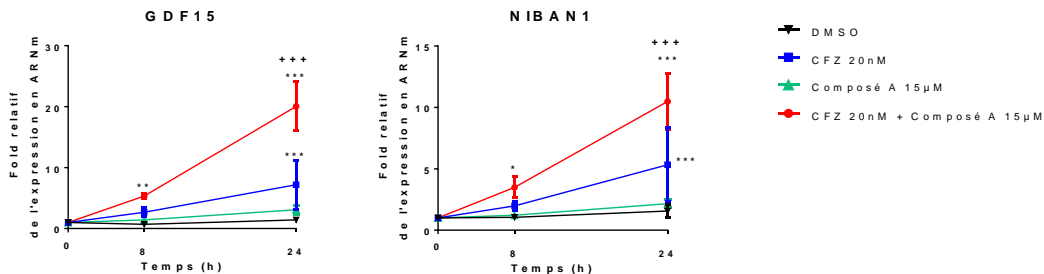


Figure 104 : Quantification de l'ARNm de GDF15 et NIBAN1 dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition au temps T0h. Les graphiques présentent la moyenne et l'écart-type de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats techniques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions			
		DMSO	Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
GDF15	8H	0.70	1.41	2.68	5.33 (**)
	24H	1.41	3.08	7.18 (***)	20.04 (***) (+++)
NIBAN1	8H	1.05	1.22	1.98	3.49 (*)
	24H	1.56	2.16	5.33 (***)	10.49 (***) (+++)

Tableau 45 : Quantification de l'ARNm de GDF15 et NIBAN1 dans les cellules HeLa par RT-qPCR après 0h, 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression du gène étudié par rapport à la condition au temps T0h obtenus lors de 4 expériences indépendantes comprenant chacune 2 réplicats biologiques. Les différences significatives déterminées par ANOVA à 2 facteurs suivi d'un post-test Tukey correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

GDF15 (*Growth differentiation factor 15*) aussi appelée MIC-1 (*Macrophage inhibitory cytokine-1*) ou NAG-1 (*NSAID-activated gene 1 protein*) est un membre de la famille TGF- β . Ce facteur GDF15 est d'abord synthétisé sous une forme pro-GDF15, qui se dimérise, et qui est ensuite clivée, permettant la production de la forme mature sécrétée (430). Ce facteur est fortement induit lors de différents stress cellulaires, comme à la suite de lésions tissulaires, lors de l'hypoxie, de l'UPR et serait ainsi impliqué dans l'inflammation, le cancer, les maladies cardiovasculaires et l'obésité (430–433). GDF15 aurait aussi bien un rôle de suppresseur de tumeur qu'un rôle pro-tumorigène (160,161). En particulier, dans le myélome multiple, GDF15 participerait à la différenciation des ostéoclastes (435), il serait sécrété par les cellules stromales de la moelle osseuse et participerait à la survie des cellules cancéreuses et à la résistance aux traitements (436,437). Du fait de son implication dans différents stress cellulaires, son induction pourrait être médiée par p53 lors de l'augmentation de l'expression de la CRP (protéine C réactive) (438), par EGR-1 (*Early growth response protein 1*) lors d'un stress oxydatif induit par un agent anticancéreux (439), par c-Myc (440), par CHOP lors de l'hypoxie et l'UPR (432), mais aussi par ATF4 et TRIB3 lors de la privation en leucine (304). Ainsi, son induction et les conséquences de celles-ci sont à confronter au contexte cellulaire et environnemental.

On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de ce gène aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 24h de traitement ($p < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés ($p < 0.01$ à T8H et $p < 0.001$ à T24H) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p < 0.001$) (**Figure 104** et **Tableau 45**). La significativité entre le carfilzomib seul et la combinaison après 8h de traitement a cependant été obtenue lors de l'étude RNAseq ($\text{padj} < 0.05$) (**Figure 103** et **Tableau 44**). Ainsi, l'augmentation de la transcription de GDF15 par la combinaison corrèle avec l'induction d'un stress.

NIBAN-1 aussi appelé FAM129A est une protéine hautement exprimée dans les cellules cancéreuses mais ses fonctions sont peu décrites (441,442). Le gène Niban a été découvert en 2000 comme étant exprimé dans un carcinome rénal de rat ayant une mutation du gène TSC2 (443). Niban-1 est décrit pour ses effets anti-apoptotiques (444–446). Par exemple, Niban-1 est phosphorylé par AKT lors d'un stress par les ultraviolets,

permettant sa liaison à la nucléophosmine et ainsi la libération de MDM2. Cela participe ainsi à l'inhibition de l'apoptose induite par p53 (445). Aussi, cette protéine possède un motif DNAJ qui est retrouvé dans les protéines de chocs thermiques, et pourrait ainsi être induite à la suite de différents stress (441,447). En effet, Niban-1 serait notamment induit à la suite de la privation en nutriments et en facteurs de croissance. Cette protéine régulerait l'autophagie de manière type cellulaire et/ou contexte dépendant (447). En particulier Niban1 serait un gène cible d'ATF4-CEBPB du fait de la présence d'un motif CARE dans son promoteur et contribuerait à la survie cellulaire (448). ATF4 induirait ainsi son expression lors d'un stress du RE ou lors d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (446,448,449). Aussi, Niban1 interagirait avec PERK et contribuerait à sa phosphorylation (448). Cependant, l'expression de Niban1 est associée à une diminution de la phosphorylation d'eIF2 α et une augmentation de la phosphorylation S6K1 et 4EBP1 de la voie mTORC1, impactant ainsi la traduction des protéines (446,448).

On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de ce gène aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib induit l'expression de ce gène de manière significative après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés ($p_{adj} < 0,05$ et $p_{adj} < 0.001$ respectivement) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p_{adj} < 0.001$) (**Figure 104** et **Tableau 45**). Ainsi, l'augmentation de la transcription de NIBAN1 par la combinaison corrèlerait avec l'induction d'un stress.

Aussi, le **tableau 46** présente les gènes dont l'expression est 2,5 fois moins importante pour la combinaison que pour le carfilzomib seul après 8h de traitement.

ID	Symbole	String Database description	FC
ENSG00000105649	RAB3A	Ras-related protein Rab-3A; Involved in exocytosis by regulating a late step in synaptic vesicle fusion. Could play a role in neurotransmitter release by regulating membrane flow in the nerve terminal; RAB, member RAS oncogene GTPases (220 aa)	0.25
ENSG00000265763	ZNF488	Zinc finger protein 488; May be involved in transcriptional regulation; Belongs to the krueppel C2H2-type zinc-finger protein family (340 aa)	0.26
ENSG00000186603	HPDL	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like protein; May have dioxygenase activity (371 aa)	0.28
ENSG00000128011	LRFN1	Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 1; Promotes neurite outgrowth in hippocampal neurons. Involved in the regulation and maintenance of excitatory synapses. Induces the clustering of excitatory postsynaptic proteins, including DLG4, DLGAP1, GRIA1 and GRIN1 (By similarity); Fibronectin type III domain containing (771 aa)	0.31
ENSG00000183691	NOG	Noggin; Inhibitor of bone morphogenetic proteins (BMP) signaling which is required for growth and patterning of the neural tube and somite. Essential for cartilage morphogenesis and joint formation. Inhibits chondrocyte differentiation through its interaction with GDF5 and, probably, GDF6 (232 aa)	0.34
ENSG00000104081	BMF	Bcl-2-modifying factor; May play a role in apoptosis. Isoform 1 seems to be the main initiator; BCL2 homology region 3 only (184 aa)	0.35
ENSG00000282827	NA	Uncharacterized	0.39
ENSG00000172935	MRGPRF	Mas-related G-protein coupled receptor member F; Orphan receptor. May bind to a neuropeptide and may regulate nociceptor function and/or development, including the sensation or modulation of pain (By similarity); G protein-coupled receptors, Class A orphans (343 aa)	0.39
ENSG00000168497	CAVIN2	Caveolae-associated protein 2; Plays an important role in caveolar biogenesis and morphology. Regulates caveolae morphology by inducing membrane curvature within caveolae. Plays a role in caveola formation in a tissue-specific manner. Required for the formation of caveolae in the lung and fat endothelia but not in the heart endothelia. Negatively regulates the size or stability of CAVIN complexes in the lung endothelial cells. May play a role in targeting PRKCA to caveolae (By similarity) (425 aa)	0.40

Tableau 46 : Gènes dont l'expression est diminuée par l'ajout du composé A au carfilzomib (Combinaison VS Carfilzomib) après 8h de traitement par l'analyse RNAseq. Le tableau présente l'identifiant ENSEMBL du gène (ID), son nom (symbole), une description de sa fonction par la base de données STRING ainsi que le fold change associé (FC). L'ensemble des gènes présentés dans ce tableau ont un fold change inférieur ou égal à 2.5 et une $p_{adj} < 0.05$.

Parmi ces gènes réprimés par la combinaison par rapport au carfilzomib seul après 8h de traitement, nous trouvons deux gènes impliqués dans le transport cellulaire (RAB3A, CAVIN2), un répresseur transcriptionnel (ZNF488), un gène impliqué dans l'apoptose (BMF), et d'autres gènes comme MRGPRF, LRFN1, NOG et HPDL. Cependant, la répression de ces gènes, mis en évidence par l'expérience de RNAseq, n'a pas été confirmée par RT-qPCR, ceux-ci n'appartenant pas aux voies de signalisation identifiées.

3.3. Prédiction de facteurs de transcription

Une analyse avec l'application Iregulon du logiciel Cytoscape a été réalisée afin d'étudier les facteurs de transcription qui pourraient être à l'origine de l'induction d'un set de gènes (450). Ce logiciel propose des facteurs de transcription candidats qui peuvent co-réguler des gènes, se basant sur des sites de liaisons aux facteurs de transcription partagés entre ces gènes. Cet outil effectue une analyse des séquences régulatrices (découverte de motifs) et utilise des données existantes comme le CHIP-Seq (méthode permettant l'analyse de l'interaction entre une protéine et l'ADN).

3.3.1. Comparaison carfilzomib vs combinaison à 8H

Les 80 gènes (gènes NA exclus) correspondant à une modulation d'au moins 2 fois (sur et sous expression) avec une padj inférieure à 5% entre le carfilzomib seul et la combinaison du carfilzomib et du composé A à 15µM après 8h de traitement ont été soumis à l'analyse par Iregulon (**Figure 105** et **Tableau 47**).

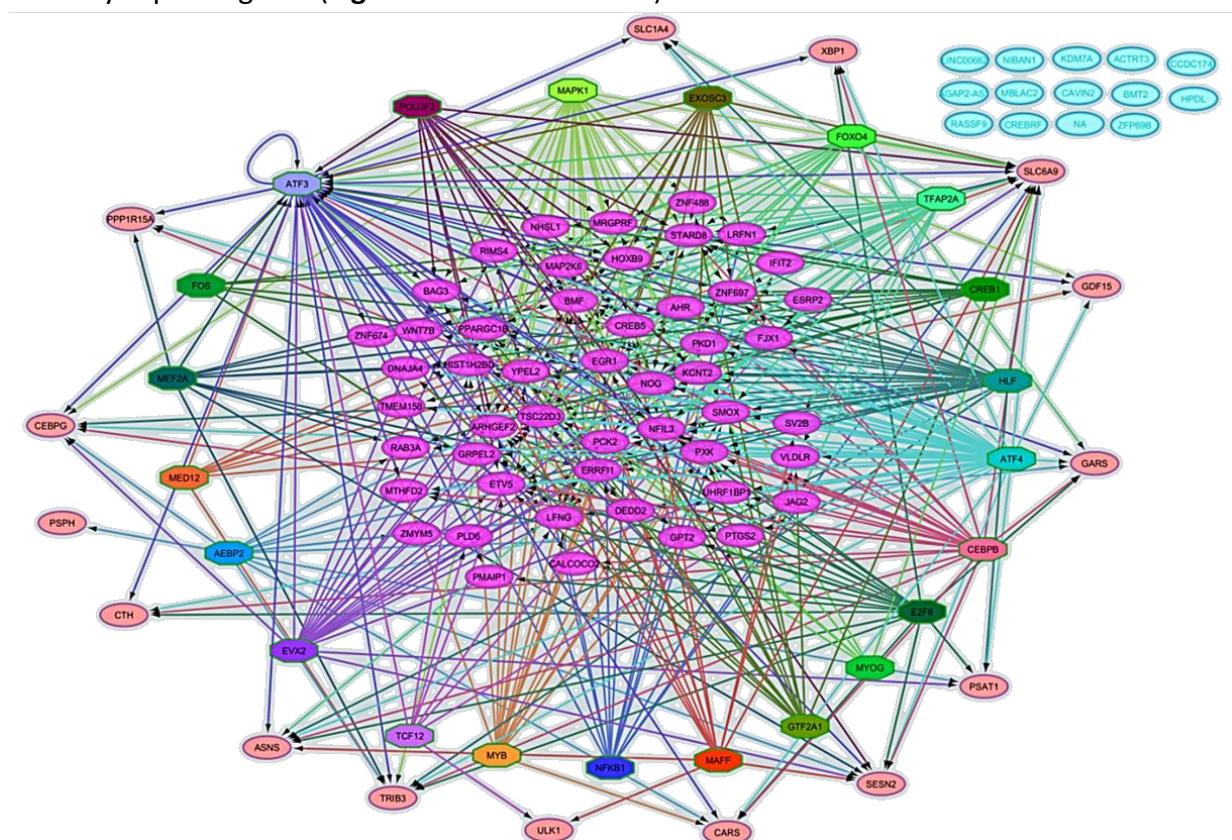


Figure 105 : Analyse des gènes modulés d'au moins 2 fois (sur- et sous-expression) entre le carfilzomib et la combinaison du carfilzomib et du composé A, après 8h de traitement et présentant une padj inférieure à 5%, par le logiciel Iregulon. En rose fushia apparaissent les gènes modulés non étudiés dans cette thèse et en rouge clair les gènes présentés dans cette thèse. Les facteurs de transcription identifiés par le logiciel apparaissent de différentes couleurs et sont reliés aux gènes.

La plus forte prédiction (NES score de 10.528 (*normalized enrichment score*)) de cet outil montre qu'une partie importante des gènes (53/80) pourraient être la résultante du cluster M1 et en particulier d'un ou plusieurs de ces facteurs de transcription: ATF4 / ATF3 / CEBPB / NFIL3 / CREB1 / CREM / CEBPA / DDIT3 / HLF / DBP / ATF1 / ATF2 / ATF5 / ATF6 / ATF7 / CREB3 / XBP1 / JUN / JUNB / JUND / JDP2 / E4F1 (**Tableau 47** et **Figure 106**). On remarque que l'on retrouve principalement des facteurs de transcription de la famille ATF (ATF4 / ATF3 / ATF1 / ATF2 / ATF5 / ATF6 / ATF7), de la famille CEBP (CEBPB / CEBPA / DDIT3), de la famille FOS/JUN (JUN / JUNB / JUND) et de la voie UPR (XBP1). On retrouve également à plusieurs reprises le facteur de transcription NFIL3. Ce facteur est également présent dans les gènes dont l'expression est fortement impactée lors de la comparaison entre le carfilzomib seul et la combinaison après 8h de traitement (**Tableau 43**).

Code du cluster	Facteurs de transcription prédits	Nb de gènes modulés	NES Score
M1	ATF4 / ATF3 / CEBPB / NFIL3 / CREB1 / CREM / CEBPA / DDIT3 / HLF / DBP / ATF1 / ATF2 / ATF5 / ATF6 / ATF7 / CREB3 / XBP1 / JUN / JUNB / JUND / JDP2 / E4F1	53	10.528
T1	E2F8	20	5.323
M2	HLF / NFIL3 / DBP / TEF / ATF2 / HOXA13 / CEBPB / CRX	27	4.912
T2	AEBP2	14	4.410
T3	MEF2A	12	4.390
M3	MEF2A / MEF2C / MEF2D / MEF2B / MEF2BNB-MEF2B / JAZF1 / MAPK1 / MAPK3 / MAPK7 / MAPK15 / NLK / MAPK6 / MAPK4	31	3.993
T4	ATF3	31	3.927
M4	GTF2A1 / GTF2A2	15	3.883
M5	LMO2 / NR3C1 / GATA1 / GATA3 / EVX2 / LHX8 / LHX6 / EMX2 / GBX2 / EVX1 / NKX1-1 / HOXD1 / HOXB3 / PAX4 / LHX2 / LHX4 / RAX / ESX1 / ISX / VSX2 / EN2 / DLX5 / NKX1-2 / RHOF2 / RHOF2B / GSX2 / ARX / MNX1 / PDX1 / PHOX2A / SHOX2 / TCF3 / DBP / HOXA3 / LHX3 / NOBOX / GBX1 / VAX2 / VSX1 / MSX2 / HOXA5 / IRF6 / HOXA1 / PAX7 / POU6F2 / ALX3 / EMX1 / HOXA2 / HOXB5 / NOTO / PRRX1	22	3.668
M7	EXOSC3	14	3.599
M8	FOXO4 / FOXO1 / FOXO3 / FOXM1 / FOXO6 / FOXD3 / FOXF1 / FOXF2 / FOXH1 / HOXJ1 / RRN3 / NANOG / FOXP1 / FOXI1 / FOXA2 / FOXA1 / FOXD1 / FOXD2 / FOXJ2 / HLF / FOXC2 / FOXC1	15	3.586
M9	NR1I2 / NR1I3 / RXRA / RXRB / VDR / CREB1 / CREM	12	3.5666
M10	NFKB1 / NFKB2 / HIVEP1 / HIVEP3 / HIVEP2 / ZNF831 / IKZF1 / MZF1 / RELB	14	3.465
T5	TCF12	8	3.439
T6	CEBPB	25	3.300
M12	POU3F2 / PDX1 / KDM4B / KDM4C / KDM4A / KDM4D / KDM4E	17	3.298
M13	MYB / SPI1 / IRF1 / E2F1 / IRF4 / IRF2 / IRF3 / IRF5 / IRF6 / IRF7 / IRF8 / PRDM1 / ELF1 / PURA / IRF9 / ZEB1	17	3.271
M15	MAFF / MAFK / MAFG / DBP / MAF / MAFA / NFE2 / BACH1 / BACH2 / MAFB / NFE2L1 / NFE2L2 / NFE2L3	14	3.193
M18	MYOG / ASCL2	6	3.133
M19	FOS / ISL1 / JUN / LHX2 / LHX9 / HOXA6 / HOXA7 / HOXB6 / HOXB7 / FOSB / FOSL1 / FOSL2 / JUNB / JUND	6	3.045
T7	MED12	8	3.044
M20	TFAPA2A / TFAP2C / NEUROD1 / PURA / TFAP2B / HLF / TPAP2E	28	3.021

Tableau 47 : Liste des facteurs de transcription prédite par le logiciel Iregulon lors de la comparaison des gènes présentant un FC de 2 (sur- et sous-expression) et une padj <5% entre les conditions CFZ et COMB à T8H.

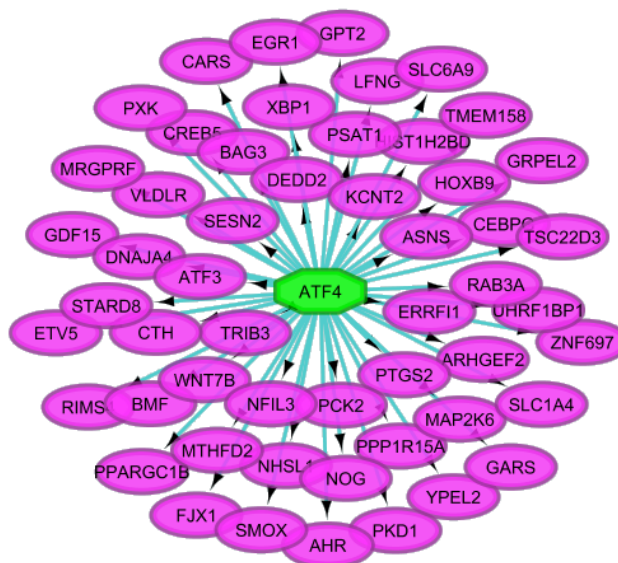


Figure 106 : Analyse des gènes modulés d’au moins 2 fois (sur et sous-expression) entre le carfilzomib et la combinaison du carfilzomib et du composé A après 8h de traitement et présentant une padj inférieure à 5% par le logiciel Iregulon. Le schéma représente les gènes qui peuvent être modulés par le cluster M1 et en particulier à un ou plusieurs facteurs de transcription suivant : ATF4 / ATF3 / CEBPB / NFIL3 / CREB1 / CREM / CEBPA / DDIT3 / HLF / DBP / ATF1 / ATF2 / ATF5 / ATF6 / ATF7 / CREB3 / XBP1 / JUN / JUNB / JUND / JDP2 / E4F1.

NFIL3 (*Nuclear factor, interleukin 3 regulated*), aussi appelé E4BP4 est un facteur de transcription bZIP, découvert pour sa liaison au site ATF du promoteur E4 adenovirus (451). Ce facteur de transcription joue un rôle dans la régulation du rythme circadien, dans le développement des cellules immunitaires, ainsi que dans la survie cellulaire (452). NFIL3 a également un rôle dans la régulation des nutriments car il est induit par l’insuline de manière PI3K dépendante (453). Cependant, l’ensemble de ces actions serait contexte dépendant, car il participe également à l’induction de la mort cellulaire induite par les glucocorticoïdes dans des cellules cancéreuses (454). NFIL3 est principalement décrit comme un répresseur transcriptionnel mais il peut également activer la transcription de certains gènes. NFIL3 est notamment un répresseur transcriptionnel des gènes cibles de CEBP- β (455).

On constate que le composé A ne module pas significativement l’expression de ce gène aux temps de cinétique étudiés. Le traitement par le carfilzomib ne module pas non plus l’expression de ce gène de manière significative. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative ce gène aux deux temps de cinétiques étudiés (padj<0.001 à T8H et padj<0.05 à T24H) et cela est significativement différent du carfilzomib seul (padj<0.001 à T8H et padj<0.01 à T24H) (**Figure 107** et **Tableau 48**).

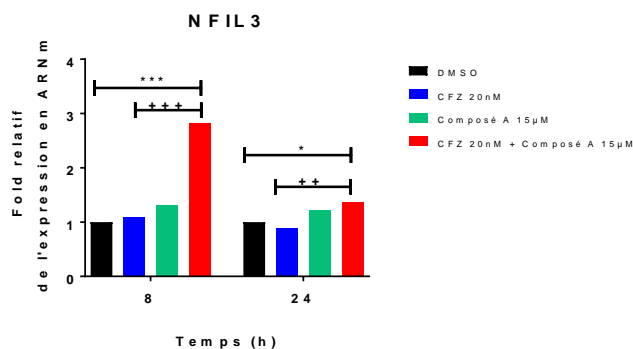


Figure 107 : Changement transcriptionnel de l'ARNm NFIL3 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. L'expression en ARNm est exprimée en fold de l'expression par rapport à la condition contrôle du temps considéré. Le graphique présente la moyenne du changement transcriptionnel calculé par RNAseq. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Gène	Cinétique	Conditions		
		Composé A	CFZ	CFZ + Composé A
NFIL3	8H	1.3	1.1	2.8 (***) (+++)
	24H	1.2	0.9	1.4 (*) (++)

Tableau 48 : Quantification de l'ARNm de NFIL3 dans les cellules HeLa par RNAseq après 8h et 24h de traitement par le carfilzomib à 20 nM seul ou en combinaison avec 15µM de composé A. Le tableau présente le fold de l'expression du gène étudié par rapport à la condition véhicule du temps considéré. Les différences significatives de la padj correspondent à $p < 0.001$: *** ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.05$: * par rapport au contrôle DMSO du temps et par rapport au carfilzomib seul : $p < 0.001$: +++ ; $p < 0.01$: ++ ; $p < 0.05$: +.

Si l'on s'intéresse désormais au **tableau 49** des 20 premiers motifs identifiés dans les 80 gènes soumis selon le NES Score, on remarque que 31 gènes possèdent le motif homer-M00001 AARE(HLH)/mES-cMyc-ChIP-Seq/Homer correspondant au motif AARE décrit dans la littérature (302) (**Figure 108**). Cela semble cohérent avec l'induction de gènes de la réponse AAR.

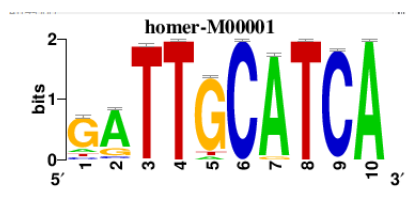


Figure 108 : Motif homer-M00001 AARE(HLH)/mES-cMyc-ChIP-Seq/Homer identifié sur 31 gènes des 80 gènes soumis à l'analyse Iregulon (gènes modulés d'au moins 2 fois (sur- et sous-expression) entre le carfilzomib et la combinaison du carfilzomib et du composé A après 8h de traitement et présentant une padj inférieure à 5%).

ID du motif enrichi	NES Score	Code cluster	Nb de gènes cibles	FT identifiés
Homer-M00001 AARE (HLH)/mES-cMyc-ChIP-Seq/home	10.528	M1	31	0
Taipale-NNATGAYGCAATN-ATF4-DBD	9.625	M1	26	ATF4 / ATF3 / CEPB
Taipale-NGGATGATGCAATM-Atf4-DBD	9.076	M1	17	ATF4 / CEPBPB
Flyfactorsurvey-Crc_CG6272_SANGER_5_FBgn0036126	6.619	M1	37	ATF3 / NFIL3 / CREB1
Factorbook-CREB	6.358	M1	31	ATF3 / ATF4 / CREM / CREB1
Transfac_pro-M01640 F\$CIN5_01	4.912	M2	12	HLF / NFIL3 / DBP / TEF / ATF2
Transfac_public-M00228 V\$VBP_01	4.855	M2	13	TEF / HLF / DBP / ATF2 / NFIL3
Encode-UW.Motif.0036	4.715	M1	7	0
Swissregulon-CEBPA-B_DDIT3.p2	4.710	M1	27	CEBPA / CEPBPB / DDIT3
Jaspar-MF0006.1 bZIP_cEBP-like_subclass	4.427	M1	12	CEBPA / CEPBPB / NFIL3 / HLF / DBP
Swissregulon-ATF2.p2	4.364	M2	9	ATF2 / NFIL3 / TEF / HLF / DBP
Jaspar-MA0025.1	4.312	M2	9	NFIL3 / TEF / HLF / DBP / ATF2
Homer-M00296 MF0006.1_bZIP_cEBP-like_subclass/jaspar	4.310	M1	12	CEBPA / CEPBPB / NFIL3 / HLF / DBP
Transfac_pro-M00514 V\$ATF4_Q2	4.260	M1	13	ATF4 / ATF3 / CREB1 / CREM / ATF5 / ATF2 / ATF1 / ATF6 / ATF7
Homer-M00018 CEBP :AP1/ThioMac-CEBPb-ChIP-Seq/Homer	4.097	M1	37	0
Encode-UW.Motif.0362	3.993	M3	10	0
Swissregulon-HLF.p2	3.962	M2	11	HLF / DBP / TEF / NFIL3 / ATF2
Taipale-NRTTACGTAAAYN-HLF-full	3.920	M2	9	HLF / NFIL3 / TEF / DBP / ATF2 / HOXA13
Transfac_pro-M00707 V\$TFIIA_Q6	3.883	M4	15	GTF2A1 / GTF2A2
Transfac_public-M00030 F\$MATA1_01	3.821	M1	17	0

Tableau 49 : Motifs identifiés par le logiciel Iregulon dans la liste de gènes soumis (gènes modulés d'au moins 2 fois entre le carfilzomib et la combinaison du carfilzomib et du composé A après 8h de traitement et présentant une padj inférieure à 5%) et les facteurs de transcription associés.

3.3.2. Comparaison DMSO vs composé A à 24H

Les 65 gènes correspondant à une modulation d'au moins 2 fois (sur- et sous-expression) avec une padj < 0.05 entre le composé A à 15µM et le véhicule après 24h de traitement ont été soumis à l'analyse par Iregulon (**Figure 109** et **Tableau 50**).

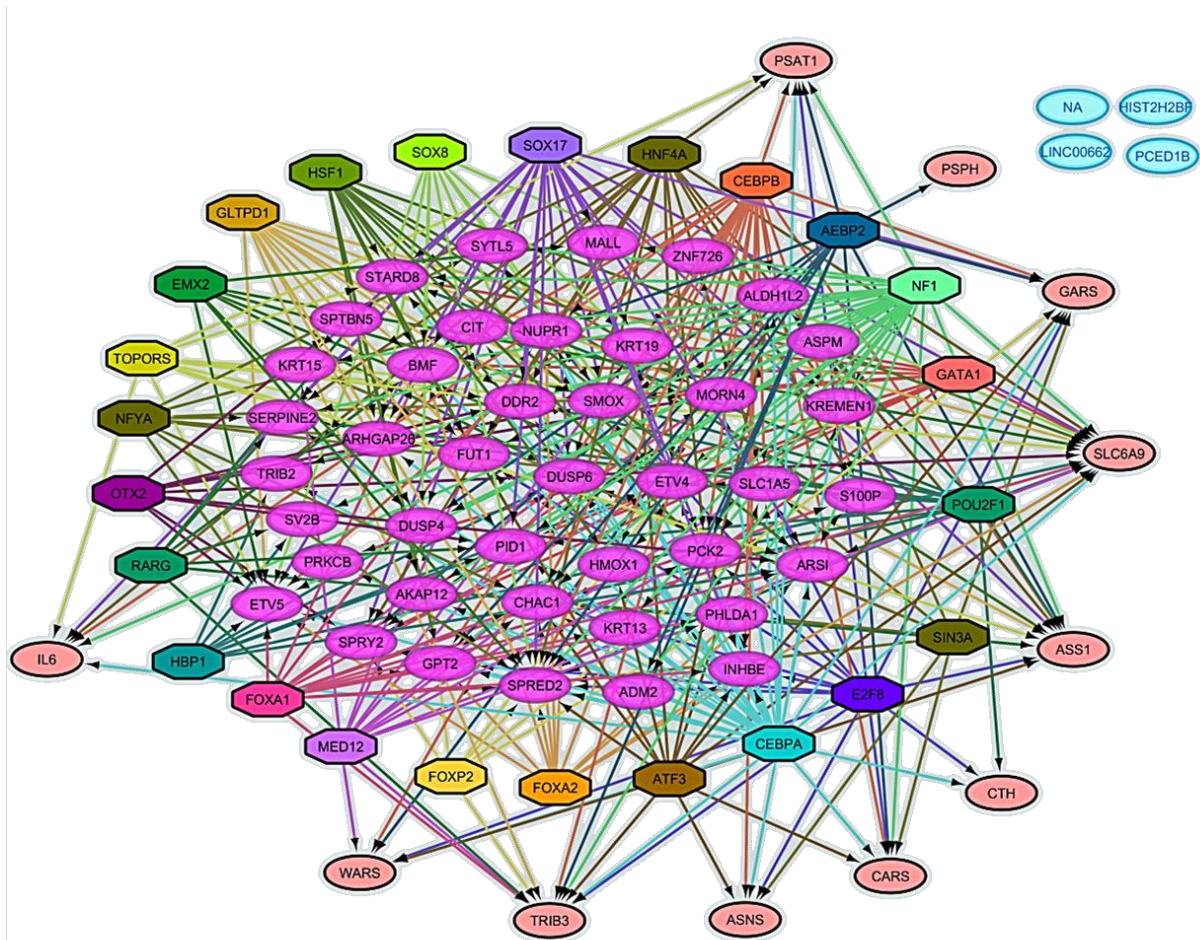


Figure 109 : Analyse des gènes modulés d’au moins 2 fois (sur- et sous-expression) entre le contrôle et le composé A après 24h de traitement et présentant une padj inférieure à 5% par le logiciel Iregulon. En rose fuchsia apparaissent les gènes modulés non étudiés dans cette thèse et en rouge clair les gènes présentés dans cette thèse. Les facteurs de transcription identifiés par le logiciel apparaissent de différentes couleurs et sont reliés aux gènes.

Code du cluster	Facteurs de transcription prédits	Nombre de gènes modulés	NES Score
M1	CEBPA / ATF4 / CEBPB / ATF3 / DDIT3 / CREB1 / CREM / NFIL3 / HLF / DBP / CEBPD / CEBPE / CEBPG / TBP / SOX9 / NR3C1 / SOX10 / TEF / ATF2 / CRX / MAFA / STAT6	40	10.508
T1	AEBP2	15	5.886
M2	HBP1	9	5.432
T2	E2F8	16	5.203
M3	SOX8 / SOX17 / CDX4 / CDX2 / HOXD13 / HOXB13 / HOXA13 / HOXC13 / HOXB9 / TBP / HOXA10 / HOXA9 / HOXD10	10	4.719
M4	HSF1	14	4.496
M5	SOX17 / SOX8 / PAX4 / TCF3 / NR2F1 / NR2F2 / ZNF281 / RREB1 / ZNF444 / ZNF467 / KLF4 / MAZ / SOX11 / SOX4 / SOX9 / SOX15 / SRY / NF1 / YY1 / NFIA / NFIC / HIC1 / NFIX / SRF	25	4.481
M6	GLTPD1	13	4.235
T3	MED12	13	4.005
T4	FOXA1	16	3.962
M7	TFCP2 / TFCP2L1 / TP53 / TP63 / HNF4A / HNF4G / NR2F1 / NR2F2	18	3.863
M8	NF1 / NFIX / NFIA / NFIB / YY1 / NFIC / TLX1 / TLX3 / NFATC1 / E2F1 / FOXA3 / HOXA13 / ELF1 / USF1 / CRX / MEF2A / MEF2C / MEF2D / MEF2B / MEF2BNB- MEF2B	34	3.820
T5	CEBPB	24	3.711
M9	RARG / ESRRB / NUP133 / NR0B1 / RXRA	7	3.624
M12	OTX2 / OTX1 / ISL1 / PITX3 / CRX / PAX7 / PITX2	9	3.534
T6	FOXA2	12	3.505
T7	ATF3	15	3.423
M15	GATA1 / GATA5 / GATA4 / GATA2 / GATA3 / GATA6 / LMO2 / NR3C1	11	3.408
M16	TOPORS	11	3.384
M17	NFYA / NFYB / NFYC	9	3.374
M19	EMX2 / EMX1 / CDX4 / HOXA5 / HOXB6 / HOXA6	8	3.247
T8	FOXP2	7	3.191
M21	POU2F1 / POU2AF1 / POU2F2 / POU2F3 / POU3F3 / POU4F1 / POU5F1 / POU5F1B / E2F1 / TFEC	16	3.150
T9	SIN3A	10	3.018

Tableau 50 : Liste des facteurs de transcription prédite par le logiciel Iregulon lors de la comparaison des gènes présentant un FC de 2 (sur- et sous-expression) et une $p_{adj} < 5\%$ entre les conditions contrôle et composé A à 24H.

La plus forte prédiction (NES score de 10.508) de cet outil montre qu'une partie importante des gènes (40/65) pourraient être la résultante du cluster M1 et en particulier d'un ou plusieurs de ces facteurs de transcription: CEBPA / ATF4 / CEBPB / ATF3 / DDIT3 / CREB1 / CREM / NFIL3 / HLF / DBP / CEBPD / CEBPE / CEBPG / TBP / SOX9 / NR3C1 / SOX10 / TEF / ATF2 / CRX / MAFA / STAT6. On remarque que l'on retrouve principalement des facteurs de transcription de la famille ATF (ATF4 / ATF3 / ATF2) et de la famille CEBP (CEBPA / CEBPB / DDIT3 / CEBPD / CEBPE / CEBPG) (**Tableau 50** et **Figure 110**).

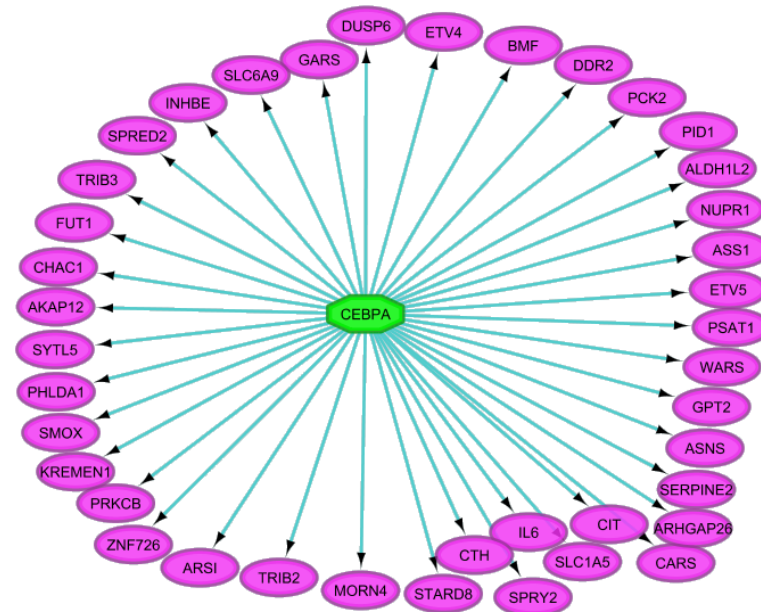


Figure 110 : Analyse des gènes modulés d’au moins 2 fois entre le contrôle et le composé A après 24h de traitement et présentant une padj inférieure à 5% par le logiciel Iregulon. Le schéma représente les gènes qui peuvent être modulés par le cluster M1 et en particulier à un ou plusieurs facteurs de transcription suivant : CEBPA / ATF4 / CEBPB / ATF3 / DDIT3 / CREB1 / CREM / NFIL3 / HLF / DBP / CEBPD / CEBPE / CEBPG / TBP / SOX9 / NR3C1 / SOX10 / TEF / ATF2 / CRX / MAFA / STAT6.

Si l’on regarde désormais le tableau des 20 premiers motifs identifiés dans les 65 gènes soumis selon le NES Score, on remarque que 23 gènes possèdent le motif homor-M00001 AARE(HLH)/mES-cMyc-ChIP-Seq/Homer correspondant au motif AARE décrit dans la littérature, identique au motif avec le plus grand NES Score lors de la comparaison entre le carfilzomib seul et la combinaison après 8h de traitement (**Tableau 51**). Il semblerait donc que les gènes modulés différemment entre le carfilzomib seul et la combinaison correspondent à des gènes avec des motifs modulés également par le composé A seul. Cependant, la modulation de gènes par le composé A seul n’est pas responsable d’une mort cellulaire, mais c’est l’association avec le carfilzomib qui provoque la mort cellulaire, peut-être par un stress nutritionnel supplémentaire.

ID du motif enrichi	NES Score	Code cluster	Nb de gènes cibles	FT identifiés
Homer-M00001 AARE (HLH)/mES-cMyc-ChIP-Seq/home	10.508	M1	23	0
Taipale-NGGATGATGCAATM-Atf4-DBD	9.448	M1	17	ATF4 / CEBPB
Taipale-NNATGAYGCAATN-ATF4-DBD	8.633	M1	21	ATF4 / CEBPB / ATF3
Swissregulon-CEBPA-B_DDIT3.p2	6.713	M1	14	CEBPA / CEBPB / DDIT3
Factorbook-CREB	6.040	M1	28	ATF3 / ATF4 / CREM / CREB1
Flyfactorsurvey- Crc_CG6272_SANGER_5_FBgn0036126	5.586	M1	28	ATF3 / NFIL3 / CREB1
Flyfactorsurvey-cic_SANGER_5_FBgn0028386	5.432	M2	9	0
Transfac_pro-M02912 V\$SOX8_04	4.719	M3	7	SOX8 / SOX17
Encode-UW.Motif.0109	4.496	M4	8	0
Transfac_pro_M02904 V\$SOX17_04	4.481	M5	7	SOX17 / SOX8
Jaspar-MF0006.1 bZIP_cEBP-like_subclass	4.307	M1	23	CEBPA / CEBPB / NFIL3 / HLF / DBP
Jaspar-CN0232.1 LM232	4.235	M6	7	0
Homer-M00296 MF0006.1_bZIP_cEBP-like_subclass/jaspar	4.183	M1	21	CEBPA / CEBPB / NFIL3 / HLF / DBP
Transfac_pro-M03571 V\$CEBPD_Q6_01	3.950	M1	4	CEBPD / CEBPG / CEBPE / CEBPB / CEBPA / TBP / SOX9 / NR3C1 / SOX10
Taipale-NCCGGNNNNNCCGGN-TFCP2-full	3.863	M7	12	TFCP2 / TFCP2L1
Encode-UV.Motif.0082	3.852	M5	8	0
Homer-M00119 NF1(CTF)/LNCAp-NF1-ChIP-Seq/Homer	3.820	M8	28	NF1 / NFIX / NFIA / NFIB / YY1 / NFIC / TLX1 / TLX3 / NFATC1 / E2F1 / FOXA3
Encode-UW.Motif.0015	3.722	M8	12	0
Transfac_public-M00228 V\$VBP_01	3.691	M1	5	TEF / HLF / DBP / ATF2 / NFIL3

Tableau 51 : Motifs identifiés par le logiciel Iregulon dans la liste de gènes soumis (gènes modulés d'au moins 2 fois entre le contrôle et le composé A après 24h de traitement et présentant une padj inférieure à 5%) et les facteurs de transcription associés.

Ainsi, les gènes modulés après 24h de traitement par le composé A seul seraient probablement dus aux facteurs de transcription ATF et CEBP. Les facteurs de transcription responsables des changements transcriptomiques observés après 24h de traitement par le composé A ont donc été induits, soit de manière transcriptionnelle avant ce temps de cinétique, on suppose entre 8h et 24h de traitement car aucun changement transcriptionnel n'a été observé à 8h de traitement, ou soit indépendamment de leurs transcriptions par des changements d'expressions protéiques.

4. Evaluation du stress nutritionnel

Les analyses transcriptomiques des cellules HeLa traitées pendant 24h avec du composé A, et pendant 8h avec la combinaison du composé A et du carfilzomib, ont mis en évidence des voies de signalisation relatives au métabolisme des acides aminés, ainsi que des similarités transcriptionnelles avec le composé tosédostat. Ces résultats nous amènent ainsi à comparer dans un premier temps les effets des composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE avec ceux du tosédostat, puis dans un second temps à explorer la réponse à la privation en acides aminés.

4.1. Comparaison avec le tosédostat

4.1.1. Tosédostat, un inhibiteur de plusieurs aminopeptidases en clinique

Le tosédostat est un inhibiteur de plusieurs aminopeptidases à zinc intracellulaires (402). C'est une prodrogue (CHR-2797) car sa fonction ester est métabolisée par les estérases cellulaires, pour former la forme acide active qui s'accumule dans la cellule (CHR-79888). Tosédostat possède dans sa structure un acide hydroxamique pouvant être responsable de la liaison au zinc et de l'inhibition de ces enzymes (**Figure 111**). Le composé actif présente une IC_{50} inférieure à $1\mu M$ sur PuSA, LTA4H, aminopeptidase N et LAP3 (ces enzymes sont décrites dans le paragraphe suivant). Le tosédostat est décrit comme un agent antiprolifératif, résultant de la déplétion en acides aminés intracellulaires et d'une réponse AAR. Cependant, la réalisation d'expériences de siRNA de chaque enzyme individuellement n'a pas montré l'évidence que celles-ci étaient responsables de l'effet de cette molécule. Les auteurs justifient que ce serait l'inhibition simultanée de toutes ces enzymes qui serait responsable de l'effet (402). Ce composé fait l'objet de plusieurs études cliniques dans la leucémie aigüe myéloïde, le syndrome myélodysplasique, le myélome multiple, le cancer du pancréas et du poumon (456–460). Le tosédostat présente un effet antiprolifératif synergique avec un inhibiteur d'HDACs qui serait dû à l'impact sur la voie NF- κB (461,462). De plus, tosédostat radiosensibilise aux rayons γ des cellules cancéreuses de l'œsophage *in vitro* (463). Cet effet radiosensibilisateur pourrait être dû à une augmentation de l'autophagie. Les auteurs ont également déterminé que l'administration du tosédostat à la suite des irradiations (post-traitement) était la modalité de traitement nécessaire pour avoir l'effet radiosensibilisateur.

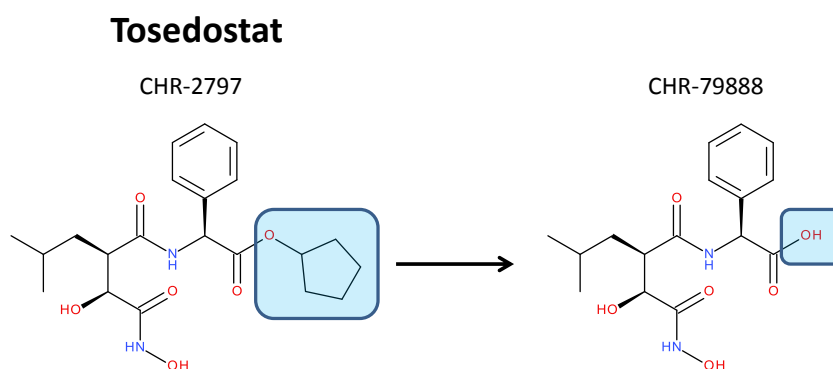


Figure 111 : Structure chimique du tosédostat (CHR-2797) qui est une pro-drogue, sa métabolisation cellulaire permet la production de la forme acide active.

4.1.2. Implication des aminopeptidases dans le cancer

Les aminopeptidases sont des métalloenzymes qui permettent la libération d'acides aminés situés aux extrémités d'un petit peptide substrat généré par le protéasome. Les plus gros peptides (entre 6 et 24 acides aminés) seraient quant à eux clivés dans un premier temps par des endopeptidases. Ces aminopeptidases ont des rôles dans différentes

fonctions physiologiques comme la régulation de peptides, le maintien du stock intracellulaire en acides aminés, le détachement de la méthionine terminale des nouvelles protéines synthétisées, ou encore l'édition d'antigènes. Plusieurs aminopeptidases ont un rôle dans la physiopathologie du cancer (464). En effet, les cellules cancéreuses, du fait de leurs croissances rapides, ont un métabolisme important, et la moindre variation de celui-ci peut leur être délétère. Ci-dessous une liste non exhaustive d'aminopeptidases associées à la physiopathologie du cancer.

L'aminopeptidase N, aussi appelée APN ou CD13 appartient à la famille M1 des zinc-aminopeptidases (M01.001, EC 3.4.11.2). Cette aminopeptidase est exprimée à la membrane cellulaire mais peut être également retrouvée sous forme soluble dans le sérum (465). La liaison de peptides substrats à cette enzyme entraîne le clivage, l'endocytose et une transduction du signal. CD13 dégrade préférentiellement des protéines et peptides avec un acide aminé neutre. Cette aminopeptidase a de nombreuses fonctions, elle est impliquée dans le clivage de peptides antigéniques avant leur liaison au CMH de classe II, elle sert de récepteur pour différents virus, elle joue un rôle dans l'endocytose du cholestérol et dans l'inactivation d'enképhalines (466–470). L'augmentation de l'expression de CD13 dans des cellules cancéreuses est associée à un effet invasif important, à une résistance à l'apoptose et à une faible survie des patients (471–475).

L'aminopeptidase sensible à la puromycine aussi appelée PuSA, codée par le gène NPEPPS appartient à la famille M1 des zinc-aminopeptidases (M01.010, EC.3.4.11.14). PuSA est localisée aussi bien dans le cytosol qu'à la membrane cellulaire. Cette aminopeptidase aurait différentes fonctions. En particulier, elle joue un rôle dans la présentation d'antigènes au CMH de classe I (476). Aussi, cette enzyme est également décrite pour digérer les peptides polyglutamines libérés par le protéasome (477). Enfin, cette aminopeptidase a une activité augmentée dans certains types de cancer et qui n'est pas corrélée à la quantité d'ARNm (478).

La leucine aminopeptidase 3 aussi appelée LAP3 ou aminopeptidase cytosolique appartient à la famille des peptidases M17 (M17.001, EC.3.4.11.1). Cette enzyme est impliquée dans la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses (479,480).

L'hydrolase du leucotriène A4, aussi appelée LTA4H fait partie de la famille M1 des zinc-aminopeptidases (M01.004, EC 3.3.2.6). Comme son nom l'indique cette enzyme est responsable de la transformation du leucotriène A4 en leucotriène B4, et aurait donc un rôle dans l'inflammation et les réactions allergiques (481). LTA4H a également un rôle dans le développement de cancer notamment par le contrôle du cycle cellulaire (482).

L'aminopeptidase B aussi appelée AP-B appartient à la famille M1 des zinc-aminopeptidases (M01.014, EC.3.4.11.6) et est impliquée dans le clivage d'acides aminés basiques. Son activité est augmentée dans certains cancers. L'augmentation de son activité dans le plasma de patients cancéreux serait cependant plutôt associée à une meilleure survie (478).

La méthionine aminopeptidase 2 aussi appelée Met-AP-2 ou p67 appartient à la famille des aminopeptidases M24 (M24.002, EC 3.4.11.18) et est impliquée dans l'hydrolyse

du résidu méthionine des nouvelles protéines. Cette enzyme lierait deux métaux, zinc, cobalt, manganèse ou fer. Met-AP-2 est impliquée dans la modulation de la phosphorylation d'eIF2- α en la protégeant de cette dernière, dans la croissance tumorale, ainsi que dans l'angiogénèse (483,484).

La leucine aminopeptidase placentaire (PLAP), aussi appelée IRAP (*Insulin-regulated aminopeptidase*), ocytocinase ou encore vasopressinase codé par le gène LNPEP appartient à la famille M1 des zinc-aminopeptidases (M01.011, EC 3.4.11.3). Comme son nom l'indique, cette enzyme est impliquée dans la dégradation de l'ocytocine et de la vasopressine. Aussi, IRAP est localisée au niveau de vésicules contenant GLUT4 (485). IRAP peut être également présent sous forme soluble par son clivage par ADAM12 (486). Aussi, cette enzyme est impliquée dans la présentation d'antigènes par le CMH de classe I (487). IRAP est également impliquée dans la physiopathologie du cancer, où son expression est associée à un faible pronostic (488). IRAP participe également à la progression tumorale médiée par l'insuline (489).

Enfin, les aminopeptidases du réticulum endoplasmique 1 (ERAP1, M01.018) et 2 (ERAP2, M01.024), aussi appelée leucine aminopeptidase insensible à la puromycine (PILSAP) pour ERAP1, appartiennent également à la famille M1 des zinc-aminopeptidases. Ces deux enzymes ont des rôles variés, dont la présentation d'antigènes par le CMH de classe I, avec des préférences différentes pour leurs substrats (490). Le niveau d'expression d'ERAP1 et 2 est impacté dans les tumeurs et cela serait tumeur-dépendant. ERAP1 et 2 jouent un rôle dans la physiopathologie du cancer, notamment par la modulation de la réponse immunitaire (490,491).

4.1.3. Etude du phénotype de boost apoptotique

Du fait du partage d'un transcriptome proche entre le composé A et le tosédostat nous avons voulu savoir si le tosédostat pouvait présenter un phénotype de boost apoptotique avec l'inhibiteur de protéasome carfilzomib.

Le tosédostat booste l'apoptose induite par le carfilzomib de manière dose-dépendante sur les HeLa mais également sur les cellules OPM2 (**Figure 112** et **Tableau 52**). Le tosédostat n'a pas induit d'apoptose seul sur ces deux lignées lors de ces expériences. En revanche, lors de la même expérience sur les OPM2, le composé A a induit l'apoptose des cellules seul à 15 μ M alors que le tosédostat à 15 μ M n'en n'a pas induit.

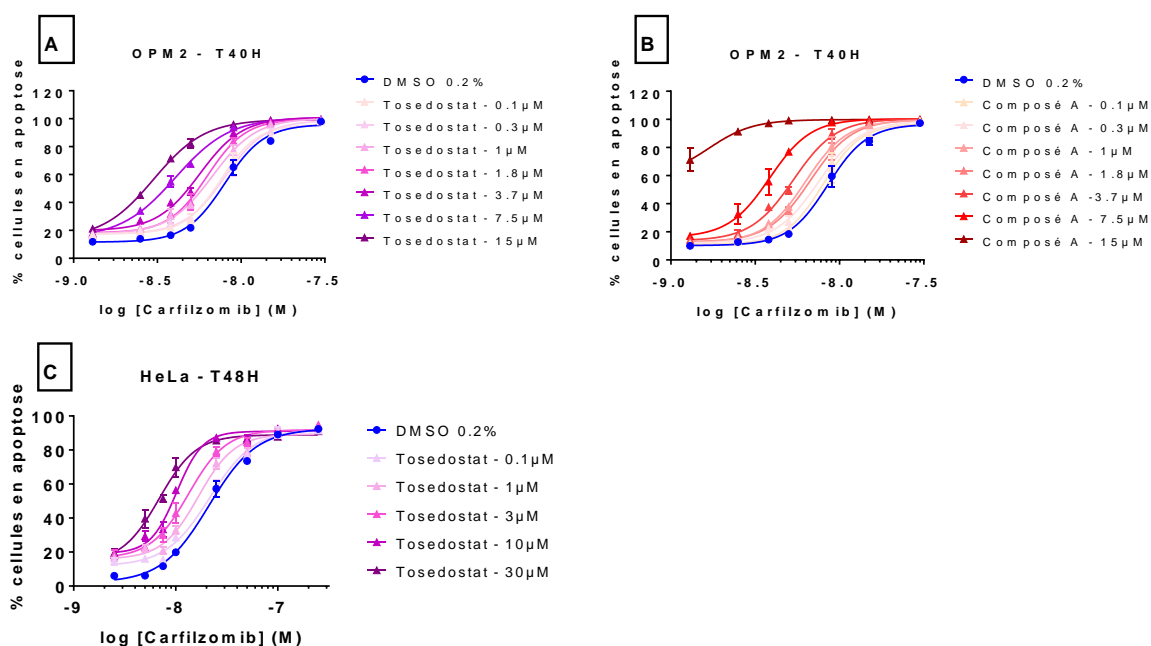


Figure 112 : A. et B. Pourcentage de cellules OPM2 en apoptose après 40h de traitement avec des concentrations croissantes en carfilzomib et en tosédostat (A) ou composé A (B). Les résultats montrent la moyenne et l'écart-type de triplicats techniques obtenus lors d'une expérience. C. Pourcentage de cellules HeLa en apoptose après 48h de traitement avec des concentrations croissantes en carfilzomib et en tosédostat. Les résultats montrent la moyenne et l'écart-type de triplicats techniques obtenus lors d'une expérience. Les graphiques ont été obtenus à l'aide du logiciel graphpad prism 7 par une régression non linéaire à 4 paramètres.

Lignée cellulaire	Composé	CC ₅₀ CFZ (nM)	CC ₅₀ CFZ + composé (nM)	Ratio des CC ₅₀
OPM2	Tosédostat à 7.5μM	8.01 [7.51 à 8.56]	4.05 [3.83 à 4.27]	1.98
	composé A à 7.5μM	8.53 [8.02 à 9.10]	3.85 [3.53 à 4.15]	2.22
HeLa	Tosédostat à 30μM	21.16 [19.12 et 23.4]	6.88 ^b [5.52 à 7.78]	3.08

Tableau 52 : CC₅₀ du carfilzomib seul et du carfilzomib associé au tosédostat ou composé A avec l'intervalle de confiance à 95%. L'ensemble de ces expériences a été réalisé une fois (n=1) en utilisant des triplicats techniques. Les CC₅₀ ont été déterminées par le logiciel GraphPad Prism après une régression non linéaire à 4 paramètres.

La mesure de la puissance du tosédostat et du composé A dans la même expérience par l'association de plusieurs doses de ces composés avec une seule dose en carfilzomib, montre que le tosédostat et le composé A possèdent une puissance similaire (**Figure 113**). L'existence, dans la série chimique d'inhibiteurs d'IDE, de composés plus puissants que le composé A en termes de boost apoptotique du carfilzomib encourage le développement de ces molécules. L'induction de l'apoptose par le composé A à 15μM sur les cellules OPM2 alors que le tosédostat n'en n'induit pas pourrait faire penser à des mécanismes d'action différents.

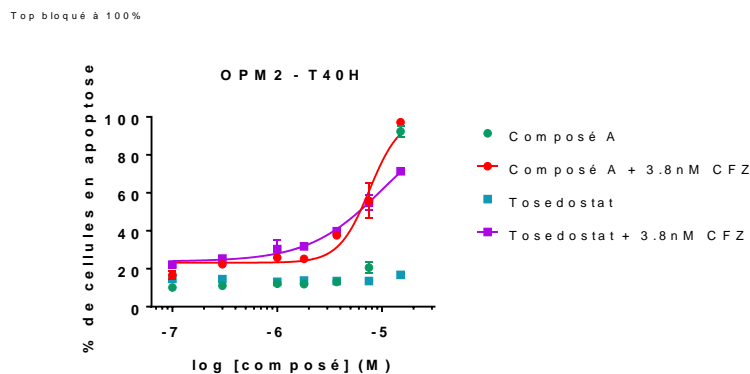


Figure 113 : Pourcentage de cellules OPM2 en apoptose après 40h de traitement avec des concentrations croissantes en tosédostat ou composé A associés à 3.8nM de carfilzomib. Les résultats montrent la moyenne et l'écart-type de triplicats techniques obtenus lors d'une expérience. Le graphique a été obtenu à l'aide du logiciel graphpad prism 7 par une régression non linéaire à 4 paramètres dont le plateau haut a été fixé à 100%.

4.1.4. Etude des cibles connues des composés

4.1.4.1. Mesure de l'inhibition enzymatique d'IDE par le tosédostat

Du fait de la présence d'un acide hydroxamique sur la molécule tosédostat, nous avons cherché à savoir si cette molécule pouvait être un inhibiteur de l'activité enzymatique d'IDE. La forme prodrogue du tosédostat a été testée sur l'activité enzymatique d'IDE sur le substrat ATTO. Il ne semblerait pas que cette forme du tosédostat soit un inhibiteur d'IDE (**Figure 114**). Cependant, il faudrait tester la forme acide active du tosédostat sur cette activité enzymatique.

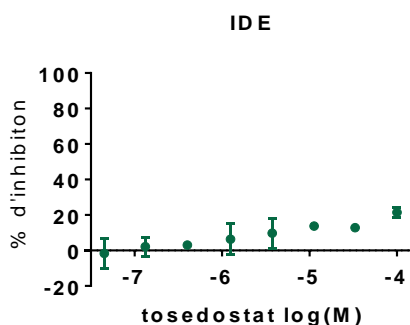


Figure 114 : Pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique d'IDE par des concentrations croissantes en tosédostat (CHR-2797) obtenu lors d'une expérience réalisée en duplicat.

4.1.4.2. Mesure de la liaison du tosédostat à IDE

L'absence d'inhibition de l'activité enzymatique d'IDE n'exclut cependant pas une éventuelle interaction du composé à cette protéine. En effet, les effets pharmacologiques d'un composé peuvent être associés à des modulations d'interactions protéines-protéines. On remarque que les expériences de CETSA réalisées dans les cellules vivantes OPM2 ne montrent pas de liaison du tosédostat (principalement la forme acide, active, intracellulaire) à IDE alors que le composé A à 15µM confirme sa liaison à cette protéine dans ces mêmes expériences ($\Delta T_{tag} = 6.81^\circ C$) (**Figure 115**).

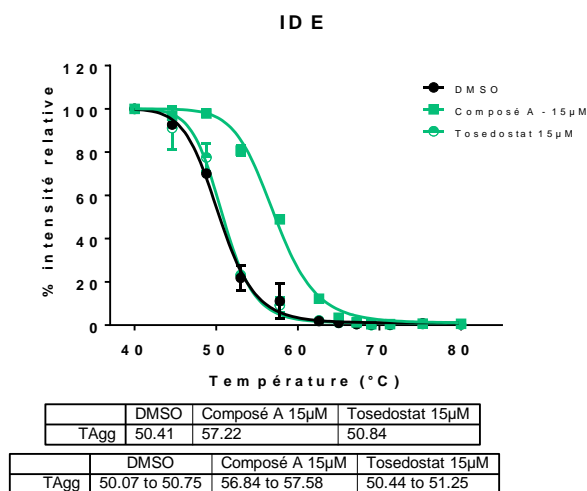


Figure 115 : CETSA réalisé sur les cellules OPM2 après 2h de traitement par le véhicule, le composé A à 15µM, ou le tosédostat à 15µM. Le graphique montre la moyenne et l'écart-type de deux expériences indépendantes en dot-blot réalisées chacune avec des répliquats techniques. La température d'agrégation de la protéine (TAgg) et l'intervalle de confiance à 95% de celle-ci sont également mentionnés.

4.1.4.3. Mesure de l'inhibition enzymatique d'aminopeptidases par les composés de la série chimique

L'activité enzymatique de différentes aminopeptidases a été mesurée en présence ou en absence de composés de la série chimique. Le **tableau 53** présente les différentes sélectivités des composés vis-à-vis de ces aminopeptidases.

IC ₅₀ (nM)	Données expérimentales			
	CHR-2797	BDM_44768	composé A	composé C
PuSA	34 ²	16500 ²	NC ²	21500 ²
LTA4H	>100000 ²	>100000 ²	>100000 ²	>100000 ²
APN	275 ¹	241 ¹	309 ¹	3592 ¹
ERAP-1	17615 ¹	6493 ¹	2803 ¹	22255 ¹
APB	>100000 ²	>100000 ²	>100000 ²	>100000 ²
MetAP2	>30000 ²	>30000 ²	>30000 ²	>30000 ²
IRAP	618 ¹	1086 ¹	1248 ¹	1876 ¹
ERAP-2	770 ¹	11094 ¹	>100000 ¹	>100000 ¹

Tableau 53 : IC₅₀ (nM) de différents composés sur différentes aminopeptidases. ¹ Résultats obtenus lors d'une seule expérience et ² la moyenne de deux expériences indépendantes. NC : non calculé.

Ainsi, ces données montrent une inhibition d'APN et d'IRAP *in vitro* par les composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE avec une IC₅₀ inférieure ou de l'ordre de la micromolaire. Le tosédostat est également un inhibiteur de l'aminopeptidase LAP3, qui n'a pas été évaluée pendant ce travail de thèse.

4.1.4.4. Mesure de la liaison des composés de la série chimique aux aminopeptidases

Tout comme précisé pour IDE, la mesure de l'activité enzymatique *in vitro* ne corrèle pas forcément à la liaison du composé à la cible *in cellulo*. Ainsi, l'étude de la liaison des composés à certaines aminopeptidases a été réalisée par CETSA.

On remarque que les composés de la série chimique, composé A et composé C, ne se lient pas à ces aminopeptidases (MetAP-2, AP-B, PuSA, LTA4H), dans les conditions testées du fait du chevauchement des intervalles de confiance à 95% du TAgg, en cohérence de ce fait avec les résultats enzymatiques (**Figure 116**). Le tosedostat décale la courbe d'agrégation de LT4AH ($\Delta T_{agg} = 11.91^{\circ}\text{C}$), en cohérence avec l'inhibition de l'activité enzymatique de cette enzyme, de l'ordre du nanomolaire, par sa forme active (402). Le tosedostat semble également décaler la courbe d'agrégation de PuSA ($\Delta T_{agg} = 2.05^{\circ}\text{C}$) avec des intervalles de confiance à 95% du TAgg qui ne se chevauchent pas, en cohérence également avec son activité enzymatique de sa forme active décrite dans la littérature. La courbe d'agrégation d'APN a été réalisée mais celle-ci ne semble pas suivre une courbe d'agrégation habituelle. Comme APN est une protéine membranaire, l'extraction protéique par plusieurs cycles de congélation-décongélation n'était peut-être pas la méthode la plus adaptée, une extraction protéique en présence de détergeant NP-40 a donc été réalisée (492). Cependant, cela n'a pas montré d'améliorations. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à la liaison des composés à APN par la technique de CETSA.

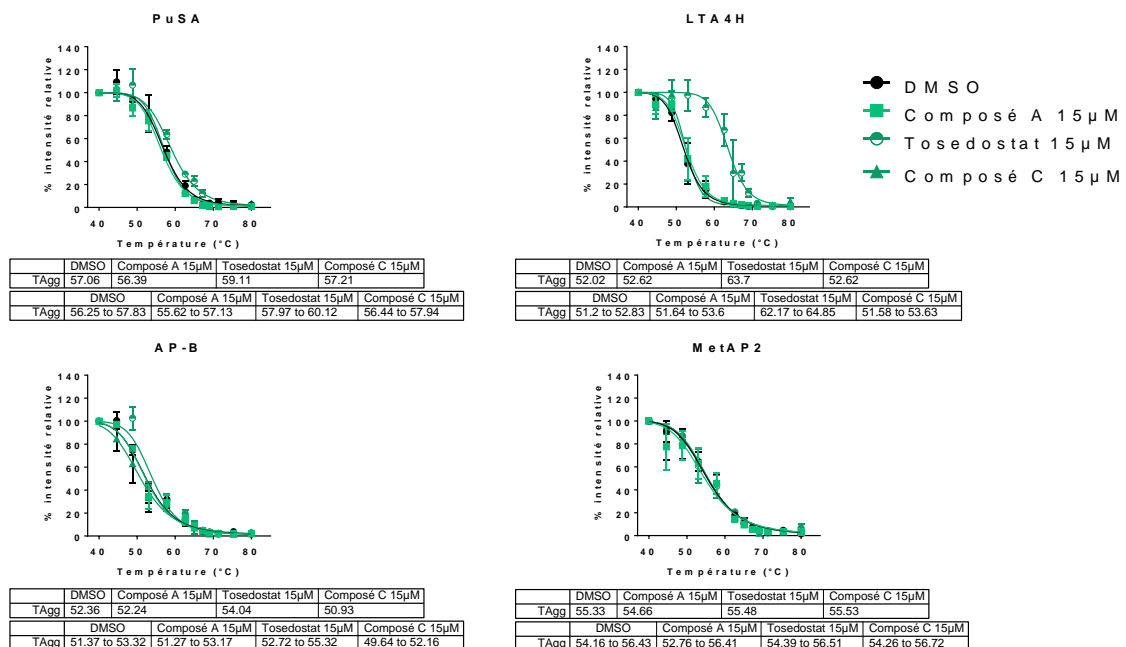


Figure 116 : CETSA réalisé sur les cellules OPM2 après 2h de traitement par le véhicule, le composé A à 15µM, le composé C à 15µM ou le tosedostat à 15µM. Le graphique montre la moyenne et le SEM de deux expériences indépendantes en dot-blot réalisées en répliquats techniques, la température d'agrégation de la protéine (TAgg) et l'intervalle de confiance à 95% de celle-ci.

4.1.4.5. Quantification de peptides intracellulaires

Par son mécanisme d'action le tosédostat induit l'accumulation de di et tri peptides intracellulaires détectables en spectrométrie de masse (402). Une étude de l'accumulation de di et tri peptides (RM / SLS / PEP / PIL) a été réalisée sur les cellules OPM2 traitées pendant 24h avec différentes conditions. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 54**.

	C _{estimée} (nM)			
	PIL	RM	PEP	SLS
DMSO	ns	ns	ns	nd
composé A 7,5µM	ns	ns	ns	nd
composé A 15µM	ns	ns	ns	nd
Tosédostat 7,5µM	181	14	199	2.2
Tosédostat 15µM	191	18	228	2.1
CFZ 5nM	nd	ns	ns	nd
CFZ 5nM_composé A 7,5µM	nd	ns	ns	nd
CFZ 5nM_composé A 15µM	ns	ns	ns	nd

Tableau 54 : Concentration estimée en nM des différents peptides en fonction des différentes conditions de traitements dans les cellules OPM2. nd = non détectable, ns = non significatif (<2nM).

On remarque que le composé A n'accumule pas ces di et tri-peptides à l'inverse du tosédostat. Cette expérience appuie un mécanisme d'action divergent entre ces deux molécules. Le choix de ces di et tri peptides a été réalisé sur les observations du tosédostat mais également sur les propriétés de ces acides aminés, qui permettent une certaine diversité. L'arginine R est un acide aminé dont la chaîne latérale est chargée positivement, l'acide glutamique E chargé négativement, la sérine S non chargée, la leucine L, l'isoleucine I et la méthionine M sont des acides aminés avec une chaîne latérale hydrophobe, et la proline P qui est un acide aminé aromatique avec une amine secondaire.

Les résultats de cette expérience n'excluent cependant pas que le composé A puisse induire l'accumulation de d'autres di et/ou tri-peptides.

4.2. Etude de l'expression de protéines pouvant être impliquées dans une réponse AAR et/ou UPR

4.2.1. Les aminopeptidases

L'analyse transcriptomique RNAseq a mis en évidence des voies de signalisation liées au métabolisme des acides aminés et une ressemblance transcriptomique avec le tosédostat. Une analyse de l'expression protéique d'aminopeptidases a été réalisée sur les cellules OPM2 et sur les cellules HeLa après 24h de traitement. On constate que les combinaisons du carfilzomib et du BDM_44768 sur les cellules OPM2, et du composé A sur les cellules HeLa, après 24h de traitement, diminuent l'expression de l'aminopeptidase B (**Figure 117**). Le traitement par le carfilzomib seul montre également une tendance à la diminution de l'expression de cette aminopeptidase.

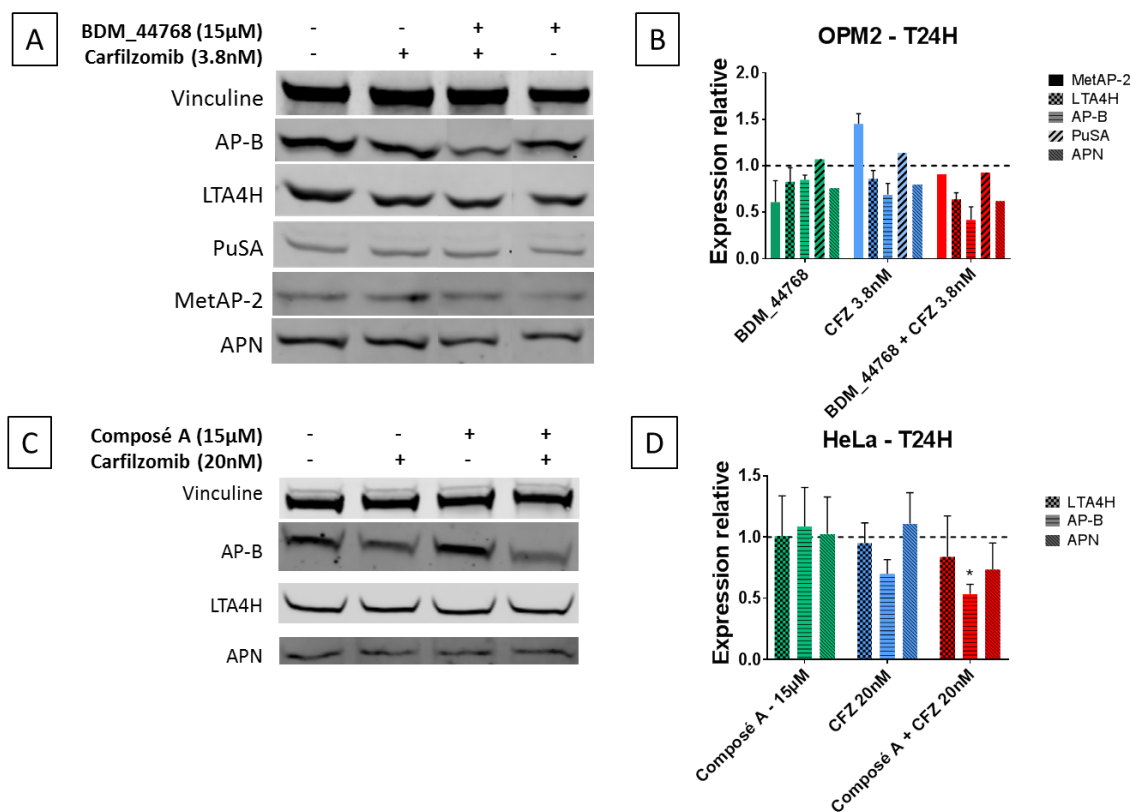


Figure 117 : A et B. Quantification du niveau d'expression protéique d'aminopeptidases dans les cellules OPM2 traitées pendant 24h avec du DMSO, du BDM_44768 à 15µM, du carfilzomib à 3.8nM ou la combinaison des deux. A. Les images de Western-Blot sont représentatives d'une expérience. B. La quantification du niveau d'expression normalisé par la Vinculine par rapport à la condition véhicule montre la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en duplicat. **C et D.** Quantification du niveau d'expression protéique d'aminopeptidases dans les cellules HeLa traitées pendant 24h avec du DMSO, du composé A à 15µM, du carfilzomib à 20nM ou la combinaison des deux. C. Les images de Western-Blot sont représentatives de trois expériences indépendantes. D. La quantification du niveau d'expression normalisé par la vinculine par rapport à la condition véhicule montre la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes. La significativité a été calculée avec le logiciel graphpad prism 7 par une ANOVA à 2 voies suivie d'un post-test Tukey.

4.2.2. Des protéines de la réponse intégrée au stress

Une étude de l'expression protéique d'eIF2α totale et de sa phosphorylation a été réalisée sur les cellules HeLa aux mêmes temps de cinétique explorés lors du RNAseq. Cette protéine est centrale à la réponse intégrée au stress (ISR).

On constate que le composé A ne module pas significativement le ratio eIF2α-P/eIF2α malgré une tendance à l'augmentation après 24h de traitement. Le carfilzomib ne module pas non plus de manière significative ce ratio malgré également une tendance à l'augmentation après 24h de traitement. En revanche, la combinaison du carfilzomib et du composé A augmente ce ratio de manière significative ($p < 0.01$) après 24h de traitement (**Figure 118**). De ce fait nous pouvons émettre l'hypothèse qu'après 24h de traitement par la combinaison la synthèse protéique globale est arrêtée du fait qu'eIF2α soit phosphorylée.

ATF4 est un facteur de transcription de l'ISR dont la traduction se réalise lors de la phosphorylation d'eIF2α. On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression d'ATF4 aux deux temps de cinétiques étudiés malgré une tendance à l'augmentation. Le carfilzomib induit significativement son expression après 8h de

traitement uniquement ($p < 0.001$). La combinaison du carfilzomib et du composé A induit de manière significative l'expression de ce facteur de transcription aux deux temps de cinétique ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul après 24h de traitement ($p < 0.001$) (**Figure 118**). Cette observation corrèle avec l'étude transcriptomique où ATF4 serait un facteur de transcription impliqué dans la réponse au traitement par la combinaison, ainsi qu'au traitement par le composé A seul. Cependant, l'augmentation de l'expression d'ATF4 ne corrèle pas avec le taux de phosphorylation d'eIF2 α , qui n'est augmenté qu'à 24h de traitement par la combinaison. Ainsi, une perspective de travail serait l'étude de la phosphorylation d'eIF2 α à des temps plus courts que T8H dans le but de savoir si cette phosphorylation est nécessaire pour l'augmentation de l'expression protéique d'ATF4.

CHOP est un facteur de transcription associé le plus majoritairement à la mort cellulaire. On constate que le composé A ne module pas significativement son expression aux deux temps de cinétique étudiés. Le carfilzomib ne module pas non plus l'expression de cette protéine. En revanche, la combinaison induit de manière significative son expression après 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul ($p < 0.001$) (**Figure 118**). Cette observation est donc cohérente avec l'augmentation de la transcription du gène codant pour CHOP après 8h et 24h de traitement par la combinaison (**cf. partie 3.2.4.1 des résultats**).

Enfin, l'étude de la phosphorylation d'IRE1 a été réalisée dans le but de connaître l'état d'activation de cette branche de l'UPR. On constate que le composé A ne module pas significativement ce ratio IRE1-P/IRE1. Le carfilzomib ne module pas non plus significativement l'expression de cette protéine et son état de phosphorylation. De plus, la combinaison ne module pas non plus de manière significative ce ratio, malgré une tendance à l'augmentation après 8h de traitement (**Figure 118**). Ainsi, il se pourrait que cette branche de l'UPR soit activée assez précocement (dans les 8 premières heures) par la combinaison, notamment car une forte augmentation de la transcription d'XBP1 a été observée par la combinaison après 8h de traitement (**cf. partie 3.2.4.3 des résultats**). Il serait intéressant d'approfondir cette observation par l'étude de ce ratio à des temps plus courts.

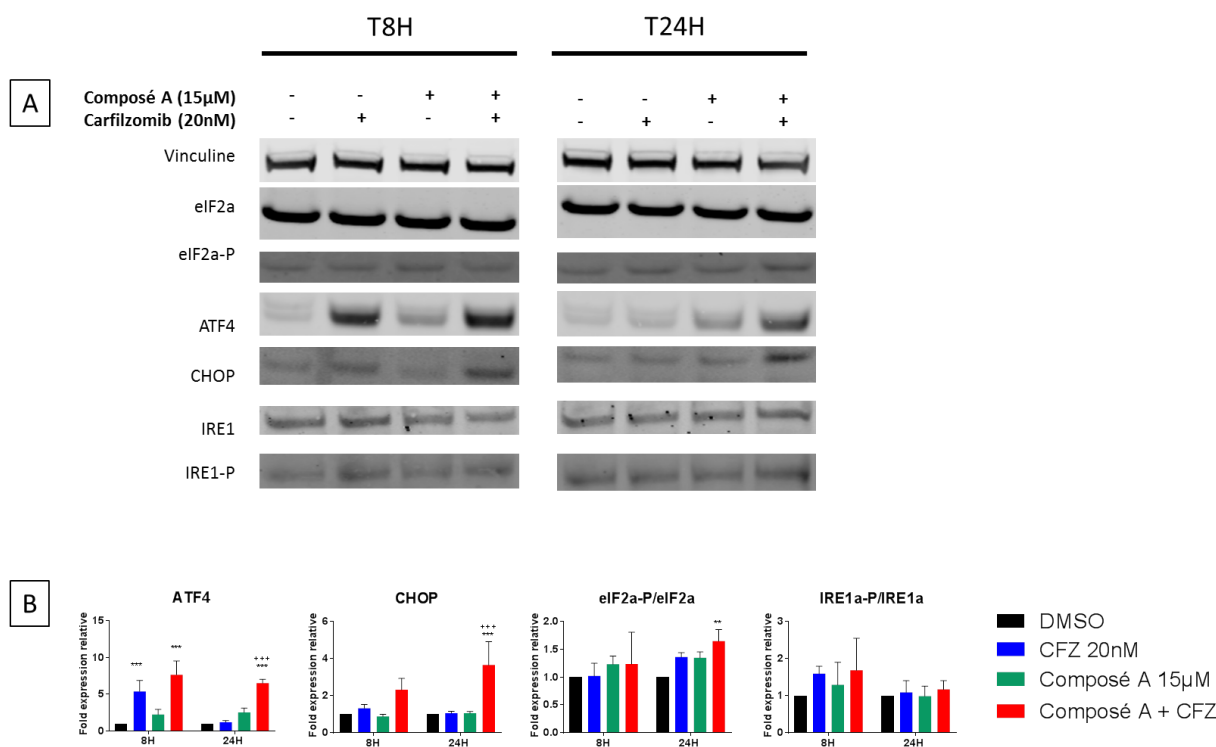


Figure 118 : A et B. Quantification du niveau d'expression protéique de protéines impliquées dans les voies AAR et UPR dans les cellules HeLa traitées pendant 8h et 24h avec du DMSO, du composé A à 15µM, du carfilzomib à 20nM ou la combinaison des deux. A. Les images de western-blot sont représentatives de trois expériences indépendantes. B. La quantification du niveau d'expression normalisé par la vinculine par rapport à la condition véhicule montre la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes. La significativité a été calculée avec le logiciel graphpad prism 7 par une ANOVA à 2 voies suivie d'un post-test Tukey.

Pour conclure, l'étude de l'expression protéique de certaines protéines impliquées dans l'ISR confirme le rôle central d'ATF4, détecté par l'étude transcriptomique, dans la réponse induite par la combinaison et appuie une induction de l'UPR et/ou de l'AAR par la combinaison. Il serait ainsi intéressant de savoir par quelle(s) kinase(s) eIF2α est phosphorylée, PERK et/ou GCN2 et/ou HRI et/ou PKR, afin d'émettre des hypothèses sur le type de stress généré.

4.2.3. Des protéines de l'autophagie

Une étude de l'expression de protéines impliquées dans l'autophagie comme p62 et LC3-I, LC3-II a été réalisée. Cette étude fait suite à l'étude transcriptomique sur les HeLa, où des gènes impliqués dans cette voie de dégradation ont été modulés par la combinaison, mais également au phénotype de boost des agrésomes avec la combinaison.

L'étude du niveau d'expression de p62 dans les OPM2 converge vers une augmentation de son expression après 16h et 24h de traitement par la combinaison (BDM_44768 à 15µM + carfilzomib à 3.8nM) et le carfilzomib à 3.8nM. Ce niveau d'expression semble plus important par la combinaison (2,4 fois plus à 24h) que par le carfilzomib seul (1,7 fois plus) (**Figure 119**).

Aussi, l'étude de l'expression de p62 a été réalisée dans les cellules HeLa aux mêmes temps de cinétique que l'étude RNAseq. On constate que le composé A induit significativement après 24h de traitement l'expression de p62 ($p < 0.05$). Le carfilzomib ne module pas significativement l'expression de cette protéine aux deux temps de cinétiques étudiés. La combinaison du carfilzomib et du composé A induit significativement son expression après 24h de traitement ($p < 0.001$) (**Figure 119**).

Ces résultats sont en cohérence avec les résultats obtenus par la combinaison d'un autre analogue, le BDM_44768, associé au carfilzomib dans les cellules OPM2. Ainsi, l'augmentation de l'expression de p62 pourrait être ainsi due à une augmentation de sa transcription, observée par RNAseq, et de sa traduction lors du traitement par la combinaison, ou à une inhibition de sa dégradation qui se fait notamment par autophagie.

Le ratio LC3II/LC3I est utilisé pour apprécier l'induction autophagique dans une cellule. LC3-II est couplée de manière covalente à la phosphatidyléthanolamine associée à l'autophagosome. LC3-II permet le recrutement d'effecteurs comme p62 pour la capture des substrats à éliminer. On constate que le composé A ne module pas significativement l'expression de ces protéines, ni du ratio LC3II/LC3I. Le carfilzomib seul induit significativement l'expression de LC3-I ($p < 0.001$) après 24h de traitement et a tendance à augmenter l'expression de LC3-II à ce même temps de cinétique. Ainsi le ratio LC3II/LC3I n'est pas modulé de manière significative par le carfilzomib aux deux temps de cinétiques étudiés. La combinaison du carfilzomib et du composé A induit significativement l'expression de LC3-I et de LC3-II après 24h de traitement ($p < 0.001$) et cela est significativement différent du carfilzomib seul. Cependant, le ratio LC3II/LC3I n'est alors pas modulé de manière significative par la combinaison (**Figure 119**).

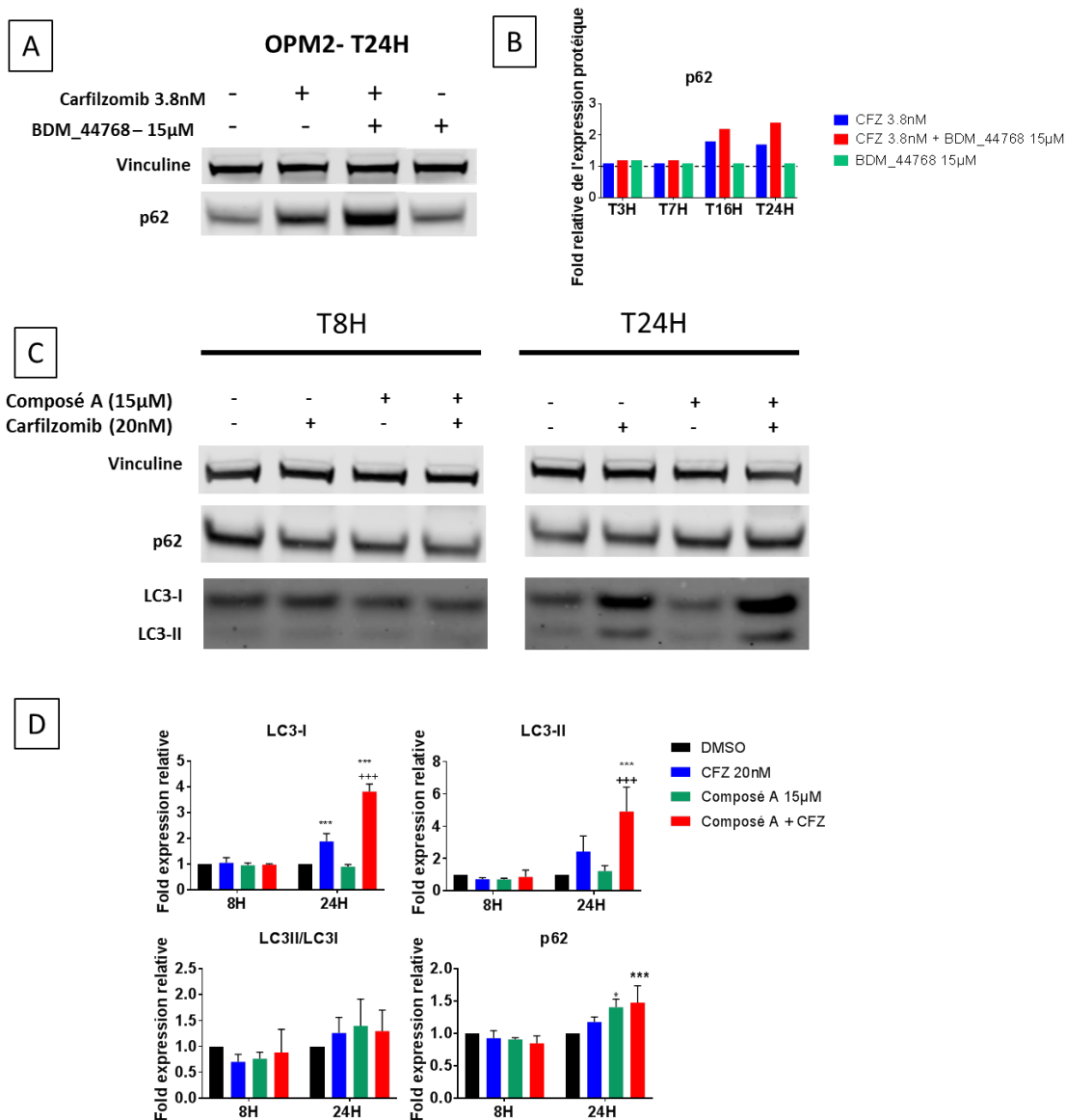


Figure 119 : A et B. Quantification du niveau d'expression protéique de p62 dans les cellules OPM2 traitées pendant 24h avec du DMSO, du BDM_44768 à 15µM, du carfilzomib à 3.8nM ou la combinaison des deux. A. Les images de Western-Blot sont représentatives d'une expérience. B. Quantification du niveau d'expression normalisé par la vinculine par rapport à la condition véhicule. C et D. Quantification du niveau d'expression protéique de protéines impliquées dans l'autophagie dans les cellules HeLa traitées pendant 8h et 24h avec du DMSO, du composé A à 15µM, du carfilzomib à 20nM ou la combinaison des deux. C. Les images de western-blot sont représentatives de trois expériences indépendantes. D. La quantification du niveau d'expression normalisé par la vinculine par rapport à la condition véhicule montre la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes. La significativité a été calculée avec le logiciel graphpad prism 7 par une ANOVA à 2 voies suivie d'un post-test Tukey.

Pour conclure, cette étude montre que l'induction de p62, de LC3-I et de LC3-II par la combinaison, sans impacter le ratio, converge vers une modulation de l'autophagie. Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur le fait qu'il y ait une induction de l'autophagie ou si le flux autophagique est bloqué (493). De plus, l'augmentation des agrésomes, observée lors de la combinaison, serait cohérente avec une modulation de l'autophagie, qui est la voie de dégradation de ces agrésomes. Un approfondissement de ces résultats, par une étude en microscopie des autophagosomes marqués par exemple, pour suivre les différentes étapes de l'autophagie (induction, autophagosome et autolysosomes),

permettrait de faire ainsi la distinction entre une induction de l'autophagie ou un blocage de la maturation des autophagosomes en autolysosomes.

4.3. Synthèse des protéines

La synthèse protéique peut être suivie et appréciée par l'incorporation d'acides aminés marqués avec un isotope stable mais cela nécessite des équipements particuliers. Nous avons utilisé le kit *Click-iT® HPG Alexa Fluor® Protein Synthesis Assay* de Lifes technologies pour apprécier la synthèse protéique. La L-homopropargylglycine (HPG), analogue de la méthionine fournie dans cet essai, est incorporée dans les protéines nouvellement synthétisées (**Figure 120**). Après fixation et perméabilisation des cellules, une réaction chimique de click entre l'alcyne de cet analogue de la méthionine, avec un azide couplé à un Alexa Fluor® 594 permet la détection de ces protéines synthétisées.

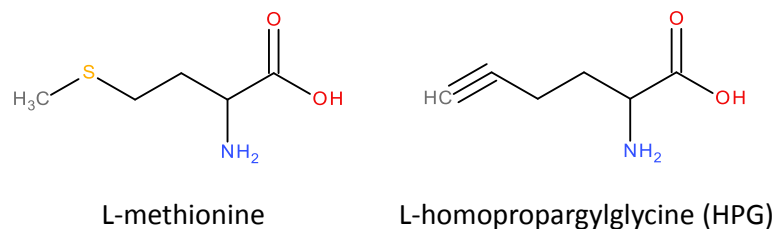


Figure 120 : Structure d'HPG (L-homopropargylglycine) est un analogue de la méthionine.

On constate que le composé A seul diminue très légèrement l'intensité du marquage protéique dans les cellules HeLa traitées pendant 24h. Le tosédostat n'a pas modifié l'intensité de ce marquage dans les cellules, alors que l'on aurait pu s'attendre à une diminution de celui-ci du fait de son mécanisme d'action. La cycloheximide, agent inhibant la synthèse protéique a diminué de manière importante ce marquage dans les cellules. Le carfilzomib seul diminue de manière dose dépendante ce marquage protéique. La combinaison du composé A au carfilzomib diminue davantage l'incorporation de l'HPG dans les protéines nouvellement synthétisées (**Figure 121**).

De ce fait, dans les conditions expérimentales testées, la diminution dose dépendante du marquage dans les cellules de l'analogue de la méthionine par le carfilzomib est en cohérence avec une diminution de la synthèse protéique, qui peut se comprendre par le stress généré par le mécanisme d'action de cette molécule. Cependant, cela n'est pas en accord avec l'observation faite par le fournisseur, où une augmentation de l'intensité du marquage est observée lors de l'ajout du bortezomib, et justifiée par l'accumulation des protéines synthétisées due à une inhibition de la dégradation par le protéasome. L'ajout du composé A au carfilzomib diminue plus fortement la synthèse protéique que le carfilzomib seul, ce qui est en cohérence avec l'induction de la phosphorylation d'eIF2α observé après 24h de traitement par la combinaison.

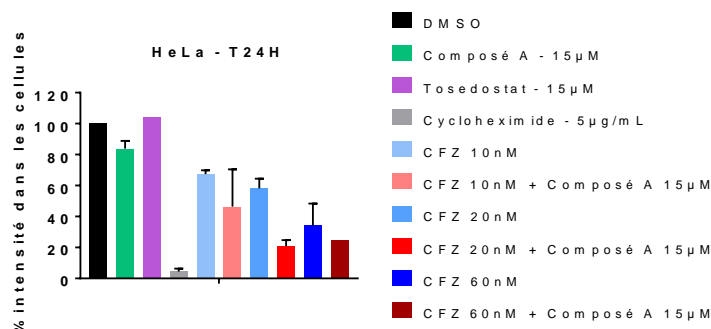


Figure 121 : Les cellules HeLa ont étéensemencées pendant 24h puis lavées au PBS et traitées avec les composés aux doses souhaitées. Du milieu de culture contenant 50µM d’HPG dans du milieu de culture sans méthionine supplémenté par 4mM de Glutamax, 200µM de cystéine, 1mM de sodium pyruvate, 10% de SVF et 1% de pénicilline/streptomycine a été ajouté. Après 24h de traitement dans le milieu contenant l’HPG les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées par l’Alexa Fluor® 594 pour l’HPG et par un marquage du noyau. Le graphique présente le pourcentage moyen de l’intensité de l’Alexa Fluor 594® dans les cellules par rapport à la condition contrôle DMSO obtenu dans deux expériences indépendantes réalisées chacune en 5 réplicats (excepté la condition CFZ 60nM + Composé A 15µM et Tosédostat réalisées lors d’une expérience).

Pour approfondir ces résultats, une étude du composé A et des autres analogues de la série chimique en dose réponse permettrait de savoir si cette observation préliminaire de la diminution de l’intensité du marquage par le composé seul se confirme. De plus, l’étude d’un autre inhibiteur du protéasome comme le bortezomib permettrait peut-être de confirmer le phénotype décrit par le fournisseur, c’est-à-dire une augmentation de l’intensité du marquage par l’ajout du bortezomib.

5. Etude de l’implication d’IDE dans les différents phénotypes

Les composés de la série chimique étudiée sont des inhibiteurs d’IDE dont l’inhibition enzymatique et l’engagement physiologique (*in cellulo et in vivo*) ont été démontrés. Nous avons voulu explorer l’implication de cette protéine dans nos différents phénotypes (boost apoptotique, des agrésomes et de l’activité chymotrypsine du protéasome).

5.1. Développement d’un outil cellulaire pour l’étude de l’implication du site catalytique d’IDE dans le phénotype de boost apoptotique

Nous avons tenté de modifier génétiquement des cellules, par la technique CRISPR-Cas9, afin qu’elles expriment une protéine IDE avec un site catalytique non fonctionnel. Cet outil cellulaire avait pour but de connaître l’implication de ce site dans l’effet booster de l’apoptose d’agents anticancéreux par les composés de la série chimique, et ainsi distinguer l’implication de substrats ou l’implication d’interactions protéines-protéines. Nous avons fait le choix de réaliser cet outil cellulaire sur les cellules OPM2 pour la pertinence par rapport au modèle thérapeutique d’intérêt. Différents mutants d’IDE avec une activité catalytique inhibée ont été décrits dans la littérature (318,320,322,351,494,495). Nous avons choisi de réaliser la mutation ponctuelle E111Q, qui inhibe la dégradation de l’insuline sans inhiber sa liaison (318,320,322), car il se pourrait que le BDM_44768 puisse encore se lier à ce mutant d’IDE (ΔT_{agg} de 1,44°C mais un chevauchement des intervalles de confiance à 95% des T_{agg}), plutôt qu’à un autre mutant E111D (ΔT_{agg} de 0,44°C), testés dans des expériences de CETSA dans des MEFs IDE KO transfectées avec ceux-ci (**Figure 122**).

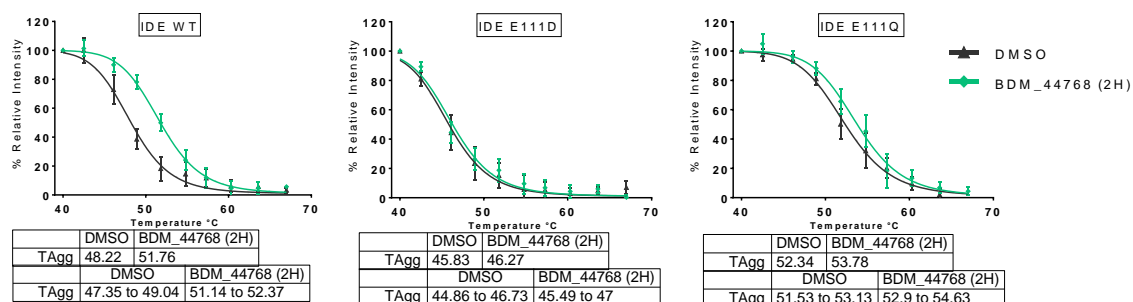


Figure 122 : CETSA réalisé sur les cellules MEFs IDE KO préalablement transfectées avec un plasmide codant pour IDE WT, IDE E111D ou IDE E111Q. Les cellules ont été ensuite traitées pendant 2h par le véhicule DMSO ou le BDM_44768 à 30µM. Le graphique montre la moyenne et le SEM de trois expériences indépendantes en dot-blot réalisées chacune avec des répliquats techniques. La température d'agrégation de la protéine (TAgg) et l'intervalle de confiance à 95% de celle-ci sont également mentionnés.

Nous avons ensuite réalisé plusieurs vecteurs CRISPR-Cas9, avec différents ARNg et différentes Cas9, la SpCas9 et la HypaCas9, un mutant plus fidèle de la SpCas9, afin de sélectionner une ou deux constructions capables de donner des mutants positifs sur un pool de cellules transfectées (496). Cependant, après le passage en cytométrie en flux pour l'isolement des cellules transfectées avec les constructions d'intérêt, seulement 5 clones ont été obtenus sur les 4224 cellules porteuses du vecteur et isolées en plaque 96 puits. Le taux de réussite a donc été diminué par 10 par rapport au nombre de clones obtenus avec l'isolement de cellules saines. L'ensemble de ces clones n'ont malheureusement pas présenté la mutation d'intérêt. Nous avons donc arrêté le développement de cet outil cellulaire.

5.2. Etude de différents phénotypes sur les MEFs IDE KO

5.2.1. Phénotype apoptotique

Plusieurs expériences de suivi de l'apoptose dans les MEFs IDE KO et MEFs WT ont été réalisées. L'absence d'expression d'IDE dans les MEFs IDE KO a été confirmée par Western-Blot et RT-qPCR.

Les différentes expériences de suivi de l'apoptose montrent que le BDM_44768 (ratio CC₅₀ de 1,44 dans les MEFs IDE KO et ratio CC₅₀ de 1,65 dans les MEFs WT traitées pendant 48h) ou le composé A (ratio de CC₅₀ de 1,54 dans les MEFs IDE KO et ratio de CC₅₀ de 1,97 dans les MEFs WT traitées pendant 72h) seraient toujours capables de booster la toxicité induite par le carfilzomib malgré l'absence d'IDE (**Figure 123** et **Tableau 55**). Il n'est cependant pas possible de conclure quant à la sensibilisation des cellules MEFs KO à la toxicité induite par le carfilzomib. En effet, les MEFs IDE KO et les MEFs WT n'ont pas toujours répondu de la même façon selon les expériences. Cela pourrait s'expliquer par les différences de passages de ces cellules entre les expériences. Il est important de rappeler que dans des cellules KO d'une protéine il y a une adaptation de celles-ci à l'absence totale de cette protéine. Les résultats de ces expériences sur ce phénotype de boost apoptotique convergent vers un effet IDE-indépendant ou partiellement dépendant des composés boosters de l'apoptose en association avec le carfilzomib.

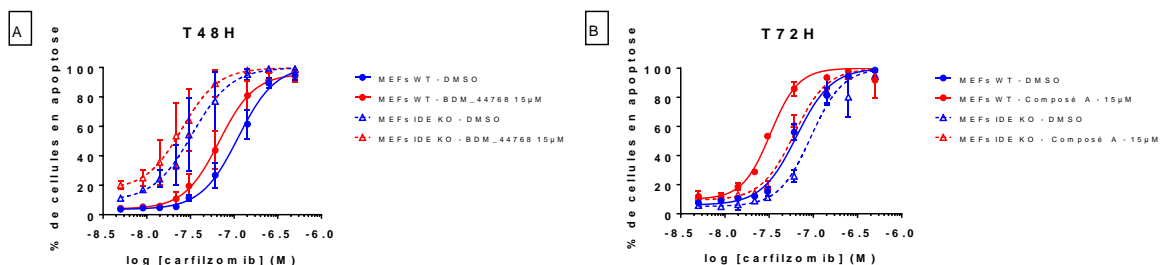


Figure 123 : A. Pourcentage de cellules MEFs WT et MEFs IDE KO en apoptose après 48h (A) ou 72h (B) de traitement avec des concentrations croissantes en carfilzomib seul ou en association avec 15µM de BDM_44768 (A) ou de composé A (B). A. Les résultats montrent la moyenne et le SEM de deux expériences indépendantes réalisées chacune en triplicats techniques. B. Les résultats montrent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats techniques.

Composé	Lignée cellulaire	CC ₅₀ CFZ (nM)	CC ₅₀ CFZ + BDM (nM)	Ratio des CC ₅₀
BDM_44768 (15µM)	MEFs WT	111.3 [89.03 à 143.6]	67.59 [52.36 à 90.81]	1.65
	MEFs KO IDE	33.34 [23.84 à 56.5]	23.1 [16.17 à 38.75]	1.44
composé A (15µM)	MEFs WT	64.44 [58.84 à 70.76]	32.72 [29.79 à 36.11]	1.97
	MEFs KO IDE	93.5 [80.61 à 108.2]	60.7 [54.85 à 67.55]	1.54

Tableau 55 : Concentration cytotoxique 50 (CC₅₀) du carfilzomib seul et du carfilzomib associé au BDM_44768 ou au composé A à 15µM dans les cellules MEFs WT et MEFs IDE KO. Les résultats avec le BDM_44768 ont été obtenus après 48h de traitement lors de deux expériences indépendantes. Les résultats avec le composé A ont été obtenus après 72h de traitement lors d'une seule expérience réalisée avec des triplicats techniques. Les CC₅₀ et les intervalles de confiance à 95% ont été déterminés par le logiciel GraphPad Prism après une régression non linéaire à 4 paramètres.

5.2.2. Activité chymotrypsine du protéasome

Deux expériences de mesure de l'activité chymotrypsine du protéasome ont été réalisées en présence du carfilzomib, seul ou en association avec 15µM du composé A pour l'une, ou du BDM_44768 pour l'autre. Dans ces expériences, le composé A et le BDM_44768 boostent l'inhibition du protéasome induite par le carfilzomib dans les MEFs IDE KO (ratio des IC₅₀ de 3,73 et de 2,12 pour le BDM_44768 et composé A respectivement) et les MEFs IDE WT (ratio IC₅₀ de 2,41 et de 1,87 pour le BDM_44768 et le composé A respectivement) (**Figure 124** et **Tableau 56**). Tout comme le phénotype apoptotique, il n'est pas possible de conclure quant à l'effet de l'absence d'IDE sur ce phénotype, car les cellules ont répondu différemment entre les deux expériences. Le composé A n'a pas présenté d'effet d'inhibition du protéasome seul dans cette expérience alors que le BDM_44768 en a présenté.

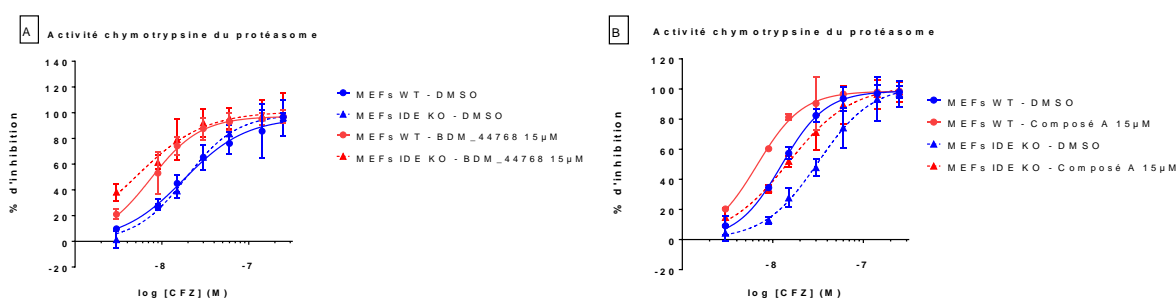


Figure 124 : Les cellules MEFs WT et MEFs IDE KO ont été traitées avec une gamme de concentration en carfilzomib associée ou non avec du BDM_44768 à 15µM (A) ou du composé A à 15µM (B) pendant 2h. Le pourcentage d'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome a été déterminé en normalisant par rapport à la condition DMSO. Les données représentent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicat.

Composé	Lignée cellulaire	IC ₅₀ CFZ (nM)	IC ₅₀ CFZ + BDM (nM)	Ratio des IC ₅₀
BDM_44768 (15µM)	MEFs WT	17.88 [11.56 à 51.97]	7.42 [5.03 à 10.71]	2.41
	MEFs KO IDE	18.93 [13.1 à 32.98]	5.07 [2.13 à 3.52]	3.73
composé A (15µM)	MEFs WT	12.46 [10.38 à 15.10]	6.67 [5.06 à 8.59]	1.87
	MEFs KO IDE	31.59 [20.7 à 87.05]	14.88 [9.90 à 31.1]	2.12

Tableau 56 : Concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) de l'activité chymotrypsine du protéasome par carfilzomib seul et par carfilzomib associé au BDM_44768 ou au composé A à 15µM dans les cellules MEFs WT et MEFs IDE KO. Les résultats ont été obtenus lors d'une expérience réalisée en triplicat. Les IC₅₀ ont été déterminées par le logiciel GraphPad Prism après une régression non linéaire à 4 paramètres.

Pour conclure, ces résultats sont en cohérence avec les résultats sur les cellules OPM2 où un boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome a été observé lors de l'association du composé A au carfilzomib. Ainsi, ce boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine en association avec le carfilzomib est présent sur d'autres lignées cellulaires que les OPM2 et ne semble pas être composé dépendant. Enfin, ces résultats convergent vers un effet IDE indépendant ou partiellement dépendant sur ce phénotype de boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome par les composés en association avec le carfilzomib.

5.3. Etude de la conséquence sur différents phénotypes du knock-down d'IDE à l'aide de siRNA

Des expériences de siRNA de la protéine IDE ont été réalisées dans les cellules HeLa afin d'approfondir les observations faites sur les MEFs IDE KO dans différents phénotypes (apoptose, agrésomes, activité chymotrypsine du protéasome). Le siRNA IDE utilisé (Dharmacon, référence 3416 – L-005899-00-0005) est un pool de 4 siRNA ciblant différentes séquences d'IDE (**Figure 125**). Des effets identiques entre un inhibiteur pharmacologique d'IDE et un siRNA d'IDE sont attendus.

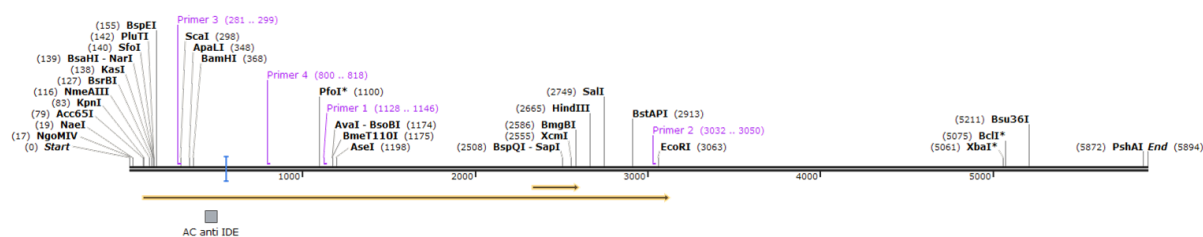


Figure 125 : ARNm d'IDE (isoforme 1 NM_004969.4) avec la flèche orange représentant la séquence codante pour la protéine IDE. Les primers (en violet) représentent les siRNA utilisés. L'anticorps anti-IDE (SC-393887) reconnaît un épitope situé entre les acides aminés 122-145 représenté par un carré gris.

5.3.1. Phénotype apoptotique

Nous remarquons que la diminution de l'expression d'IDE sensibilise légèrement les cellules au carfilzomib (CC₅₀ de 17.03nM et 12.73 nM avec le siRNA CTL et siRNA IDE respectivement). Les intervalles de confiance à 95% des CC₅₀ sont proches mais ne se chevauchent pas. Le ratio des CC₅₀, entre le carfilzomib et la combinaison du carfilzomib et

du composé A, est de 4.42 pour la condition siRNA CTL et de 4.26 pour la condition siRNA IDE. Ainsi, le boost apoptotique est toujours présent malgré la diminution de l'expression d'IDE par le siRNA de plus de 95% (Figure 126 et Tableau 57). Aussi, ce boost apoptotique a été également observé avec le BDM_44768 (données non présentées) sur les cellules HeLa transfectées avec le siRNA IDE.

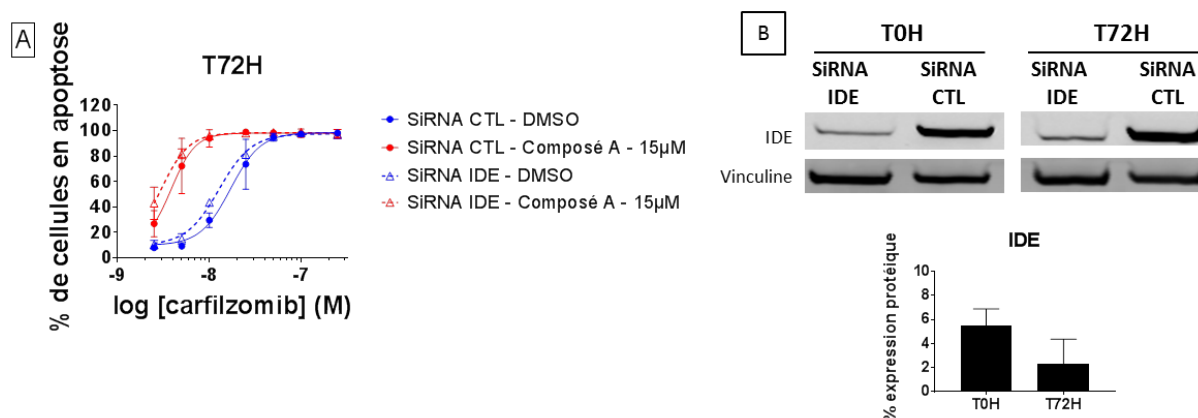


Figure 126 : Les cellules HeLa ont été transfectées avec 50nM de siRNA IDE ou de siRNA contrôle (CTL) pendant 48h. A. Les cellules transfectées ont été traitées avec différentes concentrations en carfilzomib et en composé A pendant 72h. Le pourcentage de cellules en apoptose a été déterminé par analyse d'images du marquage NucView™488 après 72h de traitement. Les données représentent la moyenne et l'écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées chacune en duplicats. La CC_{50} et l'intervalle de confiance à 95% (IC 95%) de cette valeur ont été calculés par GraphPad Prism 7 à la suite d'une régression non linéaire à 4 paramètres bloquée en bas par le pourcentage de cellules en apoptose obtenu avec la condition DMSO (10%). B. Le niveau d'expression d'IDE normalisé par rapport à la vinculine et relative à la condition siRNA CTL a été déterminé pour ces expériences par Western-Blot au moment où les cellules ont été traitées avec le carfilzomib et/ou le composé A (T0H) et au moment où le pourcentage de cellules en apoptose a été déterminé (T72H). Les données représentent la moyenne et l'écart-type de ces 3 expériences indépendantes. Les images sont représentatives de ces 3 expériences indépendantes.

SiRNA	CC_{50} CFZ (nM)	CC_{50} CFZ + composé A (nM)	Ratio des CC_{50}
SiRNA CTL	17.03 [14.26 à 20.17]	3.85 [3.32 à 4.43]	4.42
SiRNA IDE	12.73 [11.82 à 13.74]	2.99 [2.74 à 3.26]	4.26

Tableau 57 : Concentration cytotoxique 50 (CC_{50}) du carfilzomib seul et du carfilzomib associé au composé A à 15µM après 72h de traitement dans les cellules HeLa transfectées par un siRNA CTL ou un siRNA IDE. Les résultats ont été obtenus lors de 3 expériences indépendantes. Les CC_{50} ont été déterminées par le logiciel GraphPad Prism après une régression non linéaire à 4 paramètres.

L'observation de ce boost apoptotique en présence du siRNA IDE peut s'expliquer de plusieurs façons : (1) peut-être que la diminution de l'expression n'est pas assez forte (réduction de 98% de son expression à T72H) pour observer une plus forte augmentation de la sensibilité des cellules au carfilzomib et aussi à une réduction du boost apoptotique, mais cela n'est pas en accord avec la présence d'un boost apoptotique dans les cellules MEFs KO IDE ; (2) IDE n'est peut-être pas impliquée dans le phénotype apoptotique induit par nos composés ou partiellement ; (3) d'autres cibles peuvent compenser l'effet dû à l'absence d'IDE (Figure 127).

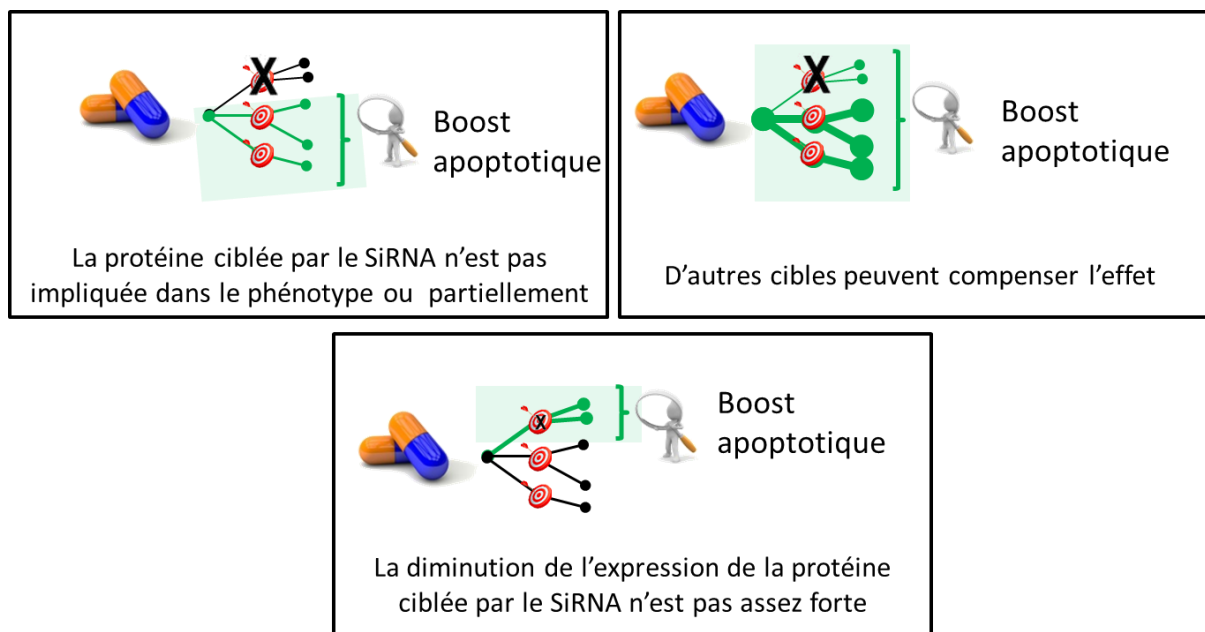


Figure 127 : Schéma présentant les hypothèses pour l'explication de l'observation d'un effet boost apoptotique du carfilzomib dans les cellules HeLa transfectées par un siRNA IDE.

5.3.2. Agrésomes

Concernant le phénotype de boost des agrésomes, dans cette expérience le boost est toujours présent malgré la diminution de l'expression d'IDE de plus de 98% au moment de la lecture de ce phénotype. En effet, une augmentation de 1,8 fois des agrésomes contre 1,9 fois a été observée lors de la combinaison du composé A à 15 μ M avec le carfilzomib à 10nM comparé au carfilzomib seul à 10nM avec le siRNA IDE et le siRNA CTL respectivement. Aussi, la diminution de l'expression d'IDE dans les cellules HeLa n'a pas impacté le pourcentage de cellules avec agrésomes dans cette expérience (37,7% pour le siRNA IDE et 44,6% pour le siRNA CTL) (**Figure 128**).

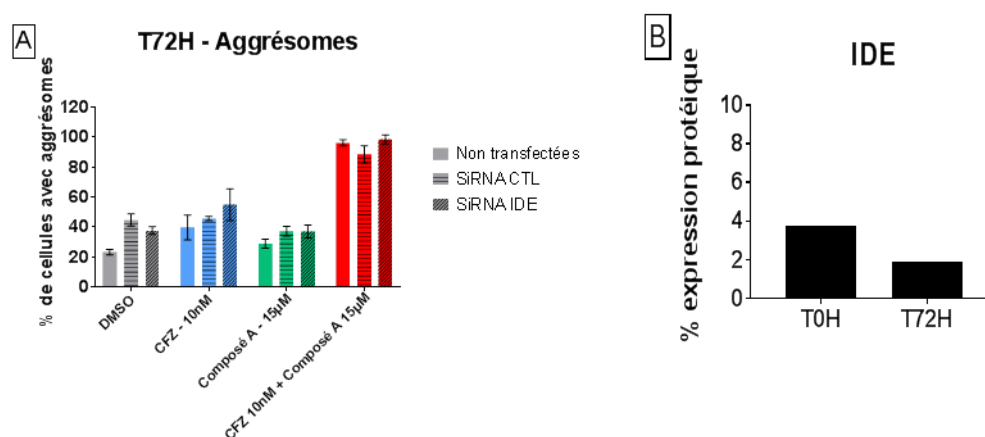


Figure 128 : Les cellules HeLa ont été transfectées avec 50nM de siRNA IDE ou de siRNA contrôle (CTL) pendant 48h. A. Les cellules transfectées ont été traitées avec du DMSO, du carfilzomib à 10nM, du composé A à 15 μ M ou l'association des deux pendant 72h. Le pourcentage de cellules avec agrésomes a été déterminé par analyse d'images du marquage Protéostat après 72h de traitement. Les données représentent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicats. B. Le niveau d'expression d'IDE normalisé par rapport à la vinculine et relative à la condition siRNA CTL a été déterminé pour cette expériences par western-blot au moment où les cellules ont été traitées avec le carfilzomib et/ou le composé A (T0H) et au moment où le pourcentage de cellules avec agrésome a été déterminé (T72H).

Pour conclure, il serait nécessaire de répéter l'expérience pour confirmer cette observation qui converge vers un effet indépendant d'IDE ou partiellement dépendant d'IDE.

5.3.3. Activité chymotrypsine du protéasome

Concernant le phénotype de boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome, celui-ci semble également être toujours présent malgré la diminution de l'expression d'IDE de plus de 93% au moment du traitement de ce phénotype d'observation courte (T2H) (**Figure 129**). En effet, une augmentation de 1,3 fois de l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome a été observée lors de la combinaison du composé A à 15 μ M avec le carfilzomib à 10nM comparé au carfilzomib à 10nM seul avec le SiRNA IDE et le SiRNA CTL lors de cette expérience.

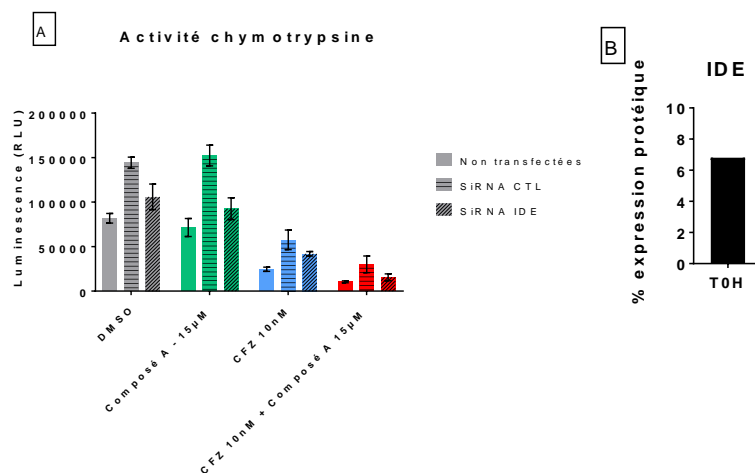


Figure 129 : Les cellules HeLa ont été transfectées avec 50nM de siRNA IDE ou de siRNA contrôle (CTL) pendant 48h. A. Les cellules transfectées ont été traitées avec du carfilzomib à 10nM, du composé A à 15 μ M et l'association des deux pendant 2h. Le pourcentage d'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome a été déterminé en normalisant par rapport à la condition DMSO. Les données représentent la moyenne et l'écart-type d'une expérience réalisée en triplicat. B. Le niveau d'expression d'IDE normalisé par rapport à la vinculine et relatif à la condition siRNA CTL a été déterminé pour cette expérience par western-blot au moment où les cellules ont été traitées (T0H) avec les différents composés.

Ce résultat préliminaire, qui convient de répéter, est en cohérence avec les observations réalisées sur les cellules MEFs IDE KO où un boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome par le BDM_44768 et le composé A était présent malgré l'absence totale d'IDE.

5.4. Composés boosters sans engagement d'IDE

Dans la série chimique des composés boosters certains ne se lient pas à IDE, comme le composé C, et pourtant ce dernier présente les mêmes caractéristiques phénotypiques (boost de l'apoptose du carfilzomib sur différentes lignées cellulaires, boost de la formation des agrésomes, induction d'ATF4 et de la phosphorylation d'eIF2 α lors de la combinaison avec le carfilzomib ...). La principale différenciation structurale entre ce composé et les autres composés de la série chimique, comme le composé A, le BDM_44768 et le composé

B, est le remplacement du triazole central par un oxadiazole. Les profils de sélectivités entre ces composés peuvent être différents mais le fait qu'ils présentent tous le même phénotype de boost apoptotique du carfilzomib, nous laisse penser qu'ils partageraient une ou plusieurs cibles communes responsables de cet effet. Il n'est pas exclu cependant que ces composés présentent le même phénotype par des cibles différentes, on serait alors face à un phénotype provokable par la modulation de plusieurs cibles (ce qui est un cas classique en pharmacologie).

6. Profilage thermique du protéome

Une expérience de TPP-TR (*Thermal Proteome Profiling- Temperature Range*) a été réalisée sur les cellules OPM2 avec le composé A en collaboration avec le Dr. Saliou, responsable de la plateforme protéomique et peptides modifiés au sein de l'Institut Pasteur de Lille. Cette expérience consiste en la réalisation d'une expérience CETSA basée sur le changement de stabilité thermique d'une protéine par un ligand, associée à la spectrométrie de masse quantitative pour la détection et la quantification du protéome entier de la cellule. Cette approche permet ainsi l'élucidation de cibles, et d'effecteurs d'une molécule chimique si celle-ci est réalisée sur cellules vivantes (379,380). L'objectif de cette expérience est donc d'éclaircir le mécanisme d'action des composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE. Cette méthode est complémentaire aux observations phénotypiques.

Ainsi, par la réalisation du protocole détaillé par l'équipe de Savitski et al. (379), 56 protéines présentant une significativité de la différence des températures d'agrégation ont été retrouvées (p_{adj} <5%). Le

tableau 58 présente les différents paramètres de ces protéines calculés par le logiciel TPP. L'**annexe 2** présente les courbes d'agrégation obtenues pour chaque protéine ainsi qu'une description de leurs fonctions par la base de données UniProt.

Protéine_ID	Nom de la protéine	ΔT_m (°C)	Pente min	pVal_adj
KRT80	Keratin, type II cytoskeletal 80	13.85	-0.27	1.81E-18
KLK7	Kallikrein-7	12.49	-0.26	3.04E-15
HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	9.24	-0.95	2.28E-08
PRPF4	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	8.93	-0.15	2.55E-16
DCTN4	Dynactin subunit 4	8.81	-0.19	1.37E-07
SERPINB5	Serpin B5	8.65	-0.28	2.50E-07
ETHE1	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	8.41	-0.26	4.70E-07
DPP3	Dipeptidyl peptidase 3	7.90	-0.15	8.60E-13
ARF1	ADP-ribosylation factor 1	7.72	-0.14	2.96E-12
NCAPD3	Condensin-2 complex subunit D3	7.59	-0.16	7.02E-12
PSMD5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	7.57	-0.12	1.35E-04
ZNF22	Zinc finger protein 22	7.35	-0.27	2.26E-05
ATP6V1D	V-type proton ATPase subunit D	7.29	-0.07	1.75E-03
SRRM1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	6.97	-0.13	7.00E-10
LAP3	Leucine aminopeptidase 3	6.65	-0.09	6.09E-03
TRMT1	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase	6.01	-0.09	2.11E-02
PPM1B	Protein phosphatase 1B	5.94	-0.15	3.58E-07
REPS1	RalBP1-associated Eps domain-containing protein 1	5.67	-0.48	3.42E-03
SYMPK	Symplekin	5.52	-0.12	3.49E-06
GTSF1	Gametocyte-specific factor 1	5.30	-0.11	2.67E-02
SRSF10	Serine/arginine-rich splicing factor 10	5.23	-0.94	9.21E-03
CPSF2	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	4.87	-0.19	2.11E-02
PTGES2	Prostaglandin E synthase 2	4.79	-0.13	1.42E-04
EML2	Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	4.78	-0.28	2.62E-02
QDPR	Dihydropteridine reductase	4.76	-0.13	1.58E-04
SEC24D	Protein transport protein Sec24D	4.75	-0.94	2.67E-02
EIF6	Eukaryotic translation initiation factor 6	4.74	-0.23	2.67E-02
DGLUCY	D-glutamate cyclase, mitochondrial	4.58	-0.15	3.52E-04
MTHFD1L	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	4.55	-0.17	3.90E-02
H2AFZ H2AFV	Histone H2A.Z Histone H2A.V	4.21	-0.16	1.76E-03
PIN4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	4.11	-0.13	2.72E-03
ELOC	Elongin-C	3.55	-0.15	1.93E-02
SNX17	Sorting nexin-17	-3.76	-0.13	3.28E-02

SMARCB1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1	-3.86	-0.16	2.65E-02
AKR7A2	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	-4.43	-0.16	5.46E-03
PSMA3	Proteasome subunit alpha type-3	-4.57	-0.14	3.54E-03
MATR3	Matrin-3	-4.81	-0.10	3.32E-02
MOB1B MOB1A	MOB kinase activator 1B/1A	-4.86	-0.11	3.07E-02
EDC3	Enhancer of mRNA-decapping protein 3	-5.52	-0.12	7.31E-03
TTC1	Tetratricopeptide repeat protein 1	-5.73	-0.10	4.52E-03
IRF2BP2	Interferon regulatory factor 2-binding protein 2	-5.80	-0.07	6.09E-03
STAMBP	STAM-binding protein	-6.09	-0.13	1.28E-05
CTBP1	C-terminal-binding protein 1	-6.18	-0.14	9.08E-06
CCDC86	Coiled-coil domain-containing protein 86	-6.42	-0.08	1.44E-03
MRPL4	39S ribosomal protein L4, mitochondrial	-6.68	-0.12	8.88E-07
BUB1	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1	-6.96	-0.16	2.97E-07
IRF2BPL	Probable E3 ubiquitin-protein ligase IRF2BPL	-6.97	-0.12	1.47E-04
TRIR	Telomerase RNA component interacting RNase	-7.62	-0.16	1.24E-08
PSMB4	Proteasome subunit beta type-4	-8.08	-0.85	2.04E-02
CALU	Calumenin	-8.64	-0.90	8.47E-03
TUBB2B	Tubulin beta-2B chain	-8.99	-0.08	3.58E-07
XRCC4	DNA repair protein XRCC4	-9.25	-0.19	3.42E-03
ETFB	Electron transfer flavoprotein subunit beta	-9.26	-0.21	3.42E-03
VCPIP1	Deubiquitinating protein VCIP135	-9.43	-0.13	3.38E-13
UBR4	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	-10.60	-0.43	3.16E-04
APIP	Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	-13.63	-0.84	4.18E-07

Tableau 58 : Tableau présentant les 56 protéines identifiées à la suite de l'expérience de TPP-TR avec une p-value (PVal_adj) inférieure à 5% de la différence des températures d'agrégations (ΔT_m) entre le composé A et la condition contrôle DMSO. Les protéines en vert présentent une stabilisation thermique par l'ajout du composé A à 15 μ M après 2h de traitement sur les cellules OPM2, et les protéines en bleu une déstabilisation. La pente minimale des courbes d'agrégation tracées est indiquée. L'ensemble des courbes de ces protéines présentent un $R^2 > 0.8$ et un plateau bas < 0.3 .

Dans cette expérience de TPP-TR, la protéine IDE connue pour être stabilisée par le composé A, a présenté un ΔT_m de 7.6°C et une p_{adj} de 6.2%, ce qui explique que celle-ci n'ait pas été retrouvée dans la liste des 56 protéines (**Figure 130**). Un ΔT_m de 8.53°C avait été calculé sur ces mêmes échantillons par la technique de western-blot.

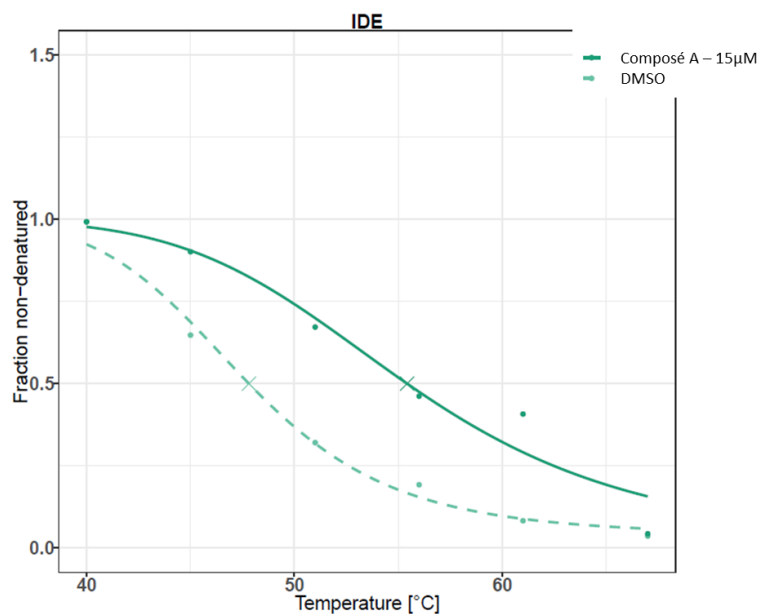


Figure 130 : Courbe de dénaturation de la protéine IDE déterminée lors de l'expérience de TPP-TR.

Des liens existent entre ces 56 protéines identifiées, on retrouve des protéines de la voie UPS, des protéines en interaction avec les ARN, des protéines impliquées dans le trafic cellulaire, ainsi que des protéines ayant un lien avec la chromatine (**Figure 131, figure 132 et annexe 2**). L'étude des connexions entre les protéines identifiées peut permettre d'identifier des protéines cibles, mais aussi des effecteurs de celles-ci par le fait que l'expérience ait été réalisée sur des cellules vivantes.

Certaines protéines présentent une déstabilisation par la présence du composé A ce qui peut s'expliquer par la rupture d'un complexe protéique, par des modifications post-traductionnelles ou encore par une liaison du composé à une forme non native de la protéine (497,498).

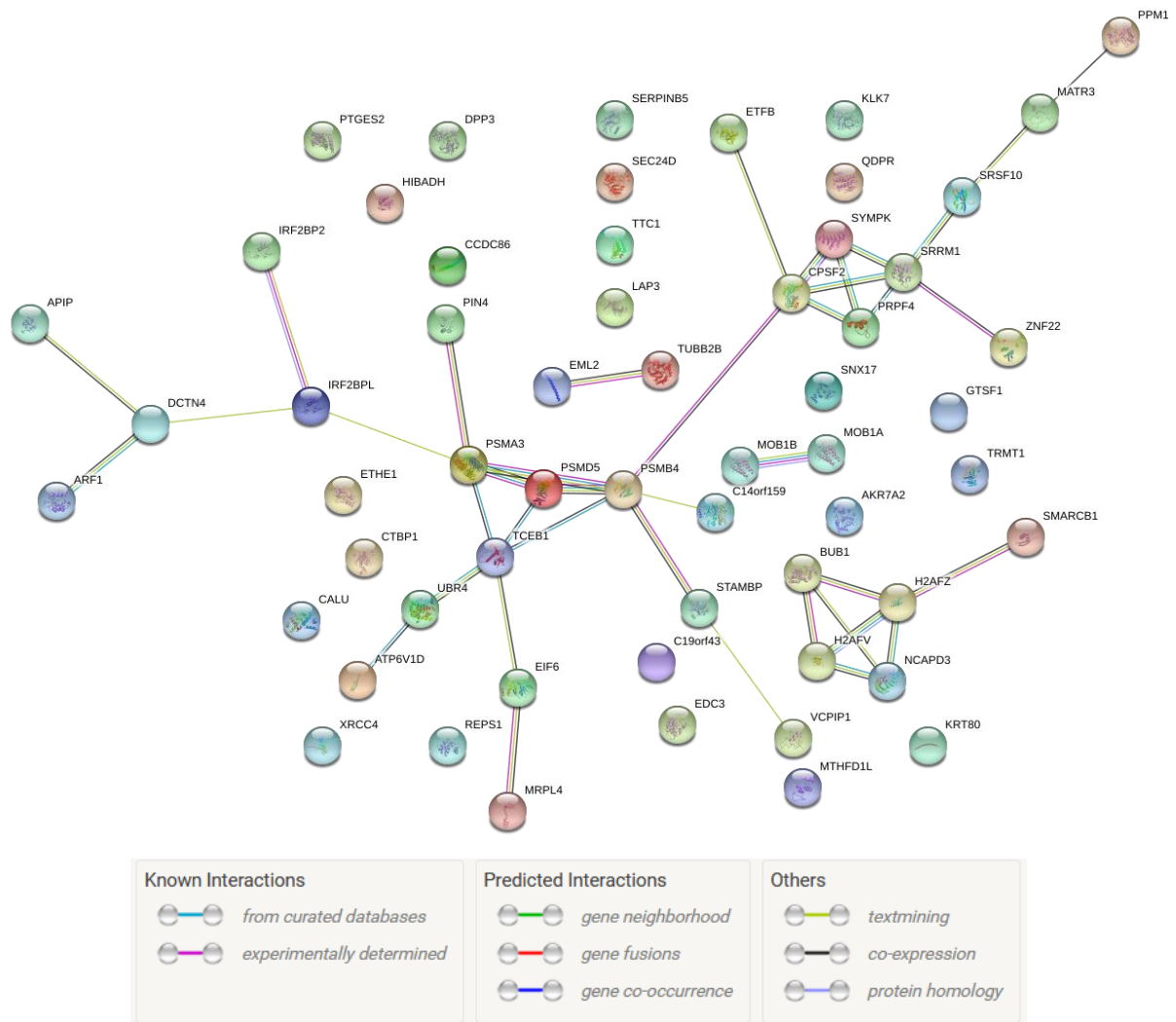


Figure 131 : Analyse des liens entre les 56 protéines identifiées ($p_{val_adj} < 0.05$) par l'expérience de TPP-TR par la base de données STRING après le traitement de cellules OPM2 par le composé A à 15 μ M pendant 2 heures. La légende des liens entre les protéines est présentée.

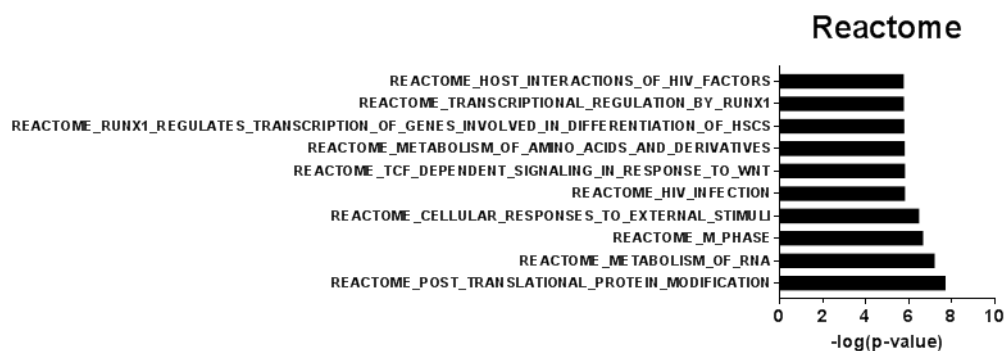


Figure 132 : Analyse des voies de signalisation pour les 56 protéines identifiées ($p_{val_adj} < 0.05$) par l'expérience de TPP-TR par la base de données Réactome.

Parmi ces protéines, certaines lient le zinc comme LAP3 (*Cytosol aminopeptidase EC:3.4.11.1*), DPP3 (*Dipeptidyl peptidase 3*), STAMBIP (*STAM-binding protein*), IRF2BPL (*Interferon regulatory factor 2-binding protein-like*), IRF2BP2 (*Interferon regulatory factor 2-binding protein 2*), MOB1B/MOB1A (*MOB kinase activator 1B/A*), TRMT1 (*tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase*), SEC24D (*Protein transport protein Sec24D*), MATR3

(*Matrin-3*), GTSF1 (*Gametocyte-specific factor 1*), UBR4 (*E3 ubiquitin-protein ligase UBR4*), APIP (*Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase or APAF1-interacting protein*), et ZNF22 (*Zinc finger protein 22*).

La série chimique d'inhibiteurs d'IDE possèdent un motif structural chélateur du zinc (acide hydroxamique). Ainsi, seules les protéines LAP3, DPP3, STAMBP et APIP lient un zinc susceptible d'être chélaté par un acide hydroxamique, les autres protéines ont un zinc structural. Ainsi, ces protéines pourraient être des cibles directes du composé A. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que le phénotype de boost apoptotique puisse être expliqué par d'autres cibles indirectement stabilisées ou déstabilisées.

LAP3 une aminopeptidase, DPP3 une peptidase et APIP une enzyme impliquée dans la récupération de la méthionine, pourraient expliquer le phénotype transcriptomique en relation avec les acides aminés, observé avec le composé A seul et en combinaison avec le carfilzomib. LAP3, DPP3 présentent une stabilisation par le composé A alors qu'APIP présente une déstabilisation par le composé A.

DPP3 est une zinc métalloprotéase impliquée dans la dégradation d'oligopeptides de 4 à 12 acides aminés comme l'angiotensine II (499). Lors d'un stress oxydatif DPP3 forme un complexe stable avec KEAP1 pour permettre l'action du facteur de transcription NRF2 (500). Ce dernier est impliqué dans la formation des agrésomes à la suite de l'inhibition du protéasome (501). Ainsi la stabilisation de DPP3 lors de l'expérience par le composé A pourrait être une interaction directe ou indirecte par la formation du complexe DPP3-KEAP1.

Concernant LAP3, il s'agit d'une exopeptidase qui catalyse l'hydrolyse de résidus leucines terminaux de peptides. Cette aminopeptidase est décrite comme étant impliquée dans la prolifération, la migration et l'angiogenèse de cellules tumorales (502). Il s'agit également d'une cible du toiséostat (402).

Concernant APIP, il s'agit d'une protéine initialement découverte pour inhiber deux programmes de mort cellulaire programmée : l'apoptose dépendante de la caspase-9 et pyroptose dépendante de la caspase 1. Plus récemment, cette protéine a été découverte pour être impliquée dans la récupération de la méthionine. APIP est ainsi une méthylthioribulose-1-phosphate dehydratase (MtnB) impliquée dans la cascade enzymatique pour la conversion de la 5 méthylthioadénosine en méthionine (503).

STAMBP est une enzyme impliquée dans le clivage de chaînes polyubiquitine, sa modulation pourrait expliquer le phénotype de boost de l'inhibition du protéasome, des agrésomes et de l'apoptose en association avec le carfilzomib. Cette protéine en lien avec l'UPS est déstabilisée par le composé A. STAMBP est une métalloprotéase à zinc qui clive spécifiquement les chaînes de polyubiquitine liées à la Lys-63. Des cellules de patients présentant une réduction de l'expression de STAMBP présentent une accumulation d'agrégats protéiques cellulaires associés à l'induction de l'apoptose (504). Aussi, STAMBP promeut l'initiation de l'autophagie en protégeant ULK1 de la dégradation par le protéasome (505).

Ainsi, nous nous sommes intéressés aux protéines susceptibles d'être des cibles directes du composé A, par la présence d'un zinc capable d'être chélaté par l'acide hydroxamique de cette molécule, mais cependant nous ne pouvons pas exclure que ce motif, et la molécule entière, puissent se lier à d'autres protéines que celles liant le zinc.

Ainsi, concernant le protéasome, une protéine structurale de cette machinerie comme la protéine PSMD5 (*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5*) a été stabilisée par le composé A, alors que les protéines PSMA3 (*Proteasome subunit alpha type-3*) et PSMB4 (*Proteasome subunit beta type-4*) ont été déstabilisées par le composé A. Une perturbation de la structure du protéasome pourrait être présente à la suite du traitement par le composé A, mais qui ne se traduirait pourtant pas par une modulation significative de l'activité chymotrypsine du protéasome par le composé seul, mais par un boost de l'inhibition du protéasome lors de l'association avec le carfilzomib. D'autres protéines impliquées dans l'UPS comme une déubiquitinase VCPIP1 (*Valosin-containing protein p97/p47 complex-interacting protein 1*), ou encore UBR4 et IRF2BPL, deux E3 ubiquitine ligases, présentent une déstabilisation par le composé A.

IRF2BPL est une E3 ubiquitine ligase responsable de l'ubiquitination et la dégradation de β -caténine, impliquée dans l'inhibition de la voie Wnt (506). Cette protéine appartient à la famille IRF2BP (*IFN regulatory factor 2 binding protein*) dont la protéine IRF2BP2, un cofacteur transcriptionnel, fait partie (507). Cette dernière est également déstabilisée par le composé A. IRF2BP2, IRF2BP1 et IRF2BPL formeraient un complexe protéique pour la répression transcriptionnel d'un facteur pro-apoptotique FASTKD2 (508).

Plusieurs protéines impliquées dans le trafic cellulaire ont été stabilisées par le composé A comme ATP6V1D, ARF1, SEC24D, EML2, DCTN4, et d'autres déstabilisées comme TUBB2B, SNX17, CTBP1. UBR4 est une protéine pouvant s'associer au microtubule, une perturbation du cytosquelette pourrait expliquer sa déstabilisation (509,510).

De plus, plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés ont été retrouvées stabilisées par le composé A comme DGLUCY, QPDR, HIBADH, TRMT1, et une autre protéine ETFB est retrouvée déstabilisée. La modulation par le composé A de ces protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés pourrait expliquer la modulation transcriptomique de gènes impliqués dans la réponse à la privation en acides aminés induite par le composé A seul mais aussi lors de la combinaison avec le carfilzomib.

On remarque aussi que certaines de ces protéines comme par exemple UBR4, un modulateur des endosomes-lysosomes (510), ATP6V1D, une protéine impliquée dans l'acidification du lysosome (511), jouent un rôle dans l'autophagie, ce qui pourrait expliquer le boost des agrésomes en association avec le carfilzomib par la modulation de l'autophagie.

Pour conclure, l'expérience de TPP-TR a été réalisée en simplicité, pour confirmer ces résultats il serait nécessaire de répéter l'expérience, peut-être en duplicat et avec davantage de températures. En effet, la liaison du composé A à IDE est robuste et reproductible par la technique de Western-Blot. Le décalage de la température d'agrégation par le composé A a été reproduit entre les deux techniques de CETSA en Western-Blot et de CETSA-TPP-TR en spectrométrie de masse mais cependant avec une p -adj légèrement supérieure à 5% pour cette dernière. Ainsi, la reproduction de l'expérience, notamment en duplicat, permettrait d'obtenir une meilleure robustesse sur les résultats et de découvrir peut-être de nouvelles cibles potentielles. De plus, la réalisation du TPP-TR sur un lysat cellulaire pourrait permettre de distinguer des cibles directes de protéines effectrices. Aussi, il est essentiel de ne pas oublier que le phénotype de boost apoptotique est observé lors de la combinaison simultanée avec le carfilzomib. Ainsi, le traitement par le carfilzomib pourrait dévoiler des cibles ou des effecteurs importants pour le mécanisme d'action de notre composé, comme c'est le cas par exemple lors de la combinaison du lénalidomide et du bortezomib (70). Une expérience de TPP-TR en combinaison avec le carfilzomib pourrait permettre d'élucider cela. Les perspectives de ces expériences seraient ensuite la réalisation d'expériences de SiRNA pour déterminer l'implication de la protéine dans le phénotype observé.

Discussion

1. Les composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE ont un intérêt thérapeutique démontré

1.1. La stratégie de combinaison

Le myélome multiple est une pathologie dont le besoin médical est insatisfait, malgré l'apparition de thérapies ciblées comme les inhibiteurs de protéasome. Les combinaisons d'agents thérapeutiques est une stratégie d'actualité pour de nombreuses raisons. En effet, cela peut permettre d'augmenter les efficacités des agents, un effet synergique (lorsque l'effet de la combinaison est supérieure à la somme des effets des agents pris séparément), additif (addition des effets des agents) ou de boost (effet supérieur lors de la combinaison d'un agent inactif et d'un agent actif) peut apparaître. Les combinaisons peuvent réduire l'apparition de résistances, par la combinaison de mécanismes d'action différents, l'apparition d'effets indésirables, par la diminution des doses pour un même effet thérapeutique, ou encore réduire la durée de traitement (512).

Dans notre cas, l'association d'un composé inactif sur l'apoptose des cellules, de la série chimique des inhibiteurs d'IDE, avec l'inhibiteur du protéasome, le carfilzomib, présente un effet boost de l'apoptose sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. Cet effet boost est également présent avec d'autres inhibiteurs du protéasome et d'autres agents anticancéreux. Son développement présente donc un intérêt thérapeutique. Celui-ci est appuyé par l'observation du Dr. Moreaux mettant en évidence que la surexpression d'IDE dans des cellules de patients atteints de myélome multiple est associée à une faible survie (**cf. partie 4.2 de l'introduction**).

1.2. La preuve de l'intérêt thérapeutique chez l'animal

L'efficacité de ce boost a été démontrée dans un modèle murin de myélome multiple lors de l'association du composé B au bortezomib. Dans cette étude une dose sub-efficace de bortezomib a été utilisée. Cette étude chez l'animal a donc permis d'apporter la preuve de l'intérêt thérapeutique de développer et d'étudier les composés de cette série chimique. Le boost *in vitro* de l'apoptose induite par cet inhibiteur du protéasome est moins puissant qu'avec le carfilzomib. La prise en considération du microenvironnement tumoral dans les études *in vitro* (par la co-culture, la culture 3D etc.) permettrait une pertinence plus importante. Ce modèle animal, très physiologique du fait de l'injection de cellules cancéreuses spontanées de myélome multiple murin, n'a cependant pas permis l'évaluation de la combinaison avec l'autre inhibiteur du protéasome, le carfilzomib (381).

Une autre expérience chez l'animal est en préparation pour l'étude de l'efficacité de la combinaison du composé B au carfilzomib, dans un modèle murin de xénogreffe de cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231-LUC. Cette expérience se positionne dans la continuité de l'ensemble des résultats *in vitro* obtenus lors de cette association.

Le choix du composé évalué chez l'animal s'est fait sur le meilleur compromis entre les propriétés physico-chimiques, pharmacodynamiques et pharmacocinétiques ; celui-ci

s'est donc porté dans notre cas sur le composé B. Ce compromis constitue toute la complexité du développement d'un médicament.

1.3. Elargissement à d'autres cancers que le myélome multiple

Le boost apoptotique des composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE est présent sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses que celles de myélome multiple (10 lignées cellulaires testées dont 5 lignées de myélome multiple). Ainsi, l'intérêt thérapeutique de ces agents peut être plus large que le myélome multiple. En particulier, on remarque que la lignée de glioblastome U87 répond bien à la combinaison de nos agents avec des inhibiteurs de protéasome. Le glioblastome est une tumeur cérébrale dont la médiane de survie est évaluée entre 10 à 17 mois selon l'HAS (513). Les chimiothérapies utilisées dans ce cancer doivent passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et ainsi doivent posséder des propriétés physico-chimiques, pharmacodynamique et/ou pharmacocinétiques particulières (514). En particulier, un inhibiteur du protéasome a été développé pour passer la BHE, il s'agit du marizomib (515). Le composé A a été évalué *in vitro* sur des cellules U87 en association avec le marizomib et a présenté un effet boost de l'apoptose (données non présentées). L'ensemble de ces résultats présente un horizon de développement et d'étude de ces molécules inhibitrices d'IDE dans d'autres cancers que le myélome multiple où le besoin thérapeutique reste insatisfait.

Les différentes lignées cancéreuses utilisées présentent des perturbations génétiques et épigénétiques connues. Ces perturbations touchent principalement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. La présence d'un boost apoptotique du carfilzomib sur l'ensemble de ces lignées cancéreuses nous laisse penser que ces perturbations génétiques ne sont que partiellement ou non impliquées dans le boost apoptotique. Cependant, elles peuvent peut-être expliquer des différences de puissance de boost entre les lignées cellulaires. De plus, les différences quantitatives de boost du bortezomib et du carfilzomib avec le BDM_44768 sur les lignées cellulaires de myélome multiple pourraient s'expliquer par ces différences génétiques et épigénétiques, influençant le mécanisme d'action du bortezomib et/ou des composés de la série chimique testée. L'étude des mutations génétiques par la base de données COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations In Cancer*) de différentes lignées cellulaires est présentée dans le **tableau 59** (516). Les boosts apoptotiques du carfilzomib et du bortezomib par le BDM_44768 sont présents sur toutes les lignées cellulaires testées sauf sur les lignées U266, OPM2, 5T33MMvt et MCF-7 pour le boost du bortezomib. Si l'on regarde les données sur les gènes mutés, il n'y a pas de gènes communs à ces trois lignées. Ainsi, il n'est pas possible de corrélérer les différences de boost entre le bortezomib et le carfilzomib à des mutations génétiques présentes dans les lignées cellulaires cancéreuses testées.

Gène avec mutation	MDA-MB-231	U-87-MG	HeLa	U-266	LP-1	OPM-2	MCF7
ALK					X		
ARID1B					X		
ATP2B3							X
BCR							X
BLM				X			
BRAF	X			X			
CACNA1D				X			
CAMTA1	X					X	
CARD11			X				
CD79A	X						
CDKN2A						X	
CHD4						X	
CLIP1							X
DDX10							X
DICER1						X	
DROSHA	X						
EGFR	X						
EP300							X
EPAS1				X			
EPS15						X	
ERBB4							X
ETV5						X	
EXT2	X						
FAT4				X		X	
FGFR3						X	
FLCN				X			
FLT3							X
FLT4				X			
GATA2				X			
GNAS	X						
GRIN2A						X	
HIF1A							X
HOXA13						X	
KDM6A					X		
KMT2A	X						
KMT2C				X			
KMT2D						X	
KRAS	X						
LATS1							X
LIFR				X			
LRP1B					X		X
MAP3K13							X
MLLT3				X			

MLLT10							X	
MSH6					X		X	
NBN								X
NCOR1							X	
NCOR2							X	X
NF1		X			X			
NF2	X							
NIN							X	
NSD3							X	
NUP98					X		X	
PAX3				X				
PAX5								X
PAX7							X	
PBRM1	X							
PCM1		X						
PDE4DIP	X							X
PDGFRA	X				X			X
PI3KCA								X
PI3KR1							X	
POLE					X			
POT1				X				
PPARG								X
PRDM16				X	X			
PREX2							X	
PTEN		X						
PTPRC							X	
PTPRT							X	
RB1					X			
RUNX1T1								X
SDHC								X
SMAD2								X
SND1							X	
STIL							X	
TENT5C								X
TP53	X				X	X	X	X
TRAF7				X				
TRRAP							X	
TSC2							X	
WAS	X							
XPC		X						
XPO1								X
ZFH3				X			X	

Tableau 59 : Mutations présentes dans des gènes associés au cancer et présentant un impact pathogénique selon la base de données COSMIC.

1.4. Elargissement à d'autres agents anticancéreux

Des boosts de l'apoptose avec d'autres agents anticancéreux que les inhibiteurs de protéasome ont été observés (inhibiteurs d'HDAC et agent stressant du RE). Un boost de la toxicité induite par des radiations (UV-C, rayons X) est également retrouvé lors de l'association avec les composés de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE. Cette dernière observation préliminaire est intéressante pour le développement de ces composés en association avec de la radiothérapie.

Une stratégie serait de s'intéresser au point commun de tous ces agents pour la compréhension du mécanisme d'action du booster. Par exemple, le panobinostat (517), les UV-C (216), le carfilzomib (518), le bortezomib (519) ou encore la tunicamycine (185) sont décrits pour induire une phosphorylation d'eIF2 α . Un autre exemple est la modulation de la voie NF- κ B par les UV-C (216), le carfilzomib (520), le panobinostat (521) ou encore la tunicamycine (522). Cependant, « on ne trouve que ce que l'on cherche et on ne cherche que ce que l'on connaît ». Ainsi, cette approche est biaisée par le fait que tout n'est pas étudié et connu, la simple étude bibliographique n'est donc pas suffisante, même si elle permet de trouver des points communs. De plus, l'effet d'un composé peut varier en fonction du contexte (lignée cellulaire, cinétique d'étude, environnement, dose etc.) ce qui complexifie cette recherche.

Une autre hypothèse serait que les composés ajoutent un stress supplémentaire qui devient délétère, indépendamment du mécanisme d'action de l'agent anticancéreux boosté. Notre stratégie a été de se focaliser sur la combinaison avec un seul agent anti-cancéreux, le carfilzomib, pour pouvoir, une fois le mécanisme d'action élucidé, l'étudier avec d'autres combinaisons.

Les composés de la série chimique boostent l'apoptose du carfilzomib sur l'ensemble des lignées cellulaires cancéreuses testées, ce qui n'est pas le cas pour la combinaison avec le bortezomib où certaines lignées cellulaires ne répondent pas à cette combinaison. Aussi, sur l'ensemble des lignées cellulaires testées, le boost de l'apoptose du bortezomib s'est toujours montré inférieur au boost apoptotique avec le carfilzomib. Ces différences ont donc attirées notre attention. Parmi les différences de mécanisme d'action entre ces deux molécules réside peut-être l'explication d'une meilleure efficacité *in cellulo* avec le CFZ par rapport au BTZ. Les données bibliographiques disponibles sur les différences entre le CFZ et BTZ montrent que le BTZ induit plus de dommages du cytosquelette que le CFZ (172). Dans l'analyse de TPP-TR plusieurs protéines associées au cytosquelette et au transport ont été retrouvées dans le réactome du composé A. Aussi, l'analyse transcriptomique de cellules U87 traitées par du BTZ (GSE97460) montre une modulation du complexe condensine impliqué dans la condensation des chromosomes avant la mitose (NCAPH, NCAPG). Dans l'analyse de TPP-TR, NCAPD3 du complexe II condensine est stabilisé par le composé A. Ainsi, peut-être que la plus faible puissance du boost du BTZ comparé au CFZ pourrait s'expliquer par la modulation de cibles communes entre le BTZ et les composés de la série chimique. On peut alors se poser la question s'il existe une synergie entre le bortezomib et le carfilzomib.

2. L'implication d'IDE dans le boost apoptotique ne serait pas totale

2.1. IDE serait une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du cancer

Les différentes données bibliographiques sur la protéine IDE converge vers une protéine multifonctionnelle. En particulier, celle-ci aurait notamment un rôle dans l'UPS et un rôle de protéine chaperon (319). L'induction transcriptomique par le carfilzomib et par la

combinaison avec nos composés lors de nos expériences, conforte l'idée que la protéine IDE aurait un rôle de protéine chaperon (**cf. parties 2.4 et 3.2.4.11 des résultats**).

L'étude du Dr. Moreaux de cohortes de patients atteints de myélome multiple, montre une surexpression d'IDE dans les cellules de patients atteints de myélome multiple (cellules primaires et lignées cellulaires humaines de myélome multiple), et cette surexpression est associée à une faible survie (**cf. partie 4.2 de l'introduction**). IDE pourrait ainsi contribuer à la survie des cellules cancéreuses. Cependant, il serait intéressant de savoir si la surexpression d'IDE est associée à des mutations et/ou une modulation de sa structure et/ou de sa fonction. Comme en témoigne la **figure 133** de la base de données COSMIC, des mutations existent sur le gène IDE, en particulier des substitutions faux-sens.

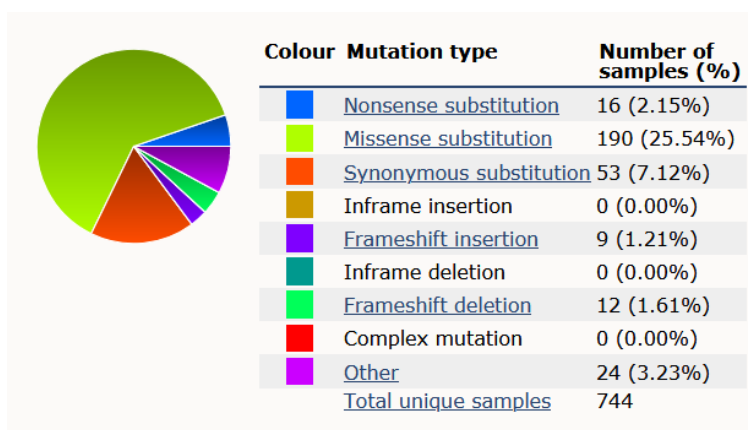


Figure 133 : Distribution des différents types de mutation d'IDE dans les 744 échantillons disponibles dans la base de données COSMIC (absence de filtres).

Si l'on s'intéresse aux mutations d'IDE dans des cellules cancéreuses pouvant avoir un impact pathogénique selon la base de données COSMIC, deux substitutions faux-sens ont été identifiées dans des cellules de mélanome (L944F et R765Q).

2.2. La comparaison des propriétés d'analogues d'une même série chimique permet d'établir des relations structure-activité

Une série d'inhibiteurs d'IDE a été développée par le laboratoire. L'inhibition enzymatique d'IDE, la liaison de la cible *in cellulo*, et l'engagement *in vivo* par les composés ont été étudiés. Dans cette série chimique, des analogues proches structuralement n'inhibent plus IDE et perdent également la liaison à cette protéine dans les cellules. Parmi ceux-ci certains boostent également l'apoptose induite par le carfilzomib. Cet effet de boost apoptotique pourrait s'expliquer par une modulation de cibles communes à ces composés. L'ensemble de ces composés de cette série chimique possèdent dans leur structure un acide hydroxamique, une structure chélatrice du zinc. Cependant, il n'est pas exclu que les composés puissent moduler d'autres cibles que celles liant le zinc. Ainsi, les différences entre ces analogues nous permettent d'émettre des hypothèses : 1/ l'inhibition d'IDE n'est peut-être pas essentielle pour le boost apoptotique du carfilzomib, 2/ la présence du boost apoptotique entre les différents analogues malgré l'absence d'inhibition d'IDE pourrait

s'expliquer par d'autres mécanismes d'action, nous sommes alors peut-être face à un phénotype déclenchable par plusieurs mécanismes, tels que l'atteinte de cibles en amont ou en aval dans une chaîne de signalisation intégrant IDE, ou l'atteinte de cibles dans des branches convergentes ne contenant pas IDE.

2.3. Le lien de causalité entre IDE et le boost apoptotique n'est pas entièrement établi

L'étude du boost apoptotique du carfilzomib a été réalisée dans des cellules murines qui n'expriment pas IDE génétiquement, ainsi que dans des cellules humaines transfectées avec un pool de siRNA. Les résultats de ces études montrent la présence d'un boost apoptotique du carfilzomib par les composés de la série chimique malgré l'absence totale d'IDE ou la diminution provisoire de son expression. Ainsi, contrairement à notre hypothèse initiale, il semble que l'inhibition d'IDE ne joue pas un rôle central dans le boost apoptotique. Toutefois, nous ne pouvons pas écarter complètement l'hypothèse que l'inhibition de cette enzyme participe partiellement à l'augmentation d'apoptose observée avec les combinaisons, pour les raisons suivantes : 1/ l'ensemble des données bibliographiques et cliniques appuient un rôle d'IDE dans le cancer, 2/ le boost apoptotique est légèrement inférieur lors de l'absence ou de la diminution de l'expression d'IDE, 3/ d'autres cibles pourraient compenser l'effet si le phénotype de boost apoptotique n'est pas spécifique à une seule cause. Aussi, l'absence totale d'expression d'une protéine dans un organisme engendre une adaptation à cette absence. L'action d'un composé qui module une protéine fonctionnelle à un instant t , est donc différente de l'absence totale et définitive d'une protéine par une modification génétique. La méthode de siRNA mime alors peut-être mieux l'action d'un composé inhibant sa fonction, mais l'interprétation de ces données n'est pas toujours simple. Pour conclure, ces études nous invitent à explorer le réactome des composés.

2.4. L'inhibition d'IDE joue peut-être un rôle dans l'effet observé chez l'animal

L'effet de boost des différents paramètres tumoraux, observés en association avec le bortezomib dans le modèle murin de myélome multiple, peut être la conséquence du boost apoptotique observé *in vitro* sur les cellules isolées, mais peut également être expliqué par d'autres effets, comme l'inhibition d'IDE. Cela est supporté par le fait que la surexpression d'IDE chez des patients atteints de myélome multiple est associée à une plus faible survie. L'environnement tumoral joue également un rôle important dans la réponse aux traitements et dans la progression de la maladie. Les effets des composés sur l'environnement tumoral n'ont pas été évalués mais il pourrait être intéressant de réaliser des expériences de co-cultures avec des cellules stromales de la moelle osseuse par exemple. L'étude des effets des composés sur ces modèles plus physiologiques permettraient de se rapprocher de la clinique.

3. La démarche scientifique pour la détermination du mécanisme d'action

3.1. La notion de causalité

Pour déterminer le mécanisme d'action du boost apoptotique en association avec le carfilzomib nous avons mis en place plusieurs stratégies. Cela a consisté en l'observation de phénotypes, à plusieurs moments, à la suite du traitement par les composés, pris séparément et lors de leur association, mais aussi en l'identification du réactome du composé, primaire et secondaire (c'est-à-dire les protéines interagissant directement avec le composé (primaire), et les protéines modulées indirectement et secondairement par des cascades de signalisation), et en la modulation de l'expression de cibles. La simple observation permet de proposer une relation causale, mais l'intervention, comme la modulation de l'expression génique (KO, siRNA...) ou le traitement par un composé chimique, mais aussi la présence d'un effet dose, permet d'établir le lien causal (523). La relation temporelle est importante dans l'établissement de la causalité, car la cause précède toujours l'effet, c'est pourquoi la plupart de nos études ont été réalisées en cinétique. Cependant, l'étude des relations causales peut être complexe, en particulier en biologie, par l'interdépendance quasi-systématique de plusieurs chaînes d'évènements qui apportent de la stabilité et de la résilience au système biologique (**Figure 134**).



Figure 134 : Représentation schématique de l'interdépendance de plusieurs chaînes d'évènements dans un système biologique.

3.2. Les outils omics pour la compréhension du mécanisme d'action

L'objectif de cette thèse a été de caractériser le mécanisme d'action de composés inactifs boosters de l'apoptose du carfilzomib. L'absence d'effet observable facilement du composé seul et la dépendance du mécanisme d'action d'un autre agent complexifient cette compréhension. Les différentes expériences omics, comme la transcriptomique ou la protéomique, constituent des approches essentielles pour la compréhension du mécanisme d'action dans sa globalité. Il s'agit ainsi de méthodes non biaisées qui permet l'étude de l'ensemble des ARNm ou des protéines, respectivement, à un instant donné.

Plusieurs approches de protéomique ont été développées pour répondre à des besoins pour l'étude d'interactions protéiques fonctionnelles, physiques, spatiales et/ou de

co-régulation (524). C'est en particulier la technologie de spectrométrie de masse qui répond au mieux à ce besoin. Dans notre cas, nous avons utilisé l'approche expérimentale du TPP-TR. Du fait de la réalisation dans des cellules vivantes, le protéome identifié peut aussi bien être primaire que secondaire. 56 protéines potentielles ont été identifiées comme étant impactées par le traitement du composé A seul. Certaines protéines pourraient être en interaction directe avec le composé, du fait de la présence d'un zinc pouvant être chélaté par la fonction acide hydroxamique de notre composé.

Aussi, une étude transcriptomique de tous les ARNm présents dans les cellules HeLa a été réalisée en cinétique. Les analyses des voies de signalisation permettent d'établir des relations dans l'ensemble des gènes modulés pour les traitements. L'utilisation du logiciel Iregulon nous a permis d'identifier d'éventuels facteurs de transcription causaux aux changements transcriptomiques observés.

Enfin, plusieurs observations de phénotypes particuliers, basés notamment sur le rationnel du mécanisme d'action du carfilzomib, ont été réalisées à différents temps de cinétique et/ou en dose réponse, et dont des liens peuvent être établis entre ces observations et les études non biaisées d'-omics.

4. Des perspectives d'exploration pour la compréhension du mécanisme d'action

4.1. Approfondissement de l'étude du protéome pour la validation de cibles

L'expérience de protéomique de TPP-TR sur les cellules OPM2 a permis de mettre en évidence 56 protéines potentielles impliquées dans le réactome primaire et secondaire du composé A. Il serait nécessaire d'explorer davantage ce protéome pour établir des liens de causalité et valider des cibles. Pour cela, une répétition de l'expérience sur les cellules OPM2 est nécessaire, mais cette-fois en étudiant également la combinaison avec le carfilzomib. En effet, un inhibiteur du protéasome, de par son mécanisme d'action sur une fonction cellulaire essentielle de dégradation, doit impacter de manière importante le protéome. Cela n'est ainsi peut-être pas anodin pour l'interaction du composé A aux protéines disponibles et ainsi pour son effet de booster.

De plus, la réalisation du TPP-TR sur un lysat cellulaire permettrait la distinction des cibles primaires des cibles secondaires.

Actuellement, nous avons identifié 4 cibles directes potentielles pour le composé A. Ces protéines présentent dans leur structure un zinc catalytique, pouvant être chélaté par la fonction acide hydroxamique de ce composé. Il serait intéressant de valider l'implication de ces cibles dans le phénotype de boost apoptotique d'intérêt par des expériences de siRNA. On pourrait également s'intéresser à l'implication de ces cibles dans d'autres phénotypes (activité du protéasome ou encore la formation des agrésomes).

De plus, le protéome est fonction du génome et de l'environnement. Ainsi, la réalisation de ce genre d'expérience dans une autre lignée cellulaire augmenterait la

pertinence des résultats. En effet, le phénotype d'intérêt, de boost apoptotique, est présent sur plusieurs lignées cellulaires, on pourrait supposer que les interactions clés responsables de celui-ci doivent être présentes dans les différents types cellulaires, dans l'hypothèse où la causalité est identique entre les lignées cellulaires.

Aussi, dans ce genre d'expérience, le temps de cinétique est important car un protéome évolue au cours du temps. Un temps court de 2h dans notre cas a été choisi mais cela est arbitraire, d'autres temps de cinétique plus courts pourraient être explorés, toujours dans ce but d'établir des liens de causalité.

L'analyse de TPP-TR a été réalisée en suivant le protocole détaillé dans la publication de Savitski et al. (379) avec une normalisation des résultats. Une analyse non paramétrique de ces données serait complémentaire à celle réalisée et permettrait d'étendre l'identification de cibles potentielles (525).

Une des forces de ce projet est la série chimique qui offre des analogues structuraux boosters de l'apoptose induite par le CFZ. Ainsi, une analyse comparative du protéome induits par ces analogues permettrait peut-être d'identifier le protéome important pour le boost.

Enfin, il est également possible de faire varier la concentration en composé (TPP-CR : *concentration range*) en fixant une température pour évaluer la puissance d'interaction avec le protéome, ainsi que de faire varier la température et la concentration en composé (2D-TPP) au sein de la même expérience (526). Cette dernière optimisation de la méthode permet notamment de mettre en évidence des protéines dont le décalage de la température d'agrégation est faible mais dose-dépendant. Ainsi, ce genre d'amélioration pourrait être utile pour valider l'engagement des cibles, notamment par l'effet dose-dépendant, qui est un point fort pour établir des liens de causalité.

4.2. Approfondissement de l'étude transcriptomique pour la validation de voies de signalisation

L'expérience de transcriptomique a permis d'émettre l'hypothèse qu'une réponse intégrée au stress est induite par la combinaison. Cela a été confirmé par la mesure de la phosphorylation d'eIF2 α et de l'expression protéique d'ATF4.

ATF4 a notamment été identifié comme un facteur de transcription causal de changements transcriptomiques. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de la modulation de l'expression de ce facteur de transcription sur la réponse apoptotique. Des expériences de siRNA pour la protéine ATF4 pourraient être réalisées et permettraient de connaître l'importance de l'expression de ce facteur sur la réponse apoptotique.

De plus, il serait intéressant de connaître par quelle kinase eIF2 α est phosphorylée pour identifier le stress causal. La réalisation d'un effet dose pour l'induction de cette modification post-traductionnelle serait également nécessaire. Une étude en cinétique de la phosphorylation d'eIF2 α à des temps plus courts et rapprochés permettrait de savoir si l'induction d'ATF4 est dépendante de celle-ci.

4.3. Exploration de phénotypes

Le boost de l'inhibition du protéasome induite par le carfilzomib est un phénotype observé précocement, seulement après 2h de traitement. Il serait intéressant de savoir si ce phénotype est également présent lors de l'association avec d'autres agents anticancéreux boostés par les composés. En effet, si une inhibition du protéasome ou un boost de l'inhibition du protéasome est présente lors de l'association avec ces autres agents, cela augmenterait la pertinence de ce phénotype pour établir un lien avec le phénotype de boost apoptotique. La causalité entre ces événements nécessite qu'une cible soit identifiée, et lorsque l'expression de cette dernière est modulée, cela doit impacter le phénotype.

A partir de l'ensemble des données disponibles, l'exploration du phénotype autophagique serait cohérente et intéressante. En effet, une première approche, protéique et transcriptomique, nous montre que l'autophagie est modulée par la combinaison. Le phénotype de boost de la présence d'agrésomes pourrait être cohérent avec la modulation de l'autophagie. Ainsi, une étude de cette voie de dégradation est justifiée. Cela pourrait par exemple se faire en imagerie et en cinétique après la transfection de la protéine LC3 marquée pour suivre les différentes étapes de l'autophagie (493).

5. Des hypothèses sur les chaînes d'évènements

5.1. Hypothèses avec une causalité dépendante du zinc

La molécule A a été conçue pour inhiber l'enzyme IDE, en particulier par la chélation du zinc via l'acide hydroxamique de la molécule. L'expérience préliminaire de TPP-TR propose 4 autres enzymes possiblement modulées par l'acide hydroxamique du composé A. A partir de ces 4 enzymes et des données bibliographiques disponibles sur ces dernières, nous sommes en mesure d'établir des liens entre les différents évènements décrits dans cette thèse (**Figure 135**). Il est important de noter qu'un composé n'est jamais 100% spécifique d'une seule et même protéine. Ainsi, peut-être que la modulation de plusieurs cibles est responsable de l'effet d'intérêt. Pour cela, lors de la validation des cibles il serait intéressant d'étudier les combinaisons de siRNA.

Le cas 1 illustre l'hypothèse selon laquelle la modulation d'IDE par le composé A qui pourrait être responsable du boost de l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome et/ou être impliquée dans la réponse intégrée au stress par son rôle de protéine chaperon (**cf. partie 4.1 de l'introduction**). Les cas 2, 3 et 5 pourraient expliquer le transcriptome relatif au métabolisme des acides aminés identifié par le traitement du composé A. En effet, dans le cas n°2, l'inhibition d'une aminopeptidase peut engendrer une privation en acides aminés qui sera neutralisée par une réponse transcriptomique AAR pour restaurer l'homéostasie. Cela est ainsi cohérent avec l'absence de phénotype apoptotique par les composés de cette série chimique. En revanche, l'association de ce composé avec le

carfilzomib engendre un stress supplémentaire qui n'est plus maîtrisable par la cellule et entraîne la mort cellulaire. Cette hypothèse s'appuie sur le fait supplémentaire qu'une privation en acides aminés est également observée par le traitement par un inhibiteur du protéasome et peu tolérée (116). Le cas n°3 avec la modulation de DPP3 par le composé pourrait engendrer la même chaîne d'évènements que le cas n°2. DPP3 est une oligopeptidase, dont l'inhibition pourrait diminuer les substrats des aminopeptidases, et ainsi expliquer également une privation en acides aminés. Dans le cas n°5, la modulation d'APIP par le composé pourrait impacter la cascade enzymatique de récupération de la méthionine, dans laquelle cette protéine est impliquée, et ainsi causer la même chaîne d'évènements que le cas n°2 et 3. De plus, l'implication de cette protéine dans la modulation de l'apoptose pourrait expliquer l'effet boost apoptotique directement. Dans le cas n°4, la modulation d'une enzyme impliquée dans l'UPS, en particulier dans le clivage de chaînes poly-ubiquitines, pourrait expliquer le boost de l'inhibition du protéasome, des agrésomes et/ou de l'apoptose avec le carfilzomib.

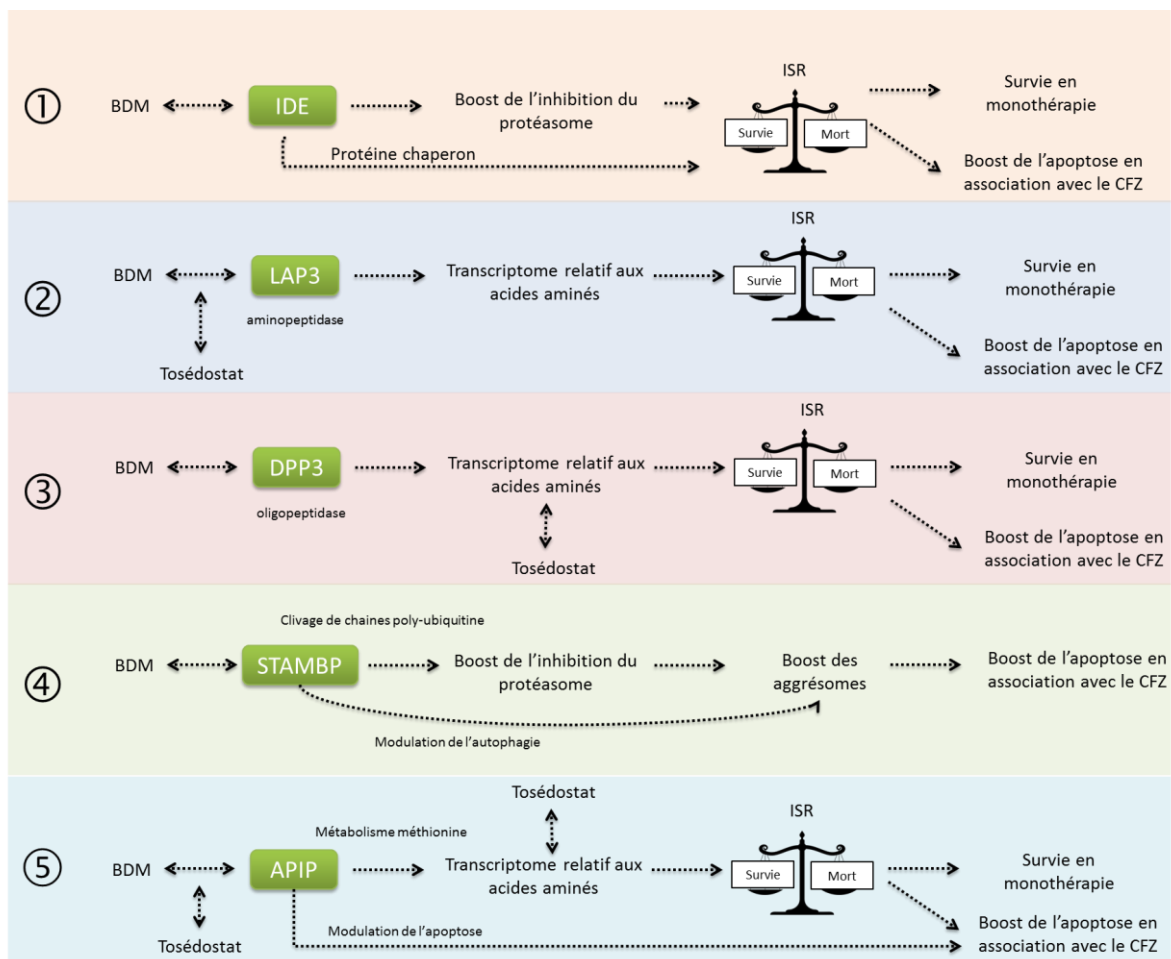


Figure 135 : Hypothèses sur des chaînes d'évènements induites par la modulation d'une cible à zinc identifiée par le TPP-TR. Les flèches en pointillés représentent des liens possibles hypothétiques.

5.2. Elargissement du champ d'investigation

D'autres protéines identifiées par le TPP-TR mais ne possédant pas un zinc catalytique pourraient expliquer le boost apoptotique par la même chaîne hypothétique d'évènements présentées à la **figure 135**. Ainsi, une modulation de l'UPS et/ou du métabolisme des acides aminés pourraient expliquer le boost apoptotique.

De plus, la modulation d'autres mécanismes cellulaires pourrait provoquer un boost apoptotique (**Figure 136**). Dans le cas n°2 une modulation de l'autophagie pourrait expliquer le transcriptome des acides aminés, car l'autophagie constitue avec le protéasome les sources d'apports en acides aminés. Aussi, la modulation de l'autophagie pourrait expliquer le boost de la formation des agrésomes.

L'expérience de TPP-TR a mis en évidence un protéome relatif au métabolisme des ARN modulé par le composé A (cas n°3). Ainsi, une perturbation du métabolisme des ARN par le composé A pourrait être présente, et pourrait expliquer le boost de l'inhibition de la synthèse protéique, et peut être aussi de l'apoptose avec le CFZ. Notamment, une légère diminution de la synthèse protéique était présente par le traitement seul du composé A (**cf. partie 4.3 des résultats**). Une confirmation de ce phénotype par un effet dose serait nécessaire pour confirmer ce résultat.

Aussi, l'expérience de TPP-TR a mis en lumière plusieurs protéines ayant un lien avec le cytosquelette et le transport des protéines/vésicules (cas n°4). Une modulation de ce mécanisme pourrait expliquer le boost des agrésomes et peut être de l'apoptose en association avec le CFZ.

Enfin, une dernière hypothèse, et pas des moindre, est la causalité du boost induite par le CFZ. En effet, l'inhibiteur du protéasome perturbe le protéome de la cellule (niveau d'expression, présence ou absence, localisations, interactions etc.) dont peut dépendre l'action des composés (cas n°1).

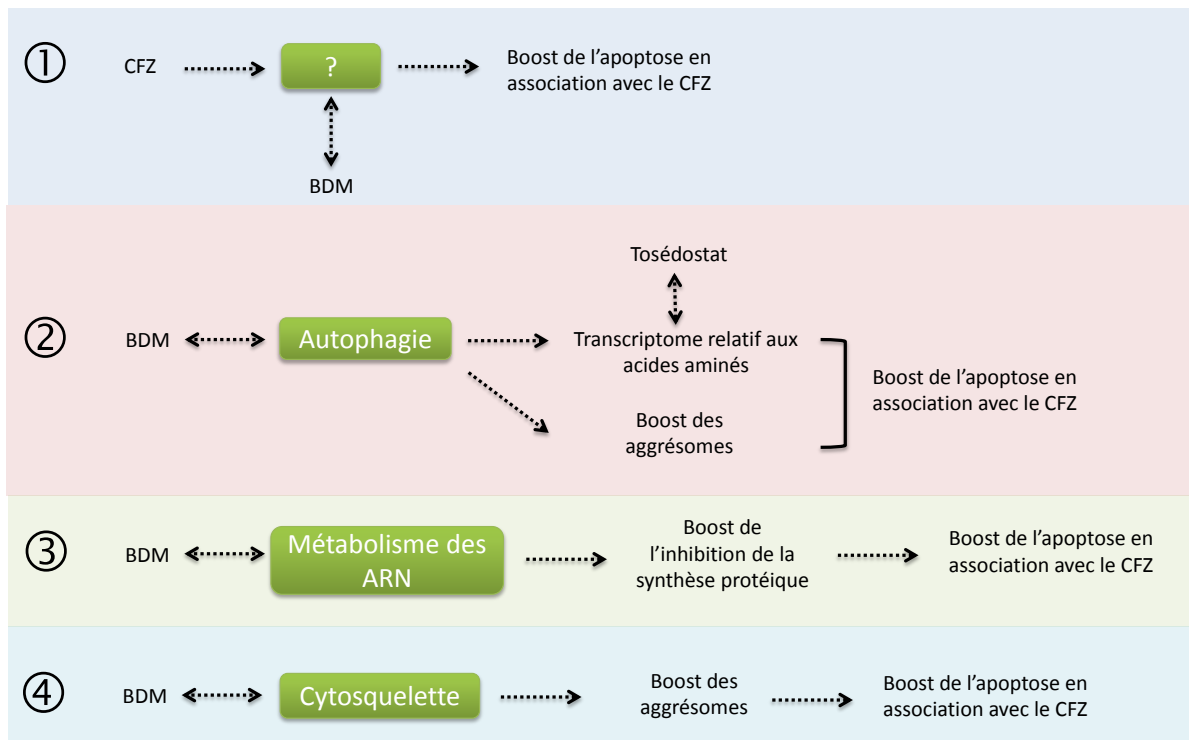


Figure 136 : Hypothèses sur des chaînes d'évènements induites par la modulation d'un mécanisme. Les flèches en pointillés représentent des liens possibles hypothétiques.

6. Conclusion

Pour conclure, les travaux de cette thèse appuient l'intérêt du développement de la série chimique d'inhibiteurs d'IDE pour le traitement du cancer en combinaison avec des inhibiteurs du protéasome. Aussi, ces travaux permettent une première compréhension du mécanisme d'action de ces boosters en termes de voies de signalisation et de cibles thérapeutiques, qu'il convient d'approfondir pour en décrire en détails la ou les chaîne(s) causale(s) reliant les cibles des composés et le ou les phénotypes observé(s). Cette compréhension précise du mode d'action permet d'affiner les indications thérapeutiques et de prévoir les limites d'un candidat médicament en termes d'index thérapeutique et d'interactions médicamenteuses. Ainsi, la compréhension du mécanisme d'action contribue au bon usage du médicament.

Annexes

High-throughput image-based aggresome quantification

Laetitia Lesire¹, Ludovic Chaput¹, Paulina Cruz De Casas¹, Fanny Rousseau¹,
Catherine Piveteau¹, Julie Dumont¹, David Pointu², Benoît Déprez¹ and Florence
Leroux¹

¹Univ. Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, U1177 - Drugs and Molecules for living
Systems, F-59000 Lille, France

²GE Healthcare Europe GmbH, succursale France, F-78140 Vélizy-Villacoublay, France

Keywords: aggresome, phenotypic screening, high-content screening, image analysis, approved drug library

Abstract

Aggresomes are subcellular perinuclear structures where misfolded proteins accumulate by retrograde transport on microtubules. Different methods are available to monitor aggresome formation but they are often laborious, time-consuming and not quantitative. Proteostat® is a red fluorescent molecular rotor dye, which becomes brightly fluorescent when it binds to protein aggregates. As this reagent was previously validated to detect aggresomes, we have miniaturized its use in 384-well plates and developed a method for high throughput imaging and quantification of aggresomes. Two different image analysis methods, including one with machine learning, were evaluated. They lead to similar robust data to quantify cells having aggresome, with satisfactory Z' factor values and reproducible EC50 values for compounds known to induce aggresome formation, like proteasome inhibitors. We demonstrated the relevance of this phenotypic assay by screening a chemical library of 1,280 compounds to find aggresome modulators. We obtained hits that present similarities in their structural and physicochemical properties. Interestingly some of them were previously described to modulate autophagy, which could explain their effect on aggresome structures. In summary, we have optimized and validated the Proteostat® detection reagent to easily measure aggresome formation in a miniaturized, automated, quantitative and high content assay. This assay can be used at low, middle or high throughput to quantify changes in aggresome formation that could help to understand chemical compound activity in pathologies such as protein misfolding disorders or cancer.

Introduction

Aggresomes may be defined as a subcellular structure where misfolded and aggregated proteins are accumulated by retrograde transport on microtubules, involving histone deacetylase 6 (HDAC6) and dynein.¹ Aggresomes are described as a perinuclear cytoplasmic inclusion at the microtubule-organizing center (MTOC), containing often polyubiquitinated

misfolded proteins, proteasome and molecular chaperones in a vimentin cage.^{2,3} The function of aggresomes is primarily protective because misfolded proteins are kidnapped and may be then processed by the autophagy pathway.⁴ So it is generally recognized that aggresomes contribute to cell survival.^{4,5} It has also been observed that the incubation of cells with toxic compounds such as proteasome inhibitors increases the load of misfolded proteins and induce aggresome formation.^{5,6} In this case, probably because the capacity of the cell to cope with misfolded proteins is exceeded (for instance in case of prolonged cellular stress or when the autophagy pathway is disturbed), aggresome formation is followed by cell death.

Different methods are available to monitor aggresome formation such as transmission electron microscopy, which consists in visualizing electron-dense particles close to the nucleus^{3,7} or to image fluorescent mutant proteins expected to aggregate.^{3,8} A classical method is to characterize aggresome formation by immunofluorescence of involved proteins, such as γ tubuline (a major MTOC component), ubiquitin, HSP70 (Heat shock protein 70 kDa) chaperone, vimentin etc..^{3,5,8} However these methods require protocols that are often laborious and time-consuming with many optimization steps, to obtain finally results that are most of the time not quantitative.

The Proteostat® detection reagent has been shown to detect aggresomes. This is a red fluorescent molecular rotor dye, which becomes brightly fluorescent when it binds to aggregated proteins.⁹ It has proven to be useful to detect aggresome formation related to cancer⁶ or to neurodegenerative diseases¹⁰. This reagent was initially developed for cell analysis by flow cytometry or by fluorescence microscopy with glass slides. Consequently, it is not suitable for testing many conditions such as when studying kinetic effects or for a library screening in a phenotypic assay.

In this paper we show how we have optimized the use the Proteostat® aggresome detection reagent to easily monitor aggresome formation in a miniaturized, automated and quantitative phenotypic assay. We decided to compare two different approaches for the image analysis. Indeed, we wanted to know if they would lead to the same results, and to assess if one of them was quantitatively more robust. The first one was to detect and specifically segment the aggresome itself in each cells which leads to have three mask, one for the nuclei, one for the cytoplasm and one for the aggresome. We performed this with the predefined building blocks available in Columbus™ software. The second method used both texture measurements in the cytoplasm and machine learning based method with no need to specifically segment the aggresome. The texture measurements allowed to detect cells with and without aggresome. We performed this with the machine learning based Phenoglyph™ module available in IN Carta™ software. Both have led to the same robust quantification of cells with aggresomes. This assay was finally validated by screening a chemical library of 1,280 compounds, using Columbus™.

Materials and methods

Cell Culture and reagents

All media and cell culture reagents were purchased from Gibco, Life Technologies (Courtaboeuf, France). HeLa cells (human cervical cancer cell line) were provided by ATCC

(Manassas, USA) and were grown in monolayer culture at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) GlutaMAX™, high glucose, pyruvate medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin.

OPM2 cells (human multiple myeloma cell line) were purchased from DSMZ Leibniz Institute (Braunschweig, Germany) and cultured in suspension culture at 37°C and 5% CO₂ in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) GlutaMAX medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin.

Carfilzomib was purchased from Selleck Chemicals (Houston, USA). Tunicamycin was from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Stock solutions from all compounds were made in dimethylsulfoxide (DMSO). Proteostat® aggresome detection kit was purchased from Enzo (Villeurbanne, France).

Adherent cell treatment

HeLa cells were seeded with the BioTek MicroFlo™ dispenser in CellCarrier-384 black, optically clear bottom, microplates (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) at the density of 37,500 cells/mL in 40 µL. The next day, nanodrops of compounds in DMSO were dispensed on cells with an acoustic nanodispenser (Echo 550, Labcyte, Sunnyvale, CA) and medium completed to achieve the target concentration in a final volume of 70 µL. Final concentration of DMSO did not exceed 0.3%. To avoid edge effect, plates were covered with respiring seal during incubation.

Suspension cell treatment

Nanodrops of compounds were dispensed with an acoustic nanodispenser (Echo 550, Labcyte, Sunnyvale, CA) in µClear® black 384-well plates (Greiner, Kremsmuster, Austria). Then 70 µL of OPM2 cells, in suspension at 171,000 cells/mL, were dispensed. Assay plates were incubated at 37°C, 5% CO₂. After treatment time, cells were transferred to a poly-lysine coated plate CellCarrier-384 black, optically clear bottom, and let to adhere at 37°C during 30 minutes.

Aggresome labelling

Cells were fixed by adding formaldehyde at 37%, directly in the 70 µL medium to achieve a final concentration of 3.8%, with the BioTek MicroFlo™ dispenser. After 15 minutes, cells were washed two times with 90 µL PBS (phosphate buffered saline) with a plate washer (Hydrospeed, Tecan). If needed, plates with PBS can be stored at 4°C for few days. PBS was removed and cells were permeabilized with 0.5% triton X-100, EDTA 3mM, pH 8.0 in 1X assay buffer of the Proteostat® aggresome detection kit. After 30 minutes, cells were washed 4 additional times with 50 µL PBS. After removing PBS, 20 µL of a mixture of Proteostat® detection reagent (1/1000) and Hoechst 33342 (500 ng/mL, Thermofisher) were added manually on cells. They were diluted in 1X assay buffer of Proteostat® aggresome detection kit or in PBS/BSA (Bovine serum albumin) 0.5% (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) if

reagent sticking is detected. After 30 minutes protected from light, wells were washed 3 times with 50 μ L PBS. Plates were stored at 4°C before imaging.

Image acquisition and analysis

Images were acquired on a high content screening platform (Equipex Imaginex BioMed, Institut Pasteur de Lille, France) automated with Agilent (Santa Clara, USA) with the microscope IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences) in 60X magnification in non-confocal mode with DAPI filter set (ex.405/em.455nm) and Texas Red filter set (ex.488/em.605nm). 6 to 12 images per well were collected. A screening 384-well plate was totally acquired in approximately 2h30. Images were analyzed either with Columbus software (Perkin Elmer) or with IN Carta™ software (General Electric).

Compound library

The Prestwick chemical library® was provided by Prestwick Chemical (Illkirch, France). This is a collection of 1,280 chemical compounds mainly composed of approved drugs with high chemical and pharmacological diversity. For convenience, after reception, we distributed the compounds in 10 mM DMSO either in 96-well plates or in 384-well Echo qualified source plates that we stored at -20°C. In the case of the screening detailed in this paper, we have made an intermediate plate with the compounds diluted at 70 μ M in culture medium, before to transfer them to the cell plates with a Bravo liquid handler (Agilent, Santa Clara, USA). The final concentration was 10 μ M.

Data analysis

Z' factors were calculated according to Zhang et al. using mean and standard deviations from DMSO and 60 nM carfilzomib controls¹¹. Plates were validated if their respective Z' factors were ≥ 0.4 and if percentage of positive cells with 60 nM carfilzomib were $\geq 70\%$. EC50 values of compounds were calculated from concentration-response curves by a nonlinear regression analysis at four parameters with GraphPad Prism 7.

Hit analysis

The 1280 screened compounds were clustered by chemical similarity. First, the molecular similarities were computed for each molecule pair using the Fingerprint ECFP4. These fingerprints were calculated using the MayaChemTools package¹² Then, we generated a similarity matrix that we used to cluster the compounds using a hierarchical cluster analysis using the “complete” method to build the dendrogram (shown in the supplementary information Fig S2). The clustering was achieved using the R statistical language¹³ Finally, compounds were arbitrary splitted into 50 distinct clusters.

Different physicochemical properties were calculated: molecular weight, cLogP, pKa, total surface area, relative polar surface area, number of H-bond donors, number of H-bond acceptors, number of rotatable bonds, number of aromatic rings, number of aromatic atoms,

and number of rings. All but pKa were calculated with Datawarrior.¹⁴ The Cxcalc calculator plugin was used for the pKa prediction, Marvin (19.26.0), 2019, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

Results

Aggresome Detection

We have designed procedures and conditions to use the Proteostat® detection reagent for image-based high content screening applications. HeLa cells were fixed in 384-well plates with formaldehyde and permeabilized with triton X100. After washing steps, the cells were stained with the Proteostat® detection reagent diluted at 1/1000 in a PBS/BSA 0.5% buffer containing 500 ng/mL Hoechst 33342 (to label the nuclei). 60 X images were acquired with the automated IN Cell Analyzer 6000 microscope with DAPI filter and Texas red filters. Details about the protocol are shown in **Table 1**. To measure the effect of compounds on aggresome formation, we added them 24 hours post cell seeding directly in the medium by acoustic droplet injection with an Echo dispenser. Cells were then incubated at 37°C, 5% CO₂ and fixed after different periods of time.

In comparison to the protocol given by the supplier, we have lowered by 2 fold the reagent concentration and found the sufficient fluorescent intensity to clearly label the aggresomes in cells treated with 10µM MG132, that is used as a reference positive control (data not shown). The washing protocol was also changed to automate this step with a plate washer. Importantly the use of 384-well plates instead of glass slides let us to increase the number of conditions simultaneously tested and globally the throughput of the assay by using automated liquid handlers and plate readers.

Step	Parameter	Volume	Time	Description
I. Cell culture and treatment				
1	Cell dispense	40µL		Dispense adherent cells (HeLa : 1500 cells/w) in 384 well plate
2	Incubation		24H	37°C, 5% CO ₂
3	Compound and medium dispense	X nL + 30µL		Test compounds are added by an Echo dispense for final volume of 70µL
4	Incubation		Variable	37°C, 5% CO ₂
II. Aggresome detection				
1	Fixation	8µL	15 min	Add 8µL formaldehyde solution at 37% with a plate dispenser in each well for 3.8% final concentration
2	Washing	90µL		Wash 2 times with PBS with a plate washer. Stop at 4°C is possible
3	Permeabilization	20µL	30 min	Remove PBS and add permeabilizing solution (0.5% Triton X-100 ; EDTA 3mM, pH 8.0) with a plate dispenser
4	Washing	50µL		Wash 4 times with PBS with a plate washer
5	Staining	20µL		Remove PBS and add solution with Proteostat

			reagent manually Detection reagent diluted at 1/1000 in PBS/BSA 0.5% and Hoechst for 500ng/mL final concentration.
6 Incubation		30 min	Protect plates from light
7 Washing	50µL		Remove solution and wash 3 times with PBS with plate washer
8 Image acquisition			Image are acquired on an automated high screening platform (Equipex Imaginex BioMed, Institut Pasteur de Lille) with the microscope IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences) in 60X magnification in non-confocal mode with DAPI filter set and Texas Red filter set
9 Image analysis			Image are analysed with the software Columbus©

Table 1: HCS aggresome detection protocol.

Image Analysis for Aggresome Quantification

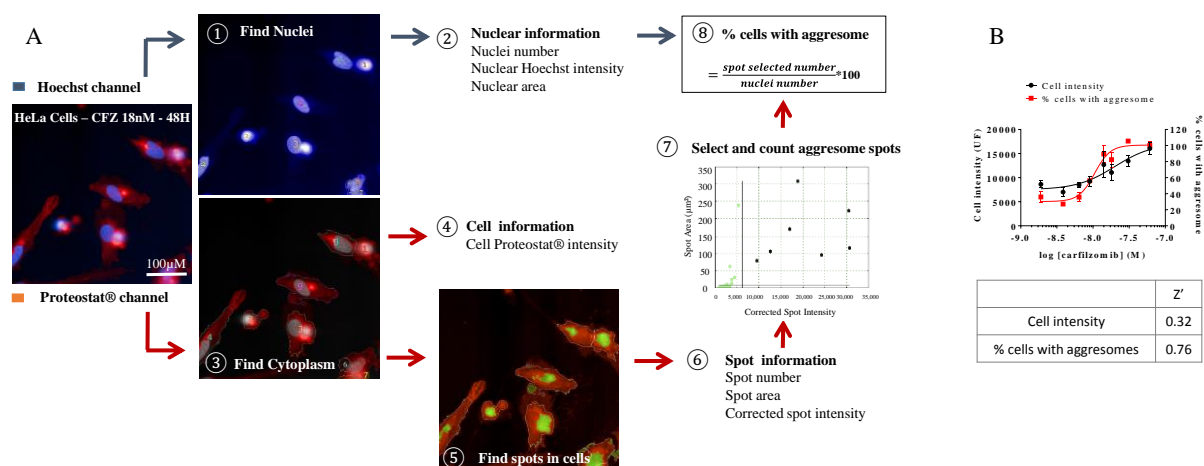


Figure 1: Image analysis for aggresome quantification with Columbus™. HeLa cells were incubated 48h with varied concentrations of carfilzomib. After labelling with Proteostat® and Hoechst 33342, images (60X) were acquired with IN Cell Analyzer 6000. **Fig 1A** shows the script developed with Columbus™ (1) Nuclei detection with Hoechst blue channel and (2) measurement of some nuclear information; (3) Cytoplasm detection with Proteostat® red channel and (4) measurement of cellular Proteostat intensity; (5) DsRed spots are found by a pre-defined building block and (6) intense and large perinuclear spots (area superior to 15µm²) spots, that are considered to be aggresomes, are (7) selected and counted to (9) calculate the percentage of cells with aggresome. **Fig 1B** compares the concentration dependent effect of carfilzomib on Proteostat® cell intensity vs effect on percentage of cells with aggresome. Data are mean ± SD, n=3 wells. Z' factors calculated with the highest concentration of carfilzomib and vehicle are given. Scale bars: 100 µm (60x magnification).

To analyze images, we have used two different softwares used for high content screening to generate statistically-significant, quantitative and multi-parametric data in a fast and automated way.

First we created a script with the Columbus™ software developed by Perkin Elmer. In this system we used predefined building blocks to perform image segmentation and analyze

the cell phenotype. As described in **Fig 1** the script starts by the identification of nuclei using the Hoechst 33342 channel (ex.405/em.455nm). Different nuclei parameters were measured at this step because they are indicators of cell viability: for instance nuclei count and nuclei area decrease with apoptosis and death, when Hoechst intensity generally increases. In a second time, we defined the cytoplasm using the Proteostat® channel (ex.488/em.605nm) and we measured the mean intensity of Proteostat® reagent in the cells. However we observed that the variation of the mean fluorescence intensity between positive cells (treated with proteasome inhibitors at a concentration and a treatment time that induce aggresome formation) and negative control cells (treated with vehicle DMSO) was low. In consequence, the mean fluorescence intensity in cells would not be a robust discriminating parameter for screening applications, and we went further in the script development using another Columbus functionality to detect spots of aggregated proteins in the cells. By comparing Proteostat® intensity in positive and negative control cells, we have considered that an intense and wide fluorescent spot localized at perinuclear level should correspond to an aggresome. So, we put two thresholds based on spot intensity and spot area, to select and count specific aggresome- spots. In particular, we used the corrected spot intensity provided by Columbus™ software, which corresponds to the difference between mean spot intensity and spot background intensity. By dividing the number of aggresomes by the number of nuclei we obtained the percentage of cells with aggresome, which was a better parameter for screening application than the mean fluorescence intensity in cells value. It is possible that this improvement is related to the fact that the spot detection is based on corrected spot intensity which takes into account the background intensity of the spot. Most of the time, the script found one aggresome per cell, but it happened that two spots were selected in the same cell. That explains why sometimes we have obtained a value for the percentage of cells with aggresome slightly higher than 100%.

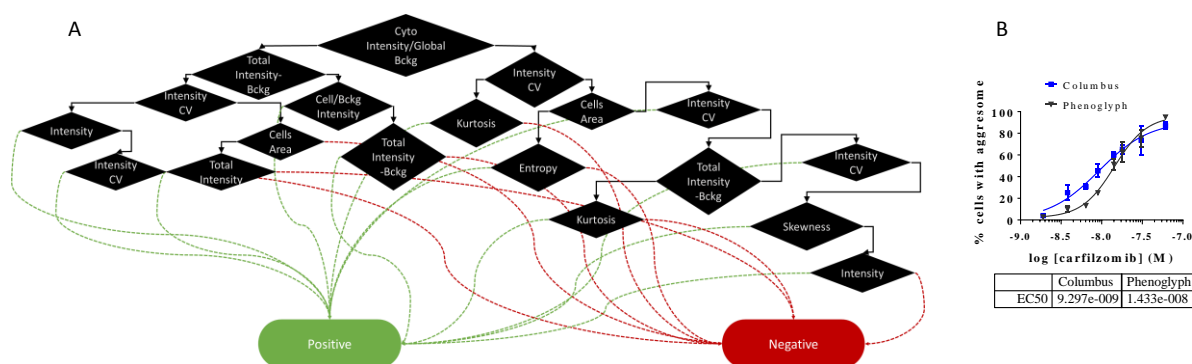


Figure 2: Image analysis for aggresome quantification with Phenoglyph™. **Fig 2A** shows which measurements were used to discriminate positive and negative cells, and highlights complexity of the random forest classification. **B.** Dose-response curves of carfilzomib in Hela cells after 48h incubation. Images were analyzed for aggresome quantification with Columbus™ or Phenoglyph™. Data are given as percentage of cells with aggresome (mean ± SEM, n=3 wells). Bckg: background, CV: coefficient of variability, Cyto: cytoplasm.

Alternatively, a plate with cells treated or not with varied concentration of carfilzomib have been analyzed with IN Carta™ software (General Electric) using the Phenoglyph™ module. Each treatment was performed in triplicate wells and 6 images containing from 31

(for high concentration of carfilzomib) to 197 total nuclei (for vehicle treatment) were acquired per well. Phenoglyph™ is a machine learning based classification combining several features that allows integrating and addressing phenotypic cell complexity. In this case only nuclei and cytoplasm were detected and all possible features including texture measurement were extracted to be processed by this module. After a first unsupervised step where the software shows the different cell populations found, we trained the module to recognize cells with aggresome based on positive and negative control phenotypes (**Fig 2A**). After defining these populations, the software gave us the similarity into a population for classifying cells. The importance of each parameter to discriminate positive and negative cells is presented in Table S1. Finally, results are given as percentage of positive cells with aggresome per well and pEC50 values were calculated by fitting these percentages of positive cells as a function of carfilzomib concentrations. In this experiment pEC50 values and confident intervals at 95% were 7.8 [7.7-7.9] and 8.0 [7.7-8.2] for Phenoglyph™ and Columbus™, respectively, so that we could conclude that both image analysis softwares gave similar data (**Fig 2B**).

In the following experiments presented in this manuscript, images were analyzed with the Columbus software because of its availability in our laboratory.

To evaluate our method, we have performed several separate dose response experiments using carfilzomib and tunicamycin as reference compounds because they were expected to induce aggresome formation. It is known that the inhibition of proteasome by compounds like MG132 or carfilzomib lead to the accumulation of misfolded proteins in the cytoplasm. These misfolded, and possibly toxic, proteins can then be transported towards the MTOC to form the aggresome before their degradation via the autophagic pathway.² **Fig 3** shows aggresome detection in our miniaturized image-based assay leads to a fine quantification of positive cells that allows the determination of robust EC50 values. An equivalent conclusion comes from the results obtained with Tunicamycin, a N-glycosylation inhibitor, reported also to induce the formation of misfolded proteins.^{15,16} In these experiments pEC50 values and confident intervals at 95% were 7.9 [7.7-8.0] and 6.3 [6.2-6.4] for carfilzomib and tunicamycin, respectively. So with this method we can determine the potency and the efficacy of compounds in a reproducible manner despite the variation of reagent intensity between the experiments.

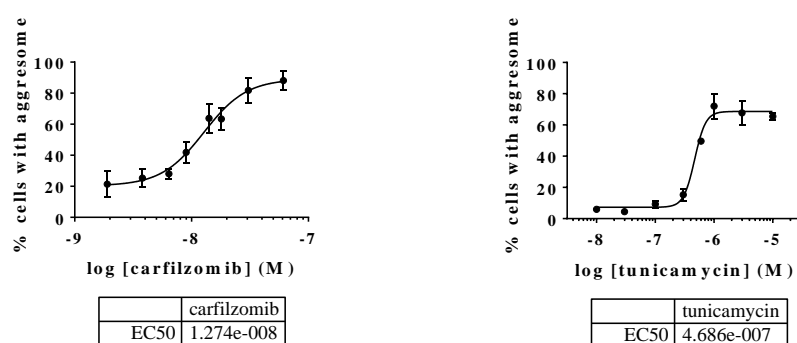


Figure 3: Dose response of carfilzomib and tunicamycin in HeLa cells after 48h of treatment. Images were analyzed on Columbus™ software. Percentage of cells with aggresomes is given as mean \pm SEM of 3 (tunicamycin) to 4 (carfilzomib) independent experiments, each performed with triplicate incubates.

HeLa cells are adherent cells quite easy to image. So we wanted to know if this method could apply to cells in suspension, such as OPM2 cells, a multiple myeloma cell line (**Fig S1**). We show that despite the fact that OPM2 cells have a narrow cytoplasm area, it is possible by selecting intense spots to quantify the number of cells with aggresome. However, the unsatisfactory Z' factor of -0.76 calculated for the non-adherent cell experiment indicates that this measure is much less robust than for adherent cells.

High content screening for aggresome modulators identification

After finding that our method was quantitative, we went further in the evaluation of the applicability of the assay to screen chemical libraries. But first it was required to check for possible plate effects. So we performed a checkerboard experiment with HeLa cells treated or not with 60 nM carfilzomib for 48h and we calculated the Z' factor. In the first experiment, we observed border effects and some Proteostat® reagent binding to plastics. To deal with these problems, we decided to seal the plates during the incubation with the compound and we diluted the reagent with 0.5% of BSA. Using these new conditions, we obtained a satisfactory Z' value of 0.5 and no border effects.

1,280 compounds of the Prestwick library were screened at the concentration of 10 μ M for 48h in order to measure their capacity to induce aggresome formation. 12 images were acquired per well and analyzed with the script developed on the Columbus™ software. Z' factor of 0.57 and an average percentage of aggresome positive cells of $96.6\% \pm 1.3$ for the reference compound carfilzomib were obtained (**Fig 4A**). Two thresholds were set to discriminate primary hits. We selected compounds that induced more than 50% of aggresome positive cells but discarded in this group those who reduced the number of nuclei in an extent higher than carfilzomib. Indeed, the robustness of the image analysis and calculation would decrease if the number of analyzed objects became too low. So 59 compounds were selected as primary hits and advanced in confirmatory sequential steps, including (1) repeat single-dose testing in triplicate, (2) dose-responsive effect and confirmation of identity and purity of the library samples. In addition we checked also that these positives were not auto-fluorescent by testing them without Proteostat® staining. After step (1), it remained 37 compounds (**Fig 4B**) and, after step (2), 28 hits with EC50 values in the micromolar range (**Fig 4C** and **Table S2**). As examples, **Fig 4D** shows images and curves obtained with increasing concentrations of perphenazine, tamoxifene and loperamide. pEC50 values and confident intervals at 95% were 5.4 [5.4-5.5], 5.3 [5.2-5.4] and 5.4 [5.3-5.5] for perphenazine tamoxifene and loperamide, respectively.

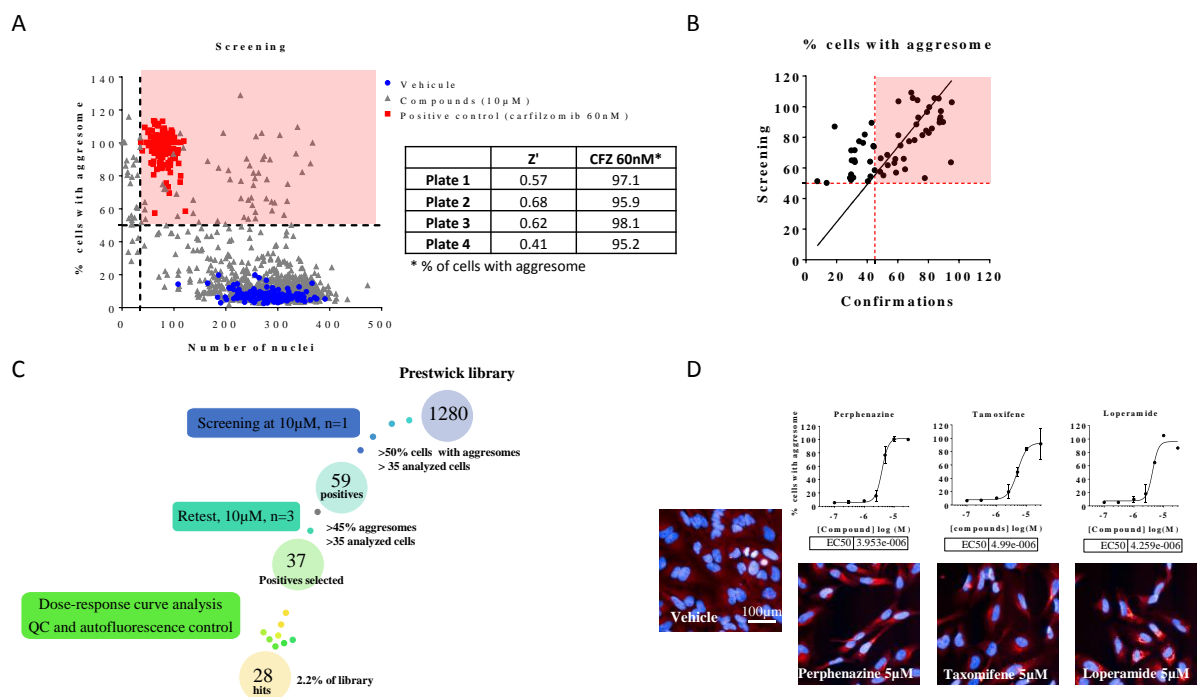


Figure 4: Screening of the Prestwick chemical library. HeLa cells were treated with 10 μ M compounds for 48 hours and then labelled with proteostat@ and Hoechst 33342. Images were acquired with IN Cell Analyzer 6000 and analysed with the script developed using ColumbusTM. **A.** Scatter plot analysis of 1,280 compounds of the Prestwick library. Thresholds for positive compound selection are represented by dotted line on the percentage of cells with aggresome (>50%) and on the number of nuclei (>35 nuclei). **B.** Scatter plot analysis of the 59 initial positive compounds. Data in retest experiments (10 μ M, n=3) are shown vs data obtained during the screening. Threshold for further compound selection is represented by dotted line on the percentage of cells with aggresome (>45%) which leads to 37 compounds for dose-response studies. **C.** Flow chart **D.** Images with same contrast and dose-response curves of perphenazine, tamoxifene and loperamide as examples of hits. Scale bars: 100 μ m (60x magnification).

Aggresome modulators characterization

The hits found from this screen belong mainly to the anti-H1 and antipsychotic pharmacological classes of drugs (**Table S1**). However, their effect on aggresome formation seems more related to structural similarities than to their belonging to pharmacological classes.

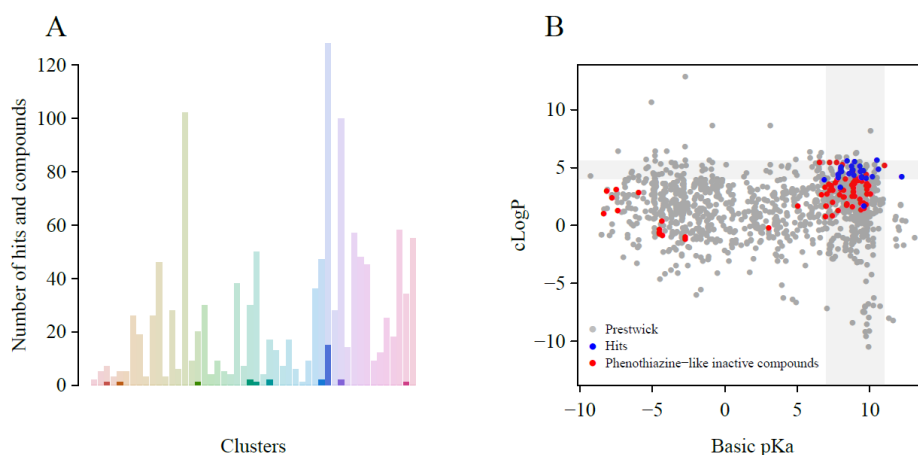


Figure 5 : A. The histogram represents the number of compounds (slightly transparent) and hits (fully opaque) in 50 characteristic clusters obtained by the hierarchical ascendant classification, based on the molecule structure similarities, of the 1280 screened compounds. The molecule pair similarities are measured using the ECFP4 fingerprint and the Tanimoto coefficient. The blue cluster that has 15 hits gathers phenothiazine-like compounds. **Fig 5B** shows the basic pKa and the cLogP of the 1280 screened compounds. The 28 hits are colored in blue. Inactive compounds of the cluster that gathers 15 hits are colored in red.

Indeed, we performed a hierarchical ascendant clustering in order to group the 1280 screened compounds by structural similarities. We clustered the library into 50 clusters and identified a cluster that gathers 15 of 28 hits. Other hits clustered into different clusters (**Fig 5A**). These 15 compounds are related to the phenothiazine and phenothiazine-like scaffolds. This cluster has 128 compounds but many of them were not active compounds. Aiming to highlight some additional specific feature of the hits, we calculated different physicochemical properties.

The cLogP of almost all of the 28 hits are gathered in a narrow range around 4,0 and 5,6. These 28 hits also exhibit characteristic pKa values, most of them lying between 7 and 11 (**Fig 5B**). In contrast, most of the inactive compounds of the phenothiazine-like cluster exhibit lower cLogP values, and some of them lower pKa values. These two physicochemical properties allow to quite well discriminate hits from inactive compounds.

These hits could correspond to lysosomotropic compounds.^{17,18} Lysosomotropic molecules are characterized as basic compounds that accumulate in acidic organelles like lysosomes. In particular, due to their high lipophilicity, these compounds could belong to class-II lysosomotropic compounds. Interestingly, some of the hits are already described as lysosomotropic compounds like perphenazine, fluphenazine, desloratadine and astemizole.^{17,19} These compounds are known to perturb cholesterol transport and to perturb autophagy flux¹⁹, that could explain the observed increase in aggresome formation. Moreover, the structure of these hits could correspond to the scaffold described to modulate autophagy, with two biphenyl core hydrophobic and a linker with a tertiary amine.²⁰ Interestingly most of the hits that we obtained are described in the literature to modulate autophagy, a phenotype that is more studied than aggresome modulation.²¹ One of our hits is tamoxifen, a Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM), which was already described to induce aggresome formation. So our results are in line with the literature.⁹ We found two other SERM drugs as aggresome inducers, clomiphene and raloxifene. All these SERM are described in the literature to modulate autophagy flux.²²⁻²⁴ Unexpectedly, loperamide was found active in our assay, whereas it is described by others to not induce aggresomes.⁹ This difference might be due to the different treatment time, more extended in our case. It is important to remember that aggresome structures are dynamic and depend of a balance between its formation and its degradation by the autophagy pathway. Having in hand a miniaturized, automated protocol allows to perform comprehensive and experimental plans combining various time points and compound concentrations. This should improve the description and understanding of the pharmacological effect(s) of compounds.

To go further, several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, are characterized by accumulated aggregates^{25,26} which have been shown to be labelled in cells by the Proteostat® reagent.^{9,27} We therefore believe that our miniaturized and quantitative method could be helpful to screen and find compounds that

decrease these harmful aggregates. In addition, this image-based assay allows multiple fluorescent readouts and so the simultaneous analysis of other relevant markers.

Acknowledgements

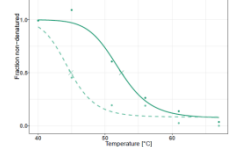
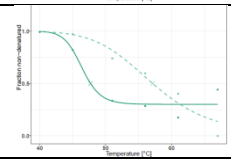
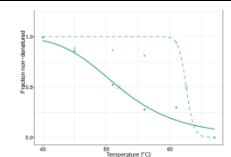
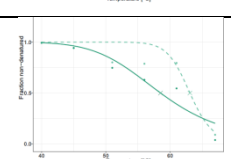
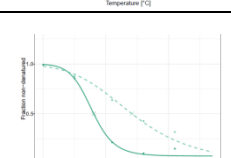
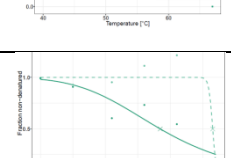
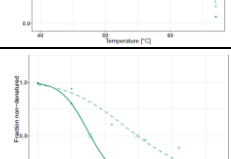
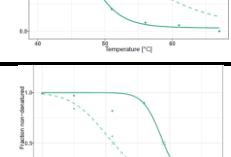
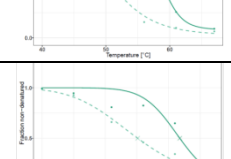
We thank Misha Bashkurov and Prashanth Dumpuri, GE Healthcare for assistance with IN Carta™. We thank Enzo Life Sciences, Inc. for advice about Proteostat® use and commercial support. We thank Alexandre Vandeputte for its help on the automated HCS ImaginEx platform (supported by the Feder 12001407 D-AL and the Agence Nationale de la Recherche ANR-10-EQPX-04-01).

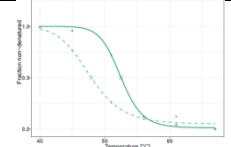
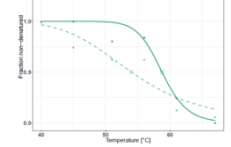
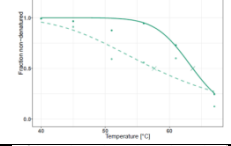
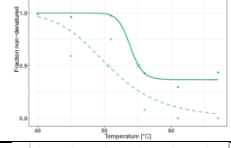
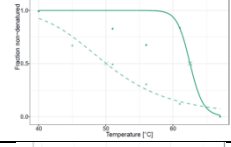
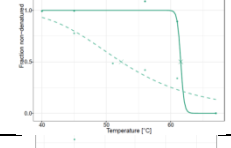
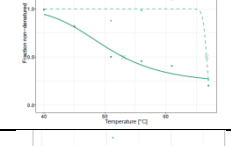
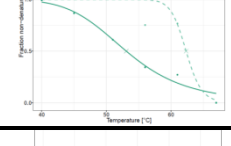
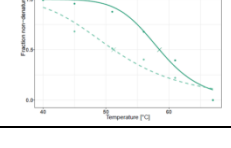
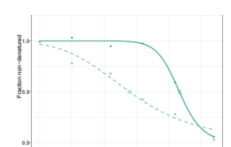
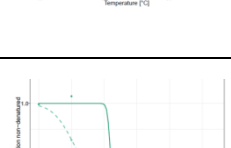
References

1. Kawaguchi, Y.; Kovacs, J. J.; McLaurin, A.; et al. The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell* 2003, 115 (6), 727–738.
2. Johnston, J. A.; Ward, C. L.; Kopito, R. R. Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *J. Cell Biol.* 1998, 143 (7), 1883–1898.
3. García-Mata, R.; Bebök, Z.; Sorscher, E. J.; et al. Characterization and Dynamics of Aggresome Formation by a Cytosolic GFP-Chimera. *J. Cell Biol.* 1999, 146 (6), 1239–1254.
4. Hyttinen, J. M. T.; Amadio, M.; Viiri, J.; et al. Clearance of Misfolded and Aggregated Proteins by Aggrephagy and Implications for Aggregation Diseases. *Ageing Res. Rev.* 2014, 18, 16–28.
5. Nawrocki, S. T.; Carew, J. S.; Pino, M. S.; et al. Aggresome Disruption: A Novel Strategy to Enhance Bortezomib-Induced Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* 2006, 66 (7), 3773–3781.
6. Malek, M. A. Y. A.; Jagannathan, S.; Malek, E.; et al. Molecular Chaperone GRP78 Enhances Aggresome Delivery to Autophagosomes to Promote Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Oncotarget* 2015, 6 (5), 3098–3110.
7. Kopito, R. R. Aggresomes, Inclusion Bodies and Protein Aggregation. *Trends Cell Biol.* 2000, 10 (12), 524–530.
8. Taylor, J. P.; Tanaka, F.; Robitschek, J.; et al. Aggresomes Protect Cells by Enhancing the Degradation of Toxic Polyglutamine-Containing Protein. *Hum. Mol. Genet.* 2003, 12 (7), 749–757.
9. Shen, D.; Coleman, J.; Chan, E.; et al. Novel Cell- and Tissue-Based Assays for Detecting Misfolded and Aggregated Protein Accumulation Within Aggresomes and Inclusion Bodies. *Cell Biochem. Biophys.* 2011, 60 (3), 173–185.
10. Schattling, B.; Engler, J. B.; Volkmann, C.; et al. Bassoon Proteinopathy Drives Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Nat. Neurosci.* 2019, 22 (6), 887–896.
11. Zhang, J.H.; Chung, T.D.; Oldenburg, K.R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* 1999, 4 (2), 67–73.
12. Sud, M. MayaChemTools: An Open Source Package for Computational Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 2016, 56 (12), 2292–2297.

13. R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2019.
14. Sander, T.; Freyss, J.; von Korff, M.; et al. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* 2015, 55 (2), 460–473.
15. Liu, X.-D.; Ko, S.; Xu, Y.; et al. Transient Aggregation of Ubiquitinated Proteins Is a Cytosolic Unfolded Protein Response to Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 2012, 287 (23), 19687–19698.
16. Guha, P.; Kaptan, E.; Gade, P.; et al. Tunicamycin Induced Endoplasmic Reticulum Stress Promotes Apoptosis of Prostate Cancer Cells by Activating MTORC1. *Oncotarget* 2017, 8 (40), 68191–68207.
17. Kuzu, O. F.; Toprak, M.; Noory, M. A.; et al. Effect of Lysosomotropic Molecules on Cellular Homeostasis. *Pharmacol. Res.* 2017, 117, 177–184.
18. Lu, S.; Sung, T.; Lin, N.; et al. Lysosomal Adaptation: How Cells Respond to Lysosomotropic Compounds. *PLOS ONE* 2017, 12 (3), e0173771..
19. Kuzu, O. F.; Gowda, R.; Noory, M. A.; et al. Modulating Cancer Cell Survival by Targeting Intracellular Cholesterol Transport. *Br. J. Cancer* 2017, 117 (4), 513–524.
20. Tsvetkov, A. S.; Miller, J.; Arrasate, M.; et al. A Small-Molecule Scaffold Induces Autophagy in Primary Neurons and Protects against Toxicity in a Huntington Disease Model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010, 107 (39), 16982–16987.
21. Li, Y.; McGreal, S.; Zhao, J.; et al. A Cell-Based Quantitative High-Throughput Image Screening Identified Novel Autophagy Modulators. *Pharmacol. Res.* 2016, 110, 35–49.
22. Li, W.; Lin, J.; Shi, Z.; et al. Clomiphene Citrate Induces Nuclear Translocation of the TFEB Transcription Factor and Triggers Apoptosis by Enhancing Lysosomal Membrane Permeabilization. *Biochem. Pharmacol.* 2019, 162, 191–201.
23. Kim, D. E.; Kim, Y.; Cho, D.-H.; et al. Raloxifene Induces Autophagy-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells via the Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Mol. Cells* 2015, 38 (2), 138–144.
24. de Medina, P.; Silvente-Poirot, S.; Poirot, M. Tamoxifen and AEBS Ligands Induced Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells through the Stimulation of Sterol Accumulation. *Autophagy* 2009, 5 (7), 1066–1067.
25. Waelter, S.; Boeddrich, A.; Lurz, R.; et al. Accumulation of Mutant Huntingtin Fragments in Aggresome-like Inclusion Bodies as a Result of Insufficient Protein Degradation. *Mol. Biol. Cell* 2001, 12 (5), 1393–1407.
26. Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease. *Nat. Med.* 2004, 10 Suppl, S10-17.
27. Patton, W. F.; Shen, D.; Tian, K. A Red-Emitting Fluorescent Probe for Rapid Detection of Protein and Peptide Aggregates in Post-Mortem Human Brain Tissue Sections from Patients Diagnosed with Alzheimer's and Parkinson's Disease. 8.

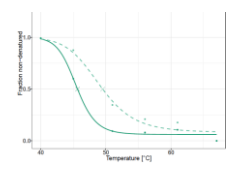
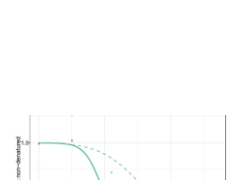
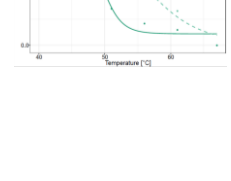
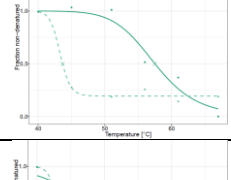
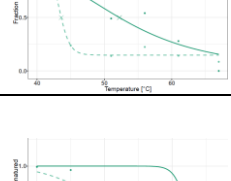
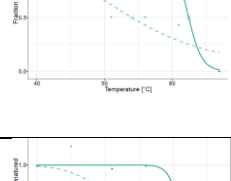
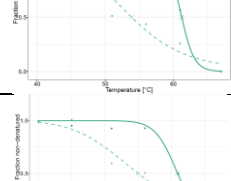
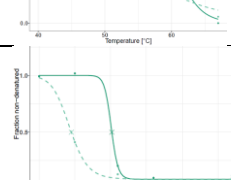
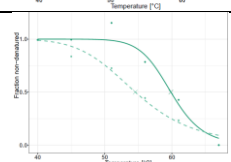
Annexe 2 : Liste des 56 protéines présentant une pVal_adj inférieure à 5% lors de l'expérience de TPP-TR sur les cellules OPM2. Le tableau présente le nom de la protéine, la courbe d'agrégation (avec en vert foncé la courbe correspondant au composé A à 15µM, en pointillé vert le véhicule), et une description de ses fonctions par la base de données UniProt. Le remplissage vert correspond à une stabilisation de la protéine par le composé A et en rouge à une déstabilisation.

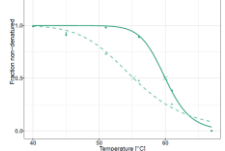
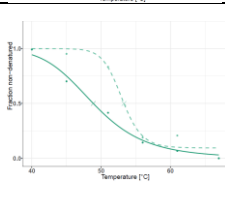
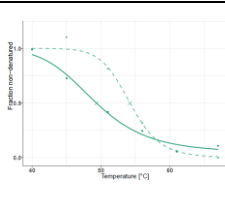
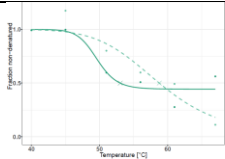
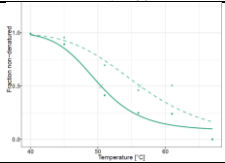
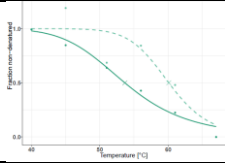
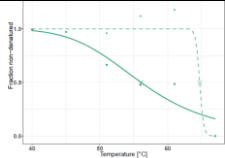
Lien	Protéine ID	Courbe d'agrégation	Description par la base de données UniProt
Protéasome	PSMD5		Acts as a chaperone during the assembly of the 26S proteasome, specifically of the base subcomplex of the PA700/19S regulatory complex (RC). In the initial step of the base subcomplex assembly is part of an intermediate PSMD5:PSMC2:PSMC1:PSMD2 module which probably assembles with a PSMD10:PSMC4:PSMC5:PAAF1 module followed by dissociation of PSMD5.
	VCIPI1		Acts as a deubiquitinating enzyme. Necessary for VCP-mediated reassembly of Golgi stacks after mitosis. May play a role in VCP-mediated formation of transitional endoplasmic reticulum (tER). Mediates dissociation of the ternary complex containing STX5A, NSF11C and VCP (By similarity). Hydrolyzes 'Lys-11'- and 'Lys-48'-linked polyubiquitin chains.
	UBR4		E3 ubiquitin-protein ligase which is a component of the N-end rule pathway. Recognizes and binds to proteins bearing specific N-terminal residues that are destabilizing according to the N-end rule, leading to their ubiquitination and subsequent degradation. Together with clathrin, forms meshwork structures involved in membrane morphogenesis and cytoskeletal organization. Regulates integrin-mediated signaling. May play a role in activation of FAK in response to cell-matrix interactions. Mediates ubiquitination of ACLY, leading to its subsequent degradation.
	PSMA3		Component of the 20S core proteasome complex involved in the proteolytic degradation of most intracellular proteins. This complex plays numerous essential roles within the cell by associating with different regulatory particles. [...]
	STAMBP		Zinc metalloprotease that specifically cleaves 'Lys-63'-linked polyubiquitin chains. Does not cleave 'Lys-48'-linked polyubiquitin chains (By similarity). Plays a role in signal transduction for cell growth and MYC induction mediated by IL-2 and GM-CSF. Potentiates BMP (bone morphogenetic protein) signaling by antagonizing the inhibitory action of SMAD6 and SMAD7. Has a key role in regulation of cell surface receptor-mediated endocytosis and ubiquitin-dependent sorting of receptors to lysosomes. Endosomal localization of STAMBP is required for efficient EGFR degradation but not for its internalization (By similarity). Involved in the negative regulation of PI3K-AKT-mTOR and RAS-MAP signaling pathways.
	PSMB4		Component of the 20S core proteasome complex involved in the proteolytic degradation of most intracellular proteins. This complex plays numerous essential roles within the cell by associating with different regulatory particles. [...]
	IRF2BPL		Probable E3 ubiquitin protein ligase involved in the proteasome-mediated ubiquitin-dependent degradation of target proteins (PubMed:29374064). Through the degradation of CTNNB1, functions downstream of FOXF2 to negatively regulate the Wnt signaling pathway (PubMed:29374064). Probably plays a role in the development of the central nervous system and in neuronal maintenance (Probable). Also acts as a transcriptional regulator of genes controlling female reproductive function. May play a role in gene transcription by transactivating GNRH1 promoter and repressing PENK promoter (By similarity).
Acides aminés / peptidases	DPP3		Cleaves and degrades bioactive peptides, including angiotensin, Leu-enkephalin and Met-enkephalin. Also cleaves Arg-Arg-beta-naphthylamide (in vitro)
	LAP3		Presumably involved in the processing and regular turnover of intracellular proteins. Catalyzes the removal of unsubstituted N-terminal amino acids from various peptides. [...] Binds 2 zinc ions per subunit. One zinc ion is tightly bound and essential for enzyme activity, while the second metal coordination site can be occupied by zinc, magnesium or manganese to give enzymes of different activities.

	DGLUCY		D-glutamate cyclase that converts D-glutamate to 5-oxo-D-proline.
	QDPR		The product of this enzyme, tetrahydrobiopterin (BH-4), is an essential cofactor for phenylalanine, tyrosine, and tryptophan hydroxylases.
	TRMT1		Dimethylates a single guanine residue at position 26 of most tRNAs using S-adenosyl-L-methionine as donor of the methyl groups.
	MTHFD1L		May provide the missing metabolic reaction required to link the mitochondria and the cytoplasm in the mammalian model of one-carbon folate metabolism in embryonic an transformed cells complementing thus the enzymatic activities of MTHFD2.
	KLK7		May catalyze the degradation of intercellular cohesive structures in the cornified layer of the skin in the continuous shedding of cells from the skin surface. Specific for amino acid residues with aromatic side chains in the P1 position. Cleaves insulin A chain at '14-Tyr- -Gln-15' and insulin B chain at '6-Leu- -Cys-7', '16-Tyr- -Leu-17', '25-Phe- -Tyr-26' and '26-Tyr- -Thr-27'. Could play a role in the activation of precursors to inflammatory cytokines.
	HIBADH		3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial. This protein is involved in the pathway L-valine degradation, which is part of Amino-acid degradation.
	APIP		Catalyzes the dehydration of methylthioribulose-1-phosphate (MTRU-1-P) into 2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate (DK-MTP-1-P). Functions in the methionine salvage pathway, which plays a key role in cancer, apoptosis, microbial proliferation and inflammation. May inhibit the CASP1-related inflammatory response (pyroptosis), the CASP9-dependent apoptotic pathway and the cytochrome c-dependent and APAF1-mediated cell death.
	ETFB		Heterodimeric electron transfer flavoprotein that accepts electrons from several mitochondrial dehydrogenases, including acyl-CoA dehydrogenases, glutaryl-CoA and sarcosine dehydrogenase. It transfers the electrons to the main mitochondrial respiratory chain via ETF-ubiquinone oxidoreductase (Probable). Required for normal mitochondrial fatty acid oxidation and normal amino acid metabolism. ETFB binds an AMP molecule that probably has a purely structural role.
Trafic cellulaire	ATP6V1D		Subunit of the peripheral V1 complex of vacuolar ATPase. Vacuolar ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells, thus providing most of the energy required for transport processes in the vacuolar system (By similarity). May play a role in cilium biogenesis through regulation of the transport and the localization of proteins to the cilium.
	ARF1		GTP-binding protein involved in protein trafficking among different compartments. Modulates vesicle budding and uncoating within the Golgi complex. Deactivation induces the redistribution of the entire Golgi complex to the endoplasmic reticulum, suggesting a crucial role in protein trafficking. In its GTP-bound form, it triggers the association with coat proteins with the Golgi membrane. The hydrolysis of ARF1-bound GTP, which is mediated by ARFGAPs proteins, is required for dissociation of coat proteins from Golgi membranes and vesicles. The GTP-bound form interacts with PICK1 to limit PICK1-mediated inhibition of Arp2/3 complex activity; the function is linked to AMPA receptor (AMPA) trafficking, regulation of synaptic plasticity of excitatory synapses and spine shrinkage during long-term depression (LTD).
	SEC24D		Component of the coat protein complex II (COPII) which promotes the formation of transport vesicles from the endoplasmic reticulum (ER). The coat has two main functions, the physical deformation of the endoplasmic reticulum membrane into vesicles and the selection of cargo molecules for their transport to the Golgi complex. Plays a central role in cargo selection within the COPII complex and together with SEC24C may have a different specificity compared to SEC24A and SEC24B. May more specifically package GPI-anchored proteins through the cargo receptor TMED10. May also be specific for IxM motif-containing cargos like the SNAREs GOSR2 and STX5.

	EML2		Tubulin binding protein that inhibits microtubule nucleation and growth, resulting in shorter microtubules.
	DCTN4		Could have a dual role in dynein targeting and in ACTR1A/Arp1 subunit of dynactin pointed-end capping. Could be involved in ACTR1A pointed-end binding and in additional roles in linking dynein and dynactin to the cortical cytoskeleton.
	TUBB2B		Tubulin is the major constituent of microtubules. It binds two moles of GTP, one at an exchangeable site on the beta chain and one at a non-exchangeable site on the alpha chain (By similarity). Plays a critical role in proper axon guidance in both central and peripheral axon tracts. Implicated in neuronal migration.
	SNX17		Critical regulator of endosomal recycling of numerous surface proteins, including integrins, signaling receptor and channels. Binds to NPxY sequences in the cytoplasmic tails of target cargos. Associates with retriever and CCC complexes to prevent lysosomal degradation and promote cell surface recycling of numerous cargos such as integrins ITGB1, ITGB5 and their associated alpha subunits. Also required for maintenance of normal cell surface levels of APP and LRP1. Interacts with membranes containing phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3P)).
	CTBP1		Corepressor targeting diverse transcription regulators such as GLIS2 or BCL6. Has dehydrogenase activity. Involved in controlling the equilibrium between tubular and stacked structures in the Golgi complex. Functions in brown adipose tissue (BAT) differentiation.
ARN/Traduction	ELOC		SIII, also known as elongin, is a general transcription elongation factor that increases the RNA polymerase II transcription elongation past template-encoded arresting sites. Subunit A is transcriptionally active and its transcription activity is strongly enhanced by binding to the dimeric complex of the SIII regulatory subunits B and C (elongin BC complex). In embryonic stem cells, the elongin BC complex is recruited by EPOP to Polycomb group (PcG) target genes in order generate genomic region that display both active and repressive chromatin properties, an important feature of pluripotent stem cells (By similarity).The elongin BC complex seems to be involved as an adapter protein in the proteasomal degradation of target proteins via different E3 ubiquitin ligase complexes, including the von Hippel-Lindau ubiquitination complex CBC(VHL). By binding to BC-box motifs it seems to link target recruitment subunits, like VHL and members of the SOCS box family, to Cullin/RBX1 modules that activate E2 ubiquitination enzymes.
	SRSF10		Splicing factor that in its dephosphorylated form acts as a general repressor of pre-mRNA splicing. Seems to interfere with the U1 snRNP 5'-splice recognition of SNRNP70. Required for splicing repression in M-phase cells and after heat shock. Also acts as a splicing factor that specifically promotes exon skipping during alternative splicing (PubMed:26876937). Interaction with YTHDC1, a RNA-binding protein that recognizes and binds N6-methyladenosine (m6A)-containing RNAs, prevents SRSF10 from binding to its mRNA-binding sites close to m6A-containing regions, leading to inhibit exon skipping during alternative splicing. May be involved in regulation of alternative splicing in neurons, with isoform 1 acting as a positive and isoform 3 as a negative regulator.
	PIN4		Isoform 1 is involved as a ribosomal RNA processing factor in ribosome biogenesis. Binds to tightly bent AT-rich stretches of double-stranded DNA. Isoform 2 binds to double-stranded DNA.
	EIF6		Binds to the 60S ribosomal subunit and prevents its association with the 40S ribosomal subunit to form the 80S initiation complex in the cytoplasm. Behaves as a stimulatory translation initiation factor downstream insulin/growth factors. Is also involved in ribosome biogenesis. Associates with pre-60S subunits in the nucleus and is involved in its nuclear export. Cytoplasmic release of TIF6 from 60S subunits and nuclear relocalization is promoted by a RACK1 (RACK1)-dependent protein kinase C activity. In tissues responsive to insulin, controls fatty acid synthesis and glycolysis by exerting translational control of adipogenic transcription factors such as CEBPB, CEBPD and ATF4 that have G/C rich or uORF in their 5'UTR. Required for ROS-dependent megakaryocyte maturation and platelets formation, controls the expression of mitochondrial respiratory chain genes involved in reactive oxygen species (ROS) synthesis (By similarity). Involved in miRNA-mediated gene silencing by the RNA-induced silencing complex (RISC). Required for both miRNA-mediated translational repression and miRNA-mediated cleavage of complementary mRNAs by RISC. Modulates cell cycle progression and global translation of pre-B cells, its activation seems to be rate-limiting in tumorigenesis and tumor growth (By similarity).

	PRPF4		Plays role in pre-mRNA splicing as component of the U4/U6-U5 tri-snRNP complex that is involved in spliceosome assembly, and as component of the precatalytic spliceosome (spliceosome B complex).
	SRRM1		Part of pre- and post-splicing multiprotein mRNP complexes. Involved in numerous pre-mRNA processing events. Promotes constitutive and exonic splicing enhancer (ESE)-dependent splicing activation by bridging together sequence-specific (SR family proteins, SFRS4, SFRS5 and TRA2B/SFRS10) and basal snRNP (SNRP70 and SNRPA1) factors of the spliceosome. Stimulates mRNA 3'-end cleavage independently of the formation of an exon junction complex. Binds both pre-mRNA and spliced mRNA 20-25 nt upstream of exon-exon junctions. Binds RNA and DNA with low sequence specificity and has similar preference for either double- or single-stranded nucleic acid substrates
	CPSF2		Component of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex that play a key role in pre-mRNA 3'-end formation, recognizing the AAUAAA signal sequence and interacting with poly(A) polymerase and other factors to bring about cleavage and poly(A) addition. Involved in the histone 3' end pre-mRNA processing.
	SYMPK		Scaffold protein that functions as a component of a multimolecular complex involved in histone mRNA 3'-end processing. Specific component of the tight junction (TJ) plaque, but might not be an exclusively junctional component. May have a house-keeping rule. Is involved in pre-mRNA polyadenylation. Enhances SSU72 phosphatase activity
	TRIR		Exoribonuclease that is part of the telomerase RNA 3' end processing complex and which has the ability to all four unpaired RNA nucleotides from 5' end or 3' end with higher efficiency for purine bases.
	MATR3		May play a role in transcription or may interact with other nuclear matrix proteins to form the internal fibrogranular network. In association with the SFPQ-NONO heteromer may play a role in nuclear retention of defective RNAs. Plays a role in the regulation of DNA virus-mediated innate immune response by assembling into the HDP-RNP complex, a complex that serves as a platform for IRF3 phosphorylation and subsequent innate immune response activation through the cGAS-STING pathway. May bind to specific miRNA hairpins.
	MRPL4		39S ribosomal protein L4, mitochondrial
	EDC3		Binds single-stranded RNA. Involved in the process of mRNA degradation and in the positive regulation of mRNA decapping. May play a role in spermiogenesis and oogenesis.
Chromatine	NCAPD3		Regulatory subunit of the condensin-2 complex, a complex which establishes mitotic chromosome architecture and is involved in physical rigidity of the chromatid axis. May promote the resolution of double-strand DNA catenanes (intertwines) between sister chromatids. Condensin-mediated compaction likely increases tension in catenated sister chromatids, providing directionality for type II topoisomerase-mediated strand exchanges toward chromatid decatenation. Specifically required for decatenation of centromeric ultrafine DNA bridges during anaphase. Early in neurogenesis, may play an essential role to ensure accurate mitotic chromosome condensation in neuron stem cells, ultimately affecting neuron pool and cortex size
	H2AFZ/H2AFV		Variant histone H2A which replaces conventional H2A in a subset of nucleosomes. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling. May be involved in the formation of constitutive heterochromatin. May be required for chromosome segregation during cell division.
	XRCC4		Involved in DNA non-homologous end joining (NHEJ) required for double-strand break repair and V(D)J recombination. Binds to DNA and to DNA ligase IV (LIG4). The LIG4-XRCC4 complex is responsible for the NHEJ ligation step, and XRCC4 enhances the joining activity of LIG4. Binding of the LIG4-XRCC4 complex to DNA ends is dependent on the assembly of the DNA-dependent protein kinase complex DNA-PK to these DNA ends

	SMARCB1		Core component of the BAF (hSWI/SNF) complex. This ATP-dependent chromatin-remodeling complex plays important roles in cell proliferation and differentiation, in cellular antiviral activities and inhibition of tumor formation. The BAF complex is able to create a stable, altered form of chromatin that constrains fewer negative supercoils than normal. This change in supercoiling would be due to the conversion of up to one-half of the nucleosomes on polynucleosomal arrays into asymmetric structures, termed altosomes, each composed of 2 histones octamers. Stimulates in vitro the remodeling activity of SMARCA4/BRG1/BAF190A. Involved in activation of CSF1 promoter.[...] Plays a key role in cell-cycle control and causes cell cycle arrest in G0/G1.
	BUB1		Serine/threonine-protein kinase that performs 2 crucial functions during mitosis: it is essential for spindle-assembly checkpoint signaling and for correct chromosome alignment. Has a key role in the assembly of checkpoint proteins at the kinetochore, being required for the subsequent localization of CENPF, BUB1B, CENPE and MAD2L1. Required for the kinetochore localization of PLK1. Required for centromeric enrichment of AUKRB in prometaphase. Plays an important role in defining SGO1 localization and thereby affects sister chromatid cohesion. Acts as a substrate for anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C) in complex with its activator CDH1 (APC/C-Cdh1). Necessary for ensuring proper chromosome segregation and binding to BUB3 is essential for this function. Can regulate chromosome segregation in a kinetochore-independent manner. Can phosphorylate BUB3. The BUB1-BUB3 complex plays a role in the inhibition of APC/C when spindle-assembly checkpoint is activated and inhibits the ubiquitin ligase activity of APC/C by phosphorylating its activator CDC20. This complex can also phosphorylate MAD1L1. Kinase activity is essential for inhibition of APC/CCDC20 and for chromosome alignment but does not play a major role in the spindle-assembly checkpoint activity. Mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis.
Autres	KRT80		Keratin, type II cytoskeletal 80, there are two types of cytoskeletal and microfibrillar keratin, I (acidic) and II (neutral to basic) (40-55 and 56-70 kDa, respectively).
	SERPIN5		Tumor suppressor. It blocks the growth, invasion, and metastatic properties of mammary tumors. As it does not undergo the S (stressed) to R (relaxed) conformational transition characteristic of active serpins, it exhibits no serine protease inhibitory activity.
	ETHE1		Sulfur dioxygenase that plays an essential role in hydrogen sulfide catabolism in the mitochondrial matrix. Hydrogen sulfide (H2S) is first oxidized by SQRDL, giving rise to cysteine persulfide residues. ETHE1 consumes molecular oxygen to catalyze the oxidation of the persulfide, once it has been transferred to a thiophilic acceptor, such as glutathione (R-SSH). Plays an important role in metabolic homeostasis in mitochondria by metabolizing hydrogen sulfide and preventing the accumulation of supraphysiological H2S levels that have toxic effects, due to the inhibition of cytochrome c oxidase. First described as a protein that can shuttle between the nucleus and the cytoplasm and suppress p53-induced apoptosis by sequestering the transcription factor RELA/NFKB3 in the cytoplasm and preventing its accumulation in the nucleus
	ZNF22		Binds DNA through the consensus sequence 5'-CAATG-3'. May be involved in transcriptional regulation and may play a role in tooth formation (By similarity)
	PPM1B		Protein phosphatase 1B. Enzyme with a broad specificity. Dephosphorylates CDK2 and CDK6 in vitro. Dephosphorylates PRKAA1 and PRKAA2. Inhibits TBK1-mediated antiviral signaling by dephosphorylating it at 'Ser-172'. Plays an important role in the termination of TNF-alpha-mediated NF-kappa-B activation through dephosphorylating and inactivating IKKBK/IKKB.
	REPS1		RalBP1-associated Eps domain-containing protein 1. May coordinate the cellular actions of activated EGF receptors and Ral-GTPases.
	GTSF1		Gametocyte-specific factor 1. Required for spermatogenesis and is involved in the suppression of retrotransposon transcription in male germ cells.

PTGES2		Prostaglandin E synthase 2. Isomerase that catalyzes the conversion of PGH2 into the more stable prostaglandin E2 (PGE2).
AKR7A2		Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2. Catalyzes the NADPH-dependent reduction of succinic semialdehyde to gamma-hydroxybutyrate. May have an important role in producing the neuromodulator gamma-hydroxybutyrate (GHB). Has broad substrate specificity. Has NADPH-dependent aldehyde reductase activity towards 2-carboxybenzaldehyde, 2-nitrobenzaldehyde and pyridine-2-aldehyde (in vitro). Can reduce 1,2-naphthoquinone and 9,10-phenanthrenequinone (in vitro). Can reduce the dialdehyde protein-binding form of aflatoxin B1 (AFB1) to the non-binding AFB1 dialcohol. May be involved in protection of liver against the toxic and carcinogenic effects of AFB1, a potent hepatocarcinogen.
MOB1B/MOB1A		Activator of LATS1/2 in the Hippo signaling pathway which plays a pivotal role in organ size control and tumor suppression by restricting proliferation and promoting apoptosis. The core of this pathway is composed of a kinase cascade wherein STK3/MST2 and STK4/MST1, in complex with its regulatory protein SAV1, phosphorylates and activates LATS1/2 in complex with its regulatory protein MOB1, which in turn phosphorylates and inactivates YAP1 oncoprotein and WWTR1/TAZ. Phosphorylation of YAP1 by LATS1/2 inhibits its translocation into the nucleus to regulate cellular genes important for cell proliferation, cell death, and cell migration.
TTC1		Tetratricopeptide repeat protein 1
IRF2BP2		Interferon regulatory factor 2-binding protein 2. Acts as a transcriptional corepressor in a IRF2-dependent manner; this repression is not mediated by histone deacetylase activities. Represses the NFAT1-dependent transactivation of NFAT-responsive promoters. Acts as a coactivator of VEGFA expression in cardiac and skeletal muscles. Plays a role in immature B-cell differentiation.
CCDC86		Coiled-coil domain-containing protein 86.
CALU		Calumenin. Involved in regulation of vitamin K-dependent carboxylation of multiple N-terminal glutamate residues. Seems to inhibit gamma-carboxylase GGCX. Binds 7 calcium ions with a low affinity (By similarity)

Bibliographie

1. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos M-V, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primer*. 20 juill 2017;3:17046.
2. Dispenzieri A, Stewart AK, Chanan-Khan A, Rajkumar SV, Kyle RA, Fonseca R, et al. Smoldering multiple myeloma requiring treatment: time for a new definition? *Blood*. 19 déc 2013;122(26):4172-81.
3. Glavey SV, Flanagan L, Bleach R, Kelly C, Quinn J, Ní Chonghaile T, et al. Secondary plasma cell leukaemia treated with single agent venetoclax. *Br J Haematol*. 11 juin 2020;
4. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mai 2005;23(15):3412-20.
5. SPF. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Partie 2 : hémopathies malignes [Internet]. [cité 15 juin 2020]. Disponible sur: /notices/estimation-nationale-de-l-incidence-des-cancers-en-france-entre-1980-et-2012.-etude-a-partir-des-registres-des-cancers-du-reseau-francim.-partie-2
6. Cancer today [Internet]. [cité 15 juin 2020]. Disponible sur: <http://gco.iarc.fr/today/home>
7. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 1 mars 2015;136(5):E359-386.
8. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. mai 2012;12(5):335-48.
9. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 15 sept 2006;108(6):2020-8.
10. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*. 13 janv 2011;117(2):553-62.
11. Ohguchi H, Hideshima T, Anderson KC. The biological significance of histone modifiers in multiple myeloma: clinical applications. *Blood Cancer J*. 22 2018;8(9):83.
12. Handa H, Murakami Y, Ishihara R, Kimura-Masuda K, Masuda Y. The Role and Function of microRNA in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Cancers*. 6 nov 2019;11(11).
13. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. mars 2005;5(3):230-42.
14. Shaffer AL, Emre NCT, Lamy L, Ngo VN, Wright G, Xiao W, et al. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature*. 10 juill 2008;454(7201):226-31.

15. Iwakoshi NN, Lee A-H, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev.* août 2003;194:29-38.
16. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, et al. The Differentiation and Stress Response Factor XBP-1 Drives Multiple Myeloma Pathogenesis. *Cancer Cell.* 10 avr 2007;11(4):349-60.
17. Bagratuni T, Wu P, Gonzalez de Castro D, Davenport EL, Dickens NJ, Walker BA, et al. XBP1s levels are implicated in the biology and outcome of myeloma mediating different clinical outcomes to thalidomide-based treatments. *Blood.* 15 juill 2010;116(2):250-3.
18. Iwakoshi NN, Lee A-H, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol.* avr 2003;4(4):321-9.
19. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood.* 14 mai 2015;125(20):3049-58.
20. Peled A, Klein S, Beider K, Burger JA, Abraham M. Role of CXCL12 and CXCR4 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cytokine.* 2018;109:11-6.
21. Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM, et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood.* 1 avr 2007;109(7):2708-17.
22. Zhu D, Wang Z, Zhao J-J, Calimeri T, Meng J, Hideshima T, et al. The Cyclophilin A-CD147 complex promotes the proliferation and homing of multiple myeloma cells. *Nat Med.* juin 2015;21(6):572-80.
23. Sanz-Rodríguez F, Teixidó J. VLA-4-dependent myeloma cell adhesion. *Leuk Lymphoma.* avr 2001;41(3-4):239-45.
24. Colombo M, Mirandola L, Platonova N, Apicella L, Basile A, Figueroa AJ, et al. Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes. *Leukemia.* avr 2013;27(5):1009-18.
25. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia.* déc 2001;15(12):1950-61.
26. Asosingh K. Migration, adhesion and differentiation of malignant plasma cells in the 5T murine model of myeloma. *Verh - K Acad Voor Geneeskde Van Belg.* 2003;65(2):127-34.
27. Xu G, Liu K, Anderson J, Patrene K, Lentzsch S, Roodman GD, et al. Expression of XBP1s in bone marrow stromal cells is critical for myeloma cell growth and osteoclast formation. *Blood.* 3 mai 2012;119(18):4205.

28. Moloudizargari M, Abdollahi M, Asghari MH, Zimta AA, Neagoe IB, Nabavi SM. The emerging role of exosomes in multiple myeloma. *Blood Rev.* 2019;38:100595.
29. Wang J, De Veirman K, Faict S, Frassanito MA, Ribatti D, Vacca A, et al. Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrow microenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression. *J Pathol.* 2016;239(2):162-73.
30. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood.* 1 août 2003;102(3):1064-9.
31. Tai Y-T, Acharya C, An G, Moschetta M, Zhong MY, Feng X, et al. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood.* 23 2016;127(25):3225-36.
32. Tamura H, Ishibashi M, Sunakawa-Kii M, Inokuchi K. PD-L1-PD-1 Pathway in the Pathophysiology of Multiple Myeloma. *Cancers.* 10 avr 2020;12(4).
33. Jelinek T, Paiva B, Hajek R. Update on PD-1/PD-L1 Inhibitors in Multiple Myeloma. *Front Immunol.* 2018;9:2431.
34. Ishibashi M, Tamura H, Sunakawa M, Kondo-Onodera A, Okuyama N, Hamada Y, et al. Myeloma Drug Resistance Induced by Binding of Myeloma B7-H1 (PD-L1) to PD-1. *Cancer Immunol Res.* 02 2016;4(9):779-88.
35. Tamura H, Ishibashi M, Yamashita T, Tanosaki S, Okuyama N, Kondo A, et al. Marrow stromal cells induce B7-H1 expression on myeloma cells, generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia.* févr 2013;27(2):464-72.
36. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood.* 1 juill 2007;110(1):296-304.
37. Slany A, Haudek-Prinz V, Meshcheryakova A, Bileck A, Lamm W, Zielinski C, et al. Extracellular matrix remodeling by bone marrow fibroblast-like cells correlates with disease progression in multiple myeloma. *J Proteome Res.* 7 févr 2014;13(2):844-54.
38. Khotskaya YB, Dai Y, Ritchie JP, MacLeod V, Yang Y, Zinn K, et al. Syndecan-1 is required for robust growth, vascularization, and metastasis of myeloma tumors in vivo. *J Biol Chem.* 18 sept 2009;284(38):26085-95.
39. Yang Y, Yaccoby S, Liu W, Langford JK, Pumphrey CY, Theus A, et al. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood.* 15 juill 2002;100(2):610-7.
40. Lwin ST, Edwards CM, Silbermann R. Preclinical animal models of multiple myeloma. *BoneKEy Rep.* 2016;5:772.

41. Olechnowicz SWZ, Edwards CM. Animal Models of Multiple Myeloma. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;1914:349-60.
42. Libouban H. The use of animal models in multiple myeloma. *Morphol Bull Assoc Anat. juin 2015;99(325):63-72*.
43. Garrett IR, Dallas S, Radl J, Mundy GR. A murine model of human myeloma bone disease. *Bone. juin 1997;20(6):515-20*.
44. Vanderkerken K, De Raeve H, Goes E, Van Meirvenne S, Radl J, Van Riet I, et al. Organ involvement and phenotypic adhesion profile of 5T2 and 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse. *Br J Cancer*. 1997;76(4):451-60.
45. Dallas SL, Garrett IR, Oyajobi BO, Dallas MR, Boyce BF, Bauss F, et al. Ibandronate reduces osteolytic lesions but not tumor burden in a murine model of myeloma bone disease. *Blood*. 1 mars 1999;93(5):1697-706.
46. Radl J, De Glopper ED, Schuit HR, Zurcher C. Idiopathic paraproteinemia. II. Transplantation of the paraprotein-producing clone from old to young C57BL/KaLwRij mice. *J Immunol Baltim Md 1950. févr 1979;122(2):609-13*.
47. Hofgaard PO, Jodal HC, Bommert K, Huard B, Caers J, Carlsen H, et al. A Novel Mouse Model for Multiple Myeloma (MOPC315.BM) That Allows Noninvasive Spatiotemporal Detection of Osteolytic Disease. *PLOS ONE*. 20 déc 2012;7(12):e51892.
48. Rutsch S, Neppalli VT, Shin D-M, DuBois W, Morse HC, Goldschmidt H, et al. IL-6 and MYC collaborate in plasma cell tumor formation in mice. *Blood*. 4 mars 2010;115(9):1746-54.
49. Chesi M, Matthews GM, Garbitt VM, Palmer SE, Shortt J, Lefebure M, et al. Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood*. 12 juill 2012;120(2):376-85.
50. Chesi M, Robbiani DF, Sebag M, Chng WJ, Affer M, Tiedemann R, et al. AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell*. févr 2008;13(2):167-80.
51. Morito N, Yoh K, Maeda A, Nakano T, Fujita A, Kusakabe M, et al. A novel transgenic mouse model of the human multiple myeloma chromosomal translocation t(14;16)(q32;q23). *Cancer Res*. 15 janv 2011;71(2):339-48.
52. Lawson MA, Paton-Hough JM, Evans HR, Walker RE, Harris W, Ratnabalan D, et al. NOD/SCID-GAMMA Mice Are an Ideal Strain to Assess the Efficacy of Therapeutic Agents Used in the Treatment of Myeloma Bone Disease. *PLOS ONE*. 13 mars 2015;10(3):e0119546.
53. Tsunenari T, Koishihara Y, Nakamura A, Moriya M, Ohkawa H, Goto H, et al. New xenograft model of multiple myeloma and efficacy of a humanized antibody against human interleukin-6 receptor. *Blood*. 15 sept 1997;90(6):2437-44.

54. Yaccoby S, Barlogie B, Epstein J. Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations. *Blood*. 15 oct 1998;92(8):2908-13.
55. Yata K, Yaccoby S. The SCID-rab model: a novel in vivo system for primary human myeloma demonstrating growth of CD138-expressing malignant cells. *Leukemia*. nov 2004;18(11):1891-7.
56. Calimeri T, Battista E, Conforti F, Neri P, Di Martino MT, Rossi M, et al. A unique three-dimensional SCID-polymeric scaffold (SCID-synth-hu) model for in vivo expansion of human primary multiple myeloma cells. *Leukemia*. avr 2011;25(4):707-11.
57. Lin J, Zhang W, Zhao J-J, Kwart AH, Yang C, Ma D, et al. A clinically relevant in vivo zebrafish model of human multiple myeloma to study preclinical therapeutic efficacy. *Blood*. 14 juill 2016;128(2):249-52.
58. Sacco A, Roccaro AM, Ma D, Shi J, Mishima Y, Moschetta M, et al. Cancer Cell Dissemination and Homing to the Bone Marrow in a Zebrafish Model. *Cancer Res*. 15 janv 2016;76(2):463-71.
59. Accueil - VIDAL eVIDAL [Internet]. [cité 7 août 2019]. Disponible sur: <https://evidal.vidal.fr/>
60. Kimmel DB. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res*. nov 2007;86(11):1022-33.
61. Russell RGG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A, Hulley PA, et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci*. nov 2007;1117:209-57.
62. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Cocks K, Bell SE, Szubert AJ, et al. First-line treatment with zoledronic acid as compared with clodronic acid in multiple myeloma (MRC Myeloma IX): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 11 déc 2010;376(9757):1989-99.
63. Avcu F, Ural AU, Yilmaz MI, Ozcan A, Ide T, Kurt B, et al. The bisphosphonate zoledronic acid inhibits the development of plasmacytoma induced in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *Eur J Haematol*. juin 2005;74(6):496-500.
64. Burwick N, Sharma S. Glucocorticoids in multiple myeloma: past, present, and future. *Ann Hematol*. janv 2019;98(1):19-28.
65. Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev*. déc 2017;36(4):561-84.

66. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 15 juin 2006;107(12):4907-16.
67. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, Neeson P, Harrison S, Smyth MJ, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*. janv 2010;24(1):22-32.
68. Chamberlain PP, Lopez-Girona A, Miller K, Carmel G, Pagarigan B, Chie-Leon B, et al. Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nat Struct Mol Biol*. sept 2014;21(9):803-9.
69. Bjorklund CC, Lu L, Kang J, Hagner PR, Havens CG, Amatangelo M, et al. Rate of CRL4(CRBN) substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-Myc and IRF4. *Blood Cancer J*. 2 oct 2015;5:e354.
70. Ganesan S, Palani HK, Balasundaram N, David S, Devasia AJ, George B, et al. Combination Lenalidomide/Bortezomib Treatment Synergistically Induces Calpain-Dependent Ikaros Cleavage and Apoptosis in Myeloma Cells. *Mol Cancer Res*. 1 avr 2020;18(4):529-36.
71. Richardson PG, Moreau P, Laubach JP, Maglio ME, Lonial S, San-Miguel J. Deacetylase inhibitors as a novel modality in the treatment of multiple myeloma. *Pharmacol Res*. 2017;117:185-91.
72. Franssen LE, Stege CAM, Zweegman S, van de Donk NWCJ, Nijhof IS. Resistance Mechanisms Towards CD38-Directed Antibody Therapy in Multiple Myeloma. *J Clin Med*. 22 avr 2020;9(4).
73. Chim CS, Kumar SK, Orlowski RZ, Cook G, Richardson PG, Gertz MA, et al. Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. *Leukemia*. 2018;32(2):252-62.
74. Collins SM, Bakan CE, Swartzel GD, Hofmeister CC, Efebera YA, Kwon H, et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunol Immunother* CII. déc 2013;62(12):1841-9.
75. Chari A, Vogl DT, Gavriatopoulou M, Nooka AK, Yee AJ, Huff CA, et al. Oral Selinexor-Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 22 2019;381(8):727-38.
76. Richter J, Madduri D, Richard S, Chari A. Selinexor in relapsed/refractory multiple myeloma. *Ther Adv Hematol*. janv 2020;11:204062072093062.
77. ALD n° 30 - Myélome multiple [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 22 juin 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_1021489/fr/ald-n-30-myelome-multiple

78. Arcangeli M-L, Brault P, Bourhis J-H, Kuhnowskie F, Henry E, Barroca V, et al. Combined G-CSF and Plerixafor enhance hematopoietic recovery of CD34+ cells from poor mobilizer patients in NSG mice. *Exp Hematol*. 22 mai 2020;
79. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, Buchholz TJ, Dajee M, Ho MN, et al. Antitumor Activity of PR-171, a Novel Irreversible Inhibitor of the Proteasome. *Cancer Res*. 1 juill 2007;67(13):6383-91.
80. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, et al. Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer. *Cancer Res*. 1 mars 2010;70(5):1970-80.
81. Chauhan D, Catley L, Li G, Podar K, Hideshima T, Velankar M, et al. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell*. 1 nov 2005;8(5):407-19.
82. Orłowski RZ, Moreau P, Niesvizky R, Ludwig H, Oriol A, Chng WJ, et al. Carfilzomib-Dexamethasone Versus Bortezomib-Dexamethasone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: Updated Overall Survival, Safety, and Subgroups. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019;19(8):522-530.e1.
83. Touzeau C, Moreau P. Ixazomib in the management of relapsed multiple myeloma. *Future Oncol Lond Engl*. août 2018;14(20):2013-20.
84. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, Bahlis NJ, Hansson M, Pour L, et al. Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 28 avr 2016;374(17):1621-34.
85. Hari P, Paba-Prada CE, Voorhees PM, Frye J, Chang Y-L, Moreau P, et al. Efficacy and safety results from a phase 1b/2, multicenter, open-label study of oprozomib and dexamethasone in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Leuk Res*. 2019;83:106172.
86. Chauhan D, Singh AV, Aujay M, Kirk CJ, Bandi M, Ciccarelli B, et al. A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 2 déc 2010;116(23):4906.
87. Zhou H-J, Aujay MA, Bennett MK, Dajee M, Demo SD, Fang Y, et al. Design and Synthesis of an Orally Bioavailable and Selective Peptide Epoxyketone Proteasome Inhibitor (PR-047). *J Med Chem*. 14 mai 2009;52(9):3028-38.
88. Spencer A, Harrison S, Zonder J, Badros A, Laubach J, Bergin K, et al. A phase 1 clinical trial evaluating marizomib, pomalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma (NPI-0052-107): final study results. *Br J Haematol*. 2018;180(1):41-51.
89. Richardson PG, Zimmerman TM, Hofmeister CC, Talpaz M, Chanan-Khan AA, Kaufman JL, et al. Phase 1 study of marizomib in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: NPI-0052-101 Part 1. *Blood*. 02 2016;127(22):2693-700.

90. Piva R, Ruggeri B, Williams M, Costa G, Tamagno I, Ferrero D, et al. CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood*. 1 mars 2008;111(5):2765-75.
91. Berkers CR, Leestemaker Y, Schuurman KG, Ruggeri B, Jones-Bolin S, Williams M, et al. Probing the specificity and activity profiles of the proteasome inhibitors bortezomib and delanzomib. *Mol Pharm*. 7 mai 2012;9(5):1126-35.
92. Vogl DT, Martin TG, Vij R, Hari P, Mikhael JR, Siegel D, et al. Phase I/II study of the novel proteasome inhibitor delanzomib (CEP-18770) for relapsed and refractory multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(8):1872-9.
93. Tandon N, Ramakrishnan V, Kumar SK. Clinical use and applications of histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma. *Clin Pharmacol Adv Appl*. 2016;8:35.
94. Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): Successes and challenges. *Cancer Lett*. 8 août 2009;280(2):233-41.
95. Santo L, Hideshima T, Kung AL, Tseng J-C, Tamang D, Yang M, et al. Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood*. 15 mars 2012;119(11):2579-89.
96. Lauffer BEL, Mintzer R, Fong R, Mukund S, Tam C, Zilberleyb I, et al. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Kinetic Rate Constants Correlate with Cellular Histone Acetylation but Not Transcription and Cell Viability. *J Biol Chem*. 13 sept 2013;288(37):26926-43.
97. Huang P, Almeciga-Pinto I, Jarpe M, van Duzer JH, Mazitschek R, Yang M, et al. Selective HDAC inhibition by ACY-241 enhances the activity of paclitaxel in solid tumor models. *Oncotarget*. 10 janv 2017;8(2):2694-707.
98. Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee K-H, Nishiyama M, Nakajima H, et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res*. 1 sept 2002;62(17):4916-21.
99. Algarín EM, Hernández-García S, Garayoa M, Ocio EM. Filanesib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Investig Drugs*. janv 2020;29(1):5-14.
100. Touzeau C, Maciag P, Amiot M, Moreau P. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2018;32(9):1899-907.
101. Kumar SK, LaPlant B, Chng WJ, Zonder J, Callander N, Fonseca R, et al. Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*. 15 janv 2015;125(3):443-8.
102. D'Agostino M, Salvini M, Palumbo A, Larocca A, Gay F. Novel investigational drugs active as single agents in multiple myeloma. *Expert Opin Investig Drugs*. juin 2017;26(6):699-711.

103. Spencer A, Yoon S-S, Harrison SJ, Morris SR, Smith DA, Brigandi RA, et al. The novel AKT inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma. *Blood*. 2 oct 2014;124(14):2190-5.
104. Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Lutz RJ, Yasui H, Okawa Y, et al. The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 juin 2009;15(12):4028-37.
105. Iftikhar A, Hassan H, Iftikhar N, Mushtaq A, Sohail A, Rosko N, et al. Investigational Monoclonal Antibodies in the Treatment of Multiple Myeloma: A Systematic Review of Agents under Clinical Development. *Antibodies Basel Switz*. 24 mai 2019;8(2).
106. Ailawadhi S, Kelly KR, Vescio RA, Jagannath S, Wolf J, Gharibo M, et al. A Phase I Study to Assess the Safety and Pharmacokinetics of Single-agent Lorvotuzumab Mertansine (IMGN901) in Patients with Relapsed and/or Refractory CD-56-positive Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019;19(1):29-34.
107. Berdeja JG. Lorvotuzumab mertansine: antibody-drug-conjugate for CD56+ multiple myeloma. *Front Biosci Landmark Ed*. 1 janv 2014;19:163-70.
108. Cho S-F, Lin L, Xing L, Li Y, Yu T, Anderson KC, et al. BCMA-Targeting Therapy: Driving a New Era of Immunotherapy in Multiple Myeloma. *Cancers*. juin 2020;12(6):1473.
109. Lonial S, Lee HC, Badros A, Trudel S, Nooka AK, Chari A, et al. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. févr 2020;21(2):207-21.
110. Matthes T, Manfroi B, Huard B. Revisiting IL-6 antagonism in multiple myeloma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1 sept 2016;105:1-4.
111. Mateos M-V, Blacklock H, Schjesvold F, Oriol A, Simpson D, George A, et al. Pembrolizumab plus pomalidomide and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (KEYNOTE-183): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. sept 2019;6(9):e459-69.
112. Gagelmann N, Riecken K, Wolschke C, Berger C, Ayuk FA, Fehse B, et al. Development of CAR-T cell therapies for multiple myeloma. *Leukemia*. 2020;34(9):2317-32.
113. Mikkilineni L, Kochenderfer JN. CAR T cell therapies for patients with multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*. 25 sept 2020;
114. Meyer-Schwesinger C. The ubiquitin-proteasome system in kidney physiology and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(7):393-411.
115. Rousseau A, Bertolotti A. Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(11):697-712.

116. Suraweera A, Münch C, Hanssum A, Bertolotti A. Failure of Amino Acid Homeostasis Causes Cell Death following Proteasome Inhibition. *Mol Cell*. 26 oct 2012;48(2):242-53.
117. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*. 20 2017;86:193-224.
118. Yu H, Matouschek A. Recognition of Client Proteins by the Proteasome. *Annu Rev Biophys*. 22 2017;46:149-73.
119. Yuan W-C, Lee Y-R, Lin S-Y, Chang L-Y, Tan YP, Hung C-C, et al. K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking. *Mol Cell*. 22 mai 2014;54(4):586-600.
120. Iwai K, Fujita H, Sasaki Y. Linear ubiquitin chains: NF- κ B signalling, cell death and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):503-8.
121. Gatti M, Pinato S, Maiolica A, Rocchio F, Prato MG, Aebersold R, et al. RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage. *Cell Rep*. 13 janv 2015;10(2):226-38.
122. Lu Y, Lee B, King RW, Finley D, Kirschner MW. Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis. *Science*. 10 avr 2015;348(6231):1250834.
123. Kwon YT, Ciechanover A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(11):873-86.
124. Yu H, Singh Gautam AK, Wilmington SR, Wylie D, Martinez-Fonts K, Kago G, et al. Conserved Sequence Preferences Contribute to Substrate Recognition by the Proteasome. *J Biol Chem*. 8 juill 2016;291(28):14526-39.
125. Prakash S, Tian L, Ratliff KS, Lehotzky RE, Matouschek A. An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat Struct Mol Biol*. sept 2004;11(9):830-7.
126. Fishbain S, Inobe T, Israeli E, Chavali S, Yu H, Kago G, et al. Sequence composition of disordered regions fine-tunes protein half-life. *Nat Struct Mol Biol*. mars 2015;22(3):214-21.
127. van der Lee R, Lang B, Kruse K, Gsponer J, Sánchez de Groot N, Huynen MA, et al. Intrinsically Disordered Segments Affect Protein Half-Life in the Cell and during Evolution. *Cell Rep*. 25 sept 2014;8(6):1832-44.
128. van der Lee R, Buljan M, Lang B, Weatheritt RJ, Daughdrill GW, Dunker AK, et al. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem Rev*. 9 juill 2014;114(13):6589-631.

129. Waku T, Nakamura N, Koji M, Watanabe H, Katoh H, Tatsumi C, et al. NRF3-POMP-20S Proteasome Assembly Axis Promotes Cancer Development via Ubiquitin-Independent Proteolysis of p53 and Retinoblastoma Protein. *Mol Cell Biol.* 28 avr 2020;40(10).
130. Ben-Nissan G, Sharon M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules.* 23 sept 2014;4(3):862-84.
131. Carroll B, Korolchuk VI, Sarkar S. Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis. *Amino Acids.* oct 2015;47(10):2065-88.
132. Saric T, Graef CI, Goldberg AL. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J Biol Chem.* 5 nov 2004;279(45):46723-32.
133. Manasanch EE, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* juill 2017;14(7):417-33.
134. Malek MAYA, Jagannathan S, Malek E, Sayed DM, Elgammal SA, El-Azeem HGA, et al. Molecular chaperone GRP78 enhances aggresome delivery to autophagosomes to promote drug resistance in multiple myeloma. *Oncotarget.* 10 janv 2015;6(5):3098-110.
135. Counihan JL, Grossman EA, Nomura DK. Cancer Metabolism: Current Understanding and Therapies. *Chem Rev.* 25 2018;118(14):6893-923.
136. Dantuma NP, Groothuis TAM, Salomons FA, Neefjes J. A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J Cell Biol.* 10 avr 2006;173(1):19-26.
137. Groothuis TAM, Dantuma NP, Neefjes J, Salomons FA. Ubiquitin crosstalk connecting cellular processes. *Cell Div.* 28 sept 2006;1:21.
138. Rastogi N, Mishra DP. Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell Div.* 26 déc 2012;7(1):26.
139. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 9 sept 1994;78(5):773-85.
140. Lou Z, Ren T, Peng X, Sun Y, Jiao G, Lu Q, et al. Bortezomib induces apoptosis and autophagy in osteosarcoma cells through mitogen-activated protein kinase pathway in vitro. *J Int Med Res.* oct 2013;41(5):1505-19.
141. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 5 sept 1997;272(36):22642-7.

142. Befani CD, Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, Patrikidou A, Bonanou S, Simos G, et al. Bortezomib represses HIF-1 α protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells. *J Mol Med Berl Ger. janv 2012*;90(1):45-54.
143. Chao CC-K. Mechanisms of p53 degradation. *Clin Chim Acta. 1 janv 2015*;438:139-47.
144. Sengupta S, Henry RW. Regulation of the retinoblastoma-E2F pathway by the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta. oct 2015*;1849(10):1289-97.
145. Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: Involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci. 11 avr 2000*;97(8):3850-5.
146. Luciano F, Jacquelin A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G, et al. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene. 2 oct 2003*;22(43):6785-93.
147. Groot KA de, Sjoerdsma MT a, Niewerth D, Cloos J, Blank JL, Niessen HWM, et al. Pharmacodynamic monitoring of (immuno)proteasome inhibition during bortezomib treatment of a critically ill patient with lupus nephritis and myocarditis. *Lupus Sci Med. 1 déc 2015*;2(1):e000121.
148. European Medicines Agency. Velcade : EPAR - product information [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 29 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/velcade>
149. European Medicines Agency. Kyprolis [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 29 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kyprolis>
150. European Medicines Agency. Ninlaro [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 29 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ninlaro>
151. Johnson HWB, Lowe E, Anderl JL, Fan A, Muchamuel T, Bowers S, et al. Required Immunoproteasome Subunit Inhibition Profile for Anti-Inflammatory Efficacy and Clinical Candidate KZR-616 ((2*S*,3*R*)-N-((*S*)-3-(Cyclopent-1-en-1-yl)-1-((*R*)-2-methyloxiran-2-yl)-1-oxopropan-2-yl)-3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-((*S*)-2-(2-morpholinoacetamido)propanamido)propenamido). *J Med Chem. 27 2018*;61(24):11127-43.
152. Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, Lauer C, et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med. juill 2009*;15(7):781-7.
153. M W, Jo B, Yk H, Kc C, Jt H, Kb K. A Selective Inhibitor of the Immunoproteasome Subunit LMP2 Induces Apoptosis in PC-3 Cells and Suppresses Tumour Growth in Nude

- Mice [Internet]. Vol. 107, British journal of cancer. Br J Cancer; 2012 [cité 29 juin 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/22677907/>
154. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* oct 1998;8(10):397-403.
 155. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* août 2001;8(8):739-58.
 156. Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 août 1999;96(18):10403-8.
 157. Zhu Y, Zhang C, Gu C, Li Q, Wu N. Function of Deubiquitinating Enzyme USP14 as Oncogene in Different Types of Cancer. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2016;38(3):993-1002.
 158. Li J, Yakushi T, Parlati F, Mackinnon AL, Perez C, Ma Y, et al. Capzimin is a potent and specific inhibitor of proteasome isopeptidase Rpn11. *Nat Chem Biol.* 2017;13(5):486-93.
 159. Rowinsky EK, Paner A, Berdeja JG, Paba-Prada C, Venugopal P, Porkka K, et al. Phase 1 study of the protein deubiquitinase inhibitor VLX1570 in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Invest New Drugs [Internet].* 3 mars 2020 [cité 29 juin 2020]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s10637-020-00915-4>
 160. Wang X, Mazurkiewicz M, Hillert E-K, Olofsson MH, Pierrou S, Hillertz P, et al. The proteasome deubiquitinase inhibitor VLX1570 shows selectivity for ubiquitin-specific protease-14 and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Sci Rep.* 06 2016;6:26979.
 161. Han KH, Kwak M, Lee TH, Park M-S, Jeong I-H, Kim MJ, et al. USP14 Inhibition Regulates Tumorigenesis by Inducing Autophagy in Lung Cancer In Vitro. *Int J Mol Sci.* 24 oct 2019;20(21).
 162. Kapuria V, Peterson LF, Fang D, Bornmann WG, Talpaz M, Donato NJ. Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Res.* 15 nov 2010;70(22):9265-76.
 163. Anchoori RK, Karanam B, Peng S, Wang JW, Jiang R, Tanno T, et al. A bis-benzylidene piperidone targeting proteasome ubiquitin receptor RPN13/ADRM1 as a therapy for cancer. *Cancer Cell.* 9 déc 2013;24(6):791-805.
 164. Lauinger L, Li J, Shostak A, Cemel IA, Ha N, Zhang Y, et al. Thiolutin is a zinc chelator that inhibits the Rpn11 and other JAMM metalloproteases. *Nat Chem Biol.* juill 2017;13(7):709-14.

165. Yang Y, Kitagaki J, Dai R-M, Tsai YC, Lorick KL, Ludwig RL, et al. Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res.* 1 oct 2007;67(19):9472-81.
166. Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature.* 9 avr 2009;458(7239):732-6.
167. Ceccarelli DF, Tang X, Pelletier B, Orlicky S, Xie W, Plantevin V, et al. An Allosteric Inhibitor of the Human Cdc34 Ubiquitin-Conjugating Enzyme. *Cell.* 24 juin 2011;145(7):1075-87.
168. Hodge CD, Edwards RA, Markin CJ, McDonald D, Pulvino M, Huen MSY, et al. Covalent Inhibition of Ubc13 Affects Ubiquitin Signaling and Reveals Active Site Elements Important for Targeting. *ACS Chem Biol.* 17 juill 2015;10(7):1718-28.
169. Khurana A, Shafer DA. MDM2 antagonists as a novel treatment option for acute myeloid leukemia: perspectives on the therapeutic potential of idasanutlin (RG7388). *OncoTargets Ther.* 2019;12:2903-10.
170. Huang H-L, Weng H-Y, Wang L-Q, Yu C-H, Huang Q-J, Zhao P-P, et al. Triggering Fbw7-mediated proteasomal degradation of c-Myc by oridonin induces cell growth inhibition and apoptosis. *Mol Cancer Ther.* mai 2012;11(5):1155-65.
171. Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, Parlati F, Shenk KD, Lee SJ, et al. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mai 2011;17(9):2734-43.
172. Karademir B, Sari G, Jannuzzi AT, Musunuri S, Wicher G, Grune T, et al. Proteomic approach for understanding milder neurotoxicity of Carfilzomib against Bortezomib. *Sci Rep.* 05 2018;8(1):16318.
173. Gupta A, Pandey A, Sethi S. Bortezomib-induced congestive cardiac failure in a patient with multiple myeloma. *Cardiovasc Toxicol.* juin 2012;12(2):184-7.
174. Honton B, Despas F, Dumonteil N, Rouvellat C, Roussel M, Carrie D, et al. Bortezomib and heart failure: case-report and review of the French Pharmacovigilance database. *Fundam Clin Pharmacol.* juin 2014;28(3):349-52.
175. Stangl K, Stangl V. The ubiquitin-proteasome pathway and endothelial (dys)function. *Cardiovasc Res.* 15 janv 2010;85(2):281-90.
176. Chari A, Hajje D. Case series discussion of cardiac and vascular events following carfilzomib treatment: possible mechanism, screening, and monitoring. *BMC Cancer.* 4 déc 2014;14:915.
177. Efentakis P, Kremastiotis G, Varela A, Nikolaou P-E, Papanagnou E-D, Davos CH, et al. Molecular mechanisms of carfilzomib-induced cardiotoxicity in mice and the emerging cardioprotective role of metformin. *Blood.* 14 2019;133(7):710-23.

178. Li Q, Dong Q-T, Yang Y-J, Tian X-Q, Jin C, Huang P-S, et al. AMPK-mediated cardioprotection of atorvastatin relates to the reduction of apoptosis and activation of autophagy in infarcted rat hearts. *Am J Transl Res.* 15 oct 2016;8(10):4160-71.
179. Sussman MA, Völkers M, Fischer K, Bailey B, Cottage CT, Din S, et al. MYOCARDIAL AKT: THE OMNIPRESENT NEXUS. *Physiol Rev.* juill 2011;91(3):1023-70.
180. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med.* mai 2007;13(5):619-24.
181. Imam F, Al-Harbi NO, Al-Harbi MM, Ansari MA, Almutairi MM, Alshammari M, et al. Apremilast reversed carfilzomib-induced cardiotoxicity through inhibition of oxidative stress, NF- κ B and MAPK signaling in rats. *Toxicol Mech Methods.* nov 2016;26(9):700-8.
182. Dasgupta S, Castro LM, Dulman R, Yang C, Schmidt M, Ferro ES, et al. Proteasome Inhibitors Alter Levels of Intracellular Peptides in HEK293T and SH-SY5Y Cells. *PLOS ONE.* 31 juill 2014;9(7):e103604.
183. Costa-Mattioli M, Walter P. The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science.* 24 2020;368(6489).
184. Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ, Ramaiah KV. Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry.* 24 oct 2000;39(42):12929-38.
185. Hamanaka RB, Bennett BS, Cullinan SB, Diehl JA. PERK and GCN2 contribute to eIF2alpha phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway. *Mol Biol Cell.* déc 2005;16(12):5493-501.
186. Lu PD, Harding HP, Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol.* 11 oct 2004;167(1):27-33.
187. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 août 2004;101(31):11269-74.
188. Palam LR, Baird TD, Wek RC. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J Biol Chem.* 1 avr 2011;286(13):10939-49.
189. Lee Y-Y, Cevallos RC, Jan E. An Upstream Open Reading Frame Regulates Translation of GADD34 during Cellular Stresses That Induce eIF2 α Phosphorylation. *J Biol Chem.* 13 mars 2009;284(11):6661-73.

190. Ma Y, Hendershot LM. Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *J Biol Chem.* 9 déc 2003;278(37):34864-73.
191. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 15 déc 2004;18(24):3066-77.
192. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 26 mai 2020;
193. Lesire L. Thèse d'exercice de Pharmacie - L'Unfolded Protein response dans le cancer : de nouvelles cibles thérapeutiques ? [Internet]. 2019 [cité 30 juin 2020]. Disponible sur: <http://pepite.univ-lille2.fr/notice/view/UDSL2-workflow-13403>
194. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol.* oct 2003;23(20):7198-209.
195. Ye P, Mimura J, Okada T, Sato H, Liu T, Maruyama A, et al. Nrf2- and ATF4-dependent upregulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition. *Mol Cell Biol.* 15 sept 2014;34(18):3421-34.
196. Cullinan SB, Diehl JA. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* mars 2006;38(3):317-32.
197. He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM, et al. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem.* 15 juin 2001;276(24):20858-65.
198. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med.* août 2011;32(4-6):234-46.
199. Coelho DS, Domingos PM. Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Front Genet* [Internet]. 2014 [cité 2 août 2017];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00076/full>
200. Moore K, Hollien J. Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Mol Biol Cell.* 15 août 2015;26(16):2873-84.
201. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol.* 10 août 2009;186(3):323-31.
202. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP1. *Dev Cell.* 4 sept 2007;13(3):365-76.

203. Han D, Lerner AG, Walle LV, Upton J-P, Xu W, Hagen A, et al. IRE1 α Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell*. 7 août 2009;138(3):562-75.
204. Lhomond S, Avril T, Dejeans N, Voutetakis K, Doultinos D, McMahon M, et al. Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO Mol Med*. 8 janv 2018;e7929.
205. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci*. mai 2014;39(5):245-54.
206. Raciti M, Lotti LV, Valia S, Pulcinelli FM, Di Renzo L. JNK2 is activated during ER stress and promotes cell survival. *Cell Death Dis*. nov 2012;3(11):e429-e429.
207. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 28 janv 2000;287(5453):664-6.
208. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. déc 2006;26(24):9220-31.
209. Chen YR, Tan TH. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int J Oncol*. avr 2000;16(4):651-62.
210. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 20 oct 2008;27(48):6245-51.
211. Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol*. févr 2005;25(3):921-32.
212. Nadanaka S, Okada T, Yoshida H, Mori K. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. févr 2007;27(3):1027-43.
213. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell*. 28 déc 2001;107(7):881-91.
214. Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell*. août 2000;6(2):269-79.
215. Harding HP, Ordonez A, Allen F, Parts L, Inglis AJ, Williams RL, et al. The ribosomal P-stalk couples amino acid starvation to GCN2 activation in mammalian cells. *eLife*. 21 2019;8.
216. Jiang H-Y, Wek RC. GCN2 phosphorylation of eIF2 α activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem J*. 15 janv 2005;385(Pt 2):371-80.

217. Dey S, Savant S, Teske BF, Hatzoglou M, Calkhoven CF, Wek RC. Transcriptional Repression of ATF4 Gene by CCAAT/Enhancer-binding Protein β (C/EBP β) Differentially Regulates Integrated Stress Response. *J Biol Chem*. 22 juin 2012;287(26):21936-49.
218. Chen C, Dudenhausen E, Chen H, Pan Y-X, Gjymishka A, Kilberg MS. Amino-acid limitation induces transcription from the human C/EBP β gene via an enhancer activity located downstream of the protein coding sequence. *Biochem J*. 1 nov 2005;391(3):649-58.
219. Chen C, Dudenhausen EE, Pan Y-X, Zhong C, Kilberg MS. Human CCAAT/Enhancer-binding Protein β Gene Expression Is Activated by Endoplasmic Reticulum Stress through an Unfolded Protein Response Element Downstream of the Protein Coding Sequence. *J Biol Chem*. 7 févr 2004;279(27):27948-56.
220. Li Y, Bevilacqua E, Chiribau C-B, Majumder M, Wang C, Croniger CM, et al. Differential control of the CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) products liver-enriched transcriptional activating protein (LAP) and liver-enriched transcriptional inhibitory protein (LIP) and the regulation of gene expression during the response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 15 août 2008;283(33):22443-56.
221. Meir O, Dvash E, Werman A, Rubinstein M. C/EBP- β Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-Triggered Cell Death in Mouse and Human Models. *Fimia GM, éditeur. PLoS ONE*. 3 mars 2010;5(3):e9516.
222. Chiribau C-B, Gaccioli F, Huang CC, Yuan CL, Hatzoglou M. Molecular Symbiosis of CHOP and C/EBP Isoform LIP Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis. *Mol Cell Biol*. 15 juill 2010;30(14):3722-31.
223. Hattori T, Ohoka N, Inoue Y, Hayashi H, Onozaki K. C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer. *Oncogene*. mars 2003;22(9):1273-80.
224. Pan Y, Chen H, Siu F, Kilberg MS. Amino Acid Deprivation and Endoplasmic Reticulum Stress Induce Expression of Multiple Activating Transcription Factor-3 mRNA Species That, When Overexpressed in HepG2 Cells, Modulate Transcription by the Human Asparagine Synthetase Promoter. *J Biol Chem*. 10 mars 2003;278(40):38402-12.
225. Chaveroux C, Jousse C, Cherasse Y, Maurin A-C, Parry L, Carraro V, et al. Identification of a Novel Amino Acid Response Pathway Triggering ATF2 Phosphorylation in Mammals. *Mol Cell Biol*. 15 déc 2009;29(24):6515-26.
226. Hayner JN, Shan J, Kilberg MS. Regulation of the ATF3 gene by a single promoter in response to amino acid availability and endoplasmic reticulum stress in human primary hepatocytes and hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech*. 1 févr 2018;1861(2):72-9.

227. Thiaville MM, Pan Y-X, Gjymishka A, Zhong C, Kaufman RJ, Kilberg MS. MEK signaling is required for phosphorylation of eIF2 α following amino acid limitation of HepG2 human hepatoma cells. *J Biol Chem*. 18 avr 2008;283(16):10848-57.
228. Fu L, Balasubramanian M, Shan J, Dudenhausen EE, Kilberg MS. Auto-activation of c-JUN gene by amino acid deprivation of hepatocellular carcinoma cells reveals a novel c-JUN-mediated signaling pathway. *J Biol Chem*. 21 oct 2011;286(42):36724-38.
229. Dennis MD, Baum JI, Kimball SR, Jefferson LS. Mechanisms involved in the coordinate regulation of mTORC1 by insulin and amino acids. *J Biol Chem*. 11 mars 2011;286(10):8287-96.
230. Li X-Z, Yan X-H. Sensors for the mTORC1 pathway regulated by amino acids. *J Zhejiang Univ Sci B*. sept 2019;20(9):699-712.
231. Mossmann D, Park S, Hall MN. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat Rev Cancer*. déc 2018;18(12):744-57.
232. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. avr 2020;21(4):183-203.
233. Barakat DJ, Mendonca J, Barberi T, Zhang J, Kachhap SK, Paz-Priel I, et al. C/EBP β regulates sensitivity to bortezomib in prostate cancer cells by inducing REDD1 and autophagosome-lysosome fusion. *Cancer Lett*. 28 mai 2016;375(1):152-61.
234. Jin H-O, Seo S-K, Woo S-H, Kim E-S, Lee H-C, Yoo D-H, et al. Activating transcription factor 4 and CCAAT/enhancer-binding protein-beta negatively regulate the mammalian target of rapamycin via Redd1 expression in response to oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Free Radic Biol Med*. 15 avr 2009;46(8):1158-67.
235. Dennis MD, McGhee NK, Jefferson LS, Kimball SR. Regulated in DNA damage and development 1 (REDD1) promotes cell survival during serum deprivation by sustaining repression of signaling through the mechanistic target of rapamycin in complex 1 (mTORC1). *Cell Signal*. 1 déc 2013;25(12):2709-16.
236. Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*. 1 janv 2016;351(6268):43-8.
237. Kimball SR, Gordon BS, Moyer JE, Dennis MD, Jefferson LS. Leucine induced dephosphorylation of Sestrin2 promotes mTORC1 activation. *Cell Signal*. 2016;28(8):896-906.
238. Ye J, Palm W, Peng M, King B, Lindsten T, Li MO, et al. GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes Dev*. 15 nov 2015;29(22):2331-6.
239. Brüning A, Rahmeh M, Friese K. Nelfinavir and bortezomib inhibit mTOR activity via ATF4-mediated sestrin-2 regulation. *Mol Oncol*. déc 2013;7(6):1012-8.

240. Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, Wyant GA, et al. The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell*. 24 mars 2016;165(1):153-64.
241. Wyant GA, Abu-Remaileh M, Wolfson RL, Chen WW, Freinkman E, Danai LV, et al. mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient. *Cell*. 19 oct 2017;171(3):642-654.e12.
242. Wang S, Tsun Z-Y, Wolfson RL, Shen K, Wyant GA, Plovanich ME, et al. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*. 9 janv 2015;347(6218):188-94.
243. Gu X, Orozco JM, Saxton RA, Condon KJ, Liu GY, Krawczyk PA, et al. SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*. 10 2017;358(6364):813-8.
244. Park Y, Reyna-Neyra A, Philippe L, Thoreen CC. mTORC1 Balances Cellular Amino Acid Supply with Demand for Protein Synthesis through Post-transcriptional Control of ATF4. *Cell Rep*. 09 2017;19(6):1083-90.
245. Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, et al. ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab*. mars 2008;7(3):269-76.
246. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 18 nov 2005;123(4):569-80.
247. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*. 5 août 2011;146(3):408-20.
248. Guo Z, Cheng X, Feng X, Zhao K, Zhang M, Yao R, et al. The mTORC1/4EBP1/PPAR γ Axis Mediates Insulin-Induced Lipogenesis by Regulating Lipogenic Gene Expression in Bovine Mammary Epithelial Cells. *J Agric Food Chem*. 29 mai 2019;67(21):6007-18.
249. Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*. 12 févr 2016;351(6274):728-33.
250. Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*. 15 mars 2013;339(6125):1323-8.
251. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 30 juill 2010;39(2):171-83.

252. Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem.* 1 mai 2009;284(18):12297-305.
253. Kim Y-M, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park J-M, Bae SS, et al. mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol Cell.* 22 janv 2015;57(2):207-18.
254. Gao W, Shen Z, Shang L, Wang X. Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death Differ.* oct 2011;18(10):1598-607.
255. Pike LRG, Singleton DC, Buffa F, Abramczyk O, Phadwal K, Li J-L, et al. Transcriptional up-regulation of ULK1 by ATF4 contributes to cancer cell survival. *Biochem J.* 15 janv 2013;449(2):389-400.
256. Allavena G, Boyd C, Oo KS, Maellaro E, Zhivotovsky B, Kaminsky VO. Suppressed translation and ULK1 degradation as potential mechanisms of autophagy limitation under prolonged starvation. *Autophagy.* nov 2016;12(11):2085-97.
257. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* févr 2011;13(2):132-41.
258. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 mars 2011;108(12):4788-93.
259. Chotechuan N, Azzout-Marniche D, Bos C, Chaumontet C, Gausserès N, Steiler T, et al. mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* déc 2009;297(6):E1313-1323.
260. Averous J, Lambert-Langlais S, Mesclon F, Carraro V, Parry L, Jousse C, et al. GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Sci Rep.* 14 2016;6:27698.
261. García MA, Meurs EF, Esteban M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie.* juill 2007;89(6-7):799-811.
262. Scheuner D, Patel R, Wang F, Lee K, Kumar K, Wu J, et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *J Biol Chem.* 28 juill 2006;281(30):21458-68.
263. Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell.* 27 juill 1990;62(2):379-90.

264. Gal-Ben-Ari S, Barrera I, Ehrlich M, Rosenblum K. PKR: A Kinase to Remember. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2019 [cité 3 juill 2020];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00480/full>
265. Piazzini M, Bavelloni A, Faenza I, Blalock W. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 and the double-strand RNA-dependent kinase, PKR: When two kinases for the common good turn bad. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1 oct 2020;1867(10):118769.
266. Lee K, Kunkeaw N, Jeon SH, Lee I, Johnson BH, Kang G-Y, et al. Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA N Y N*. juin 2011;17(6):1076-89.
267. Xu Z, Williams BRG. The B56 α Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 2A Is a Target for Regulation by Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR. *Mol Cell Biol*. 15 juill 2000;20(14):5285-99.
268. Ishii T, Kwon H, Hiscott J, Mosialos G, Koromilas AE. Activation of the I kappa B alpha kinase (IKK) complex by double-stranded RNA-binding defective and catalytic inactive mutants of the interferon-inducible protein kinase PKR. *Oncogene*. 5 avr 2001;20(15):1900-12.
269. Blalock WL, Piazzini M, Bavelloni A, Raffini M, Faenza I, D'Angelo A, et al. Identification of the PKR nuclear interactome reveals roles in ribosome biogenesis, mRNA processing and cell division. *J Cell Physiol*. août 2014;229(8):1047-60.
270. Burwick N, Aktas BH. The eIF2-alpha kinase HRI: a potential target beyond the red blood cell. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(12):1171-7.
271. Suragani RNVS, Zachariah RS, Velazquez JG, Liu S, Sun C-W, Townes TM, et al. Heme-regulated eIF2 α kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood*. 31 mai 2012;119(22):5276-84.
272. Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab*. 1 nov 2009;20(9):436-43.
273. Wortel IMN, van der Meer LT, Kilberg MS, van Leeuwen FN. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2017;28(11):794-806.
274. I D, Z E. Mechanism and Medical Implications of Mammalian Autophagy [Internet]. Vol. 19, *Nature reviews. Molecular cell biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2018 [cité 6 juill 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/29618831/>
275. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*. sept 2013;41(16):7683-99.

276. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem*. 16 juill 2010;285(29):22576-91.
277. Fan L, Yin S, Zhang E, Hu H. Role of p62 in the regulation of cell death induction. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2018;23(3-4):187-93.
278. Gjymishka A, Palii SS, Shan J, Kilberg MS. Despite Increased ATF4 Binding at the C/EBP-ATF Composite Site following Activation of the Unfolded Protein Response, System A Transporter 2 (SNAT2) Transcription Activity Is Repressed in HepG2 Cells. *J Biol Chem*. 10 oct 2008;283(41):27736-47.
279. Sato H, Nomura S, Maebara K, Sato K, Tamba M, Bannai S. Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*. déc 2004;325(1):109-16.
280. Koppula P, Zhang Y, Shi J, Li W, Gan B. The glutamate/cystine antiporter SLC7A11/xCT enhances cancer cell dependency on glucose by exporting glutamate. *J Biol Chem*. 25 août 2017;292(34):14240-9.
281. Hatzoglou M, Fernandez J, Yaman I, Closs E. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:377-99.
282. Huang CC, Li Y, Lopez AB, Chiang C-M, Kaufman RJ, Snider MD, et al. Temporal regulation of Cat-1 (cationic amino acid transporter-1) gene transcription during endoplasmic reticulum stress. *Biochem J*. 1 juill 2010;429(1):215-24.
283. Lopez AB, Wang C, Huang CC, Yaman I, Li Y, Chakravarty K, et al. A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochem J*. 15 févr 2007;402(1):163-73.
284. Huang CC, Chiribau C-B, Majumder M, Chiang C-M, Wek RC, Kelm RJ, et al. A bifunctional intronic element regulates the expression of the arginine/lysine transporter Cat-1 via mechanisms involving the purine-rich element binding protein A (Pur alpha). *J Biol Chem*. 20 nov 2009;284(47):32312-20.
285. Balasubramanian MN, Butterworth EA, Kilberg MS. Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 15 avr 2013;304(8):E789-799.
286. Huggins CJ, Mayekar MK, Martin N, Saylor KL, Gonit M, Jailwala P, et al. C/EBP γ Is a Critical Regulator of Cellular Stress Response Networks through Heterodimerization with ATF4. *Mol Cell Biol*. 1 mars 2016;36(5):693-713.
287. Mimura J, Inose-Maruyama A, Taniuchi S, Kosaka K, Yoshida H, Yamazaki H, et al. Concomitant Nrf2- and ATF4-Activation by Carnosic Acid Cooperatively Induces Expression of Cytoprotective Genes. *Int J Mol Sci [Internet]*. 5 avr 2019 [cité 3 avr 2020];20(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6480217/>

288. Dickhout JG, Carlisle RE, Jerome DE, Mohammed-Ali Z, Jiang H, Yang G, et al. Integrated stress response modulates cellular redox state via induction of cystathionine γ -lyase: cross-talk between integrated stress response and thiol metabolism. *J Biol Chem.* 2 mars 2012;287(10):7603-14.
289. Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD, et al. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 mai 2012;109(18):6904-9.
290. Han J, Back SH, Hur J, Lin Y-H, Gildersleeve R, Shan J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol.* mai 2013;15(5):481-90.
291. Shan J, Zhang F, Sharkey J, Tang TA, Örd T, Kilberg MS. The C/ebp-Atf response element (CARE) location reveals two distinct Atf4-dependent, elongation-mediated mechanisms for transcriptional induction of aminoacyl-tRNA synthetase genes in response to amino acid limitation. *Nucleic Acids Res.* 16 nov 2016;44(20):9719-32.
292. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* mars 2003;11(3):619-33.
293. Dey S, Sayers CM, Verginadis II, Lehman SL, Cheng Y, Cerniglia GJ, et al. ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J Clin Invest.* 1 juill 2015;125(7):2592-608.
294. Sarcinelli C, Dragic H, Piecyk M, Barbet V, Duret C, Barthelaix A, et al. ATF4-Dependent NRF2 Transcriptional Regulation Promotes Antioxidant Protection during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancers.* 1 mars 2020;12(3).
295. Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine.* avr 2011;54(1):6-19.
296. Chérasse Y, Maurin A-C, Chaveroux C, Jousse C, Carraro V, Parry L, et al. The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(17):5954-65.
297. Su N, Kilberg MS. C/EBP homology protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene. *J Biol Chem.* 12 déc 2008;283(50):35106-17.
298. Matsumoto H, Miyazaki S, Matsuyama S, Takeda M, Kawano M, Nakagawa H, et al. Selection of autophagy or apoptosis in cells exposed to ER-stress depends on ATF4 expression pattern with or without CHOP expression. *Biol Open.* 2013;2(10):1084-90.
299. Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated

- induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 déc 2010;30(50):16938-48.
300. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 29 juin 2007;129(7):1337-49.
301. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. févr 2001;21(4):1249-59.
302. Carraro V, Maurin A-C, Lambert-Langlais S, Averous J, Chaveroux C, Parry L, et al. Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PloS One*. 21 déc 2010;5(12):e15716.
303. Hua F, Li K, Yu J-J, Lv X-X, Yan J, Zhang X-W, et al. TRB3 links insulin/IGF to tumour promotion by interacting with p62 and impeding autophagic/proteasomal degradations. *Nat Commun*. 13 août 2015;6(1):7951.
304. Jousse C, Deval C, Maurin A-C, Parry L, Chérasse Y, Chaveroux C, et al. TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J Biol Chem*. 25 mai 2007;282(21):15851-61.
305. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J*. 23 mars 2005;24(6):1243-55.
306. Shimizu K, Takahama S, Endo Y, Sawasaki T. Stress-inducible caspase substrate TRB3 promotes nuclear translocation of procaspase-3. *PloS One*. 2012;7(8):e42721.
307. Teske BF, Fusakio ME, Zhou D, Shan J, McClintick JN, Kilberg MS, et al. CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Mol Biol Cell*. août 2013;24(15):2477-90.
308. Sharma K, Vu T-T, Cook W, Naseri M, Zhan K, Nakajima W, et al. p53-independent Noxa induction by cisplatin is regulated by ATF3/ATF4 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Oncol*. 2018;12(6):788-98.
309. Pagliarini V, Giglio P, Bernardoni P, Zio DD, Fimia GM, Piacentini M, et al. Downregulation of E2F1 during ER stress is required to induce apoptosis. *J Cell Sci*. 15 mars 2015;128(6):1166-79.
310. Hiramatsu N, Messah C, Han J, LaVail MM, Kaufman RJ, Lin JH. Translational and posttranslational regulation of XIAP by eIF2 α and ATF4 promotes ER stress-induced cell death during the unfolded protein response. *Mol Biol Cell*. mai 2014;25(9):1411-20.
311. Fribley A, Zeng Q, Wang C-Y. Proteasome Inhibitor PS-341 Induces Apoptosis through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress-Reactive Oxygen Species in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Mol Cell Biol*. 15 nov 2004;24(22):9695-704.

312. Baranowska K, Misund K, Starheim KK, Holien T, Johansson I, Darvekar S, et al. Hydroxychloroquine potentiates carfilzomib toxicity towards myeloma cells. *Oncotarget*. 25 oct 2016;7(43):70845-56.
313. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D, et al. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res*. 15 mai 2009;69(10):4415-23.
314. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res*. 4 janv 2018;46(D1):D624-32.
315. Mirsky IA, Broh-Kahn RH. The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Arch Biochem*. janv 1949;20(1):1-9.
316. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 23 janv 2015;347(6220):1260419.
317. Huet Y, Strassner J, Schaller A. Cloning, expression and characterization of insulin-degrading enzyme from tomato (*Solanum lycopersicum*). *Biol Chem*. janv 2008;389(1):91-8.
318. Shen Y, Joachimiak A, Rosner MR, Tang W-J. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature*. 19 oct 2006;443(7113):870-4.
319. Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Grasso G, Gioia M, Coletta A, et al. Multiple functions of insulin-degrading enzyme: a metabolic crosslight? *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 21 juin 2017;1-29.
320. Perlman RK, Gehm BD, Kuo WL, Rosner MR. Functional analysis of conserved residues in the active site of insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem*. 15 oct 1993;268(29):21538-44.
321. Malito E, Hulse RE, Tang W-J. Amyloid beta-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell Mol Life Sci CMLS*. août 2008;65(16):2574-85.
322. Manolopoulou M, Guo Q, Malito E, Schilling AB, Tang W-J. Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem*. 22 mai 2009;284(21):14177-88.
323. Im H, Manolopoulou M, Malito E, Shen Y, Zhao J, Neant-Fery M, et al. Structure of substrate-free human insulin-degrading enzyme (IDE) and biophysical analysis of ATP-induced conformational switch of IDE. *J Biol Chem*. 31 août 2007;282(35):25453-63.

324. Song E-S, Juliano MA, Juliano L, Hersh LB. Substrate activation of insulin-degrading enzyme (insulysin). A potential target for drug development. *J Biol Chem*. 12 déc 2003;278(50):49789-94.
325. Song ES, Rodgers DW, Hersh LB. A monomeric variant of insulin degrading enzyme (IDE) loses its regulatory properties. *PloS One*. 16 mars 2010;5(3):e9719.
326. Deprez-Poulain R, Hennuyer N, Bosc D, Liang WG, Enée E, Marechal X, et al. Catalytic site inhibition of insulin-degrading enzyme by a small molecule induces glucose intolerance in mice. *Nat Commun*. 23 sept 2015;6:8250.
327. Noinaj N, Song ES, Bhasin S, Alper BJ, Schmidt WK, Hersh LB, et al. Anion activation site of insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem*. 2 janv 2012;287(1):48-57.
328. Yao H, Hersh LB. Characterization of the binding of the fluorescent ATP analog TNP-ATP to insulysin. *Arch Biochem Biophys*. 15 juill 2006;451(2):175-81.
329. Song ES, Juliano MA, Juliano L, Fried MG, Wagner SL, Hersh LB. ATP effects on insulin-degrading enzyme are mediated primarily through its triphosphate moiety. *J Biol Chem*. 24 déc 2004;279(52):54216-20.
330. Malito E, Ralat LA, Manolopoulou M, Tsay JL, Wadlington NL, Tang W-J. Molecular bases for the recognition of short peptide substrates and cysteine-directed modifications of human insulin-degrading enzyme. *Biochemistry*. 2 déc 2008;47(48):12822-34.
331. Hamel FG, Mahoney MJ, Duckworth WC. Degradation of intraendosomal insulin by insulin-degrading enzyme without acidification. *Diabetes*. avr 1991;40(4):436-43.
332. Song ES, Jang H, Guo H-F, Juliano MA, Juliano L, Morris AJ, et al. Inositol phosphates and phosphoinositides activate insulin-degrading enzyme, while phosphoinositides also mediate binding to endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 avr 2017;114(14):E2826-35.
333. Leissring MA, Farris W, Wu X, Christodoulou DC, Haigis MC, Guarente L, et al. Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem J*. 1 nov 2004;383(Pt. 3):439-46.
334. Morita M, Kurochkin IV, Motojima K, Goto S, Takano T, Okamura S, et al. Insulin-degrading enzyme exists inside of rat liver peroxisomes and degrades oxidized proteins. *Cell Struct Funct*. oct 2000;25(5):309-15.
335. Kupfer SR, Wilson EM, French FS. Androgen and glucocorticoid receptors interact with insulin degrading enzyme. *J Biol Chem*. 12 août 1994;269(32):20622-8.
336. Seta KA, Roth RA. Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 3 févr 1997;231(1):167-71.
337. Song ES, Rodgers DW, Hersh LB. Insulin-degrading enzyme is not secreted from cultured cells. *Sci Rep*. 05 2018;8(1):2335.

338. Bulloj A, Leal MC, Xu H, Castaño EM, Morelli L. Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2010;19(1):79-95.
339. Son SM, Cha M-Y, Choi H, Kang S, Choi H, Lee M-S, et al. Insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes is mediated by an autophagy-based unconventional secretory pathway in Alzheimer disease. *Autophagy*. 03 2016;12(5):784-800.
340. Zhao J, Li L, Leissring MA. Insulin-degrading enzyme is exported via an unconventional protein secretion pathway. *Mol Neurodegener*. 14 janv 2009;4:4.
341. Li Q, Ali MA, Cohen JI. Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread. *Cell*. 20 oct 2006;127(2):305-16.
342. Guo Q, Manolopoulou M, Bian Y, Schilling AB, Tang W-J. Molecular basis for the recognition and cleavages of IGF-II, TGF-alpha, and amylin by human insulin-degrading enzyme. *J Mol Biol*. 15 janv 2010;395(2):430-43.
343. Bennett RG, Duckworth WC, Hamel FG. Degradation of amylin by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem*. 24 nov 2000;275(47):36621-5.
344. Müller D, Baumeister H, Buck F, Richter D. Atrial natriuretic peptide (ANP) is a high-affinity substrate for rat insulin-degrading enzyme. *Eur J Biochem*. 1991;202(2):285-92.
345. Duckworth WC, Kitabchi AE. Insulin and glucagon degradation by the same enzyme. *Diabetes*. juin 1974;23(6):536-43.
346. Safavi A, Miller BC, Cottam L, Hersh LB. Identification of gamma-endorphin-generating enzyme as insulin-degrading enzyme. *Biochemistry*. 12 nov 1996;35(45):14318-25.
347. Kim Y-G, Lone AM, Nolte WM, Saghatelian A. Peptidomics approach to elucidate the proteolytic regulation of bioactive peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 mai 2012;109(22):8523-7.
348. Ralat LA, Kalas V, Zheng Z, Goldman RD, Sosnick TR, Tang W-J. Ubiquitin is a novel substrate for human insulin-degrading enzyme. *J Mol Biol*. 25 févr 2011;406(3):454-66.
349. Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Bianculli A, Orlandi A, Desimio MG, et al. Insulin-degrading enzyme (IDE): a novel heat shock-like protein. *J Biol Chem*. 25 janv 2013;288(4):2281-9.
350. Sbardella D, Tundo GR, Sciandra F, Bozzi M, Gioia M, Ciaccio C, et al. Proteasome Activity Is Affected by Fluctuations in Insulin-Degrading Enzyme Distribution. *PLOS ONE*. 17 juill 2015;10(7):e0132455.
351. Beuzelin C, Evnouchidou I, Rigolet P, Cauvet-Burgevin A, Girard P-M, Dardalhon D, et al. Deletion of the Fission Yeast Homologue of Human Insulinase Reveals a TORC1-Dependent Pathway Mediating Resistance to Proteotoxic Stress. *PLOS ONE*. 24 juin 2013;8(6):e67705.

352. de Tullio MB, Morelli L, Castaño EM. The irreversible binding of amyloid peptide substrates to insulin-degrading enzyme: a biological perspective. *Prion*. juin 2008;2(2):51-6.
353. Sharma SK, Chorell E, Steneberg P, Vernersson-Lindahl E, Edlund H, Wittung-Stafshede P. Insulin-degrading enzyme prevents α -synuclein fibril formation in a nonproteolytical manner. *Sci Rep*. 31 juill 2015;5:12531.
354. Grasso G, Rizzarelli E, Spoto G. How the binding and degrading capabilities of insulin degrading enzyme are affected by ubiquitin. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 1 juill 2008;1784(7):1122-6.
355. Saric T, Müller D, Seitz H-J, Pavelic K. Non-covalent interaction of ubiquitin with insulin-degrading enzyme. *Mol Cell Endocrinol*. 30 juin 2003;204(1-2):11-20.
356. Bellia F, Lanza V, Ahmed IMM, Garcia-Vinuales S, Veiss E, Arizzi M, et al. Site directed mutagenesis of insulin-degrading enzyme allows singling out the molecular basis of peptidase versus E1-like activity: the role of metal ions. *Met Integr Biometal Sci*. 10 janv 2019;
357. Grasso G, Lanza V, Malgieri G, Fattorusso R, Pietropaolo A, Rizzarelli E, et al. The insulin degrading enzyme activates ubiquitin and promotes the formation of K48 and K63 diubiquitin. *Chem Commun Camb Engl*. 7 nov 2015;51(86):15724-7.
358. Bennett RG, Hamel FG, Duckworth WC. Insulin inhibits the ubiquitin-dependent degrading activity of the 26S proteasome. *Endocrinology*. juill 2000;141(7):2508-17.
359. Sbardella D, Tundo GR, Coletta A, Marcoux J, Koufogeorgou EI, Ciaccio C, et al. The insulin-degrading enzyme is an allosteric modulator of the 20S proteasome and a potential competitor of the 19S. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 28 mars 2018;
360. Fawcett J, Permana PA, Levy JL, Duckworth WC. Regulation of protein degradation by insulin-degrading enzyme: analysis by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Arch Biochem Biophys*. 1 déc 2007;468(1):128-33.
361. Weirich G, Mengele K, Yfanti C, Gkazepis A, Hellmann D, Welk A, et al. Immunohistochemical evidence of ubiquitous distribution of the metalloendoprotease insulin-degrading enzyme (IDE; insulysin) in human non-malignant tissues and tumor cell lines. *Biol Chem*. nov 2008;389(11):1441-5.
362. Yfanti C, Mengele K, Gkazepis A, Weirich G, Giersig C, Kuo W-L, et al. Expression of metalloprotease insulin-degrading enzyme (insulysin) in normal and malignant human tissues. *Int J Mol Med*. oct 2008;22(4):421-31.
363. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 18 2017;357(6352).

364. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B, Zhan F, Chng WJ, Roels S, et al. Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood*. 15 avr 2007;109(8):3177-88.
365. Radulescu RT, Hufnagel C, Luppia P, Hellebrand H, Kuo W-L, Rosner MR, et al. Immunohistochemical demonstration of the zinc metalloprotease insulin-degrading enzyme in normal and malignant human breast: correlation with tissue insulin levels. *Int J Oncol*. janv 2007;30(1):73-80.
366. Gong Y, Ma Y, Sinyuk M, Loganathan S, Thompson RC, Sarkaria JN, et al. Insulin-mediated signaling promotes proliferation and survival of glioblastoma through Akt activation. *Neuro-Oncol*. janv 2016;18(1):48-57.
367. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*. déc 2008;8(12):915-28.
368. Zhao L, Teter B, Morihara T, Lim GP, Ambegaokar SS, Ubeda OJ, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 8 déc 2004;24(49):11120-6.
369. Liu M, Wang Z, Ren M, Yang X, Liu B, Qi H, et al. SIRT4 regulates PTEN stability through IDE in response to cellular stresses. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. avr 2019;33(4):5535-47.
370. Radulescu RT, Duckworth WC, Levy JL, Fawcett J. Retinoblastoma protein co-purifies with proteasomal insulin-degrading enzyme: implications for cell proliferation control. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 avr 2010;395(2):196-9.
371. Tundo GR, Sbardella D, De Pascali SA, Ciaccio C, Coletta M, Fanizzi FP, et al. Novel Platinum(II) compounds modulate insulin-degrading enzyme activity and induce cell death in neuroblastoma cells. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem*. janv 2015;20(1):101-8.
372. Leissring MA, Malito E, Hedouin S, Reinstatler L, Sahara T, Abdul-Hay SO, et al. Designed inhibitors of insulin-degrading enzyme regulate the catabolism and activity of insulin. *PloS One*. 7 mai 2010;5(5):e10504.
373. Maianti JP, McFedries A, Foda ZH, Kleiner RE, Du XQ, Leissring MA, et al. Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones. *Nature*. 3 juill 2014;511(7507):94-8.
374. Herledan A, Andres M, Lejeune-Dodge A, Leroux F, Biela A, Piveteau C, et al. Drug Target Engagement Using Coupled Cellular Thermal Shift Assay-Acoustic Reverse-Phase Protein Array. *SLAS Discov Adv Life Sci R D*. 2020;25(2):207-14.
375. Leroux F, Bosc D, Beghyn T, Hermant P, Warenghem S, Landry V, et al. Identification of ebselen as a potent inhibitor of insulin degrading enzyme by a drug repurposing screening. *Eur J Med Chem*. 1 oct 2019;179:557-66.

376. Durham TB, Toth JL, Klimkowski VJ, Cao JXC, Siesky AM, Alexander-Chacko J, et al. Dual Exosite-binding Inhibitors of Insulin-degrading Enzyme Challenge Its Role as the Primary Mediator of Insulin Clearance in vivo. *J Biol Chem*. 17 juin 2015;jbc.M115.638205.
377. Charton J, Gauriot M, Guo Q, Hennuyer N, Marechal X, Dumont J, et al. Imidazole-derived 2-[N-carbamoylmethyl-alkylamino]acetic acids, substrate-dependent modulators of insulin-degrading enzyme in amyloid- β hydrolysis. *Eur J Med Chem*. mai 2014;79:184-93.
378. Miguet L, Béchade G, Fornecker L, Zink E, Felden C, Gervais C, et al. Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J Proteome Res*. juill 2009;8(7):3346-54.
379. Franken H, Mathieson T, Childs D, Sweetman GMA, Werner T, Tögel I, et al. Thermal proteome profiling for unbiased identification of direct and indirect drug targets using multiplexed quantitative mass spectrometry. *Nat Protoc*. oct 2015;10(10):1567-93.
380. Savitski MM, Reinhard FBM, Franken H, Werner T, Savitski MF, Eberhard D, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science*. 10 mars 2014;346(6205):1255784.
381. Vanderkerken K, Asosingh K, Croucher P, Van Camp B. Multiple myeloma biology: lessons from the 5TMM models. *Immunol Rev*. août 2003;194:196-206.
382. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol*. 2011;490:71.
383. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 28 déc 1998;143(7):1883-98.
384. García-Mata R, Bebök Z, Sorscher EJ, Sztul ES. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol*. 20 sept 1999;146(6):1239-54.
385. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao T-P. The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell*. 12 déc 2003;115(6):727-38.
386. Hyttinen JMT, Amadio M, Viiri J, Pascale A, Salminen A, Kaarniranta K. Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Res Rev*. nov 2014;18:16-28.
387. Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Andtbacka RHI, Dunner K, et al. Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 1 avr 2006;66(7):3773-81.
388. Shen D, Coleman J, Chan E, Nicholson TP, Dai L, Sheppard PW, et al. Novel Cell- and Tissue-Based Assays for Detecting Misfolded and Aggregated Protein Accumulation

- Within Aggresomes and Inclusion Bodies. *Cell Biochem Biophys.* juill 2011;60(3):173-85.
389. Granato M, Santarelli R, Lotti LV, Renzo LD, Gonnella R, Garufi A, et al. JNK and Macroautophagy Activation by Bortezomib Has a Pro-Survival Effect in Primary Effusion Lymphoma Cells. *PLOS ONE.* 26 sept 2013;8(9):e75965.
390. Auner HW, Moody AM, Ward TH, Kraus M, Milan E, May P, et al. Combined inhibition of p97 and the proteasome causes lethal disruption of the secretory apparatus in multiple myeloma cells. *PLoS One.* 2013;8(9):e74415.
391. Mishima Y, Santo L, Eda H, Cirstea D, Nemani N, Yee AJ, et al. Ricolinostat (ACY-1215) induced inhibition of aggresome formation accelerates carfilzomib-induced multiple myeloma cell death. *Br J Haematol.* 1 févr 2015;n/a-n/a.
392. Vangala JR, Potluri A, Radhakrishnan SK. BET Inhibitors Synergize with Carfilzomib to Induce Cell Death in Cancer Cells via Impairing Nrf1 Transcriptional Activity and Exacerbating the Unfolded Protein Response. *Biomolecules.* avr 2020;10(4):501.
393. Lesire L, Chaput L, Casas PCD, Rousseau F, Piveteau C, Dumont J, et al. High-Throughput Image-Based Aggresome Quantification: SLAS Discov Adv Sci Drug Discov [Internet]. 25 mai 2020 [cité 25 mai 2020]; Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/eprint/UCQWMEZEZH7MNQ/full>
394. Gentile M, Latonen L, Laiho M. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. *Nucleic Acids Res.* 15 août 2003;31(16):4779-90.
395. Mullenders LHF. Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol.* 5 déc 2018;17(12):1842-52.
396. Chang H-W, Tang J-Y, Yen C-Y, Chang H-S, Huang H-W, Chung Y-A, et al. Synergistic anti-oral cancer effects of UVC and methanolic extracts of *Cryptocarya concinna* roots via apoptosis, oxidative stress and DNA damage. *Int J Radiat Biol.* 2016;92(5):263-72.
397. Latonen L, Taya Y, Laiho M. UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene.* 11 oct 2001;20(46):6784-93.
398. Latonen L, Kurki S, Pitkänen K, Laiho M. p53 and MDM2 are regulated by PI-3-kinases on multiple levels under stress induced by UV radiation and proteasome dysfunction. *Cell Signal.* janv 2003;15(1):95-102.
399. Flickinger I, Rütgen BC, Gerner W, Calice I, Tichy A, Saalmüller A, et al. Radiation up-regulates the expression of VEGF in a canine oral melanoma cell line. *J Vet Sci.* 2013;14(2):207-14.

400. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst.* 23 déc 2015;1(6):417-25.
401. Kasinath BS, Mariappan MM, Sataranatarajan K, Lee MJ, Feliers D. mRNA translation: unexplored territory in renal science. *J Am Soc Nephrol JASN.* déc 2006;17(12):3281-92.
402. Krige D, Needham LA, Bawden LJ, Flores N, Farmer H, Miles LEC, et al. CHR-2797: an antiproliferative aminopeptidase inhibitor that leads to amino acid deprivation in human leukemic cells. *Cancer Res.* 15 août 2008;68(16):6669-79.
403. Kim KB, Myung J, Sin N, Crews CM. Proteasome inhibition by the natural products epoxomicin and dihydroeponemycin: insights into specificity and potency. *Bioorg Med Chem Lett.* 6 déc 1999;9(23):3335-40.
404. Kilberg MS, Pan Y-X, Chen H, Leung-Pineda V. Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:59-85.
405. Lv Y, Xiao J, Liu J, Xing F. E2F8 is a Potential Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer.* 2017;8(7):1205-13.
406. Lü Y, Zhang J, Li L, Li S, Yang Z. Carcinogenesis effects of E2F transcription factor 8 (E2F8) in hepatocellular carcinoma outcomes: an integrated bioinformatic report. *Biosci Rep.* 28 févr 2020;40(2).
407. Jin DH, Kim Y, Lee BB, Han J, Kim HK, Shim YM, et al. Metformin induces cell cycle arrest at the G1 phase through E2F8 suppression in lung cancer cells. *Oncotarget.* 6 oct 2017;8(60):101509-19.
408. Leung-Pineda V, Pan Y, Chen H, Kilberg MS. Induction of p21 and p27 expression by amino acid deprivation of HepG2 human hepatoma cells involves mRNA stabilization. *Biochem J.* 1 avr 2004;379(Pt 1):79-88.
409. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 19 nov 1993;75(4):817-25.
410. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct.* 2008;33(1):75-89.
411. Zou S, Wang X, Liu P, Ke C, Xu S. Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* oct 2019;118:109210.
412. Tsai W-B, Aiba I, Long Y, Lin H-K, Feun L, Savaraj N, et al. Activation of Ras/PI3K/ERK Pathway Induces c-Myc Stabilization to Upregulate Argininosuccinate Synthetase, Leading to Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells. *Cancer Res.* 15 mai 2012;72(10):2622-33.

413. Sprynski AC, Hose D, Caillot L, Réme T, Shaughnessy JD, Barlogie B, et al. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood*. 7 mai 2009;113(19):4614-26.
414. Yavari K, Taghikhani M, Ghannadi Maragheh M, Mesbah-Namin SA, Babaei MH. Downregulation of IGF-IR expression by RNAi inhibits proliferation and enhances chemosensitization of human colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis*. janv 2010;25(1):9-16.
415. Straus DS. Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *FASEB J*. janv 1994;8(1):6-12.
416. Jousse C, Bruhat A, Ferrara M, Fafournoux P. Physiological concentration of amino acids regulates insulin-like-growth-factor-binding protein 1 expression. *Biochem J*. 15 août 1998;334 (Pt 1):147-53.
417. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ*. avr 2008;15(4):621-7.
418. Abcouwer SF, Marjon PL, Loper RK, Vander Jagt DL. Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. août 2002;43(8):2791-8.
419. Marjon PL, Bobrovnikova-Marjon EV, Abcouwer SF. Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Mol Cancer*. 22 janv 2004;3:4.
420. Wang Y, Ning Y, Alam GN, Jankowski BM, Dong Z, Nör JE, et al. Amino acid deprivation promotes tumor angiogenesis through the GCN2/ATF4 pathway. *Neoplasia N Y N*. août 2013;15(8):989-97.
421. Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, Mercurio AM, Hunt JS, Ron D, et al. Transcriptional Regulation of VEGF-A by the Unfolded Protein Response Pathway. *PLOS ONE*. 8 mars 2010;5(3):e9575.
422. Pereira ER, Liao N, Neale GA, Hendershot LM. Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Proangiogenic Factors by the Unfolded Protein Response. *PLOS ONE*. 2 sept 2010;5(9):e12521.
423. Wang Y, Alam GN, Ning Y, Visioli F, Dong Z, Nör JE, et al. The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res*. 15 oct 2012;72(20):5396-406.
424. Masjedi A, Hashemi V, Hojjat-Farsangi M, Ghalamfarsa G, Azizi G, Yousefi M, et al. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 1 déc 2018;108:1415-24.

425. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(8):469-84.
426. Gameiro PA, Struhl K. Nutrient Deprivation Elicits a Transcriptional and Translational Inflammatory Response Coupled to Decreased Protein Synthesis. *Cell Rep.* août 2018;24(6):1415-24.
427. Sanchez CL, Sims SG, Nowery JD, Meares GP. Endoplasmic reticulum stress differentially modulates the IL-6 family of cytokines in murine astrocytes and macrophages. *Sci Rep.* 17 oct 2019;9(1):1-12.
428. Iwasaki Y, Suganami T, Hachiya R, Shirakawa I, Kim-Saijo M, Tanaka M, et al. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes.* janv 2014;63(1):152-61.
429. Fang P, Xiang L, Huang S, Jin L, Zhou G, Zhuge L, et al. IRE1 α -XBP1 signaling pathway regulates IL-6 expression and promotes progression of hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* oct 2018;16(4):4729-36.
430. Emmerson PJ, Duffin KL, Chintharlapalli S, Wu X. GDF15 and Growth Control. *Front Physiol.* 2018;9:1712.
431. Unsicker K, Spittau B, Kriegelstein K. The multiple facets of the TGF- β family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* août 2013;24(4):373-84.
432. Zheng H, Wu Y, Guo T, Liu F, Xu Y, Cai S. Hypoxia Induces Growth Differentiation Factor 15 to Promote the Metastasis of Colorectal Cancer via PERK-eIF2 α Signaling. *BioMed Res Int.* 2020;2020:5958272.
433. Scheffer D, Kulcsár G, Nagyéri G, Kiss-Merki M, Rékási Z, Maloy M, et al. Active mixture of serum-circulating small molecules selectively inhibits proliferation and triggers apoptosis in cancer cells via induction of ER stress. *Cell Signal.* janv 2020;65:109426.
434. Rochette L, Méloux A, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Functional roles of GDF15 in modulating microenvironment to promote carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 15 avr 2020;165798.
435. Westhrin M, Moen SH, Holien T, Mylin AK, Heickendorff L, Olsen OE, et al. Growth differentiation factor 15 (GDF15) promotes osteoclast differentiation and inhibits osteoblast differentiation and high serum GDF15 levels are associated with multiple myeloma bone disease. *Haematologica.* déc 2015;100(12):e511-514.
436. Corre, Corre J. Growth Differentiation Factor 15 in Multiple Myeloma: A Microenvironment Factor Predictive of Response to Treatment? *Acta Haematol.* 2014;131(3):170-2.

437. Tanno T, Lim Y, Wang Q, Chesi M, Bergsagel PL, Matthews G, et al. Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood*. 30 janv 2014;123(5):725-33.
438. Kim Y, Noren Hooten N, Evans MK. CRP Stimulates GDF15 Expression in Endothelial Cells through p53. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:8278039.
439. Kang H-S, Ock J, Lee H-J, Lee Y-J, Kwon B-M, Hong S-H. Early growth response protein 1 upregulation and nuclear translocation by 2'-benzoyloxycinnamaldehyde induces prostate cancer cell death. *Cancer Lett*. 28 févr 2013;329(2):217-27.
440. Li S, Ma Y-M, Zheng P-S, Zhang P. GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 10 avr 2018;37(1):80.
441. Adachi H, Majima S, Kon S, Kobayashi T, Kajino K, Mitani H, et al. Niban gene is commonly expressed in the renal tumors: a new candidate marker for renal carcinogenesis. *Oncogene*. 22 avr 2004;23(19):3495-500.
442. Ito S, Fujii H, Matsumoto T, Abe M, Ikeda K, Hino O. Frequent expression of Niban in head and neck squamous cell carcinoma and squamous dysplasia. *Head Neck*. janv 2010;32(1):96-103.
443. Majima S, Kajino K, Fukuda T, Otsuka F, Hino O. A novel gene « Niban » upregulated in renal carcinogenesis: cloning by the cDNA-amplified fragment length polymorphism approach. *Jpn J Cancer Res Gann*. sept 2000;91(9):869-74.
444. Tang S, Wang J, Liu J, Huang Y, Zhou Y, Yang S, et al. Niban protein regulates apoptosis in HK-2 cells via caspase-dependent pathway. *Ren Fail*. nov 2019;41(1):455-66.
445. Ji H, Ding Z, Hawke D, Xing D, Jiang B-H, Mills GB, et al. AKT-dependent phosphorylation of Niban regulates nucleophosmin- and MDM2-mediated p53 stability and cell apoptosis. *EMBO Rep*. 1 juin 2012;13(6):554-60.
446. Sun GD, Kobayashi T, Abe M, Tada N, Adachi H, Shiota A, et al. The endoplasmic reticulum stress-inducible protein Niban regulates eIF2alpha and S6K1/4E-BP1 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 17 août 2007;360(1):181-7.
447. Nozima BH, Mendes TB, Pereira GJ da S, Araldi RP, Iwamura ESM, Smaili SS, et al. FAM129A regulates autophagy in thyroid carcinomas in an oncogene-dependent manner. *Endocr Relat Cancer*. 01 2019;26(1):227-38.
448. Pällmann N, Livgård M, Tesikova M, Zeynep Nenseth H, Akkus E, Sikkeland J, et al. Regulation of the unfolded protein response through ATF4 and FAM129A in prostate cancer. *Oncogene*. 2019;38(35):6301-18.
449. Evstafieva AG, Kovaleva IE, Shoshinova MS, Budanov AV, Chumakov PM. Implication of KRT16, FAM129A and HKDC1 genes as ATF4 regulated components of the integrated stress response. *PloS One*. 2018;13(2):e0191107.

450. Janky R, Verfaillie A, Imrichová H, Van de Sande B, Standaert L, Christiaens V, et al. iRegulon: From a Gene List to a Gene Regulatory Network Using Large Motif and Track Collections. *Bussemaker HJ, éditeur. PLoS Comput Biol.* 24 juill 2014;10(7):e1003731.
451. Cowell IG, Skinner A, Hurst HC. Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors. *Mol Cell Biol.* juill 1992;12(7):3070-7.
452. Keniry M, Dearth RK, Persans M, Parsons R. New Frontiers for the NFIL3 bZIP Transcription Factor in Cancer, Metabolism and Beyond. *Discov Craiova Rom.* juin 2014;2(2):e15.
453. Tong X, Muchnik M, Chen Z, Patel M, Wu N, Joshi S, et al. Transcriptional repressor E4-binding protein 4 (E4BP4) regulates metabolic hormone fibroblast growth factor 21 (FGF21) during circadian cycles and feeding. *J Biol Chem.* 19 nov 2010;285(47):36401-9.
454. Priceman SJ, Kirzner JD, Nary LJ, Morris D, Shankar DB, Sakamoto KM, et al. Calcium-dependent upregulation of E4BP4 expression correlates with glucocorticoid-evoked apoptosis of human leukemic CEM cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 juin 2006;344(2):491-9.
455. Li F, Liu J, Jo M, Curry TE. A role for nuclear factor interleukin-3 (NFIL3), a critical transcriptional repressor, in down-regulation of periovulatory gene expression. *Mol Endocrinol Baltim Md.* mars 2011;25(3):445-59.
456. Grierson P, Teague A, Suresh R, Lim K-H, Amin M, Pedersen K, et al. Phase Ib/II study combining tosedostat with capecitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol.* févr 2020;11(1):61-7.
457. Mawad R, Becker PS, Hendrie P, Scott B, Wood BL, Dean C, et al. Phase II study of tosedostat with cytarabine or decitabine in newly diagnosed older patients with acute myeloid leukaemia or high-risk MDS. *Br J Haematol.* janv 2016;172(2):238-45.
458. Mathisen MS, Ravandi F. Efficacy of tosedostat, a novel, oral agent for elderly patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia: a review of the Phase II OPAL trial. *Future Oncol Lond Engl.* avr 2012;8(4):351-7.
459. van Herpen CML, Eskens F a. LM, de Jonge M, Desar I, Hooftman L, Bone EA, et al. A Phase Ib dose-escalation study to evaluate safety and tolerability of the addition of the aminopeptidase inhibitor tosedostat (CHR-2797) to paclitaxel in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer.* 26 oct 2010;103(9):1362-8.
460. Löwenberg B, Morgan G, Ossenkoppele GJ, Burnett AK, Zachée P, Dührsen U, et al. Phase I/II clinical study of Tosedostat, an inhibitor of aminopeptidases, in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 oct 2010;28(28):4333-8.
461. Smith EM, Zhang L, Walker BA, Davenport EL, Aronson LI, Krige D, et al. The combination of HDAC and aminopeptidase inhibitors is highly synergistic in myeloma

- and leads to disruption of the NFκB signalling pathway. *Oncotarget*. 10 juill 2015;6(19):17314-27.
462. Moffat D, Patel S, Day F, Belfield A, Donald A, Rowlands M, et al. Discovery of 2-(6-[[[6-Fluoroquinolin-2-yl)methyl]amino]bicyclo[3.1.0]hex-3-yl)-N-hydroxypyrimidine-5-carboxamide (CHR-3996), a Class I Selective Orally Active Histone Deacetylase Inhibitor. *J Med Chem*. 23 déc 2010;53(24):8663-78.
463. Anbalagan S, Biasoli D, Leszczynska KB, Mukherjee S, Hammond EM. In Vitro Radiosensitization of Esophageal Cancer Cells with the Aminopeptidase Inhibitor CHR-2797. *Radiat Res*. sept 2015;184(3):259-65.
464. Hitzerd SM, Verbrugge SE, Ossenkoppelle G, Jansen G, Peters GJ. Positioning of aminopeptidase inhibitors in next generation cancer therapy. *Amino Acids*. avr 2014;46(4):793-808.
465. van Hensbergen Y, Broxterman HJ, Hanemaaijer R, Jorna AS, van Lent NA, Verheul HMW, et al. Soluble aminopeptidase N/CD13 in malignant and nonmalignant effusions and intratumoral fluid. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. déc 2002;8(12):3747-54.
466. Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med*. août 2008;14(8):361-71.
467. Tusell SM, Schittone SA, Holmes KV. Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *J Virol*. févr 2007;81(3):1261-73.
468. Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Pfenninger A, Frick W, Jähne G, et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem*. 14 janv 2005;280(2):1306-20.
469. Dong X, An B, Salvucci Kierstead L, Storkus WJ, Amoscato AA, Salter RD. Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 janv 2000;164(1):129-35.
470. Lucius R, Sievers J, Mentlein R. Enkephalin metabolism by microglial aminopeptidase N (CD13). *J Neurochem*. avr 1995;64(4):1841-7.
471. Zhang Q, Wang J, Zhang H, Zhao D, Zhang Z, Zhang S. Expression and clinical significance of aminopeptidase N/CD13 in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Ther*. mars 2015;11(1):223-8.
472. Dalal BI, Al Mugairi A, Pi S, Lee SY, Khare NS, Pal J, et al. Aberrant expression of CD13 identifies a subgroup of standard-risk adult acute lymphoblastic leukemia with inferior survival. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. juin 2014;14(3):239-44.

473. Mishima Y, Matsumoto-Mishima Y, Terui Y, Katsuyama M, Yamada M, Mori M, et al. Leukemic cell-surface CD13/aminopeptidase N and resistance to apoptosis mediated by endothelial cells. *J Natl Cancer Inst.* 3 juill 2002;94(13):1020-8.
474. Liang W, Gao B, Xu G, Weng D, Xie M, Qian Y. Possible contribution of aminopeptidase N (APN/CD13) to migration and invasion of human osteosarcoma cell lines. *Int J Oncol.* déc 2014;45(6):2475-85.
475. Zheng Y-B, Gong J-H, Liu X-J, Li Y, Zhen Y-S. A CD13-targeting peptide integrated protein inhibits human liver cancer growth by killing cancer stem cells and suppressing angiogenesis. *Mol Carcinog.* 2017;56(5):1395-404.
476. Kim E, Kwak H, Ahn K. Cytosolic aminopeptidases influence MHC class I-mediated antigen presentation in an allele-dependent manner. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 déc 2009;183(11):7379-87.
477. Bhutani N, Venkatraman P, Goldberg AL. Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *EMBO J.* 7 mars 2007;26(5):1385-96.
478. Perez I, Blanco L, Sanz B, Errarte P, Ariz U, Beitia M, et al. Altered Activity and Expression of Cytosolic Peptidases in Colorectal Cancer. *Int J Med Sci.* 2015;12(6):458-67.
479. Fang C, Zhang J, Yang H, Peng L, Wang K, Wang Y, et al. Leucine aminopeptidase 3 promotes migration and invasion of breast cancer cells through upregulation of fascin and matrix metalloproteinases-2/9 expression. *J Cell Biochem.* 2019;120(3):3611-20.
480. He X, Huang Q, Qiu X, Liu X, Sun G, Guo J, et al. LAP3 promotes glioma progression by regulating proliferation, migration and invasion of glioma cells. *Int J Biol Macromol.* janv 2015;72:1081-9.
481. Rao NL, Riley JP, Banie H, Xue X, Sun B, Crawford S, et al. Leukotriene A(4) hydrolase inhibition attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 mai 2010;181(9):899-907.
482. Oi N, Yamamoto H, Langfald A, Bai R, Lee M-H, Bode AM, et al. LTA4H regulates cell cycle and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 01 2017;38(7):728-37.
483. Lin M, Zhang X, Jia B, Guan S. Suppression of glioblastoma growth and angiogenesis through molecular targeting of methionine aminopeptidase-2. *J Neurooncol.* janv 2018;136(2):243-54.
484. Datta R, Choudhury P, Bhattacharya M, Soto Leon F, Zhou Y, Datta B. Protection of translation initiation factor eIF2 phosphorylation correlates with eIF2-associated glycoprotein p67 levels and requires the lysine-rich domain I of p67. *Biochimie.* oct 2001;83(10):919-31.

485. Li DT, Habtemichael EN, Bogan JS. Vasopressin inactivation: Role of insulin-regulated aminopeptidase. *Vitam Horm.* 2020;113:101-28.
486. Ito N, Nomura S, Iwase A, Ito T, Kikkawa F, Tsujimoto M, et al. ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 20 févr 2004;314(4):1008-13.
487. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, et al. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science.* 10 juill 2009;325(5937):213-7.
488. Shibata K, Kikkawa F, Suzuki Y, Mizokami Y, Kajiyama H, Ino K, et al. Expression of placental leucine aminopeptidase is associated with a poor outcome in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Oncology.* 2004;66(4):288-95.
489. Shibata K, Kajiyama H, Ino K, Nawa A, Nomura S, Mizutani S, et al. P-LAP/IRAP-induced cell proliferation and glucose uptake in endometrial carcinoma cells via insulin receptor signaling. *BMC Cancer.* 19 janv 2007;7:15.
490. Compagnone M, Cifaldi L, Fruci D. Regulation of ERAP1 and ERAP2 genes and their dysfunction in human cancer. *Hum Immunol.* mai 2019;80(5):318-24.
491. Babaie F, Hosseinzadeh R, Ebraze M, Seyfizadeh N, Aslani S, Salimi S, et al. The roles of ERAP1 and ERAP2 in autoimmunity and cancer immunity: New insights and perspective. *Mol Immunol.* 2 mars 2020;121:7-19.
492. Kawatkar A, Schefter M, Hermansson N-O, Snijder A, Dekker N, Brown DG, et al. CETSA beyond Soluble Targets: a Broad Application to Multipass Transmembrane Proteins. *ACS Chem Biol.* 20 2019;14(9):1913-20.
493. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 5 févr 2010;140(3):313-26.
494. Gehm BD, Kuo WL, Perlman RK, Rosner MR. Mutations in a zinc-binding domain of human insulin-degrading enzyme eliminate catalytic activity but not insulin binding. *J Biol Chem.* 15 avr 1993;268(11):7943-8.
495. Perlman RK, Rosner MR. Identification of zinc ligands of the insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem.* 30 déc 1994;269(52):33140-5.
496. Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature.* 19 oct 2017;550(7676):407-10.
497. Dai L, Zhao T, Bisteau X, Sun W, Prabhu N, Lim YT, et al. Modulation of Protein-Interaction States through the Cell Cycle. *Cell.* 31 2018;173(6):1481-1494.e13.
498. Hudson RP, Dawson JE, Chong PA, Yang Z, Millen L, Thomas PJ, et al. Direct Binding of the Corrector VX-809 to Human CFTR NBD1: Evidence of an Allosteric Coupling

- between the Binding Site and the NBD1:CL4 Interface. *Mol Pharmacol.* 2017;92(2):124-35.
499. Jha S, Taschler U, Domenig O, Poglitsch M, Bourgeois B, Pollheimer M, et al. Dipeptidyl peptidase 3 modulates the renin-angiotensin system in mice. *J Biol Chem.* 16 juin 2020;
500. Lu K, Alcivar AL, Ma J, Foo TK, Zywea S, Mahdi A, et al. NRF2 Induction Supporting Breast Cancer Cell Survival Is Enabled by Oxidative Stress-Induced DPP3-KEAP1 Interaction. *Cancer Res.* 01 2017;77(11):2881-92.
501. Qin S, Jiang C, Gao J. Transcriptional factor Nrf2 is essential for aggresome formation during proteasome inhibition. *Biomed Rep.* 1 déc 2019;11(6):241-52.
502. Wang X, Ji S, Ma Y, Xing X, Zhou Y, Xu X, et al. Vimentin plays an important role in the promotion of breast cancer cell migration and invasion by leucine aminopeptidase 3. *Cytotechnology.* 22 juin 2020;
503. Kang W, Hong SH, Lee HM, Kim NY, Lim YC, Le LTM, et al. Structural and biochemical basis for the inhibition of cell death by APIP, a methionine salvage enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 7 janv 2014;111(1):E54-61.
504. McDonnell LM, Mirzaa GM, Alcantara D, Schwartzentruber J, Carter MT, Lee LJ, et al. Mutations in STAMBP, encoding a deubiquitinating enzyme, cause microcephaly-capillary malformation syndrome. *Nat Genet.* mai 2013;45(5):556-62.
505. Tian S, Jin S, Wu Y, Liu T, Luo M, Ou J, et al. High-throughput screening of functional deubiquitinating enzymes in autophagy. *Autophagy.* 26 mai 2020;1-12.
506. Higashimori A, Dong Y, Zhang Y, Kang W, Nakatsu G, Ng SSM, et al. Forkhead Box F2 Suppresses Gastric Cancer through a Novel FOXF2-IRF2BPL- β -Catenin Signaling Axis. *Cancer Res.* 01 2018;78(7):1643-56.
507. Ramalho-Oliveira R, Oliveira-Vieira B, Viola JPB. IRF2BP2: A new player in the regulation of cell homeostasis. *J Leukoc Biol.* 2019;106(3):717-23.
508. Yeung KT, Das S, Zhang J, Lomniczi A, Ojeda SR, Xu C-F, et al. A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2. *Mol Cell Biol.* juin 2011;31(11):2287-98.
509. Shim SY, Wang J, Asada N, Neumayer G, Tran HC, Ishiguro K, et al. Protein 600 Is a Microtubule/Endoplasmic Reticulum-Associated Protein in CNS Neurons. *J Neurosci.* 2 avr 2008;28(14):3604-14.
510. Kim ST, Lee YJ, Tasaki T, Mun SR, Hwang J, Kang MJ, et al. The N-recognin UBR4 of the N-end rule pathway is targeted to and required for the biogenesis of the early endosome. *J Cell Sci [Internet].* 1 sept 2018 [cité 21 juill 2020];131(17). Disponible sur: <https://jcs-biologists-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/content/131/17/jcs217646>

511. Nakadera E, Yamashina S, Izumi K, Inami Y, Sato T, Fukushima H, et al. Inhibition of mTOR improves the impairment of acidification in autophagic vesicles caused by hepatic steatosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 22 janv 2016;469(4):1104-10.
512. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 30 mars 2017;8(23):38022-43.
513. ALD n° 30 - Cancer primitif du système nerveux central [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 30 juill 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_1005897/fr/ald-n-30-cancer-primitif-du-systeme-nerveux-central
514. Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*. 12 juin 2009;9(Suppl 1):S3.
515. Morin A, Soane C, Pierce A, Sanford B, Jones KL, Crespo M, et al. Proteasome inhibition as a therapeutic approach in atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Neuro-Oncol Adv*. déc 2020;2(1):vdaa051.
516. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 8 janv 2019;47(D1):D941-7.
517. Montalbano R, Waldegger P, Quint K, Jabari S, Neureiter D, Illig R, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a pivotal role in cell death mediated by the pan-deacetylase inhibitor panobinostat in human hepatocellular cancer cells. *Transl Oncol*. avr 2013;6(2):143-57.
518. Sacco A, Aujay M, Morgan B, Azab AK, Maiso P, Liu Y, et al. Carfilzomib-Dependent Selective Inhibition of the Chymotrypsin-like Activity of the Proteasome Leads to Antitumor Activity in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res*. 1 avr 2011;17(7):1753-64.
519. Xian M, Cao H, Cao J, Shao X, Zhu D, Zhang N, et al. Bortezomib sensitizes human osteosarcoma cells to adriamycin-induced apoptosis through ROS-dependent activation of p-eIF2 α /ATF4/CHOP axis. *Int J Cancer*. 01 2017;141(5):1029-41.
520. Tang W, Su G, Li J, Liao J, Chen S, Huang C, et al. Enhanced anti-colorectal cancer effects of carfilzomib combined with CPT-11 via downregulation of nuclear factor- κ B in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 1 sept 2014;45(3):995-1010.
521. Mondello P, Brea EJ, De Stanchina E, Toska E, Chang AY, Fennell M, et al. Panobinostat acts synergistically with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma cells with MyD88 L265P mutations. *JCI Insight*. 15 2018;3(22).
522. Panzhinskiy E, Ren J, Nair S. Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Insulin Resistance: Role of Endoplasmic Reticulum Stress/Reactive Oxygen Species/Nuclear Factor Kappa B Axis. *PLOS ONE*. 18 oct 2013;8(10):e77228.

523. Plenge RM, Scolnick EM, Altshuler D. Validating therapeutic targets through human genetics. *Nat Rev Drug Discov.* août 2013;12(8):581-94.
524. Budayeva HG, Kirkpatrick DS. Monitoring protein communities and their responses to therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* juin 2020;19(6):414-26.
525. Childs D, Bach K, Franken H, Anders S, Kurzawa N, Bantscheff M, et al. Nonparametric Analysis of Thermal Proteome Profiles Reveals Novel Drug-binding Proteins. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2019;18(12):2506-15.
526. Mateus A, Määttä TA, Savitski MM. Thermal proteome profiling: unbiased assessment of protein state through heat-induced stability changes. *Proteome Sci.* 2016;15:13.