

Université de Montréal

**L'immunoprotéasome : Régulateur de
transcription et promoteur de survie cellulaire**

par

Alexandre Rouette

Programme de biologie moléculaire, option biologie des systèmes
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en biologie moléculaire
option biologie des systèmes

Avril 2016

© Alexandre Rouette, 2016

Résumé

Le protéasome (CP) contrôle la majorité des fonctions cellulaires par la dégradation des protéines intracellulaires. En plus d'exprimer le CP, les vertébrés expriment également l'immunoprotéasome (IP), caractérisé par des préférences de dégradation distinctes. Le rôle le mieux caractérisé pour l'IP est la génération d'antigènes adaptés pour la liaison au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Cependant, les nombreux phénotypes observés au niveau de cellules déficientes en IP ou avec une mutation révèlent que l'IP influence des fonctions immunitaires indépendamment de la génération d'antigènes et peut atténuer le stress présent au niveau de cellules non-immunitaires. L'objectif de cette thèse était de caractériser les rôles de l'IP qui ne sont pas reliés à la génération d'antigènes associés au CMH-I. L'analyse du transcriptome de cellules dendritiques IP-déficientes en cours de maturation révèle que l'IP affecte l'expression de plus de 8 000 transcrits. L'IP affecte l'expression génique principalement au niveau transcriptionnel en contrôlant l'abondance de régulateurs de transcriptions tels que NF- κ B et les membres des familles IRF et STAT. Les cellules dendritiques IP-déficientes sont également moins efficaces pour activer des lymphocytes T CD8⁺, même chargées artificiellement avec des quantités optimales d'antigènes associés au CMH-I. En outre, nos études montrent que l'IP est fortement exprimé au niveau de cellules de patients atteints de leucémie myéloïde aigue. L'expression de l'IP est intrinsèque aux leucémies, puisque qu'elle n'est pas corrélée à la présence de lymphocytes sécréteurs d'IFN- γ . De plus, l'expression d'IP est particulièrement élevée au niveau de leucémies monocytaires et/ou possédant un réarrangement *MLL*. Notamment, des analyses de corrélation montrent que l'IP est connecté à des gènes impliqués dans le métabolisme, l'activité mitochondriale et la réponse au stress. En effet l'inhibition de la sous-unité PSMB8 de l'IP mène à l'accumulation de protéines ubiquitinées et la mort de cellules leucémiques monocytaires. Globalement, nos travaux montrent que le rôle de l'IP n'est pas limité à la génération d'antigènes, mais qu'il peut contrôler l'expression génique et la survie des leucémies.

Mots-clés : Système ubiquitine-protéasome, immunoprotéasome, séquençage d'ARNm, régulation de l'expression génique, stress protéotoxique, leucémie, inhibiteurs de protéasome

Abstract

By regulating protein degradation, constitutive proteasomes (CP) control practically all cellular functions. In addition to CP, vertebrates express immunoproteasomes (IP), which display distinct substrate preferences. The first non-redundant role ascribed to IP is its enhanced ability to generate MHC I-associated antigens. However, deletion or inhibition of IP subunits can affect several immune cell functions independently of MHC-I antigen generation. Moreover, recent work has shown that IP can be expressed in non-immune cells to deal with cell stress. Thus, we wished to investigate the roles of IP that are not related to antigen generation and that are not redundant with the CP. Based on profiling of WT and IP-deficient maturing mouse dendritic cells (DCs), we report that IP regulate the expression of more than 8,000 transcripts. The broad impact of IP on gene expression is cell-autonomous, mediated mainly at the transcriptional level, and involves major signaling pathways including IRFs, NF- κ B and STATs. Moreover, even when engineered to present optimal amounts of antigenic peptides, IP-deficient DCs are inefficient for in vivo T-cell priming. In addition, consistent with the fact that cancer cells endure proteotoxic stress, we report that acute myeloid leukemia (AML) cells from patients express high levels of IP genes. Expression of IP genes in AML is a cell-autonomous and IFN-independent feature that correlates with the methylation status of IP genes, and is particularly high in AML with a monocytic phenotype and/or *MLL* rearrangement. Notably, IP inhibition leads to accumulation of polyubiquitinated proteins and cell death in IP^{high} but not IP^{low} AML cells. Co-clustering analysis reveals that genes correlated with IP subunits in monocytic AMLs are primarily implicated in cell metabolism and proliferation, mitochondrial activity and stress responses. Overall, our studies show that the role of IP is not limited to antigen processing and reveals major non-redundant roles for IP in transcription regulation and resistance to cell stress in AML.

Keywords : Ubiquitin-proteasome system, immunoproteasome, RNA-Seq analysis, gene regulation, proteotoxic stress, cancer, acute myeloid leukemia, proteasome inhibitors

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xvi
Avant-Propos.....	xviii
CHAPITRE 1.....	1
1. Introduction.....	2
1.1 Le système ubiquitine-protéasome.....	2
1.1.1 Ubiquitination d'un substrat.....	2
1.1.2 Particules régulatrices du protéasome.....	4
1.1.2.1 Particules régulatrices canoniques.....	5
1.1.2.2 Particules régulatrices non-canoniques.....	6
1.1.3 La chambre catalytique du protéasome.....	7
1.1.4 Un modèle pour la dégradation d'un substrat.....	10
1.1.5 Signaux de dégradation.....	10
1.1.6 L'homéostasie protéique.....	12
1.1.7 Réponse au stress.....	13
1.1.8 Dégradation de protéines en absence d'ubiquitination.....	14
1.1.9 Régulation de l'activité du protéasome.....	14
1.2 Les différents types de protéasome chez les vertébrés.....	16
1.2.1 Évolution de l'IP.....	17
1.2.2 Expression de l'IP.....	18
1.2.2.1 Expression au niveau des cellules immunitaires.....	18
1.2.2.2 Expression en condition inflammatoire/infectieuse.....	19
1.2.2.3 Expression au niveau des cellules non-immunitaires.....	19

1.2.2.4	Expression de protéasomes mixtes	20
1.2.3	Incorporation des sous-unités catalytiques	20
1.2.4	Différences d'activité au niveau des sous-unités catalytiques	21
1.2.4.1	Comparaisons à l'aide de substrats fluorogéniques	22
1.2.4.2	Comparaisons à l'aide de substrats peptidiques.....	24
1.2.5	Différences de structure au niveau des sous-unités catalytiques	25
1.3	Rôles biologiques de l'IP	27
1.3.1	Génération d'antigènes pour le CMH-I	28
1.3.2	Fonctions indépendantes de la génération d'antigènes	30
1.3.2.1	Régulation de la survie des lymphocytes	30
1.3.2.2	Régulation de la production de cytokines	30
1.3.2.3	Atténuation de la sévérité de l'inflammation et de l'auto-immunité	31
1.3.3	Régulation de l'expression génique	32
1.3.4	Élimination de protéine endommagées en réponse au stress	35
1.4	Pathologies humaines associées au protéasome et à l'IP	36
1.4.1	Une perte de fonction de l'IP est associée à des syndromes auto-inflammatoires ..	37
1.4.2	Le protéasome au niveau du cancer	38
1.4.2.1	Des inhibiteurs de l'activité du protéasome pour le traitement du cancer	38
1.4.2.2	Mécanismes de cytotoxicité par les inhibiteurs de l'activité du protéasome....	40
1.5	Objectifs	42
1.5.1	Hypothèses et questions de recherche.....	42
1.5.2	Objectif général.....	43
1.5.3	Objectifs spécifiques	43
1.6	Modèles.....	44
CHAPITRE 2		45
2.	Immunoproteasomes shape the transcriptome and regulate the function of dendritic cells .	46
2.1	Présentation de l'article #1	47
2.2	Contributions des auteurs.....	48
2.3	Abstract	49
2.4	Introduction.....	50

2.5 Materials and Methods.....	52
2.6 Results.....	59
2.6.1 The effect of IPs on gene expression is cell-autonomous.....	59
2.6.2 Relationship between proteasome subunits and differential gene expression.....	59
2.6.3 IPs do not affect mRNA stability and have a minimal influence on mRNA maturation	62
2.6.4 IPs have a broad impact on the transcriptional program of maturing DCs.....	63
2.6.5 Variations in histone monoubiquitylation cannot explain the impact of IPs on the transcriptome.....	65
2.6.6 STAT, IRF and NF- κ B signaling pathways are perturbed in IP-deficient DCs	67
2.6.7 IP-deficiency affects key DC genes and functions	70
2.6.8 IP-deficient DCs are phenotypically more similar to macrophages than WT DCs .	71
2.6.9 dKO DCs are functionally deficient in vivo	74
2.7 Discussion.....	78
2.8 Acknowledgments.....	80
2.9 Disclosures.....	80
2.10 References.....	81
2.11 Footnotes.....	86
2.12 Supplemental Material.....	87
 CHAPITRE 3	 91
3. Expression of immunoproteasome genes is regulated by cell-intrinsic and –extrinsic factors in human cancers.....	92
3.1 Présentation de l’article #2.....	93
3.2 Contributions des auteurs.....	94
3.3 Abstract	95
3.4 Introduction.....	96
3.5 Results.....	97
3.5.1 Genes encoding proteasome catalytic subunits are overexpressed in several cancer types	97
3.5.2 High expression of IP genes is associated with improved survival in breast cancer	97

3.5.3 IP subunits are co-expressed in breast cancer samples	101
3.5.4 IP expression is cell-autonomous in AML but not in breast cancer	101
3.5.5 IP subunits are highly expressed in myeloid and lymphoid cancer cell lines.....	102
3.5.6 IP expression is upregulated in AML with an M5 phenotype or MLL rearrangements	103
3.5.7 IP expression is regulated by DNA methylation.....	105
3.5.8 IP expression correlates with distinct functional networks in M5 vs. non-M5 AML	108
3.5.9 THP1 cells are addicted to IPs	108
3.5.10 IP expression correlates with sensitivity to non-selective proteasome inhibitors	111
3.6 Discussion	112
3.7 Methods.....	115
3.8 References	119
3.9 Acknowledgements.....	123
3.10 Author Contributions	123
3.11 Additional Information	123
3.12 Supplementary Information	124
 CHAPITRE 4.....	 129
4. Discussion.....	130
4.1 Un rôle pour l'IP dans la régulation de l'expression génique.....	131
4.1.1 L'effet de l'IP sur l'expression des gènes est vaste, complexe et dynamique	131
4.1.2 Un IP homogène est nécessaire pour affecter le transcriptome	131
4.1.3 L'IP affecte la transcription de l'ARNm	132
4.1.4 L'activité catalytique du protéasome est couplée aux différences d'expression génique entre cellules de type sauvage et dKO	134
4.2 L'IP affecte la protéolyse de régulateurs de transcription	134
4.2.1 L'IP affecte l'activité et l'abondance de facteurs de transcription	134
4.2.2 Des modèles pour la dégradation sélective par l'IP	137
4.2.3 L'IP affecte l'expression génique au niveau des thymocytes.....	138
4.3 L'impact de l'IP sur l'expression génique affecte des processus biologiques.....	138

4.3.1	Fonction des cellules dendritiques	139
4.3.2	Production de médiateurs inflammatoires	140
4.3.3	Sécrétion de cytokines	141
4.3.4	Les cellules dendritiques dans les pathologies humaines	142
4.3.4.1	Cellules dendritiques et auto-immunité	142
4.3.4.2	Cellules dendritiques et cancer	142
4.4	L'importance de l'IP dans la survie des leucémies.....	144
4.4.1	L'IP chez le cancer du sein	145
4.4.2	L'IP comme facteur pronostic de leucémie	146
4.4.3	L'IP et le traitement de la leucémie	147
4.5	Les leucémies ont une dépendance non-oncogénique à l'IP	148
4.6	L'IP et la réponse au stress	149
4.7	Régulation de l'expression d'IP chez les leucémies	150
4.8	Le thymoprotéasome et la sélection des lymphocytes T CD8 ⁺	152
4.9	Perspectives.....	154
	L'IP affecte l'expression génique : plusieurs niveaux de régulation impliqués	154
	Est-ce que l'IP affecte la survie des LMA <i>in vivo</i> ?	155
	La réponse au stress par les différents types de protéasome.....	156
	Conclusion	158
	Bibliographie.....	i
	Annexe	i
A.1	Liste de régulateurs prédits par l'outil <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> pour chaque groupe de gènes différentiellement exprimés	ii
A.2	Corrélation entre l'expression d'ARNm et l'activité des régulateurs.....	vi
A.3	Gènes différentiellement exprimés inclus dans les termes d'ontologie « Réponse inflammatoire » et « Réponse antivirale »	x

Liste des tableaux

Table 2.1. Selected top differentially expressed genes between WT and dKO DCs.....	72
Table 2.2. Genes comprised in the core conventional DC and macrophage signatures and their expression level between WT and dKO dendritic cells.	75
Supplemental Table 2.S1. Primers used for qPCR experiments.....	89
Table 3.1 Correlation between risk of death and proteasome expression.....	99
Supplementary Table 3.S1 Risk of death associated to expression of proteasome encoding genes.	125
Supplementary Table 3.S2 Functional categories associated to genes specifically correlating with IP in M5 or non-M5 AMLs.....	126

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 Ubiquitination d'un substrat.	3
Figure 1.2 Les particules régulatrices du protéasome.....	6
Figure 1.3 La chambre catalytique du protéasome à travers l'évolution.	9
Figure 1.4 Élimination de protéines mal repliées par le protéasome.	12
Figure 1.5 Régulation de l'activité du protéasome.	15
Figure 1.6 Les différents types de protéasome chez les vertébrés.	17
Figure 1.7 Préférences catalytiques du CP et de l'IP.	23
Figure 1.8 Structure moléculaire du CP et de l'IP.	26
Figure 1.9 Voie de présentation du CMH de classe I.	28
Figure 1.10 Fonctions immunitaires et non-immunitaires de l'immunoprotéasome.	32
Figure 1.11 Régulateurs de transcription et protéasome.....	33
Figure 1.12 L'aneuploïdie et le stress protéique.	40

Chapitre 2

Figure 2.1 Gene expression changes are cell autonomous.	60
Figure 2.2 Relationship between proteasomes and differential gene expression.	61
Figure 2.3 IPs do not globally affect mRNA stability or maturation.....	64
Figure 2.4 IPs have a broad impact on the transcriptional program of maturing DCs.	66
Figure 2.5 The broad gene expression changes cannot be explained by variations in histone monoubiquitylation.	68
Figure 2.6 STAT, IRF, and NF- κ B pathways are perturbed in IP-deficient DCs.....	70
Figure 2.7 Presence of IPs is important to maintain DC functional integrity.....	74
Supplemental Figure 2.S1 Proteasomal content and stress in WT and dKO DCs.....	87
Supplemental Figure 2.S2 Ubiquitylation and predicted regulators quantification.....	88

Chapitre 3

Figure 3.1 Genes encoding proteasome catalytic subunits are overexpressed in several cancer types.	98
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 3.2 Expression of IP subunits is cell-autonomous and correlates with poor outcome in AML.....	101
Figure 3.3 IP expression is upregulated in AML with an M5 phenotype or <i>MLL</i> rearrangements.	105
Figure 3.4 DNA methylation in primary AML samples.....	106
Figure 3.5 5-azacytidine treatment increases levels of <i>PSMB8</i> and <i>PSMB9</i> in NB4 cells.	107
Figure 3.6 IP expression correlates with distinct functional networks in M5 vs. non-M5 AMLs.	110
Figure 3.7 THP1 cells are addicted to IPs.....	111
Supplementary Figure 3.S1 Correlation of CP or IP expression with survival outcome.	127
Supplementary Figure 3.S2 IP expression in human cancer cell lines.	128

Chapitre 4

Figure 4.1 Comment l'IP pourrait affecter l'expression génique.	133
Figure 4.2 L'IP module la transcription génique et affecte l'activation des cellules dendritiques.	136
Figure 4.3 Activation d'un lymphocyte T par une cellule dendritique mature.....	140
Figure 4.4 Une forte expression d'IP est essentielle chez les leucémies de type M5 ou possédant un réarrangement <i>MLL</i> pour résister au stress cellulaire de type oxydatif.	151

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADRM1	Molécule régulant l'adhésion 1
AML	Leucémie myéloïde aigue
APOBEC3	Enzyme d'édition de l'ARNm apolipoprotéine B, polypeptide catalytique 3
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Enzyme hydrolase de l'Adénosine triphosphate
BAX	Régulateur d'apoptose Bax
BIM	Gène de mort ovarienne lié à BCL2
BIP	Protéine liant l'immunoglobuline
BMP2K	Kinase inductible de la protéine de la morphologie de l'os
CANDLE	Syndrome de dermatose neutrophilique chronique atypique avec lipodystrophie et température élevée
CAS9	Protéine associée à CRISPR 9
CCL	Ligand de chimiokine à motif C-C
CCR	Récepteur de chimiokine à motif C-C
CD	Marqueur de différenciation
CHIP-SEQ	Immunoprécipitation de chromatine et séquençage d'ADN
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cytochrome c oxydase
CP	Protéasome standard
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
CTEC	Cellule épithéliale du cortex thymique
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CXCL	Ligand de chimiokine à motif C-X-C
DC	Cellules dendritiques
DDI1	Protéine inductible au dommage d'ADN 1
DEG	Gène différentiellement exprimé
DKO	Double knockout pour PSMB8 et PSMB10 de l'immunoprotéasome

DLC1	Protéine délétée dans le cancer du foie 1
DNMT	Méthyltransférase de l'ADN
DP	Thymocytes double-positifs CD4 ⁺ /CD8 ⁺
DSK2	Protéine contenant un domaine d'ubiquitine
E1	Enzyme d'activation de l'ubiquitine
E2	Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine
E3	Enzyme ligase de l'ubiquitine
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermal
EPCAM	Molécule d'adhésion de cellule épithéliale
FAB	Classification franco-américano-britannique des leucémies aiguës
GATA3	Facteur de transcription agissant en trans spécifique des lymphocytes T
GDPD3	Protéine contenant un domaine Glycerophosphodiester Phosphodiesterase 3
GM-CSF	Facteur de stimulation de colonies de granulocytes et de macrophages
GO	Ontologie de gènes
GP-100	Glycoprotéine 100
H2A	Histone 2A
H2B	Histone 2B
H2K	Locus du complexe majeur d'histocompatibilité 2-K chez la souris
HECT	Domaine homologue à l'extrémité carboxy-terminale E6-AP
HEPB1	Composante A de la hexaprényle diphosphate synthétase
HIF-1 α	Facteur inductible à l'hypoxie alpha
HSP	Protéine de réponse au choc thermique
IFN- γ	Interféron-gamma
IG	Immunoglobuline
I κ B	Inhibiteur du facteur nucléaire kappa d'activateur génique de polypeptide léger au niveau des cellules B
IL	Interleukine
IP	Immunoprotéasome
IPA	Analyse de fonction <i>Ingenuity</i>
IRF	Facteur de régulation de l'interféron
JASL	Syndrome auto-inflammatoire japonais avec lipodystrophie

JMP	Syndrome auto-inflammatoire de contractures articulaires, atrophie musculaire, anémie microcytaire et lipodystrophie induite par la panniculite
LMA	Leucémie myéloïde aigue
LMP	Polypeptide de petite masse moléculaire
LPS	Lipopolysaccharide
MAGE	Antigène associé au mélanome
MDM2	Double Minute 2 Murin (Ubiquitine ligase E3)
MELAN-A	Antigène de mélanome reconnu par les cellules T
MECL1	Sous-unité du complexe endopeptidase multicatalytique 1
MIP	Peptides associés au complexe majeur d'histocompatibilité
MLL	Protéine de leucémie à lignée mixte
MTOR	Cible de la rapamycine des mammifères
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NK	Cellules tueuses naturelles
NRF	Facteur nucléaire érythroïde
P21	Inhibiteur de la kinase dépendante de cycline 1
P53	Protéine tumorale 53
PA28	Activateur de protéasome 28
PA700	Activateur de protéasome 700
PML-RAR	Protéine fusion leucémie promyélocytaire et récepteur d'acide rétinoïque
POL-II	Polymérase 2
PSMA	Sous-unité alpha du protéasome
PSMB	Sous-unité beta du protéasome
PSMC	Sous-unité régulatrice ATPase du protéasome 26S
PSMD	Sous-unité régulatrice non-ATPase du protéasome 26S
RAD23	Protéine de réparation d'excision des nucléotides
RB	Protéine du rétinoblastome
RING	Nouveau gène vraiment intéressant
RNA-Seq	Séquençage d'ARN de seconde-génération
RPL29	Protéine ribosomale L29
SERPINB	Inhibiteur de sérine protéase B

SKP2	Protéine associé à la kinase en phase S
SRC-3	Co-activateur de récepteur de stéroïdes 3
STAT	Protéine transducteur du signal et activateur de transcription
TAP	Transporteur de peptides
T-BET	Facteur de transcription avec boîte T
TCGA	L'atlas génomique de cancer
TCR	Récepteur de cellule T
TIL	Lymphocytes infiltrant de tumeurs
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TP	Thymoprotéasome
UB	Ubiquitine
UCH	Hydrolase C-terminale d'ubiquitine
UPR	Réponse des protéines mal repliées
USP	Protéase spécifique à l'ubiquitine
WT	De type sauvage
XBP1	Protéine liant la boîte X 1

À ma famille

Remerciements

Ce travail n'aurait jamais été possible sans le support et les conseils de plusieurs personnes. Je voudrais d'abord remercier chaleureusement mon directeur de recherche, Claude Perreault, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir enseigné la créativité et la rigueur scientifique ainsi que pour m'avoir fourni les outils pour poursuivre une carrière fructueuse en recherche.

J'aimerais remercier les membres anciens et actuels du laboratoire pour m'avoir aidé dans mon cheminement, pour leurs conseils et pour avoir fourni une excellente ambiance de travail. Merci spécialement à Danielle avec qui j'ai eu la chance de travailler lors de mon arrivée, pour m'avoir enseigné différentes techniques et pour les connaissances scientifiques mais surtout pour m'avoir enseigné la rigueur scientifique. Merci également à tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler directement : Moutih, Marie-Pierre, Stéphanie, David, Étienne, Sylvie et Anca. Un merci spécial à Assya pour les discussions fructueuses générées par notre équipe bi-disciplinaire et pour l'initiation à la bio-info. Merci également à Charles qui reprend le flambeau de l'immunoprotéasome. Je veux aussi remercier les collègues-étudiants de l'IRIC pour les nombreuses activités non-scientifiques, qui sont primordiales pour la réussite et le bien-être. J'aimerais aussi exprimer ma gratitude envers Virginie pour son soutien continu au quotidien, ainsi que sa relecture minutieuse de la thèse et ses précieux conseils.

J'aimerais aussi remercier les membres qui ont participé à mes comités de suivi et à mon comité pré-doctoral, El-Bachir Affar, Alain Verreault, Nada Jabado et Étienne Gagnon pour leur temps précieux et leur contribution significative à mon cheminement scientifique à travers leurs commentaires et discussions ainsi qu'aux membres du jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ma thèse : Sylvain Meloche et Michel Tremblay. Je remercie également les gens travaillant aux plates-formes scientifiques de l'IRIC pour leurs conseils et leur contribution à l'avancement de mes projets : Raphaëlle Lambert, Pierre Melançon, Jennifer Huber, Patrick Gendron, Geneviève Boucher, Danièle Gagné, Gaël Dulude et Jean Duchaine.

Merci également à plusieurs organismes pour leur soutien financier : les Instituts de Recherche en Santé du Canada, la fondation Cole, le programme de biologie moléculaire et la faculté des études supérieures de l'université de Montréal.

Finalement, je ne serais jamais où je suis maintenant sans l'aide précieuse de ma famille. Peu importe ce qui se passe, je sais que je peux compter sur vous. Maman et Papa, vous avez toujours été là pour moi et vous m'avez toujours supporté dans mes entreprises et aventures. Je suis fier d'être votre fils. Merci à ma sœur, Julie, pour m'encourager dans ce que je fais et pour avoir fait de moi une meilleure personne.

Avant-Propos

L'élimination des protéines endommagées ou en fin de vie est essentielle, puisqu'elles sont toxiques pour la cellule. Le protéasome est un complexe multi-protéique présent de façon ubiquitaire et responsable de l'élimination de la plupart des protéines intracellulaires. De plus, plusieurs fonctions cellulaires sont contrôlées grâce à l'élimination sélective de protéines régulatrices par le protéasome. Alors qu'il est essentiel pour maintenir le fonctionnement cellulaire, il joue également un rôle majeur dans la survie de cellules cancéreuses. Cependant, une diminution de son activité est liée à l'apparition d'agrégats de protéines insolubles chez des maladies dégénératives. Illustrant son importance majeure, le protéasome est remarquablement conservé à travers l'évolution, étant donné que sa structure est identique chez tous les eucaryotes.

L'existence d'un second type de protéasome, l'immunoprotéasome, représente un mystère étant donné qu'il est présent strictement chez les vertébrés et qu'il est exprimé en contexte particulier. Le rôle le mieux décrit pour l'immunoprotéasome est la génération préférentielle d'antigènes pour stimuler la reconnaissance par le système immunitaire. Cependant, les phénotypes observés récemment chez des cellules génétiquement modifiées et chez des individus avec des mutations montrent que l'immunoprotéasome est aussi impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire ainsi que dans la réponse au stress. De plus, ces phénotypes sont indépendants de la génération d'antigènes. L'objectif principal de cette thèse était d'éclaircir et de comprendre les rôles de l'immunoprotéasome qui ne sont pas reliés à la génération d'antigènes en situation immunitaire ou pathologique.

Les résultats de nos travaux seront présentés en quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré à une introduction générale ainsi qu'aux objectifs et modèles utilisés. Le second chapitre inclut un article publié étudiant le rôle de l'immunoprotéasome dans la régulation de l'expression génique chez les cellules dendritiques. Le troisième chapitre inclut un manuscrit soumis qui explore l'expression et le rôle de l'immunoprotéasome dans la survie des leucémies myéloïdes aigues. Les résultats obtenus dans le cadre des chapitre deux et trois sont discutés et mis en contexte dans le chapitre quatre, c'est-à-dire la discussion. Une section du chapitre quatre

sera consacrée à des résultats préliminaires obtenus sur le rôle d'un troisième type de protéasome, le thymoprotéasome, dans le développement des lymphocytes T CD8⁺ chez la souris. Enfin, une annexe comprend les données et analyses supplémentaires générées pour le projet d'analyse du transcriptome des cellules dendritiques IP-déficientes en cours de maturation et qui ne sont pas incluent dans l'article original.

Nos travaux montrent l'étendue et la complexité de l'impact de l'immunoprotéasome sur l'expression génique chez des cellules dendritiques en cours de maturation. De plus, ils révèlent comment différents niveaux de régulation tels que la dégradation, la transcription et l'expression d'ARNm affecte le contrôle de la fonction des cellules dendritiques par l'immunoprotéasome. Nos travaux identifient également un nouveau rôle pour l'immunoprotéasome dans la survie des leucémies myéloïdes aigues par la réponse au stress oxydatif. Finalement, nos travaux fournissent une série de méthodes pour étudier l'impact et le rôle d'un gène dans les cancers humains à l'aide d'approches intégrant des analyses transcriptomiques, génomiques, cliniques et de modèles de culture cellulaire.

CHAPITRE 1

1. Introduction

1.1 Le système ubiquitine-protéasome

Chez les eucaryotes, la reconnaissance et l'élimination des protéines endommagées et en fin de vie sont accomplies par le système ubiquitine-protéasome. Le système ubiquitine-protéasome est pourvu d'outils lui permettant d'éliminer sélectivement les protéines préalablement reconnues et modifiées de façon appropriée. La sélectivité de ce système permet également d'assurer un contrôle étroit de la durée de vie des protéines au niveau basal ou en réponse à un stimulus¹. Illustrant son importance capitale, le système ubiquitine-protéasome est remarquablement conservé de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à l'humain²⁻⁴. De plus, des perturbations dans l'activité de ce système sont la cause de plusieurs pathologies humaines, tels que le cancer et les maladies neurodégénératives et inflammatoires⁵.

1.1.1 Ubiquitination d'un substrat

L'attachement d'un polypeptide, l'ubiquitine, sur un substrat protéique sert d'ancrage qui sera utilisé pour la reconnaissance et la dégradation par un complexe multi-protéique, le protéasome. Le processus de conjugaison de l'ubiquitine sur un substrat, l'ubiquitination, nécessite l'action séquentielle (*i*) d'une enzyme d'activation (E1) qui active l'ubiquitine à l'aide d'adénosine triphosphate (ATP), (*ii*) d'une enzyme de conjugaison (E2) qui reçoit l'ubiquitine et catalyse son transfert sur le substrat et (*iii*) d'une enzyme ligase (E3) permettant l'interaction physique entre l'enzyme de conjugaison et le substrat⁶⁻⁸ (Figure 1.1). Suite au transfert d'une première molécule d'ubiquitine sur le substrat, de multiples rondes successives d'ubiquitination sur l'ubiquitine terminale permettent la formation d'une chaîne d'ubiquitine linéaire⁹. La spécificité du processus d'ubiquitination est possible grâce à l'énorme quantité d'interactions potentielles entre les enzymes E2 et E3. En effet, plus de 40 E2 et 600 à 1 000 E3 sont présentes chez les mammifères d'autant plus que chaque E2 peut s'associer à plus d'une E3 et réciproquement. En conséquence, chaque complexe E2-E3 formé permet de conjuguer une chaîne d'ubiquitine sur seulement un ou quelques substrats^{6, 10}. La demi-vie d'un substrat peut donc être régulée par la cellule en contrôlant la synthèse et l'assemblage du ou des complexes

E2-E3 permettant son ubiquitination, puisque la chaîne d'ubiquitine formée est utilisée subséquemment pour la dégradation du substrat.

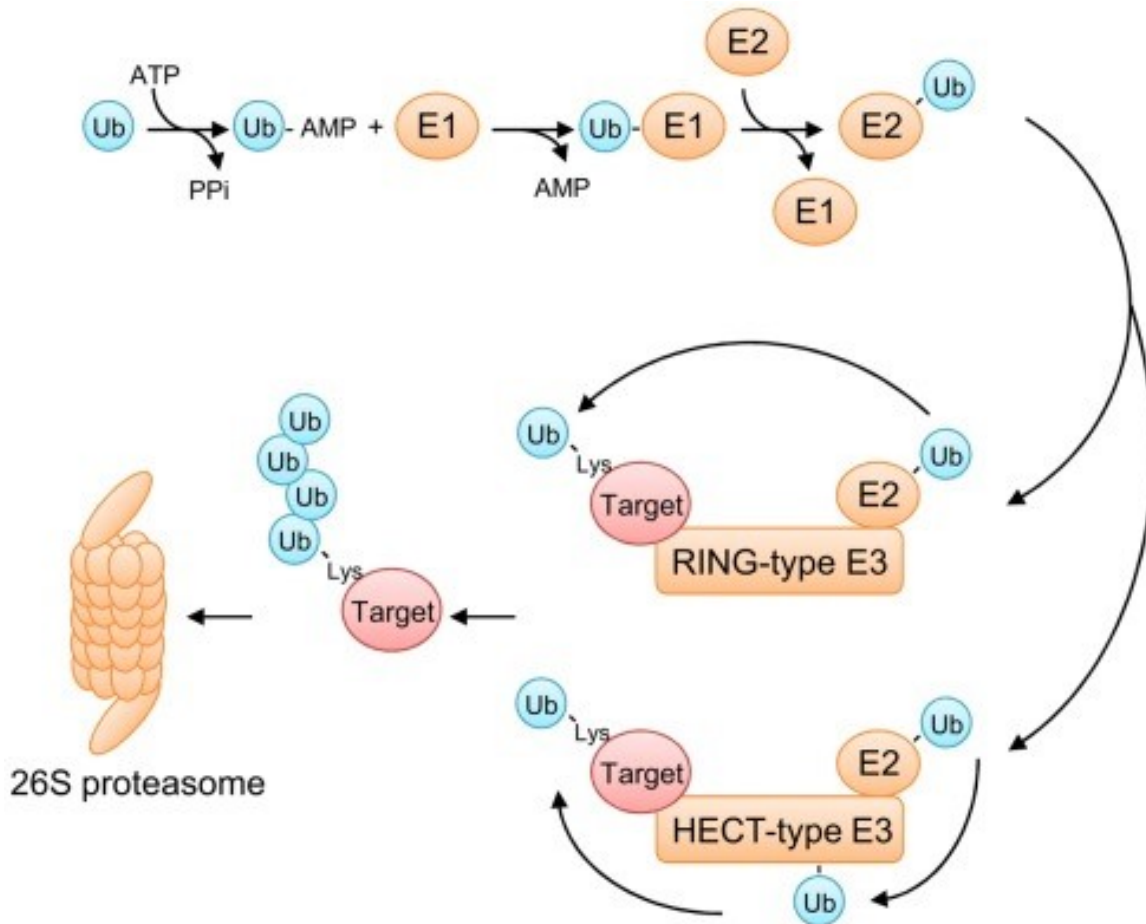


Figure 1.1 Ubiquitination d'un substrat.

L'ubiquitination est un processus réversible accompli par des réactions séquentielles impliquant trois classes d'enzymes (E1, E2 et E3). L'enzyme d'activation (E1) active l'ubiquitine (Ub) à l'aide d'ATP et la transfère sur l'enzyme de conjugaison (E2). Celle-ci catalyse le transfert d'ubiquitine sur une lysine (Lys) du substrat en combinaison avec une enzyme ligase (E3). Les E3 forment deux groupes : le type RING, responsable du transfert direct entre l'E2 et le substrat, et le type HECT, qui reçoit l'ubiquitine et la transfère ensuite sur le substrat. Le substrat ubiquitiné est ensuite éliminé par le protéasome. Reproduit avec la permission de *Frontiers Media SA* (Magori et Citovsky¹¹).

Puisque l'ubiquitine se conjugue à un résidu lysine, la formation d'une chaîne d'ubiquitine linéaire est possible grâce à la présence de sept lysines internes dans la séquence de l'ubiquitine.

Plusieurs chaînes d'ubiquitine peuvent donc être formées et potentiellement entraîner le substrat vers des destins différents. Typiquement, la formation de chaînes par les lysines internes 48 et 11 de l'ubiquitine permet de cibler le substrat pour la dégradation. La formation d'une chaîne via la lysine 63 permet quant-à-elle le recrutement de partenaires de liaisons servant à des fonctions cellulaires variées. D'autres types de chaînes ont été détectées *in vitro* et *in vivo*, mais leur fonction reste peu définie^{6, 12, 13}.

La conjugaison d'une chaîne d'ubiquitine sur un substrat est un processus réversible, étant donné que de multiples enzymes peuvent retirer l'ubiquitine seul ou la chaîne d'ubiquitine présents sur un substrat. Aussi nommées déubiquitinases, ces enzymes forment une famille composée d'une centaine de membres chez l'homme¹⁴. Elles contrôlent l'ubiquitination d'un substrat par plusieurs mécanismes : en régulant la vitesse d'ubiquitination du substrat par l'association avec une enzyme E3, en dégradant directement une chaîne d'ubiquitine sur un substrat, en activant le précurseur de l'ubiquitine ainsi qu'en recyclant l'ubiquitine conjuguée. La spécificité des enzymes déubiquitinases varie. En effet, certaines sont spécifiques pour certains types de chaîne d'ubiquitine tandis que d'autres peuvent cibler n'importe quelle chaîne d'ubiquitine¹⁵.

1.1.2 Particules régulatrices du protéasome

La reconnaissance et la dégradation d'un substrat protéique nécessite d'abord la liaison par le protéasome de la chaîne d'ubiquitine conjuguée au substrat. Pour ce faire, le protéasome est composé d'une chambre catalytique associée à deux particules régulatrices à chaque extrémité (Figure 1.2). Alors que la chambre catalytique est responsable de la dégradation du substrat, les particules régulatrices sont responsables de la reconnaissance et de la liaison de la chaîne d'ubiquitine conjuguée au substrat. Or, la particule régulatrice est également responsable de présenter le substrat de façon appropriée pour l'insertion dans la chambre catalytique. En effet, l'activité protéolytique du protéasome est compartimentée en son intérieur et est normalement inaccessible pour les protéines intracellulaires.

1.1.2.1 Particules régulatrices canoniques

La particule régulatrice canonique, aussi nommée PA700 ou 19S, est responsable de la reconnaissance de la chaîne d'ubiquitine ainsi que du contrôle de l'accès aux sites protéolytiques de la chambre catalytique (Figure 1.2). En effet, la présence de la particule régulatrice stimule dramatiquement la capacité du protéasome à dégrader les protéines ubiquitinées^{16, 17}. Elle est également exprimée de façon ubiquitaire. Illustrant son importance, la particule régulatrice est remarquablement conservée chez les eucaryotes, de la levure aux mammifères¹⁸⁻²². De plus, les protéases primitives retrouvées chez les bactéries et archaebactéries sont associés à des formes de particules régulatrices pour contrôler l'accès à leurs sites catalytiques intérieurs^{23, 24}.

La particule régulatrice est composée de 19 sous-unités distinctes possédant une activité enzymatique d'hydrolyse de l'ATP [ATPase] (PSMC1-6 chez l'humain), ou sans activité ATPase (PSMD1-4, PSMD6-9, PSMD11-14 et ADRM1 chez l'humain)^{25, 26}. En effet, la dégradation d'un substrat par le protéasome est dépendante de la présence d'ATP et le taux de dégradation de l'ATP est un déterminant direct du taux de dégradation de protéines ubiquitinées^{16, 27, 28}. La particule régulatrice permet la reconnaissance et la capture de la chaîne d'ubiquitine d'un substrat grâce aux sous-unités PSMD4 et ADRM1, qui possèdent des domaines pouvant agir comme récepteurs d'ubiquitine^{25, 26}. La chaîne d'ubiquitine liée au substrat est ensuite détachée à l'aide de la sous-unité PSMD14 qui possède une activité de déubiquitination²⁹. La capture et la dégradation de la chaîne d'ubiquitine peuvent être aussi stimulées par la présence de multiples protéines associées au protéasome. Notamment, Rad23, Dsk2 et Ddi1 possèdent un domaine récepteur d'ubiquitine tandis qu'Usp14 et Uch37 ont une activité de déubiquitination^{25, 30}.

La liaison et la déubiquitination du substrat permettent ensuite de stimuler l'hydrolyse d'ATP par les sous-unités ATPases³¹. Cela a pour effet de permettre à la particule régulatrice de linéariser le substrat en brisant ses structures secondaires et tertiaires, d'ouvrir la cavité étroite de la chambre catalytique du protéasome pour permettre l'accès aux sites protéolytiques et d'y initier l'insertion du substrat^{25, 32, 33}. Bref, la particule régulatrice est nécessaire pour la reconnaissance et la liaison du substrat ainsi que pour préparer le substrat pour l'insertion dans la chambre catalytique.

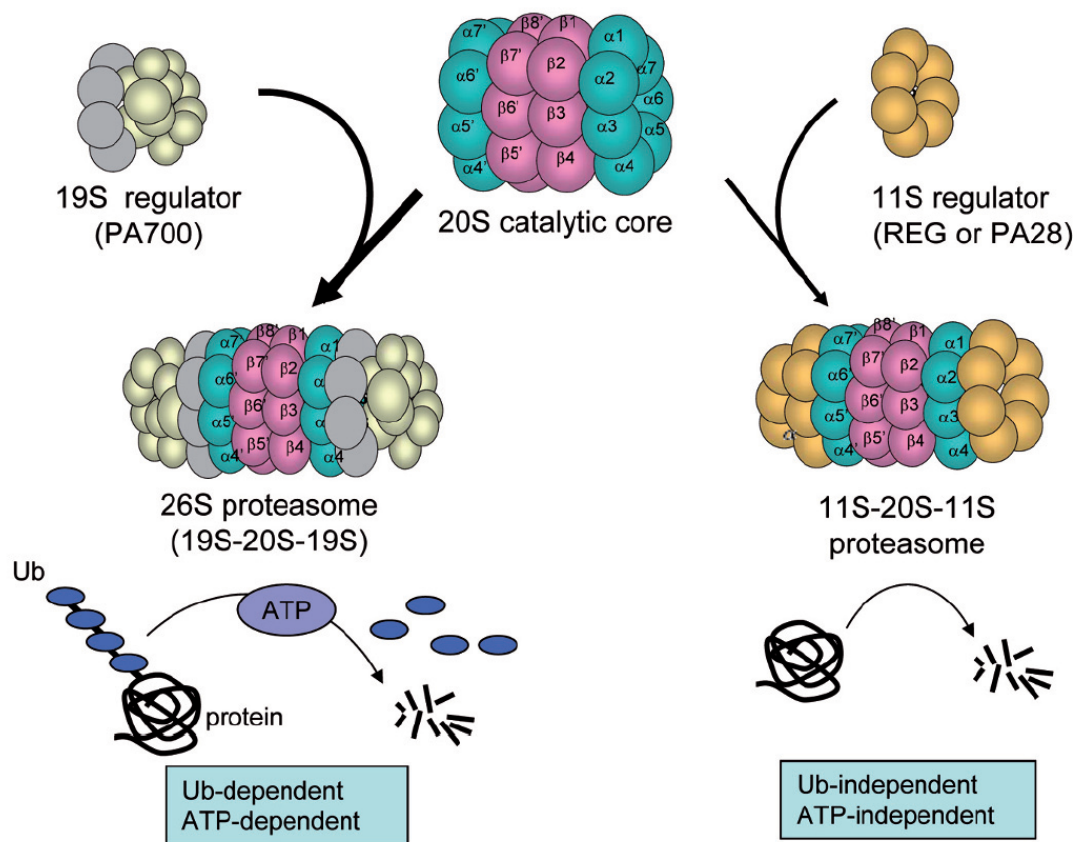


Figure 1.2 Les particules régulatrices du protéasome.

La chambre catalytique est un cylindre creux composé de deux anneaux extérieurs α et deux anneaux intérieurs β . Il existe au moins deux classes de particules régulatrices du protéasome qui s'associe à la chambre catalytique. La particule régulatrice canonique (aussi nommé PA700 ou 19S) est principalement responsable de la dégradation de protéines ubiquitinées en présence d'ATP. Une seconde classe de particules régulatrices permet la dégradation indépendamment d'ATP et d'ubiquitine (Pa28, aussi nommé 11S ou REG). Reproduit avec la permission de *Springer* (Mao I et al³⁴).

1.1.2.2 Particules régulatrices non-canoniques

Alors que l'expression des particules régulatrices canoniques est ubiquitaire, certaines particules régulatrices non-canoniques peuvent également être exprimées et s'associer à la chambre catalytique aussi bien dans certains tissus spécifiques que lors de contextes spécifiques. L'association de ces particules régulatrices non-canoniques a la capacité de modifier les caractéristiques de dégradation de la chambre catalytique. Notamment, une seconde classe de

particules régulatrices, nommées Pa28 (aussi appelés 11S ou REG), permet de réguler la dégradation de substrats indépendamment de la présence d'ATP et d'ubiquitine (Figure 1.2).

Tout d'abord, les sous-unités Pa28 α et Pa28 β (codées par *PSME1* et *PSME2*) sont exprimées suite à une stimulation par l'interféron- γ (IFN- γ) et forment un anneau hétéro-heptamérique nommé Pa28 $\alpha\beta$ ^{35, 36}. La liaison de Pa28 $\alpha\beta$ à chaque extrémité de la chambre catalytique permet d'augmenter la capacité du protéasome à dégrader des polypeptides non-ubiquitinés. Toutefois, ces types de protéasome sont incapables de dégrader des protéines entières^{35, 36}. Des protéasomes hybrides peuvent être formés comprenant une particule régulatrice canonique (19S) à une extrémité et Pa28 $\alpha\beta$ à l'autre extrémité. Retrouvés aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, ces protéasomes hybrides sont capables de dégrader des protéines ubiquitinées. L'association de Pa28 $\alpha\beta$ pour former un protéasome hybride modifie la nature des produits de dégradation générés et facilite leur expulsion de la chambre catalytique³⁷⁻³⁹. Le rôle biologique le plus étudié pour Pa28 $\alpha\beta$ est la production de peptides adaptés pour la présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I)^{37, 40}.

Enfin, la sous-unité Pa28 γ (codée par *PSME3*) formant un anneau homo-heptamérique est quant à elle exprimée de façon indépendante de l'IFN- γ ³⁴. Son association avec le protéasome peut influencer la dégradation de régulateurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réponse immunitaire indépendamment de la présence d'ATP ou de l'ubiquitination du substrat⁴¹⁻⁴⁴. En effet, comparé aux souris normales, les souris déficientes pour Pa28 γ sont plus petites et plus susceptibles aux infections bactériennes. De plus, les cellules provenant de ces souris prolifèrent moins et montrent une susceptibilité accrue à l'apoptose^{34, 45, 46}.

1.1.3 La chambre catalytique du protéasome

Alors que les particules régulatrices permettent de reconnaître, de déubiquitiner et de défaire la structure tridimensionnelle d'un substrat, la chambre catalytique du protéasome est responsable de sa dégradation en fragments. La chambre catalytique est un baril cylindrique creux à extrémités ouvertes formé de deux anneaux α extérieurs et deux anneaux β intérieurs

composés respectivement de 7 sous-unités homologues α (PSMA1-7) et β (PSMB1-7)³⁰ (Figure 1.3). Les anneaux α sont responsables de l'association avec les particules régulatrices pour permettre l'ouverture des extrémités et l'accès aux sites catalytiques internes^{30, 47}. En absence de particules régulatrices, les extrémités de la chambre catalytique sont bloquées par les extrémités N-terminal des sous-unités α ^{47, 48}. Cette fermeture de la chambre catalytique en absence de liaison de la particule régulatrice est nécessaire pour empêcher les protéines cytoplasmiques d'être dégradées par le protéasome de façon non-spécifique²⁵.

Sur chaque anneau β , trois des sous-unités β possèdent chacune une thréonine catalytiquement active à leur extrémité N-terminal, responsable de l'hydrolyse des liens peptidiques : PSMB5, PSMB6 et PSMB7. Ces sous-unités catalytiques n'hydrolysent pas de façon équivalente tous les liens peptidiques. En effet, le type d'acide aminé présent à côté du lien peptidique influence la capacité et la vitesse d'hydrolyse d'une sous-unité catalytique. De plus, chaque sous-unité catalytique possède des préférences distinctes. PSMB5 hydrolyse préférentiellement un lien peptidique lorsqu'un acide aminé hydrophobe (ex : Alanine, Leucine) est situé en amont. PSMB6 quant à elle hydrolyse un lien lorsqu'un acide aminé chargé négativement ou également nommé acide aminé acide (ex : Acide Aspartique) est situé en amont. Enfin PSMB7 hydrolyse un lien lorsqu'un acide aminé chargé positivement, également nommé acide aminé basique (ex : Arginine), est situé en amont^{1, 2, 49-52}. Ces préférences d'hydrolyse après les acides aminés hydrophobes, acides et basiques sont respectivement désignées activité chymotrypsine, caspase et trypsin, d'après leur similarité avec d'autres protéases. L'importance relative de chaque sous-unité dans la vitesse de dégradation d'un substrat est donc influencée par le type d'acides aminés composant majoritairement ce substrat. Par exemple, la dégradation d'une protéine formée d'une grande proportion d'acides aminés basiques sera dépendante de l'activité de PSMB7⁵³.

Cependant, la nomenclature utilisée pour les préférences d'hydrolyse des sous-unités catalytiques n'est pas absolue, puisqu'elle est basée sur l'acide aminé situé en amont du lien peptidique hydrolysé. En effet la dégradation peut être influencée non seulement par l'acide aminé situé directement en aval du lien peptidique, mais aussi par les acides aminés plus distants⁵⁴. D'ailleurs, chaque sous-unité catalytique contribue à la dégradation d'un substrat. En

effet l'inhibition simultanée d'au moins deux sous-unités est nécessaire pour diminuer significativement la protéolyse d'un substrat⁵³.

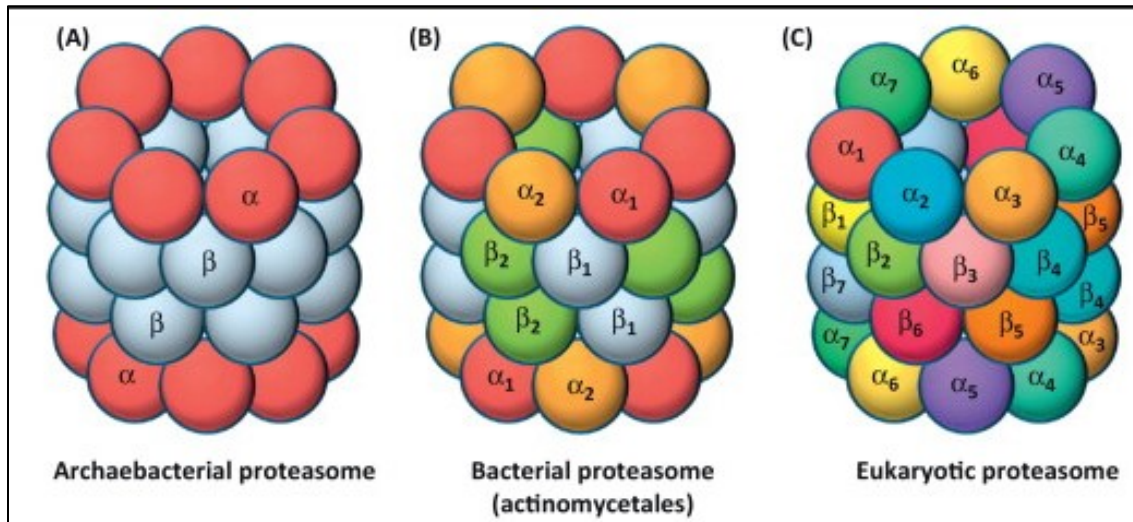


Figure 1.3 La chambre catalytique du protéasome à travers l'évolution.

Modèles de protéasome en forme de baril cylindrique $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. (A) Le protéasome de l'archaebactérie *Thermoplasma acidophilum* est composé de deux anneaux extérieurs et deux anneaux intérieurs contenant respectivement sept sous-unités α identiques (rouge) et 7 sous-unités β identiques (gris). (B) Le protéasome de la bactérie *Rhodococcus erythropolis* est composé de deux sous-unités α différentes (rouge et orange) et de deux sous-unités β différentes (gris et vert), formant respectivement les anneaux α et β . (C) Pour le protéasome de l'eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*, sept différentes sous-unités α et β ont leur position définie dans la chambre catalytique du protéasome eucaryote. Reproduit avec la permission d'Elsevier (Kniepert A et al⁵⁵).

La chambre catalytique du protéasome est remarquablement bien conservée chez les eucaryotes, sa structure et ses préférences catalytiques étant très similaires entre la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les mammifères²⁻⁴. Il existe également des protéasomes structurellement similaires à la chambre catalytique eucaryote chez les bactéries et archaebactéries (Figure 1.3). La chambre catalytique du protéasome de l'archaebactérie *Thermoplasma acidophilum* est composée d'anneaux α et β chacun constitués de 7 copies d'une seule sous-unité α ou β , tandis que celle de la bactérie actinomycète *Rhodococcus* est composée d'anneaux α et β chacun constitués respectivement de deux sous-unités α ou β . Cependant, les préférences d'hydrolyse de ces

protéasomes sont moins diversifiées que celles de leurs homologues eucaryotes puisqu'ils possèdent seulement une activité de type chymotrypsine^{56,57}.

1.1.4 Un modèle pour la dégradation d'un substrat

Basé sur des essais *in vitro* à l'aide de protéasomes purifiés, un modèle de la dégradation d'une protéine par le protéasome a été développé¹⁶. Tout d'abord, une fois entré dans la cavité de la chambre catalytique, un substrat se lie initialement à une des deux sous-unités à activité chymotrypsine qui le dégrade grossièrement en long fragments. Ceci stimule l'activité de la seconde sous-unité chymotrypsine et des sous-unités à activité caspase. La stimulation de ces sous-unités promeut la dégradation des longs fragments en plus petits fragments. Bien que l'activité des sous-unités de type trypsine ne soit pas influencée par la liaison du substrat sur d'autres sites, elle contribue aussi à la dégradation des longs fragments. Pendant ce temps, l'activité chymotrypsine est inhibée temporairement pour empêcher d'autres protéines d'entrer dans la chambre catalytique. La protéolyse des fragments continue jusqu'à ce qu'ils soient assez petits pour être expulsés du protéasome. Un nouveau substrat peut ainsi entrer dans la chambre catalytique pour stimuler l'activité chymotrypsine à nouveau. Ce modèle de dégradation permet d'éviter de boucher la cavité centrale de la chambre catalytique en s'assurant que le substrat est dégradé au complet avant l'entrée d'un autre substrat.

Selon ce modèle, les fragments générés par la dégradation d'un substrat sont de longueur variable. En effet des études indiquent que la longueur des fragments expulsés du protéasome varie entre 3 et 22 acides aminés^{58,59}. Ces fragments ont généralement une durée de vie limitée et sont rapidement réduits en acides aminés par différentes protéases et aminopeptidases cytosoliques⁶⁰.

1.1.5 Signaux de dégradation

Comme vu précédemment, la première étape dans la reconnaissance d'un substrat pour la dégradation est la liaison d'une chaîne d'ubiquitine. Plusieurs observations montrent que ce processus est nécessaire pour la majorité des protéines éliminées par le protéasome. En effet, la délétion du gène codant pour l'enzyme E1 est mortelle chez les eucaryotes⁶¹⁻⁶³. De plus,

l'inactivation de la voie de conjugaison d'ubiquitine chez des cellules en culture bloque la dégradation de la majorité des protéines intracellulaires⁶⁴. Puis, la quantité totale d'ubiquitine mesurée sur les protéines intracellulaires est proportionnelle à l'activité catalytique du protéasome⁶⁵. Finalement, la quantité d'ubiquitine conjuguée sur un substrat est un déterminant direct de la force de sa reconnaissance par le protéasome et de sa susceptibilité à la dégradation⁶⁶.

Afin qu'il soit ubiquitiné, un substrat doit posséder des éléments intrinsèques à sa séquence: un motif, i.e. une séquence particulière d'acides aminés, pouvant être reconnu par la machinerie de conjugaison d'ubiquitine ainsi qu'une lysine pour permettre la conjugaison de la première ubiquitine⁶⁷. Il semble qu'il ne soit pas nécessaire que la chaîne d'ubiquitine ait une longueur minimale pour permettre la reconnaissance et la dégradation par le protéasome. En effet, la conjugaison d'une seule ubiquitine ou d'une chaîne de deux ubiquitines est suffisant pour la dégradation de certains substrats^{68, 69}.

Indépendamment de l'ubiquitination, un autre élément nécessaire pour la dégradation d'un substrat est la présence d'une séquence de plusieurs acides aminés qui n'adopte pas une structure tridimensionnelle précise et définie. Cette séquence présente dans le substrat est aussi appelée séquence désordonnée. Elle sert d'appât à la particule régulatrice pour initier l'entrée et le dépliement du substrat dans la cavité du régulateur. Sa présence est nécessaire, puisque les protéines poly-ubiquitinées qui ne possèdent pas ce motif peuvent lier le protéasome mais ne sont pas dégradées⁷⁰⁻⁷³. Selon des études *in vitro*, la séquence désordonnée doit être d'une longueur minimale de 30 acides aminés pour qu'elle puisse initier la dégradation du substrat par le protéasome⁷⁴. En effet, les protéines chez la levure, la souris et l'humain possédant une séquence désordonnée d'une longueur minimale de 30 acides aminés ont une durée de vie plus courte que ceux qui ont un segment désordonné plus petit ou absent⁷⁵. Enfin, presque la moitié des gènes codant des protéines chez l'humain contiennent des séquences désordonnées, montrant son importance⁷⁶.

1.1.6 L'homéostasie protéique

La régulation de la structure et du repliement d'une protéine est essentielle pour sa fonction ainsi que pour l'homéostasie du protéome⁷⁷. Cependant, des erreurs dans la traduction des protéines peuvent empêcher leur repliement adéquat, formant des protéines nouvellement synthétisées étant mal repliées et en conséquence défectueuses. Or, une fraction importante des protéines nouvellement synthétisées dans la cellule sont défectueuses^{78, 79} (Figure 1.4).

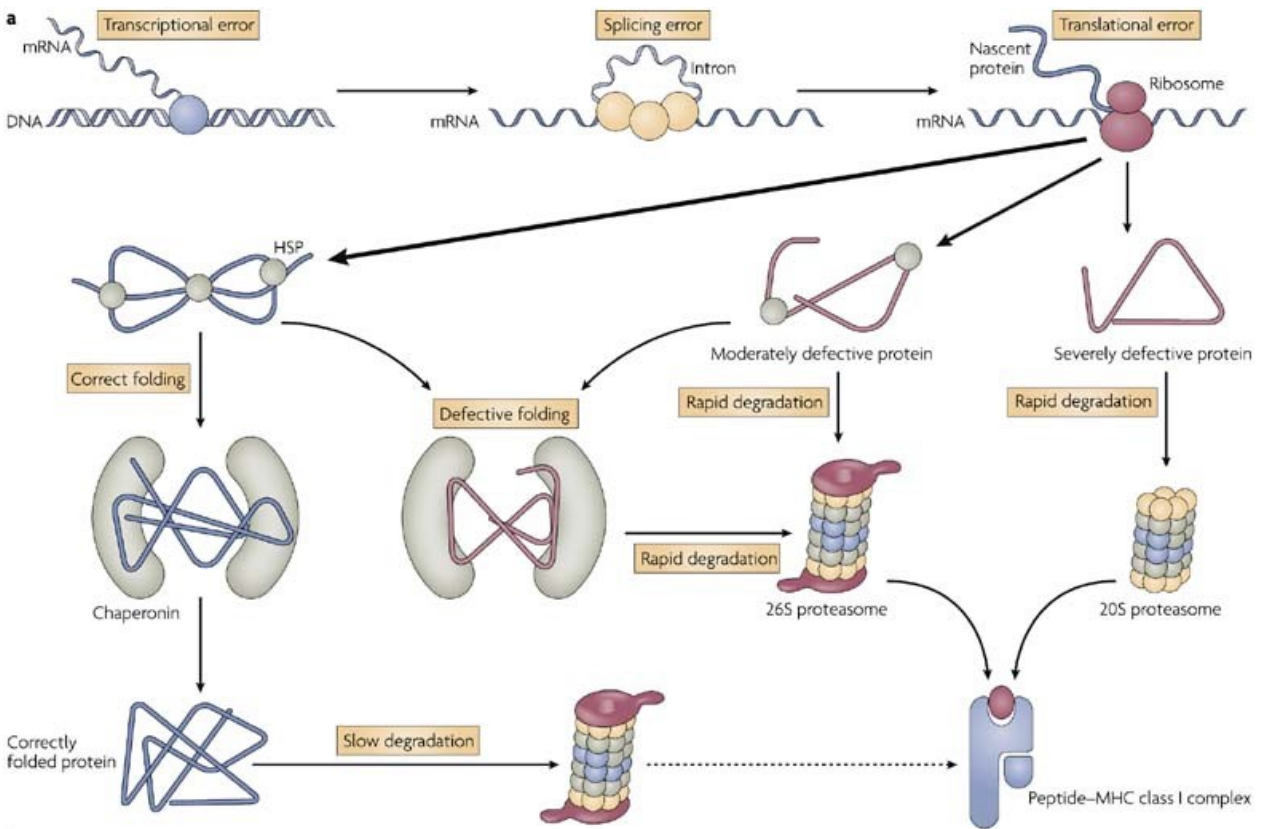


Figure 1.4 Élimination de protéines mal repliées par le protéasome.

Les erreurs dans la synthèse protéique mènent à l'apparition de protéines mal repliées. Celles-ci sont reconnues par la machinerie de contrôle de qualité des protéines pour être replié correctement par des chaperonnes ou bien éliminées par le protéasome. L'épaisseur des flèches indique la proportion relative hypothétique pour chaque voie de signalisation. Les produits de dégradation générés peuvent aussi être chargés sur une molécule du CMH-I. HSP : Protéine de réponse au choc thermique. Reproduit avec la permission de *Nature Publishing Groups* (Eisenlohr L et al⁸⁰).

L'accumulation de ces protéines nouvellement synthétisées défectueuses étant toxique, divers mécanismes de contrôle de qualité sont nécessaires pour favoriser leur élimination (Figure 1.4). Notamment, les protéines chaperonnes sont des protéines accessoires responsables de la reconnaissance des protéines défectueuses. En effet, elles reconnaissent des domaines ou séquences à caractère hydrophobe normalement dissimulés à l'intérieur de la protéine mais exposés à la surface suite au dépliement⁸¹.

Ces protéines chaperonnes cytosoliques peuvent tout d'abord aider au repliement de la protéine dans sa structure tridimensionnelle d'origine et prévenir la formation d'agrégats protéiques insolubles⁸². Mais elles peuvent également promouvoir le recrutement des enzymes responsables de l'ubiquitination⁸³. Les protéines défectueuses sont donc rapidement ubiquitinées et dégradées par le protéasome^{78, 79, 84}.

Il existe également des mécanismes de contrôle des protéines étant spécifiques à certaines organelles, notamment au sein du réticulum endoplasmique. L'accumulation de protéines mal repliées au sein de ce compartiment induit un stress du réticulum endoplasmique, menant à l'activation de la réponse des protéines mal repliées (UPR)⁸⁵. La reconnaissance de ces protéines défectueuses est effectuée par des chaperonnes spécifique au réticulum endoplasmique tel que Bip. Cette interaction favorise l'export des protéines défectueuses du réticulum endoplasmique vers le cytosol où elles sont rapidement ubiquitinées et éliminées par le système ubiquitine-protéasome^{86, 87}.

1.1.7 Réponse au stress

Plusieurs facteurs internes ou externes à la cellule peuvent augmenter de façon transitoire ou permanente la génération de protéines défectueuses causant un stress protéique. Par exemple, l'augmentation du taux de synthèse protéique par l'IFN- γ et par la voie de signalisation mTOR (cible de la rapamycine des mammifères) accroît le taux d'erreurs de traduction et la génération de protéines défectueuses⁸⁸⁻⁹¹. De plus, le stress oxydatif, caractérisé par l'augmentation d'oxygène réactif à l'intérieur de la cellule, peut aussi endommager les protéines et ainsi provoquer l'exposition de segments à caractère hydrophobe. Un stress oxydatif élevé peut

également dénaturer une protéine, c'est-à-dire la déplier partiellement ou complètement⁹²⁻⁹⁴. Les protéines endommagées et accumulées en réponse à un stress sont éliminées par le protéasome, tout comme les protéines nouvellement synthétisées⁹⁵. Notamment, la structure tertiaire de la protéine calmoduline est modifiée suite à l'oxydation en corrélation avec une dégradation accélérée⁹⁶.

La perte d'ubiquitine n'affecte pas l'élimination des protéines endommagées par oxydation⁹⁷. En effet, plusieurs études montrent des exemples de protéines endommagées par oxydation qui peuvent être dégradées de façon indépendante de l'ubiquitine soit par un protéasome complet ou soit par la chambre catalytique seule⁹⁷⁻¹⁰³. La reconnaissance de ces protéines oxydées par le protéasome serait possible grâce à la liaison de domaines à caractère hydrophobe exposés par le mauvais repliement sur les sous-unités α de la chambre catalytique^{103, 104}. De plus, le dépliement partiel ou complet d'une protéine suite à l'oxydation rend possible l'insertion dans l'ouverture étroite de la chambre catalytique en absence de particule régulatrice¹⁰⁵.

1.1.8 Dégradation de protéines en absence d'ubiquitination

En plus d'être capable de dégrader les protéines oxydées sans ubiquitination, le protéasome peut également dégrader des protéines sous forme native en absence d'ubiquitination. Plusieurs de ces exemples sont des régulateurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose : p21, c-Fos, c-Jun, 53, Rb, HIF-1 α , p105/NF- κ B, Bim et Src-3¹⁰⁵⁻¹¹¹. De plus, bien que les archaebactéries et bactéries expriment une forme rudimentaire de protéasome, aucun mécanisme semblable à l'ubiquitination n'a été découvert^{56, 57, 112, 113}. D'un point de vue de l'évolution, le protéasome possédait donc déjà la capacité de dégrader des protéines en absence d'ubiquitination. Toutefois, le mécanisme moléculaire expliquant ce phénomène n'est pas encore clairement établi, mais impliquerait la présence d'une région dépliée intrinsèque à la structure du substrat¹⁰⁵.

1.1.9 Régulation de l'activité du protéasome

Les composantes du protéasome sont exprimées dans toutes les cellules d'un organisme eucaryote de façon ubiquitaire. Cependant, l'activité du protéasome peut être contrôlée par

plusieurs mécanismes qui ne sont pas mutuellement exclusifs (Figure 1.5). Tout d'abord, la localisation intracellulaire du protéasome peut influencer son activité. Par exemple, lorsque le protéasome est présent dans le noyau, il peut influencer la régulation de la machinerie transcriptionnelle. Alors que lorsqu'il est présent près du réticulum endoplasmique, il peut influencer entre autres le contrôle de qualité des protéines^{114, 115}. Ensuite, comme vu précédemment, l'association avec une particule régulatrice non-canonique peut modifier la nature des produits de dégradation générés et facilite leur expulsion de la chambre catalytique (Section 1.1.2).

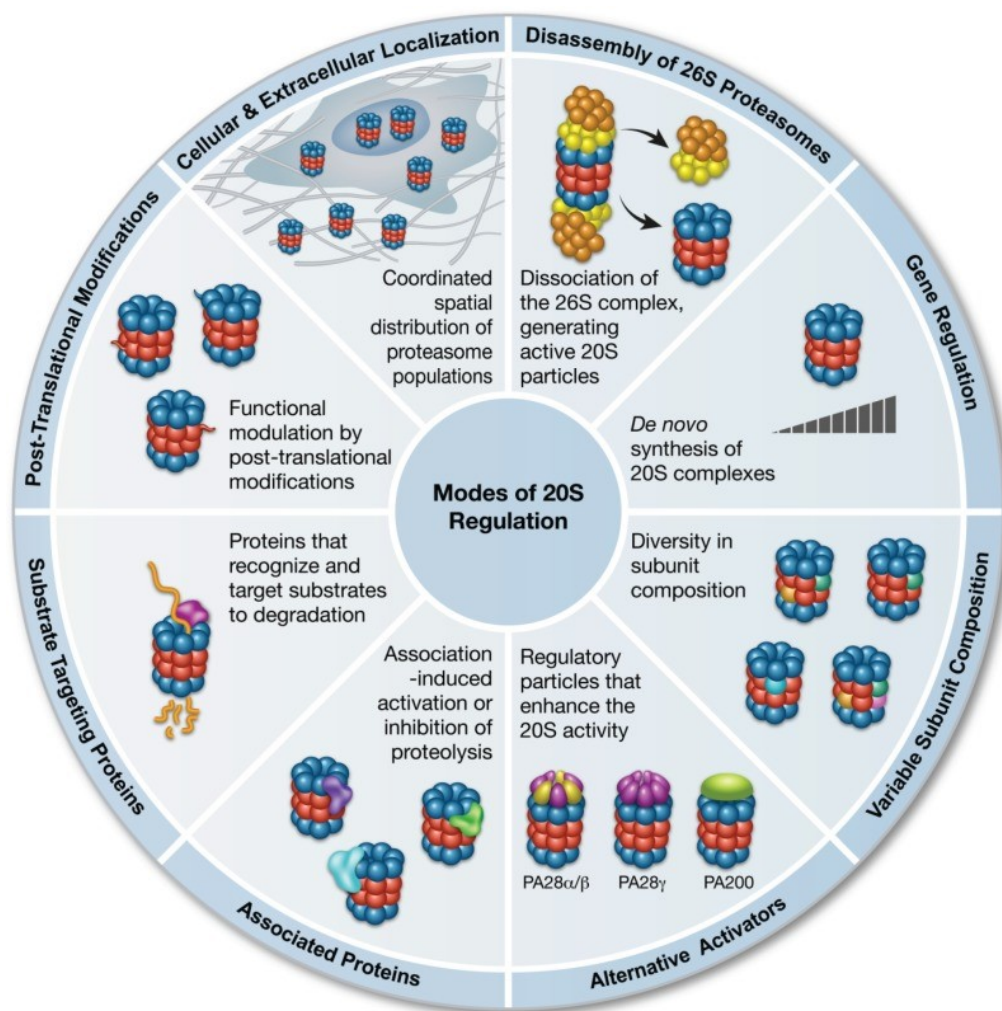


Figure 1.5 Régulation de l'activité du protéasome.

Mécanismes spécifiques régulant la fonction et l'activité du protéasome. Reproduit avec la permission de *Molecular Diversity Preservation International* (Ben-Nissan G et al¹⁰⁵)

D'une part, les sous-unités du protéasome peuvent être modifiées de façon post-traductionnelle pour modifier sa fonction. Par exemple, la phosphorylation de la sous-unité PSMC4 de la particule régulatrice augmente l'activité du protéasome, ce qui influence la dégradation de régulateurs du cycle cellulaire. La phosphorylation de sous-unités de la particule régulatrice permet également de faciliter le recrutement du protéasome vers certaines structures cellulaires¹¹⁶⁻¹¹⁸. L'ubiquitination de la sous-unité PSMD4 de la particule régulatrice contrôle quant à elle le recrutement des substrats au protéasome¹¹⁹.

D'autre part, l'activité du protéasome peut être régulée au niveau transcriptionnel. En effet, l'inhibition de l'activité du protéasome stimule la transcription des gènes codant pour les sous-unités catalytiques et non-catalytiques. Lorsque l'activité du protéasome est bloquée, l'abondance des facteurs de transcription NRF1 et NRF2 chez l'humain (Rpn4 chez la levure) est augmentée, leur permettant de stimuler la transcription des gènes du protéasome¹²⁰⁻¹²³. Ils peuvent aussi stimuler la transcription des gènes du protéasome en présence de stress oxydatif^{124, 125}. Le protéasome peut être également désassemblé temporairement par un stress oxydatif. Une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène est la capacité accrue de la chambre catalytique à dégrader les protéines endommagées par oxydation en absence de particule régulatrice^{101, 102, 126}. Finalement, la diversité dans la composition des sous-unités catalytiques peut également modifier l'activité du protéasome.

1.2 Les différents types de protéasome chez les vertébrés

Le protéasome est remarquablement conservé, puisque sa structure est identique de la levure à l'humain et les sous-unités le composant sont hautement homologues. Or, en plus des sous-unités catalytiques PSMB5, PSMB6 et PSMB7 formant le protéasome standard (CP), les vertébrés expriment des sous-unités catalytiques additionnelles. En effet, l'incorporation respective de PSMB8, PSMB9 et PSMB10 en remplacement de PSMB5, PSMB6 et PSMB7 permet de former l'immunoprotéasome (IP) (Figure 1.6). Ces sous-unités montrent une grande homologie, puisque l'identité de séquence entre PSMB8 et PSMB5, entre PSMB9 et PSMB6 et

entre PSMB10 et PSMB7 est respectivement de 72,4%, 63,3% et 58,9%¹²⁷. De plus, PSMB11, une 7^e sous-unité spécifiquement exprimée dans le thymus, est incorporée avec PSMB9 et PSMB10 pour former le thymoprotéasome (TP)^{55, 128}. PSMB11 est quant à elle homologue à PSMB5 et PSMB8 et possède une homologie d'identité de séquence de 50% avec chaque sous-unité¹²⁸.

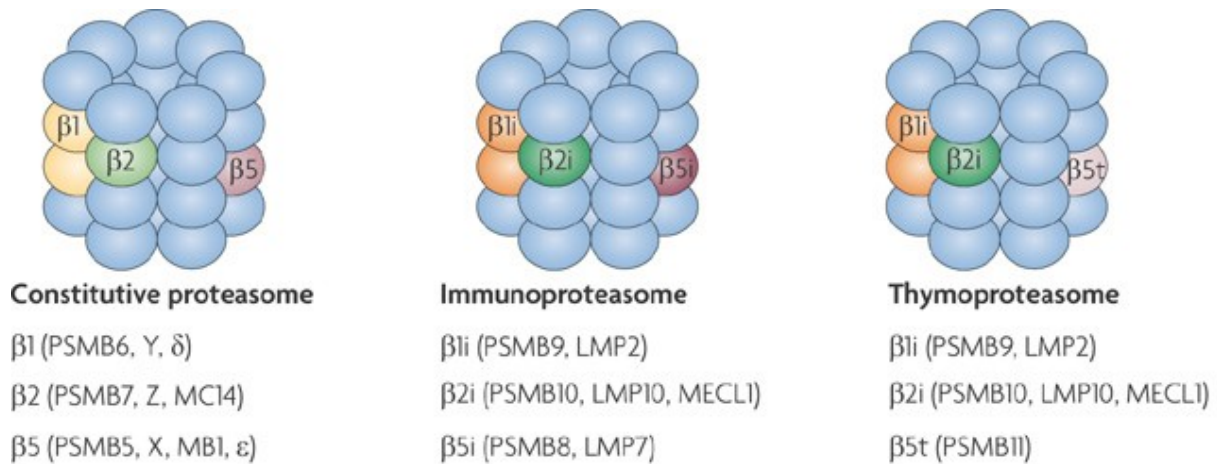


Figure 1.6 Les différents types de protéasome chez les vertébrés.

Les sous-unités catalytiques du protéasome standard sont $\beta 1$ (aussi nommée PSMB6, Y et δ), $\beta 2$ (aussi nommée PSMB7, Z et MC14) et $\beta 5$ (aussi nommée PSMB5, X et MB1 et ϵ). Les sous-unités catalytiques de l'immunoprotéasome sont $\beta 1i$ (aussi nommée PSMB9 et LMP2), $\beta 2i$ (aussi nommée PSMB10, LMP10 et MECL1) et $\beta 5i$ (aussi nommée PSMB8 et LMP7). Les sous-unités catalytiques du thymoprotéasome sont $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5t$ (aussi nommée PSMB11). Reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Groettrup M et al¹²⁹).

1.2.1 Évolution de l'IP

Les données d'évolution suggèrent un rôle pour l'IP et le TP au niveau du système immunitaire adaptatif. Tout d'abord, les gènes codant pour les sous-unités catalytiques PSMB8 et PSMB9 ont été découverts au début des années 1990¹³⁰⁻¹³³. Ils sont localisés dans la région génomique du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), une région enrichie en gènes spécialisés dans la réponse immunitaire. Plus spécifiquement, PSMB8 et PSMB9 sont localisés près des gènes *TAP1* et *TAP2* codant pour des transporteurs de peptides pour le CMH de classe I (CMH-I). À ce titre, l'IP a été beaucoup étudié pour son rôle dans la génération de peptides ou

d'antigènes pour le CMH-I (Section 1.3.1). Des analyses phylogéniques des gènes *PSMB8* et *PSMB9* révèlent qu'ils sont apparus chez les vertébrés à mâchoire¹³⁴. En effet, ces gènes sont présents chez les poissons, reptiles, amphibiens et mammifères, entre autres, mais sont remarquablement absents chez les oiseaux^{135, 136}. Le gène codant pour PSMB10 a quant à lui été découvert plus tard étant localisé en dehors de la région du CMH¹³⁷⁻¹³⁹. En effet, bien qu'il soit localisé dans la région du CMH chez les vertébrés inférieurs, il est situé en dehors du CMH chez les vertébrés supérieurs tels que les mammifères¹⁴⁰. Ceci suggère que la coévolution de cette sous-unité avec le CMH n'est pas essentielle¹³⁵. Enfin, la sous-unité PSMB11 est également apparue chez les vertébrés et le gène qui l'encode est situé à l'extérieur de la région du CMH¹⁴⁰.

1.2.2 Expression de l'IP

Bien que toutes les cellules contiennent un protéasome fonctionnel, l'expression des différentes sous-unités catalytiques n'est pas homogène. En effet, certains tissus expriment seulement le CP tandis que d'autres expriment seulement l'IP. Pour sa part, la sous-unité catalytique PSMB11 est exclusivement retrouvée dans les cellules épithéliales du cortex thymique^{128, 141}, une région spécialisée dans le développement de lymphocytes T.

1.2.2.1 Expression au niveau des cellules immunitaires

Les premières études ayant caractérisé l'IP ont montré que ses sous-unités catalytiques étaient exprimées de façon prédominante chez les tissus à fonction immunitaire. En effet, chez la souris et l'humain, l'expression des sous-unités catalytiques de l'IP est élevée chez les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B et les cellules épithéliales de la médulla thymique. Ces cellules sont aussi communément nommées cellules présentatrices d'antigènes étant donné qu'elles présentent une grande quantité de complexes CMH associés à un peptide à la surface cellulaire. De plus, l'expression d'IP est également élevée chez des cellules immunitaires qui ne sont pas *a priori* des cellules présentatrices d'antigènes, tels que les cellules immatures du thymus (thymocytes) et les lymphocytes T matures. Enfin, l'IP est aussi exprimé chez des tissus lymphoïdes contenant des lymphocytes, dont la rate et les ganglions lymphatiques, ainsi que dans des tissus non-lymphoïdes infiltrés par des lymphocytes, tels que l'intestin et le colon¹⁴²⁻¹⁵⁰.

1.2.2.2 Expression en condition inflammatoire/infectieuse

Alors que son expression est restreinte aux tissus et cellules immunitaires en situation non-inflammatoire, les sous-unités catalytiques de l'IP peuvent être synthétisées dans pratiquement tous les tissus lors d'une réponse immunitaire. Lors d'une réponse immunitaire, une grande quantité d'IFN- γ est sécrétée par les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (NK). La sécrétion d'IFN- γ permet de stimuler l'activation de cellules immunitaires ainsi que pour activer les défenses antivirales et anticancéreuses de cellules non-immunitaires¹⁵¹. De plus, l'IFN- γ induit la transcription des gènes codants pour les sous-unités catalytiques de l'IP chez les tissus non-immunitaires. En effet, la liaison de l'IFN- γ à son récepteur à la surface cellulaire mène à l'activation des régulateurs de transcription STAT1 et IRF1. Ceux-ci peuvent ensuite lier le promoteur des gènes codants pour les sous-unités catalytiques de l'IP pour stimuler leur transcription^{55, 152-154}. Ainsi, l'IP peut être exprimé dans pratiquement tous les tissus suite à une infection virale, fongique ou bactérienne en présence d'IFN- γ . En effet, en quelques jours, l'IP devient la forme prédominante de protéasome exprimée dans le foie d'une souris infecté par un virus^{55, 155, 156}. Cependant, cette expression est transitoire, puisque les tissus infectés n'expriment plus d'IP après quelques jours. Ceci est dû à une réduction de la sécrétion d'IFN- γ ainsi qu'à une faible stabilité post-traductionnelle des sous-unités catalytiques de l'IP^{155, 157}.

1.2.2.3 Expression au niveau des cellules non-immunitaires

Récemment, plusieurs études ont montré que l'IP peut également être exprimé dans des tissus non-immunitaires en absence d'inflammation. En effet, l'analyse d'expression protéique par spectrométrie de masse révèle que les sous-unités catalytiques de l'IP sont exprimées chez une grande proportion de cellules et tissus humains. En revanche, cette proportion est plus élevée chez les tissus, en particulier chez les tissus infiltrés par des cellules immunitaires, que chez les lignées cellulaires. Ceci suggère que la présence de cellules immunitaires dans les tissus influence la détection des sous-unités catalytiques de l'IP¹⁵⁸. Néanmoins, l'IP est détecté chez des lignées cellulaires et tissus non-infiltrés par des cellules immunitaires. En effet, l'expression des sous-unités catalytiques de l'IP a été détectée chez des hépatocytes, des adipocytes différenciés, des précurseurs d'adipocytes, des cellules souches embryonnaires, des cellules de la rétine, des cellules musculaires myoblastiques en cours de différenciation et des cellules

musculaires du cœur de souris diabètes¹⁵⁹⁻¹⁶⁵. Les sous-unités catalytiques de l'IP ont également été détectées chez des lignées cellulaires établies à partir de néoplasies provenant du rein, de la peau, de la moelle osseuse et des poumons¹⁴⁸. Ces données suggèrent donc que les fonctions de l'IP ne sont pas seulement liées à la réponse immunitaire.

1.2.2.4 Expression de protéasomes mixtes

Des analyses de corrélation des sous-unités du protéasome réalisées à grande échelle chez plusieurs tissus et cellules humaines révèlent que les sous-unités catalytiques de l'IP sont co-exprimées. Cette co-expression est indépendante de l'expression des sous-unités catalytiques du CP¹⁵⁸. Ceci suggère que la présence de protéasomes incorporant à la fois des sous-unités catalytiques conventionnelles et de l'IP est peu fréquente. Néanmoins, des protéasomes mixtes pouvant incorporés à la fois des sous-unités catalytiques du CP et de l'IP ont été isolées dans des lignées cellulaires transformées et des cellules primaires humaines¹⁴⁸. Ces protéasomes mixtes existent sous deux formes. La première forme incorpore la sous-unité PSMB8 de l'IP en combinaison avec PSMB6 et PSMB7. La deuxième forme incorpore les sous-unités PSMB8 et PSMB9 de l'IP en combinaison avec PSMB7. L'existence de ces deux formes de protéasomes mixtes est cohérente avec les règles d'incorporation des sous-unités catalytiques de l'IP (Section 1.2.3). Ces protéasomes mixtes représentent une proportion significative du réservoir de protéasomes cellulaires : 10 à 20% chez des lignées cellulaires de mélanome et 30 à 50% chez des cellules primaires de foie, de rein, de l'intestin, du colon ainsi que chez des cellules dendritiques¹⁴⁸. Ainsi, la formation de protéasomes mixtes augmente la diversité des protéasomes présent dans la cellule et peut affecter les fonctions dépendantes du protéasome. En effet, la présence de protéasome mixtes dans la cellule modifie l'activité catalytique du protéasome et influence la nature des fragments produits^{148, 166, 167} (Section 1.2.4).

1.2.3 Incorporation des sous-unités catalytiques

Pour favoriser la formation de protéasomes homogènes, des règles strictes gouvernent l'incorporation des sous-unités dans la chambre catalytique. Les sous-unités α s'assemblent en un anneau servant d'échafaud sur lequel les sous-unités β sont incorporées de façon ordonnée et consécutive, menant à la formation d'un demi-protéasome. La dimérisation de deux demi-

protéasomes est suivie de la dégradation de la queue pro-peptidique de chaque sous-unité β , permettant l'initiation de l'activité catalytique et la formation d'une chambre catalytique mature¹⁶⁸. L'incorporation consécutive des sous-unités β dans une cellule permet de limiter la diversité lorsque plusieurs types de sous-unités catalytiques sont exprimés en même temps.

L'IP s'assemble également de façon consécutive, formant d'abord un intermédiaire contenant PSMB9 et PSMB10. Dans cet intermédiaire, bien que l'incorporation de PSMB10 dépende de la présence de PSMB9, l'incorporation de PSMB9 est réciproquement facilitée par PSMB10 mais non dépendante d'elle. En effet il a été montré que chez des souris transgéniques les protéasomes de cellules déficientes pour PSMB9 n'incorporent pas PSMB10 tandis que l'incorporation de PSMB9 n'est que légèrement affectée chez les cellules déficientes en PSMB10¹⁶⁹⁻¹⁷¹. PSMB8 est incorporé préférentiellement à PSMB5 dans l'intermédiaire contenant PSMB9 et PSMB10 et est nécessaire à leur activation. Ceci favorise ainsi l'assemblage d'IP homogènes^{169, 172}. Cependant, PSMB8 peut également s'associer à des intermédiaires PSMB6 et PSMB7 ou PSMB9 et PSMB7, menant à la formation de protéasomes mixtes. En effet, il a été montré que l'incorporation de PSMB8 reste inchangée chez les cellules déficientes pour PSMB9 ou PSMB10^{171, 173}. Pour sa part, PSMB5, pouvant seulement s'incorporer dans des précurseurs contenant PSMB6 et PSMB7, favorise l'assemblage de CP homogènes¹⁷². Grâce à ces règles d'incorporation, quatre types de protéasomes différents peuvent être formés : le CP, l'IP ainsi que deux types de protéasomes mixtes.

1.2.4 Différences d'activité au niveau des sous-unités catalytiques

Les sous-unités catalytiques du CP montrent des préférences dans l'hydrolyse des liens peptidiques d'un substrat. En effet, PSMB5, PSMB6 et PSMB7 hydrolysent un lien peptidique respectivement après un acide aminé hydrophobe, après un acide aminé acide et après un acide aminé basique (Section 1.1.3). Plusieurs études ont tenté de mesurer l'impact de l'incorporation des sous-unités de l'IP à la place du CP sur les préférences d'hydrolyse du protéasome (Figure 1.7). Utilisant principalement des protéasomes purifiés d'extraits cellulaires, ces études peuvent être divisées en deux catégories selon le type de substrat utilisé: (i) un substrat fluorogénique

artificiel et (ii) l'analyse des fragments libérés suite à la dégradation d'un substrat peptidique (courts polypeptides ou protéines complètes) grâce à la spectrométrie de masse.

1.2.4.1 Comparaisons à l'aide de substrats fluorogéniques

Un substrat fluorogénique est composé d'une série de trois à quatre acides aminés conjugués à un fluorochrome. L'hydrolyse du lien entre l'acide aminé terminal et le fluorochrome par le protéasome permet la libération du fluorochrome et la quantification de sa fluorescence. Ainsi, les différentes préférences d'hydrolyse du protéasome peuvent être mesurées en variant l'acide aminé présent en position terminal. Cependant, l'utilisation de substrats fluorogéniques n'est pas parfaite, étant donné qu'ils mesurent seulement l'influence de l'acide aminé situé en amont du lien peptidique sur la préférence d'hydrolyse et non celui situé en aval. De plus, une seule sous-unité catalytique du protéasome peut dégrader plus qu'un substrat fluorogénique différent^{52, 174}.

Tout d'abord, l'utilisation de substrats fluorogéniques montre que PSMB6 est la seule sous-unité capable d'hydrolyser efficacement un substrat fluorogénique à côté d'un acide aminé acide⁵¹. L'incorporation de PSMB9 à la place de PSMB6 détruit cette activité, puisque PSMB9 hydrolyse préférentiellement après un acide aminé hydrophobe. En effet, les protéasomes purifiés de cellules de souris déficientes pour PSMB9 montrent une diminution de l'hydrolyse après un acide aminé hydrophobe et une augmentation de l'hydrolyse après un acide aminé acide^{175, 176}. De plus, l'expression de PSMB6 chez des cellules en culture mène à une diminution de la capacité d'hydrolyse après un résidu acide^{177, 178}. La stimulation de cellules en culture avec l'IFN- γ , qui augmente la synthèse de PSMB9 et son incorporation dans le protéasome, diminue la capacité d'hydrolyse après un résidu acide¹⁵⁵.

Ensuite, l'utilisation de substrats fluorogéniques montre que les sous-unités catalytiques homologues PSMB10 et PSMB7 hydrolysent toutes les deux préférentiellement après des acides aminés de type basique¹⁷⁹. En effet, les protéasomes de cellules déficientes pour PSMB10 montrent exactement les mêmes préférences d'hydrolyse que les cellules possédant PSMB10¹⁷³.

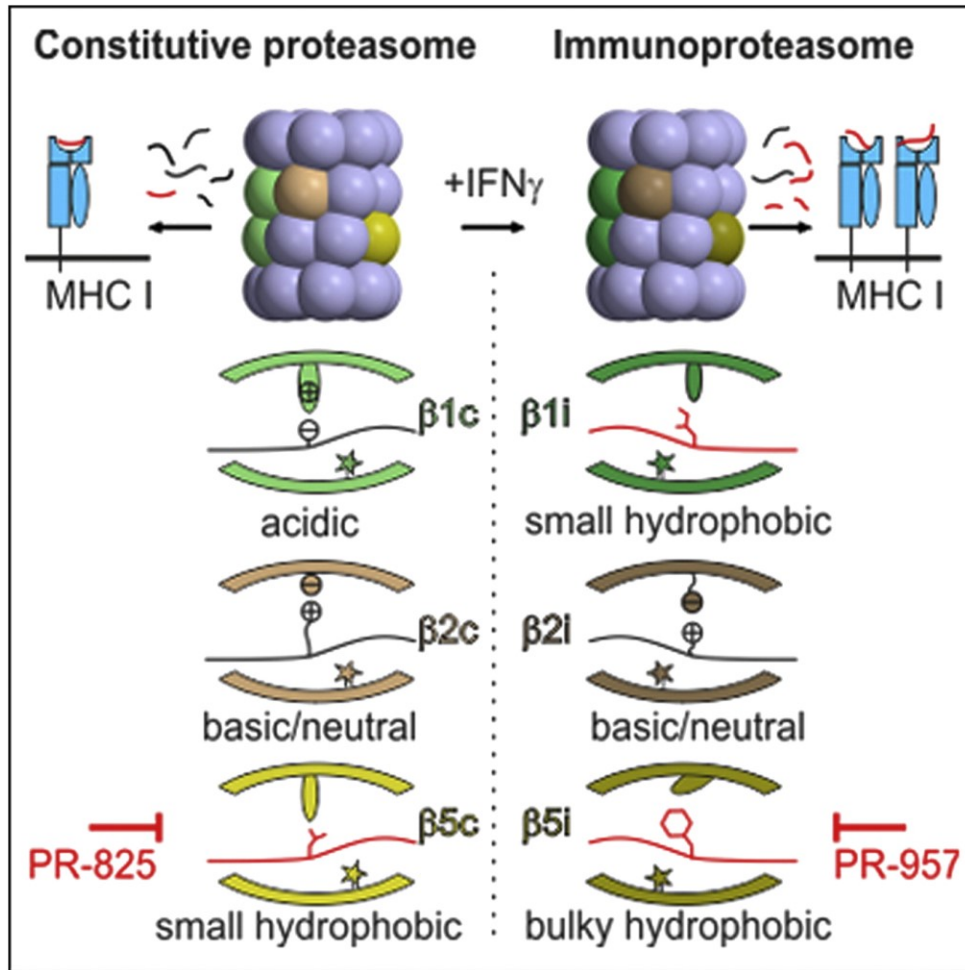


Figure 1.7 Préférences catalytiques du CP et de l'IP.

Les sous-unités catalytiques du CP (PSMB5, PSMB6 et PSMB7 aussi nommées respectivement $\beta 5$, $\beta 1$ et $\beta 2$) et de l'IP (PSMB8, PSMB9 et PSMB10 aussi nommées respectivement $\beta 5i$, $\beta 1i$ et $\beta 2i$) montrent des préférences catalytiques distinctes. Reproduit avec permission d'*Elsevier* (Huber EM et al¹²⁷)

De même, les deux sous-unités PSMB8 et PSMB5 hydrolysent toutes deux préférentiellement après un acide aminé hydrophobe. Cependant, l'utilisation de substrats fluorogéniques a donné lieu à de vives controverses sur les différences dans la capacité d'hydrolyse après un acide aminé hydrophobe entre l'IP et le CP. En effet, d'une part, des études utilisant des protéasomes purifiés d'hépatocytes ou de cellules leucémiques en culture stimulées à l'IFN- γ montrent une augmentation de la capacité d'hydrolyse après un acide aminé hydrophobe^{176, 180, 181}. D'autre part, des études montrent une diminution de la capacité d'hydrolyse après un acide aminé hydrophobe en utilisant des protéasomes purifiés de fibroblastes stimulés à l'IFN- γ ou

d'hépatocytes de souris infectés par un virus^{155, 182}. L'utilisation de modèles transgéniques ne permet pas plus de résoudre cette controverse. En effet, tandis que des études montrent que les protéasomes purifiés de cellules possédant une délétion de PSMB8 ont une capacité réduite d'hydrolyse après un acide aminé hydrophobe^{176, 178, 180, 183}, des protéasomes purifiés de plusieurs tissus de souris déficientes en PSMB8 (thymus, rate et foie) montrent une augmentation de cette capacité d'hydrolyse¹⁸⁴.

1.2.4.2 Comparaisons à l'aide de substrats peptidiques

L'utilisation de substrats peptidiques et l'analyse des fragments libérés à l'aide de la spectrométrie de masse ont permis d'apporter une compréhension supplémentaire aux résultats obtenus avec les substrats fluorogéniques. L'analyse de la dégradation de l'énolase-I, une protéine de 436 acides aminés, révèle que les fragments générés par l'IP et le CP sont majoritairement différents⁵⁴. L'inspection des acides aminés situés en amont et en aval du lien peptidique hydrolysé révèle que : (i) l'IP montre une préférence pour un lien peptidique si un acide aminé hydrophobe est situé en amont, (ii) l'IP n'hydrolyse pas un lien peptidique si un acide aminé hydrophobe est situé en aval, (iii) le CP peut hydrolyser un lien peptidique situé entre deux acides aminés hydrophobes. En d'autres termes, le CP peut couper préférentiellement entre deux acides aminés hydrophobes tandis que l'IP ne peut pas. L'IP coupe préférentiellement entre un acide aminé hydrophobe et un acide aminé non-hydrophobe.

Ces résultats sont cohérents avec l'analyse de fragments produits par la dégradation de précurseurs des peptides MAGE-C2, MAGE-A3 et Melan-A associés au CMH-I de cellules cancéreuses^{167, 185, 186}. En effet, contrairement à l'IP, le CP empêche la génération de ces peptides à partir de leurs précurseurs puisqu'il hydrolyse à travers une séquence consécutive d'acides aminés hydrophobes à l'intérieur de ces peptides. L'IP quant à lui permet la génération de ces peptides à cause de la présence d'un acide aminé hydrophobe suivi d'un acide aminé non-hydrophobe à leurs extrémités. L'utilisation de protéasomes mixtes dans ces réactions de dégradation a permis de confirmer que PSMB5 et PSMB8 étaient respectivement responsables de ces préférences par le CP et l'IP¹⁶⁷.

Finalement, l'analyse de la dégradation des précurseurs peptides tumoraux MAGE-C2, MAGE-A10, gp100 et tyrosinase permet de confirmer que le remplacement de PSMB6 par PSMB9 affecte les préférences d'hydrolyse après un résidu acide. En effet, des protéasomes incorporant PSMB6, en hydrolysant après des acides aminés aspartiques dits acides, sont capables de générer les peptides dérivés de ces précurseurs tumoraux alors que les protéasomes contenant PSMB9 sont incapables de générer ces peptides¹⁶⁷.

1.2.5 Différences de structure au niveau des sous-unités catalytiques

Les structures moléculaires du CP et de l'IP de la souris ayant été résolues récemment par cristallographie, elles permettent une comparaison directe de la structure des sous-unités, de leurs sites actifs et des pochettes de liaison du substrat¹²⁷ (Figure 1.7 et Figure 1.8). En premier lieu, il a été observé que les structures globales des paires de sous-unités homologues (PSMB5/PSMB8, PSMB6/PSMB9 et PSMB7/PSMB10) se superposent parfaitement, en dépit des différences de structure primaire. Cependant, l'affinité d'un substrat envers les sites actifs du protéasome est déterminée par les interactions avec les différentes pochettes de liaison du substrat et va influencer les préférences catalytiques.

Or, les pochettes de liaison du substrat de PSMB10 et de PSMB7 sont identiques tant au niveau structurel qu'au niveau de la séquence en acides aminés, en accord avec les données de substrats artificiels et de substrats polypeptidiques. Le rôle de l'incorporation de la sous-unité PSMB10 de l'IP à la place de la sous-unité PSMB7 reste donc énigmatique.

En revanche, PSMB9 montre des différences en acides aminés (T20V, T31F, R45L et T52A) par rapport à PSMB6. Cette différence augmente l'hydrophobicité et diminue la taille de la pochette S1 de liaison du substrat située à côté du site actif. De plus, les substitutions T22A et A27V chez PSMB9 contribuent à diminuer la taille de la pochette de liaison S3. Ainsi, comme les données précédentes le montraient, PSMB9 hydrolyse plus efficacement un lien peptidique après des petits acides aminés hydrophobes que des résidus chargés contrairement à PSMB6.

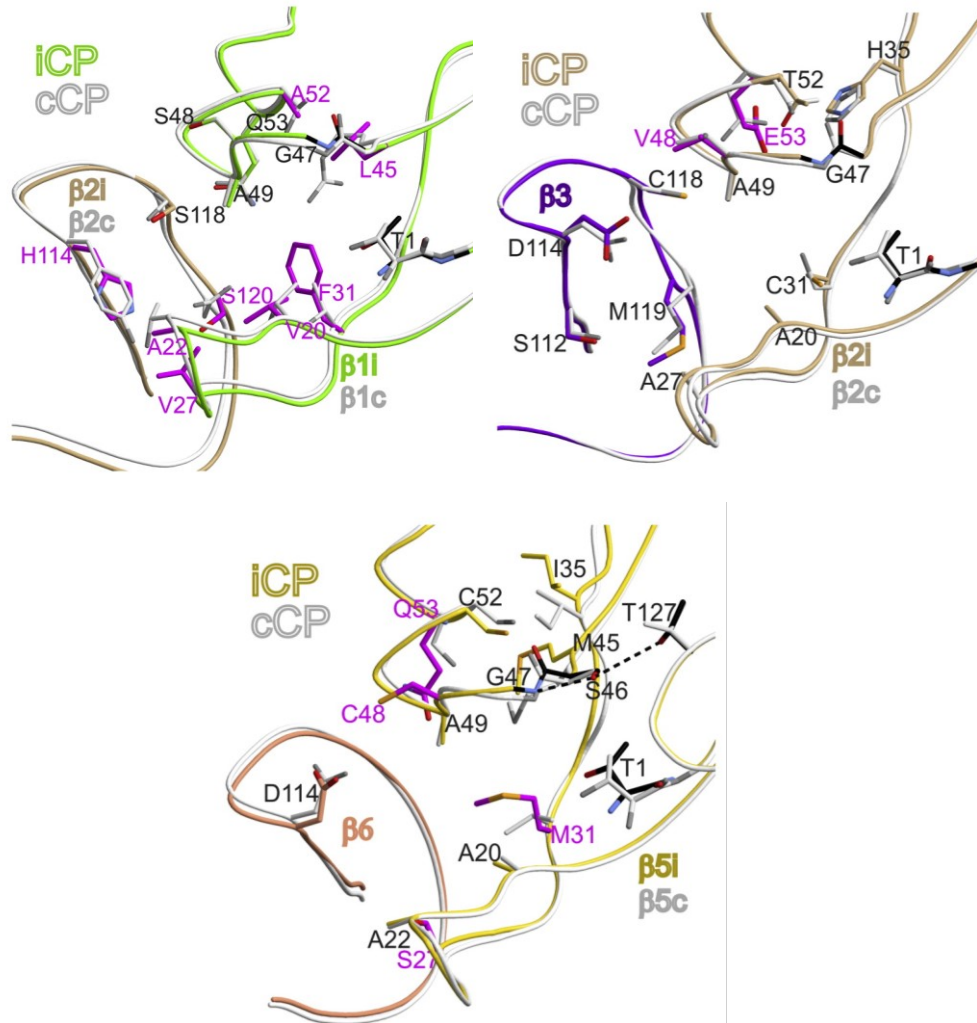


Figure 1.8 Structure moléculaire du CP et de l'IP.

Structure des pochettes de liaison du substrat pour les sous-unités catalytiques du CP en gris (cCP : PSMB5, PSMB6 et PSMB7 aussi nommées β_5 , β_1 et β_2) et de l'IP (iCP : PSMB8 en jaune, PSMB9 en brun et PSMB10 en vert aussi nommées β_{5i} , β_{1i} et β_{2i}). Les changements d'acides aminés entre le CP et l'IP sont colorés en magenta. Reproduit avec permission d'Elsevier(Groll EM et al¹²⁷)

Chez PSMB5, les acides aminés situés dans la poche S1 près du site actif (A20, M45, A49 et C52) sont responsables des préférences hydrophobes. Or, elles sont inchangées entre PSMB5 et PSMB8, confirmant que PSMB8 et PSMB5 ont une préférence envers les liens peptidiques précédés d'un acide aminé hydrophobe. En revanche, la taille de cette poche est plus grande chez PSMB8 que PSMB5. Ceci est dû à une conformation distincte de Met45 permettant à PSMB8 d'accommoder des acides aminés avec une grosse chaîne latérale.

L'incapacité de PSMB8 à hydrolyser un lien peptidique entre deux résidus hydrophobes⁵⁴ pourrait s'expliquer par une substitution (A27S) dans la pochette de liaison du substrat S3 qui lui confère des propriétés hydrophiles. Finalement, le caractère hydrophile aux alentours du site actif est plus prononcé pour PSMB8 que pour PSMB5 grâce aux substitutions A46S et V127T. Cette augmentation de polarité pourrait augmenter la vitesse d'hydrolyse des liens peptidiques par le site actif. En effet, des expériences de digestion de protéasomes *in vitro* ou de génération d'peptides *in vivo* suggèrent que l'IP a un taux plus élevé de dégradation des substrats et d'efflux des fragments^{187, 188}.

1.3 Rôles biologiques de l'IP

Le système ubiquitine-protéasome est impliqué dans plusieurs processus cellulaires importants via l'élimination sélective de protéines intracellulaires. Plusieurs exemples précis illustrent la diversité de fonctions du protéasome : (i) le protéasome contrôle le cycle cellulaire en limitant la durée de vie de régulateurs tels que des cyclines et des inhibiteurs de cycline^{189, 190}, (ii) le protéasome est impliqué dans le contrôle de qualité des protéines nouvellement synthétisées et l'élimination des protéines endommagées par le stress⁷⁸ (Section 1.1.7), (iii) le protéasome est essentiel pour pourvoir les cellules en acides aminés et ubiquitine libres¹⁹¹⁻¹⁹³, (iv) le protéasome régule le système immunitaire en générant des peptides pour le CMH-I (Section 1.3.1) et (v) le protéasome a un rôle important dans la régulation de l'expression génique (Section 1.3.3).

Le remplacement du CP par l'IP modifie les préférences d'hydrolyse et influence l'impact du protéasome sur plusieurs processus biologiques. Parmi ceux déjà connus avant le début de cette thèse, il y a la génération de peptides adaptés pour le CMH-I, la régulation de la fonction de cellules immunitaires, la réponse au stress et la régulation de l'expression génique (résultats préliminaires).

1.3.1 Génération d'antigènes pour le CMH-I

Exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées, les molécules du CMH-I présentent de courts fragments peptidiques provenant de protéines intracellulaires, nommés peptides ou antigènes. Elles présentent ces antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ chargés de la surveillance immunitaire contre les pathogènes intracellulaires et les cellules transformées. Ces antigènes sont principalement générés par la dégradation de protéines par le protéasome, puis exportés vers le réticulum endoplasmique à l'aide des transporteurs de peptides 1 et 2 (TAP1, TAP2) où ils sont chargés sur une molécule du CMH-I pour être envoyé à la surface cellulaire^{194, 195} (Figure 1.9).

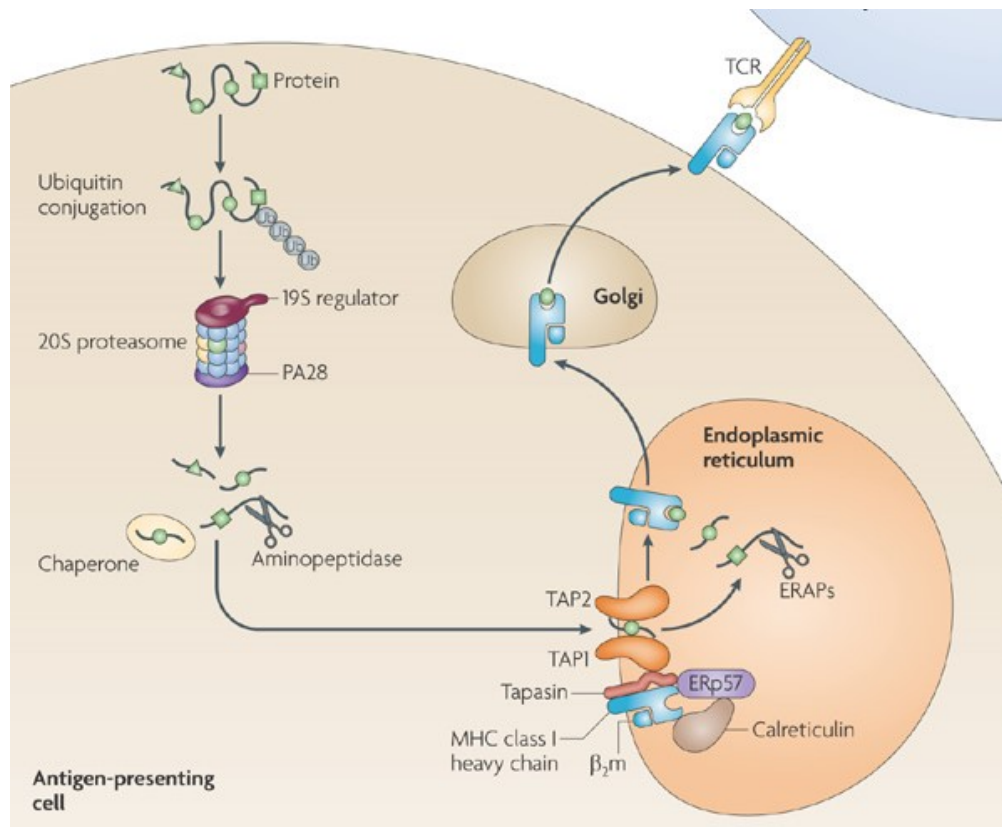


Figure 1.9 Voie de présentation du CMH de classe I.

Les fragments générés par la dégradation de protéines intracellulaires peuvent être transportés dans le réticulum endoplasmique par les transporteurs de peptides (TAP) 1 et 2. Ils s'associent ensuite à une molécule du CMH de classe I et le complexe formé est transporté à la surface cellulaire pour être présenté aux récepteurs de lymphocytes T CD8⁺ (TCR). Reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Groettrup M et al¹²⁹).

Les premières études sur l'IP se sont concentrées d'abord sur la génération préférentielle d'antigènes pour le CMH-I. En effet les gènes codant pour PSMB8 et PSMB9 sont localisés à proximité des gènes *TAP1* et *TAP2*. De plus, leur expression est stimulée par l'IFN- γ , tout comme *TAP1*, *TAP2* et les gènes codants pour les molécules du CMH-I¹⁹⁶ tandis que l'IP est exprimé dans les cellules présentatrices d'antigènes (Section 1.2.2).

L'IP n'est pas nécessaire pour la génération d'antigènes associés au CMH-I, puisque le CP peut accomplir ce rôle également. Or, la présence d'IP permet d'augmenter la diversité des antigènes produits. En effet, l'analyse par spectrométrie de masse des antigènes présentés à la surface de cellules dendritiques montre qu'une portion importante d'antigènes sont générés préférentiellement par l'IP^{142, 197}. En accord avec ces observations, les cellules déficientes pour PSMB8 seul ou PSMB8 et PSMB9 montrent un déficit de 50% des molécules CMH-I à leur surface^{198, 199}. De plus, la génération de plusieurs antigènes d'origine endogène, virale, bactérienne ou tumorale peut être modifiée positivement ou négativement en présence d'IP^{175, 187, 198, 200-204}.

Le protéasome est le principal déterminant de la nature de l'extrémité C-terminal des antigènes associés au CMH-I. Or les molécules du CMH-I montrent une préférence pour les antigènes avec des acides aminés hydrophobes en C-terminal tandis qu'elle défavorise ceux possédant des acides aminés acides¹⁹⁴. Le remplacement de PSMB6 par PSMB9 augmentant la génération d'antigènes à extrémités hydrophobes à la place d'acides, PSMB9 est à l'origine de la génération préférentielle d'antigènes adaptés pour le CMH-I par l'IP (Figure 1.10).

Ceci a des conséquences favorables sur la réponse immunitaire. Tout d'abord, la réponse immunitaire en réponse à une infection virale est diminuée chez des tissus infectés de souris déficientes en IP puisque la présentation des antigènes associés au CMH-I à la surface est altérée²⁰². De plus, des souris déficientes en sous-unités de l'IP montrent un répertoire altéré de lymphocytes T CD8⁺^{173, 205}, étant donné que le développement des lymphocytes T CD8⁺ dans le thymus et la nature de leur récepteur est dépendant des antigènes présentés par les cellules épithéliales et les cellules dendritiques du thymus²⁰⁶.

1.3.2 Fonctions indépendantes de la génération d'antigènes

L'IP est également exprimé dans des cellules qui ne sont pas présentatrices d'antigènes (Section 1.2.2). Ainsi, une série d'études ont montré des rôles pour l'IP indépendants de la génération d'antigènes pour le CMH-I.

1.3.2.1 Régulation de la survie des lymphocytes

Les lymphocytes T exprimant fortement l'IP, ce dernier peut contrôler la prolifération et la survie des lymphocytes T dans certaines situations (Figure 1.10). Il a été montré chez des souris transgéniques que les lymphocytes T ont besoin de l'IP pour proliférer de façon adéquate et survivre dans un environnement inflammatoire. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ de souris déficientes pour PSMB8 et PSMB10 prolifèrent de façon excessive en réponse à des stimuli activateurs *in vitro*¹⁹⁹. De plus, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ est plus bas chez des souris transplantées avec une moelle osseuse déficiente en PSMB10 qu'avec une moelle osseuse normale²⁰⁷. De surcroît, les lymphocytes T provenant de souris déficientes pour PSMB8, PSMB9 ou PSMB10 sont incapables de survivre lorsqu'ils sont transférés chez une souris infectée par un virus^{173, 202, 208}. Enfin, les lymphocytes T CD4⁺ de souris déficientes pour PSMB9 sont moins efficaces pour activer les lymphocytes B à produire des anticorps contre le virus influenza¹⁴⁵.

Les lymphocytes B expriment également beaucoup d'IP, mais la délétion de ses sous-unités catalytiques affecte des fonctions indépendantes de la génération d'antigènes pour le CMH-I. En effet, les lymphocytes B déficientes pour PSMB9 sont moins efficaces pour produire des anticorps et inaptes à survivre lorsqu'ils sont stimulés par des lymphocytes T CD4⁺ non-modifiés¹⁴⁵. Ceci indique que l'IP est aussi nécessaire pour la fonction des lymphocytes B.

1.3.2.2 Régulation de la production de cytokines

Les cellules du système immunitaire produisent des cytokines, petites protéines sécrétées localement ou de façon systémique, pour activer ou réprimer d'autres cellules immunitaires ou non-immunitaires. Le protéasome est impliqué dans la production de cytokines en contrôlant la dégradation et l'activation de régulateurs inflammatoires^{209, 210}. Or, il a été rapporté que l'IP

pouvait également influencer la production de cytokines par les cellules immunitaires (Figure 1.10). En effet, utilisant des modèles génétiques et des traitements pharmacologiques, des études ont montré que l'IP régule la production de cytokines chez des lymphocytes T et B, des macrophages et des cellules dendritiques. Tout d'abord, l'inhibition de la sous-unité PSMB8 bloque la production (i) d'interleukine (IL)-2 et d'IFN- γ chez des lymphocytes T provenant de cellules de sang humain, (ii) d'IL-6 et d'IFN- γ produits par des cellules de rate murines et (iii) d'IL-6, d'IL-23 et de TNF- α provenant de cellules de sang humain stimulées avec une endotoxine²¹¹. Aussi, la double délétion de PSMB8 et PSMB10 influence l'expression de l'ARNm codant pour l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-2R β . De plus, elle affecte aussi l'expression des ARNm codant pour les facteurs de transcription Gata3 et T-Bet chez des lymphocytes T activés provenant de cellules de rate murines²¹². Chez la souris, la délétion de PSMB9 diminue quant à elle la production d'IL-6, d'IFN- α , d'IL-1 β et de TNF- α par les cellules dendritiques¹⁴⁵. Finalement, la délétion de chacune des sous-unités de l'IP affecte la production d'oxyde nitrique par les macrophages en réponse au lipopolysaccharide, une endotoxine présente à la surface des bactéries Gram⁻²¹³. Le mécanisme par lequel l'IP contrôle la production de plusieurs cytokines reste inconnu. Néanmoins, des régulateurs transcriptionnels sont responsables de la production de cytokines par les cellules immunitaires.

1.3.2.3 Atténuation de la sévérité de l'inflammation et de l'auto-immunité

L'IP est important pour la prolifération adéquate et la survie des lymphocytes T ainsi que pour la production de plusieurs cytokines dans un environnement inflammatoire. Néanmoins, l'IP est aussi important pour la réponse immunitaire en conditions normales qu'en conditions pathologiques. En effet, des pathologies à nature inflammatoire et auto-immune sont sensibles à l'inhibition générale de l'activité du protéasome : effet protecteur chez des modèles d'arthrites²¹⁴, d'asthme²¹⁵, et chez des cas de dommages cardiaques ou cérébraux^{216, 217}. Plusieurs études ont montrés que l'inhibition de PSMB8 réduit les réponses immunitaires auto-immunes dans des modèles murins expérimentaux²¹⁸. De plus, l'inhibition de PSMB8 retarde la progression de l'arthrite rhumatoïde dans deux modèles expérimentaux différents et retarde l'induction du diabète de type 1²¹¹. L'inhibition de PSMB8 permet aussi de réduire la sévérité de colite expérimentale (inflammation de l'intestin) chez la souris et réduit la production de

cytokines inflammatoires (IL-23, IL-1 β , TNF- α , IL-23 et IL-17) par les cellules du colon²¹⁹⁻²²¹. Le traitement avec l'inhibiteur de PSMB8 peut aussi réduire la sévérité d'autres modèles murins de maladies auto-immunes, tels que la sclérose multiple²²², le lupus érythémateux systémique²²³ et une maladie thyroïdienne auto-immune, la thyroïdite d'Hashimoto²²⁴.

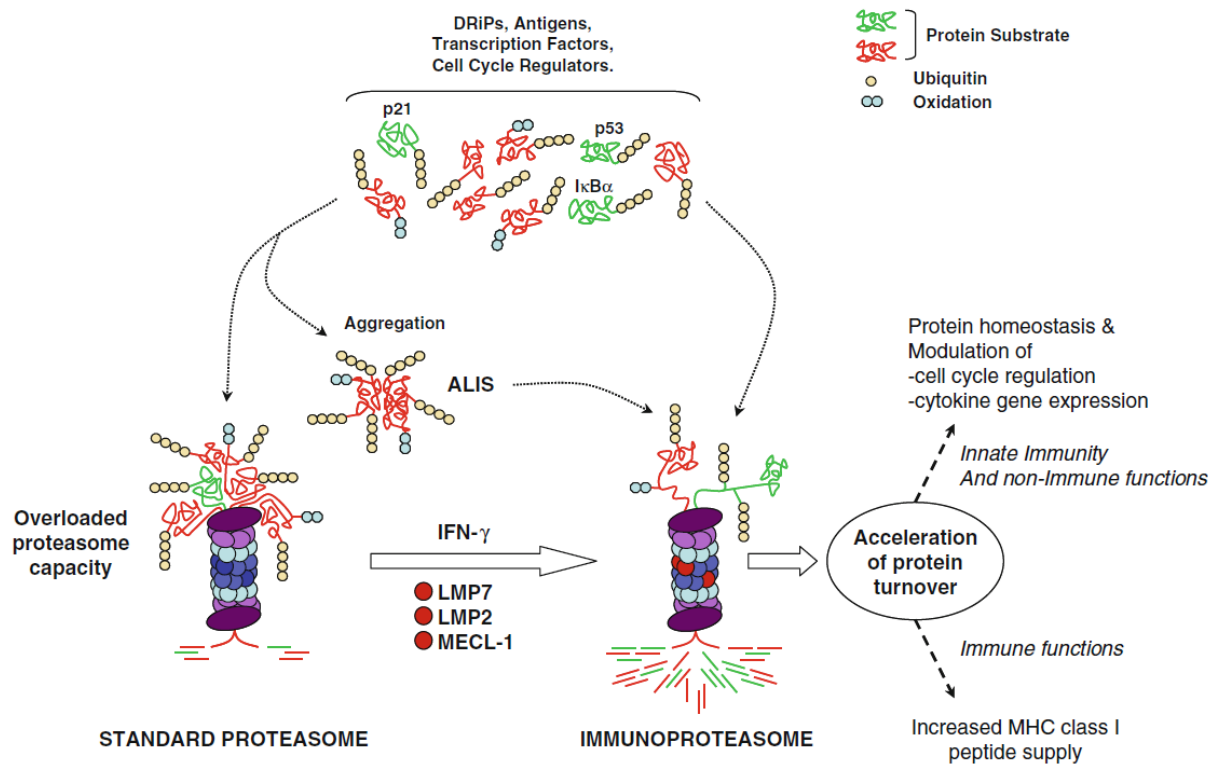


Figure 1.10 Fonctions immunitaires et non-immunitaires de l'immunoprotéasome.

La présence d'IP augmente la capacité d'une cellule à dégrader les protéines endommagées en réponse au stress. La présence d'IP influence également des fonctions immunitaires et non-immunitaires tels la sécrétion de cytokine et la production d'antigènes CMH-I. Reproduit avec permission de *Springer* (Ebstein F et al²²⁵).

1.3.3 Régulation de l'expression génique

L'IP régule la survie et de la fonction de lymphocytes ainsi que la production de cytokines par les cellules immunitaires. Or, ces fonctions peuvent être régulées au niveau transcriptionnel. Il est connu que le protéasome contrôle l'activité transcriptionnelle, notamment en régulant l'activité de cofacteurs du complexe général de transcription, aussi nommés régulateurs de transcription^{226, 227} (Figure 1.11).

Tout d'abord, le protéasome peut contrôler l'abondance de ces régulateurs soit en condition basale soit après leur activation lorsque leur fonction n'est plus requise. Par exemple, les enzymes ligases E3 Mdm2 et Skp2 ubiquitinent respectivement les facteurs de transcription p53 et Myc pour leur dégradation par le protéasome en condition basale. Seul un signal d'activation dissociant p53 et Myc de ces régulateurs négatifs permet de les stabiliser. Parmi les cibles transcriptionnelles de p53 et Myc se trouve leurs régulateurs négatifs respectifs qui permettent d'assurer la terminaison du signal d'activation²²⁸⁻²³⁰.

Ensuite, certains activateurs de transcription étant présents sous forme de précurseurs, la protéolyse limitée de ces précurseurs par le protéasome permet de libérer leur forme active. C'est le cas de la sous-unité Nf-κB1 du complexe Nf-κB, dont la forme transcriptionnellement active (p50) doit être dégradée par le protéasome à partir du précurseur p105 pour réguler la transcription²³¹. Le protéasome peut également contrôler l'abondance de protéines qui interagissent avec des régulateurs de transcription et réguler ainsi indirectement leur activité. Notamment, le régulateur négatif du complexe Nf-κB, IκB est dégradé sélectivement par le protéasome suite à un signal d'activation^{231, 232}.

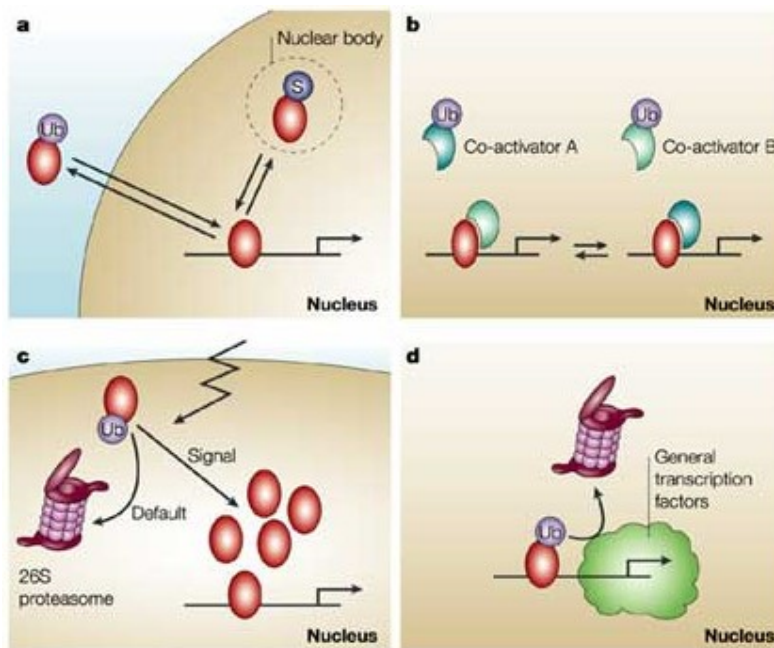


Figure 1.11 Régulateurs de transcription et protéasome.

(a) Un régulateur est séquestré hors du noyau et son inhibiteur est éliminé par le protéasome. (b) L'ubiquitination (Ub) bloque l'association du régulateur avec un cofacteur. (c) Le régulateur est maintenu dans une forme instable et un signal bloque sa dégradation. (d) Élimination pendant l'activation transcriptionnelle. Reproduit avec permission de *Nature Publishing Group* (Muratani et al²²⁶).

Enfin, le protéasome peut également influencer l'activité transcriptionnelle en régulant la disponibilité de l'ubiquitine cellulaire qui est limitante dans la cellule¹⁹³. En effet, puisque la dégradation de protéines ubiquitinées libère de l'ubiquitine, un changement dans l'activité du protéasome est susceptible de modifier la quantité d'ubiquitine libre dans la cellule. Par conséquent, l'activité transcriptionnelle peut être modulée de deux façons : (i) l'ajout d'ubiquitine sur un régulateur transcriptionnel affecte son activité en l'empêchant de se lier à un cofacteur ou à la machinerie transcriptionnelle²³³ (Figure 1.11), (ii) l'ajout d'ubiquitine sur les histones H2A et H2B affecte leurs interactions avec la chromatine et ainsi l'activation transcriptionnelle. En effet, l'ajout d'une seule ubiquitine (mono-ubiquitination) sur H2A (H2Aub) est associé à la répression transcriptionnelle. H2Aub réprime l'initiation transcriptionnelle puisqu'elle bloque la formation de groupes méthyles sur la lysine 4 de l'histone H3, des marqueurs d'activation transcriptionnelle²³⁴. De surcroît, les enzymes responsables de la mono-ubiquitination sur H2A sont présentes dans les complexes de répression transcriptionnelle *in vivo*. En revanche, la mono-ubiquitination de H2B (H2Bub) est corrélée à une forte activité transcriptionnelle, puisque cette modification est trouvée dans les régions de gènes fortement exprimés²³⁵ et que la perte de l'enzyme catalysant la mono-ubiquitination de H2B ralentit la transcription génique²³⁶.

Alors que le rôle du protéasome dans l'activité transcriptionnelle est bien étudié, l'impact de l'IP est inconnu. Néanmoins, plusieurs études suggèrent un rôle pour l'IP dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle. D'une part, il a été montré que le remplacement du CP par l'IP peut affecter l'abondance du régulateur négatif I κ B dans certains types cellulaires^{145, 237-240}. L'IP a donc un rôle potentiel dans l'activation du complexe Nf- κ B, un régulateur transcriptionnel important dans la réponse immunitaire et la survie cellulaire. D'autre part, l'IP affecte la production de cytokines par plusieurs cellules immunitaires, un processus régulé de façon transcriptionnelle (Section 1.3.2). Enfin, précédemment au début de cette thèse, notre laboratoire a montré que la délétion d'IP affecte l'abondance de plusieurs ARNm chez les cellules dendritiques matures¹⁴².

En bref, le protéasome est impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle, et il semblerait que l'IP pourrait y jouer aussi un rôle et ce de façon non-redondante avec le CP.

1.3.4 Élimination de protéine endommagées en réponse au stress

En plus d'activer les défenses antivirales et anticancéreuses de cellules non-immunitaires, l'IFN- γ stimule le taux de synthèse protéique, ce qui augmente les erreurs de traduction et génère des protéines défectueuses (Section 1.1.7). L'IFN- γ génère également des produits réactifs de l'oxygène, menant à l'augmentation du nombre de protéines oxydées²⁴¹⁻²⁴⁴. Or, un protéasome fonctionnel est nécessaire pour éliminer ces protéines défectueuses. Donc la synthèse des sous-unités catalytiques de l'IP en réponse à l'IFN- γ pourrait être un mécanisme de protection cellulaire.

En effet, les protéasomes de fibroblastes embryonnaires déficients pour la sous-unité PSMB8 de l'IP sont moins performants pour l'élimination des protéines endommagées et des agrégats formés en réponse à l'IFN- γ ^{238, 245}. Cependant, il n'a pas encore été déterminé comment l'IP serait plus performant que le CP pour éliminer ces protéines endommagées, la particule régulatrice canonique étant limitante pour la reconnaissance de la chaîne d'ubiquitine¹⁸¹. En revanche, une partie importante des protéines éliminées par l'IP dans cette étude sont endommagées par oxydation, et le protéasome peut dégrader des protéines endommagées par oxydation en absence d'ubiquitine (Section 1.1.7).

Or, des observations à partir de souris génétiquement modifiées viennent appuyer l'idée d'un rôle préférentiel pour l'IP dans l'élimination de protéines endommagées et oxydées : (i) le foie et le cerveau de souris déficientes pour l'IP sont incapables d'éliminer les protéines ubiquitinées et oxydées s'accumulant en situation basale ou en réponse à une inflammation^{238, 246}, (ii) les cellules musculaires cardiaques de souris déficientes pour PSMB8 sont incapables d'éliminer les protéines ubiquitinées générés par l'IFN- γ et le virus Coxackie B3²⁴⁷, (iii) la quantité de protéine oxydées en réponse au peroxyde est augmentée chez des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes pour PSMB9¹²⁵, (iv) la réponse au stress est moins efficace chez les cellules rétiennes de souris déficientes pour l'IP^{164, 248, 249}.

De plus, des études *in vitro* montrent que l'IP est capable de dégrader des protéines dénaturées par oxydation^{125, 250}. Finalement, des orthologues de PSMB8 et PSMB9 ont été découverts chez

un invertébré rudimentaire de la branche des animaux (le placozoa *Trichoplax adhaerens*). Chez ces invertébrés, le rôle de ces orthologues de *PSMB8* et *PSMB9* est d'aider les cellules à se prémunir contre le stress oxydatif et protéique²⁵¹.

En réponse au stress oxydatif, les régulateurs de transcription NRF1 et NRF2 peuvent induire la transcription des sous-unités catalytiques et non-catalytiques du protéasome (Section 1.1.9). L'expression des sous-unités catalytiques de l'IP peut également être stimulée par le stress oxydatif chez des fibroblastes^{125, 250}. De plus, l'oxyde nitrique augmente la synthèse de *PSMB8* et *PSMB9* chez les cellules endothéliales via l'activité des protéines kinase A et G²⁵². Enfin, une augmentation de l'expression des sous-unités catalytiques de l'IP est observée chez des cellules provenant de pathologies dont l'étiologie implique le stress oxydatif et l'inflammation : la rétine de patients atteints de dégénérescence maculaire²⁴⁸, la moelle épinière de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique^{253, 254} ainsi que les muscles provenant d'un modèle animal de dystrophie musculaire de Duchenne²⁵⁵. Ces observations suggèrent fortement que l'IP est plus performant que le CP pour l'élimination des protéines endommagées et la réponse au stress cellulaire (Figure 1.10).

1.4 Pathologies humaines associées au protéasome et à l'IP

Des perturbations dans l'activité du protéasome sont à l'origine de plusieurs pathologies humaines dont le cancer et les maladies neurodégénératives et inflammatoires⁵. En effet, une diminution de la fonction du protéasome dans certaines maladies génétiques ou dégénératives engendre des dommages tissulaires importants en raison de l'accumulation de protéines endommagées à l'intérieur des cellules. De plus, des mutations induisant une perte de fonction de l'IP ont été découvertes au niveau de maladies génétiques humaines et leurs études sont particulièrement informatives. Enfin, une hyper-activation du système ubiquitine-protéasome a été observé dans plusieurs types de cancer et plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène. En conclusion, ces dysfonctions dans la fonction du protéasome

révèlent l'importance d'un fonctionnement adéquat du système ubiquitine-protéasome dans l'organisme.

1.4.1 Une perte de fonction de l'IP est associée à des syndromes auto-inflammatoires

De nombreuses études ont démontré le lien entre des dysfonctionnements dans le système ubiquitine-protéasome et des maladies neurodégénératives chroniques telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie d'Huntington. En effet ces maladies sont caractérisées par la présence d'agrégats de protéines endommagées causant une inflammation et une dégénérescence majeure des cellules neuronales⁵.

De même, des syndromes inflammatoires associés au protéasome affectant des tissus non-neuronaux ont également été décrits. Les patients affectés par ces syndromes présentent des symptômes sévères incluant de la fièvre, des éruptions cutanées, de l'inflammation, une forte réduction de la taille des tissus musculaires et graisseux ainsi qu'une calcification des ganglions. Ces syndromes sont regroupés sous l'appellation « syndromes auto-inflammatoires associés au protéasome » et incluent les syndromes Nakajo-Nishimura, CANDLE (Syndrome de dermatose neutrophilique chronique atypique avec lipodystrophie et température élevée), JMP (Syndrome de contractures articulaires, atrophie musculaire, anémie microcytaire et lipodystrophie induite par la panniculite) et JASL (Syndrome auto-inflammatoire japonais avec lipodystrophie)²⁵⁶.

Récemment, une série d'études indépendantes ont identifié des mutations récessives dans le gène codant pour la sous-unité PSMB8 de l'IP chez les patients atteints de syndromes auto-inflammatoires associés au protéasome^{162, 257-259}. Ces mutations homozygotes faux-sens identifiées entraînent un changement d'acide aminé dans la protéine synthétisée (G197V, G201V ou T75M), induisant une modification de sa structure tertiaire. Par conséquent, l'incorporation de PSMB8 dans le protéasome est défectueuse, causant une diminution de l'activité catalytique du protéasome et l'accumulation de protéines ubiquitinées et oxydées chez les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. Une étude a également identifié des mutations hétérozygotes dans *PSMB8* en combinaison avec des mutations hétérozygotes pour

des sous-unités non-catalytiques chez des patients atteints du syndrome CANDLE. L'assemblage du protéasome est défectueux et les cellules de ces patients sont moins performantes pour résister à un stress cellulaire, puisqu'ils accumulent des protéines ubiquitinées²⁶⁰.

Puisque plusieurs gènes inflammatoires sont exprimés dans les cellules immunitaires et non-immunitaires de ces patients, une signature inflammatoire prononcée est observée chez les patients atteints du syndrome CANDLE. De plus, la sécrétion d'IFN- α dépendante de l'activité du protéasome par les cellules immunitaires de ces patients mène à une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires²⁶⁰. Enfin, les lymphocytes B provenant de patients atteints du syndrome Nakajo–Nishimura et les cellules sanguines de patients atteints du syndrome CANDLE expriment respectivement des quantités excessives d'IL-6 ainsi que de Cxcl10, de Ccl2 et de Ccl5^{162, 259}.

Globalement, les rôles biologiques décrits pour l'IP dans la régulation de la production de cytokines ainsi que dans la réponse au stress (Sections 1.3.2 et 1.3.3) sont cohérents avec ces observations chez les patients atteints de mutations dans *PSMB8*.

1.4.2 Le protéasome au niveau du cancer

Alors qu'une diminution de l'activité du protéasome est néfaste pour l'homéostasie et la viabilité cellulaires et tissulaires, une hyper-activation de l'activité du protéasome a été observée au niveau du cancer. En effet, un grand nombre d'études appuie l'implication du protéasome dans le contrôle de la survie cellulaire et de la prolifération par la dégradation sélective d'inhibiteurs de ces voies^{231, 261, 262}.

1.4.2.1 Des inhibiteurs de l'activité du protéasome pour le traitement du cancer

Ainsi, des inhibiteurs de l'activité du protéasome dirigés à la fois contre le CP et l'IP furent synthétisés et utilisés pour traiter des cellules cancéreuses²⁶³. L'inhibition de l'activité du protéasome par le bortezomib en culture *in vitro* ou injectées chez la souris est cytotoxique chez des lignées cancéreuses dérivées de myélome, de lymphome, de leucémie, de cancer de prostate,

de cancer du pancréas, de cancer de l'ovaire et de cancer du côlon²⁶⁴⁻²⁶⁹. Bien que le protéasome soit exprimé de façon ubiquitaire, cette toxicité est préférentielle pour les cellules cancéreuses puisque l'activité du protéasome est plus élevée dans des cellules cancéreuses que dans des tissus normaux²⁷⁰. En effet, le bortezomib n'induit pas la mort de fibroblastes non-transformées en culture *in vitro*²⁷¹⁻²⁷³.

Les inhibiteurs du protéasome sont particulièrement efficaces contre les tumeurs hématologiques. En effet, le bortezomib a été acceptée en milieu clinique pour le traitement du myélome multiple et montre une efficacité supérieure comparé aux tumeurs solides^{271, 274, 275}. L'utilisation du bortezomib réduit la taille de la tumeur chez 35% et 88% des patients atteints de myélomes multiple réfractaires lorsqu'utilisé respectivement seul ou en combinaison avec le dexaméthasone^{276, 277}. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de protéasome démontre également de l'efficacité préclinique et clinique pour le traitement de la leucémie myéloïde aigue. En effet, contrairement aux cellules de moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical non-transformées, le traitement de cellules souches primaires de leucémie myéloïde aigue par le MG-132, un inhibiteur du protéasome, est cytotoxique²⁶⁸. Le bortezomib diminue également la viabilité de cellules primaires de leucémie myéloïde aigue *in vitro* ou dans des modèles murins de leucémie induite^{278, 279}. Enfin, des études cliniques en phase I démontre une amélioration de la survie de patients adultes et âgés atteints de leucémique myéloïde aigue suite au traitement avec le bortezomib^{280, 281}.

En revanche, puisque le protéasome est exprimé de façon ubiquitaire, des effets secondaires ont été détectés chez un grand nombre de patients. Ces effets secondaires incluent des symptômes gastro-intestinaux, de l'anémie, de la thrombocytopenie, de la fatigue excessive et une neuropathie périphérique²⁸². De plus, de la résistance au traitement au bortezomib a été observée avec des mutations dans *PSMB5* en son domaine de liaison au bortezomib ainsi qu'une surexpression de *PSMB5*²⁸³. Afin de contrer ce phénomène de résistance et augmenter l'efficacité chez les tumeurs résistantes au bortezomib, de nouvelles générations d'inhibiteurs du protéasome, tels le Carfilzomib et l'Ixazomib, sont maintenant approuvées pour le l'utilisation en milieu clinique contre le myélome multiple²⁸⁴⁻²⁸⁶. Ces inhibiteurs étant également dirigés à la fois contre le CP et l'IP, il est possible que des effets secondaires soient détectés

chez les futurs patients traités. Des inhibiteurs permettant d'inhiber seulement un type de protéasome pourraient permettre de diminuer la toxicité.

1.4.2.2 Mécanismes de cytotoxicité par les inhibiteurs de l'activité du protéasome

Les mécanismes proposés pour expliquer la cytotoxicité des inhibiteurs du protéasome chez les cellules cancéreuses peuvent être divisés en deux catégories : l'induction d'un stress protéique et l'arrêt de dégradation de suppresseurs de tumeurs²⁷⁴.

Chez les myélomes multiples, l'induction de la cytotoxicité par le bortezomib est bien caractérisée. En effet, ces tumeurs sont particulièrement sensibles à l'inhibition du protéasome puisque ce cancer est dérivé de lymphocytes B activées (plasmocytes). Ces cellules sécrètent de grandes quantités d'immunoglobulines (Ig), tout comme les cellules tumorales. L'inhibition du protéasome entraîne l'accumulation massive d'Ig dans le réticulum endoplasmique et génère une grande quantité de stress du réticulum endoplasmique (Section 1.1.6). Lorsque prolongé, ce type de stress active la voie UPR et peut mener à l'induction d'apoptose²⁸⁷⁻²⁹⁰. De plus, la répression de Xbp1, un médiateur majeur de l'UPR, a été observée chez des myélomes résistants aux inhibiteurs du protéasome²⁹¹.

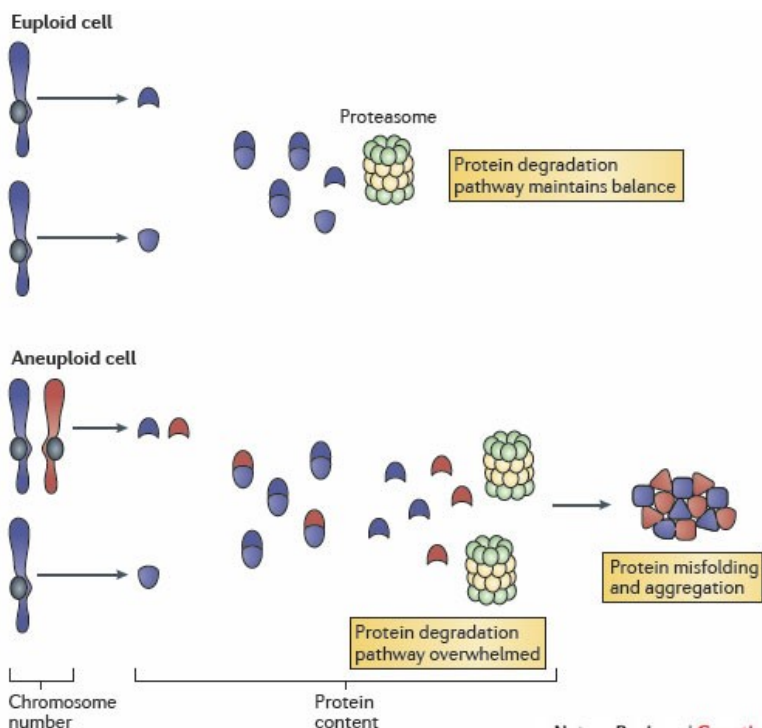


Figure 1.12 L'aneuploïdie et le stress protéique.

Le maintien du nombre de sous-unités de complexes protéiques est contrôlé notamment par le nombre de copies géniques et la dégradation par le protéasome. L'addition de chromosomes, l'aneuploïdie, chez une cellule cancéreuse produit des déséquilibres dans la quantité de protéines et submerge la capacité de dégradation normale du protéasome. Reproduit avec la permission de *Nature Publishing Group* (Gordon D et al²⁹²).

Bien que les autres types de cancers ne sécrètent pas d'Ig, leur sensibilité aux inhibiteurs du protéasome est également dépendante de l'accumulation de protéines mal repliées dans le cytosol et le réticulum endoplasmique. Cette accumulation est causée par deux caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses et fut décrite notamment pour le cancer colorectal. La première est une synthèse protéique excessive nécessaire pour maintenir un métabolisme élevé. La deuxième est la présence d'aneuploïdie, nombre anormal de chromosomes, créant un fort déséquilibre dans la stœchiométrie des transcrits et des protéines²⁹³⁻²⁹⁶. Ces caractéristiques augmentent drastiquement le nombre d'erreurs de traduction, générant des protéines défectueuses mal repliées éliminées par le protéasome. De plus, une expérience chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* montre que la présence d'un extra-chromosome est suffisante pour augmenter la sensibilité aux inhibiteurs du protéasome, puisque cela augmente le nombre de transcrits et provoque un déséquilibre dans la stœchiométrie de complexes mutli-protéiques²⁹⁷ (Figure 1.12).

L'inhibition du protéasome par le bortezomib peut également bloquer la dégradation de suppresseurs de tumeurs. En effet, l'inhibition du protéasome stabilise IκB, le régulateur négatif du complexe Nf-κB, en bloquant sa dégradation. Ceci inhibe l'activation de la voie Nf-κB, impliqué dans la prolifération, la survie et la promotion des métastases^{261, 296, 298-301}. Le bortezomib peut également induire la mort cellulaire et l'arrêt de prolifération cellulaire en stabilisant les niveaux des protéines pro-apoptotiques Bax, Noxa et de p53, en bloquant la dégradation des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p27, mais aussi en bloquant des voies de signalisation liées à la réparation de l'ADN^{262, 296, 302}.

1.5 Objectifs

En plus d'exprimer le protéasome standard (CP), les vertébrés expriment l'immunoprotéasome (IP). Le rôle le mieux décrit pour l'immunoprotéasome est la génération préférentielle d'antigènes pour aider la reconnaissance par le système immunitaire. Cependant, les phénotypes observés récemment chez des cellules génétiquement modifiées et chez des individus avec des mutations montrent que l'IP régule des fonctions immunitaires et non-immunitaires de façon indépendante de la génération d'antigènes CMH-I. Notamment, l'IP est impliqué dans la régulation de la survie et de la fonction de lymphocytes ainsi que la production de cytokines. Des études suggèrent également qu'il peut éliminer préférentiellement les protéines endommagées en réponse au stress chez les cellules non-immunitaires. Néanmoins, les mécanismes moléculaires par lesquels l'IP influence ces processus sont inconnus.

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par des altérations génomiques et métaboliques générant une grande quantité de stress cellulaire. Les constituants cellulaires peuvent être endommagés par ce type de stress, notamment les protéines. Or, le protéasome permet d'éliminer les protéines endommagées. De plus, l'inhibition du protéasome est toxique pour les cellules cancéreuses, puisque des inhibiteurs du protéasome sont utilisés en milieu clinique pour traiter les patients atteints de myélome multiple. Malgré le fait que des études suggèrent que l'IP peut éliminer préférentiellement les protéines endommagées, il existe très peu d'information sur le rôle de l'IP dans la survie des cellules cancéreuses.

1.5.1 Hypothèses et questions de recherche

Le CP et l'IP ont des préférences et des cinétiques d'hydrolyse distinctes, leur donnant le potentiel de contrôler différemment l'élimination des substrats. Donc, ces caractéristiques pourraient mener à des différences dans l'abondance de protéines contrôlant des fonctions cellulaires importantes ainsi qu'à des différences dans la réponse au stress. Tout d'abord, l'IP pourrait affecter l'élimination de régulateurs de transcription, puisque plusieurs fonctions cellulaires affectées par la perte d'IP sont contrôlées au niveau transcriptionnel. Ensuite, l'IP pourrait avoir un rôle important dans la survie des cellules cancéreuses, étant donné qu'il montre

une capacité supérieure dans la réponse au stress. Enfin, l'IP pourrait contrôler ces processus de façon non-redondante avec le CP à cause de ses préférences catalytiques distinctes.

Plus spécifiquement, deux questions principales ont été posées pour tester ces hypothèses:

- Est-ce que l'IP peut réguler l'expression génique?

- Est-ce que l'IP peut influencer la survie des cellules cancéreuses?

1.5.2 Objectif général

L'objectif principal de cette thèse est d'éclaircir et de comprendre les rôles de l'IP qui ne sont pas reliés à la génération d'antigènes associés au CMH-I en situation immunitaire et pathologique.

1.5.3 Objectifs spécifiques

Objectif 1 : Caractériser l'étendue et la complexité de la réponse transcriptionnelle de cellules dendritiques en cours de maturation provenant de souris déficientes en IP (Chapitre 2).

Objectif 2 : Découvrir l'impact de l'IP dans la survie des cellules cancéreuses à partir d'échantillons primaires humains (Chapitre 3).

1.6 Modèles

Pour caractériser l'impact de l'IP sur la réponse transcriptionnelle, nous avons utilisé des cellules dendritiques provenant de souris de type sauvage ou de souris avec une double délétion pour les gènes *Psm8* et *Psm10* codant pour deux des trois sous-unités catalytiques de l'IP (*double knock-out* [dKO]). Ce modèle permet de comparer directement le remplacement de l'IP par le CP, puisque les cellules dendritiques de type sauvage sont composées principalement d'IP tandis que les cellules dKO expriment du CP¹⁴². Cependant, les cellules dendritiques sont peu abondantes chez la souris et forment des groupes hétérogènes. Pour contourner ce problème, nous avons généré une population nombreuse (>20x10⁶ par souris) et homogènes de cellules dendritiques myéloïdes conventionnelles (Cd11b⁺/Cd11c⁺/B220⁻) par la différenciation et l'expansion *in vitro* de précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse en présence de GM-CSF^{142, 303}. Également, le processus de maturation des cellules dendritiques à l'aide d'une endotoxine induit une réponse transcriptionnelle rapide, étendue et synchronisée. De plus, les régulateurs transcriptionnels contrôlant cette réponse sont bien caractérisés³⁰⁴⁻³⁰⁹.

Pour découvrir l'impact de l'IP dans la survie des cellules cancéreuses à partir d'échantillons primaires humains, nous avons utilisé des données disponibles publiquement provenant du projet *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Au début de ce projet, plus de 3 000 échantillons provenant de 13 cancers humains étaient disponibles ainsi qu'un petit nombre d'échantillons primaires de tissus non-cancéreux. L'expression des gènes codant pour l'IP et le CP fut obtenue à partir du transcriptome généré par séquençage de l'ARNm des échantillons (RNA-Seq). De plus, les données cliniques des patients furent utilisées pour comparer la survie de groupes de patients. Enfin, des modèles de culture cellulaire ont permis de tester *in vitro* les hypothèses générées.

CHAPITRE 2

2. Immunoproteasomes shape the transcriptome and regulate the function of dendritic cells

Running title: Immunoproteasomes regulate transcription

Danielle A. de Verteuil^{*,†,‡}, Alexandre Rouette^{*,†,‡}, Marie-Pierre Hardy^{*,†}, Stéphanie Lavallée^{*},
Assya Trofimov^{*}, Étienne Gaucher^{*} and Claude Perreault^{*,†,2}

^{*}Institute for Research in Immunology and Cancer, [†]Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7

[‡]D.A.d.V. and A.R. contributed equally to this work.

²CORRESPONDENCE: Claude Perreault (claude.perreault@umontreal.ca), Institute for Research in Immunology and Cancer, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7. Phone: 514-343-6126; Fax: 514-343-5839

Journal of Immunology, Volume 193 (3), pages 1121-1132, August 1st 2014

2.1 Présentation de l'article #1

Le protéasome (CP) contrôle la majorité des fonctions cellulaires par la dégradation des protéines intracellulaires. En plus d'exprimer le CP, les vertébrés expriment également l'immunoprotéasome (IP) caractérisé par des préférences de dégradation distinctes (Section 1.2). Les nombreux phénotypes observés chez les cellules déficientes en IP ou avec une mutation révèlent que l'IP influence des fonctions immunitaires indépendamment de la génération d'antigènes associés au CMH-I. Or, ces fonctions peuvent être régulées au niveau transcriptionnel (Sections 1.3 et 1.4). Alors que le CP peut réguler la transcription, l'impact de l'IP est inconnu. Néanmoins, des études suggèrent un rôle pour l'IP dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle, puisqu'il peut influencer la production de cytokines et l'activation du régulateur Nf- κ B (Section 1.3).

Les mécanismes permettant au CP d'influencer la transcription sont bien documentés. D'une part, le protéasome peut contrôler l'abondance de régulateurs de transcription en les dégradant en contextes précis. Le protéasome contrôle également la disponibilité de l'ubiquitine intracellulaire. Ainsi, l'activité du protéasome influence la quantité d'ubiquitine présente sur les histones H2A et H2B, des modifications associées respectivement à l'activation et à la répression transcriptionnelle (Section 1.3).

Pour étudier le rôle de l'IP dans la régulation de l'expression génique, nous avons d'abord analysé le transcriptome de cellules dendritiques en cours de maturation et déficientes pour les sous-unités PSMB8 et PSMB10 de l'IP (*double knockout* [dKO]) à l'aide du séquençage d'ARNm nouvelle-génération. Des tests en culture ont ensuite permis de disséquer la régulation de l'abondance des transcrits par l'IP. Puis, nous avons utilisé des outils bio-informatiques pour découvrir les régulateurs transcriptionnels influençant l'expression des transcrits affectés par la perte d'IP ainsi que les fonctions qui leur sont associées. Enfin, la fonction des cellules dendritiques dKO fut évaluée *in vivo* en mesurant l'activation de lymphocytes T CD8⁺.

2.2 Contributions des auteurs

DAdV[‡]: Planification et design expérimental, exécution des expériences, préparation des figures et analyse des résultats (Figures 2.1, 2.2A, 2.3, 2.4, 2.5B, Tableau 2.1 et Figure supplémentaire 2.S1D), écriture du manuscrit

AR[‡]: Planification et design expérimental, exécution des expériences, préparation des figures et analyse des résultats (Figures 2.2B-C, 2.4, 2.5A, 2.6, 2.7A, Tableau 2.2 et Figures supplémentaires 2.S1A-C et 2.S2), écriture du manuscrit

MPH: Exécution et analyse des expériences de cytométrie (Figure 2.7B) et transferts adoptifs (Figure 2.7D-G)

SL: Exécution et analyse des expériences d'abondance de facteurs de transcription (Figure 2.6B-C et Figure supplémentaire 2.S2C)

AT: Discussion générale

EG: Exécution et analyse des expériences d'abondance d'ubH2B (Figure supplémentaire 2.S2B)

CP: Planification et design expérimental, analyse des résultats, discussion générale et écriture du manuscrit

2.3 Abstract

By regulating protein degradation, constitutive proteasomes (CPs) control practically all cellular functions. In addition to CPs, vertebrates express immunoproteasomes (IPs). The major non-redundant role ascribed to IPs is their enhanced ability to generate antigenic peptides. We report that CPs and IPs differentially regulate the expression of more than 8000 transcripts in maturing mouse dendritic cells (DCs) via regulation of signaling pathways such as IRFs, STATs and NF- κ B. IPs regulate the transcription of many mRNAs and maturation of a few of them. Moreover, even when engineered to present optimal amounts of antigenic peptide, IP-deficient DCs are inefficient for *in vivo* T-cell priming. Our study shows that the role of IPs in DCs is not limited to antigen processing and reveals a major non-redundant role for IPs in transcription regulation. The dramatic effect of IPs on the transcriptional landscape could explain the various immune and non-immune phenotypes observed in vertebrates with IP-deficiency or -mutations.

2.4 Introduction

In all eukaryotes, proteolysis of a variety of cellular proteins by constitutive proteasomes (CPs)³ plays an important role in many basic cellular processes including regulation of cell cycle and division, differentiation and development, morphogenesis and response to stress¹. Vertebrates also express immunoproteasomes (IPs), in which the catalytic β -subunits are replaced by interferon- γ -inducible homologues: LMP2 (aka β 1i, *Psmb9*) for β 1 (*Psmb6*), MECL1 (aka β 2i, *Psmb10*) for β 2 (*Psmb7*), and LMP7 (aka β 5i, *Psmb8*) for β 5 (*Psmb5*). The best described non-redundant role ascribed to IPs is their enhanced ability to generate MHC I-associated peptides (MIPs)²⁻⁵.

As regulators of protein degradation, proteasomes regulate practically all cellular functions^{1, 6, 7}. It is therefore logical to assume that replacement of CPs by IPs could have pleiotropic and far reaching effects on cell function^{8, 9}. In line with this, deletion or inhibition of IP subunits can affect several immune cell functions independently of MIP processing: T-cell proliferation, B-cell survival and cytokine production^{10, 11}. Moreover, the expression of IPs in numerous non-immune cells from non-inflamed tissues suggests that the roles of IPs are not limited to the immune system. Thus, IPs have been implicated in adipocyte differentiation¹², maintenance of pluripotency in embryonic stem cells¹³, response to injury in the retina and brain¹⁴ and neoplastic transformation¹⁵. However, the mechanisms responsible for the various phenotypes observed in vertebrates with IP-deficiency or -mutations remain elusive.

The proteolytic subunits of CPs are known to regulate gene expression, typically via cleavage of transcriptional regulators¹⁶. Since CPs and IPs display distinct substrate preferences^{4, 17}, we hypothesized that they might have non-redundant effects on gene expression. This assumption was supported by preliminary gene expression microarray experiments showing that several transcripts are differentially expressed in wild-type (WT) and IP-deficient dendritic cells (DCs)⁴. The goal of our work was therefore to evaluate the global impact of IPs on gene expression, discover its underlying mechanisms and evaluate its *in vivo* relevance.

Based on multidimensional profiling of WT and *Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}* (double knockout [dKO]) DCs, we report that IPs regulate the expression of more than 8,000 transcripts in maturing DCs. The broad impact of IPs on gene expression is cell-autonomous, mediated mainly at the transcriptional level, and likely involves major signaling pathways including IRFs, NF- κ B and STATs. Furthermore, even when engineered to present similar levels of a model epitope, dKO DCs were less effective than WT DCs in priming T cells *in vivo*. We conclude that IPs have pervasive effects on gene transcription and may thereby regulate fundamental cellular processes in DCs.

2.5 Materials and Methods

2.5.1 Mice and DC culture

Mice on a C57BL/6 or B6.SJL background were housed at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) animal facility. *Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}* (dKO) and *Mecl1^{-/-}* mice were generously provided by Dr T.A. Griffin from the Medicine College of the University of Cincinnati, and *Lmp7^{-/-}* mice by Dr H.J. Fehling from the Institute of immunology, University Clinics Ulm. OT-1 on a *Rag2^{-/-}* background mice were purchased from Taconic Farms. All protocols using animals were conform to the local law and regulations and have been approved by Université de Montréal's Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux. Bone marrow-derived DCs were generated from 8-12 week old mice, and maturation was induced with LPS (Sigma-Aldrich), as described⁴. For co-culture experiment of B6.SJL WT and C57BL/6 BMDCs, sorting was performed on DCs stimulated overnight with LPS. Harvested cells were treated for 20 min with Fc Block CD16/CD32 (BD Bioscience) before staining with anti-CD11c (PECy7; BD Bioscience), anti-CD86 (APC; BioLegend), anti-CD45.1 (APCCy7; BD Bioscience) and anti-CD45.2 (FITC; BD Bioscience). Cells were sorted for CD11c⁺CD86⁺CD45.1⁺ (WT) or CD11c⁺CD86⁺CD45.2⁺ (dKO) profiles on a FACSAria Cell Sorter (BD Bioscience).

2.5.2 RT-PCR and transcript stability assays

Total RNA was extracted from cells with TRIzol RNA reagent (Life Technologies) as instructed by the manufacturer. For mRNA maturation assays, samples were further purified using DNase I (QIAGEN). Retro-transcription was performed as described by the manufacturer, and quantitative PCRs were performed using the Taqman technology with an ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems). Results were analysed with the SDS 2.2.2 software (Applied Biosystems). Primers' sequences are available in Supplemental Table 2.S1. For transcript stability assays, mature DCs were treated for 1h, 3h, 6h or 12h with 5ug/mL actinomycin D (Sigma-Aldrich) or left untreated prior to harvest, extensive washes and RNA extraction. Student's T-test was used to compare means.

2.5.3 RNA-sequencing

RNA was extracted from 4 experimental replicates of WT and dKO DCs stimulated for 0h, 1h, 2h or 6h with LPS. Total RNA was isolated from 5×10^6 cells per sample with TRIzolTM RNA reagent (Life Technologies) as recommended by the manufacturer. RNA extracted samples were treated with DNase I and purified using RNeasy Mini kit (QIAGEN). Sample quality was assessed using the 2100 Bioanalyzer RNA Nano chips (Agilent Technologies). Transcriptome libraries were generated from 4 ug total RNA using the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) following the manufacturer's protocols. Paired-end (2 x 100 bp) sequencing was performed using an Illumina HiSeq2000 sequencer running TruSeq SBS v3 chemistry as previously described¹⁸. Cluster density was targeted at around 600-800k clusters/mm². 16 transcriptomes were sequenced per lane. Sequence data was mapped to the mouse reference genome (mm9) using the Casava 1.8.1 and the Eland v2e mapping softwares (Illumina) by IRIC's bioinformatics platform. Reads were filtered for quality (Q30) and known contaminants. Reads that mapped two or more locations were discarded. Resulting mapped reads amounted to an average coverage of 29X of the annotated mouse transcriptome. RNA-sequencing data have been submitted to the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE52616.

2.5.4 Differential gene expression analyses

Differential gene expression was determined using R v3.0.1 software (<http://www.r-project.org/>) with the DESeq package¹⁹. Comparisons were made between WT and dKO conditions at each time point of LPS stimulation or between untreated and LPS-stimulated cells for WT and dKO independently. Significance was achieved when the p-value adjusted for multiple testing (Benjamini-Hochberg) was <0.1. An independent filtering step, that removed about 40% of genes from the lowest quantile for overall sum of counts for all conditions, was included to increase detection power by the multiple testing algorithm. Genes removed through filtering were found not to achieve statistical significance, thus this step reduced the severity of the multiple testing adjustment without removing important DEGs.

The list of all 8,104 genes that showed significant differential expression between WT and dKO at any time point were analysed with MeV (<http://www.tm4.org/mev.html>) for clustering analyses of their kinetic of differential expression. A figure of merit for k-means clustering was calculated for a range of 1 to 40 clusters with our dataset to assess the predictive power of the k-means algorithm (data not shown). Thus, we determined an optimal range between 11 and 17 clusters. K-means clustering was performed (Pearson correlation algorithm with a maximum of 50 iterations) for these numbers of clusters successively and each cluster was represented as a hierarchical tree (Pearson correlation with average linkage clustering). We found that 15 clusters were necessary to adequately separate all groups of genes with similar kinetics, and that adding more clusters did not improve significantly clustering quality.

2.5.5 Functional analyses of differentially expressed genes (DEGs)

DEGs from cluster 1 to 15 were uploaded into the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>) and upstream regulator analysis was performed from which we extracted the most drastically affected molecules described as “transcriptional regulators” ($p < 0.05$ with right-tailed Fisher's exact test). The IPA's z-score algorithm was used to predict the direction of change for a given regulator [increase ($z\text{-score} \geq 2$) or decrease ($z\text{-score} \leq -2$)] depending on the dKO/WT ratio of expression of its target genes within a cluster, for each time point (no LPS, 1h, 2h and 6h LPS). For each cluster, a map was generated with any given regulator that had a p-value ≤ 0.05 and a z-score ≥ 2 or ≤ -2 at one of the timepoints. Regulators passing these two thresholds were highlighted. A gene ontology over-representation analysis (ORA) was performed with InnateDB²⁰ and lists of enriched biological processes were extracted (with adjusted p-values for multiple testing [Benjamini-Hochberg algorithm] < 0.05).

2.5.6 Correlation between mRNA \log_2 ratio and predicted activity

A correlation coefficient calculation was performed between the \log_2 ratio of mRNA differential expression and z-score of predicted activity of each regulator for all timepoints of LPS stimulation. For regulators present in more than one cluster, a correlation coefficient was

calculated between the \log_2 ratio of expression and all combinations of z-score values found in the different clusters. A strong correlation was defined as ≥ 0.5

2.5.7 Chromatin immunoprecipitation

Immature DCs (no LPS stimulation) were crosslinked 10 min with 1% formaldehyde, then quenched 5 min with 1.25 M glycine. Crosslinked samples were resuspended with cell lysis buffer (5 mM Pipes pH 8, 85 mM KCl, 0.5% NP40 with protease inhibitors). After 10 min on ice, samples were pelleted and resuspended with nuclei lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS) for another 10 min. Sonication was performed with a Bioruptor water sonicator (Diagenode) at 4°C (20 times 30s ON/OFF, setup high). Samples were centrifuged, supernatant transferred into a new tube and 1/20 of samples kept as inputs. The remaining of the samples was diluted two times with dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton-X100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris pH 8, 167 mM NaCl). Anti-histone 2B (H2B) (Abcam) or anti-ubiquitylated H2B (ubH2B) (Millipore) antibodies were added for an overnight incubation at 4°C. PBS/BSA-washed magnetic Dynabeads Protein G (Life Technologies) was added for additional 4h. Samples were centrifuged, resuspended in dialysis buffer (2 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, 0.2% sarkosyl), and washed twice with dialysis buffer and 4 times with wash buffer (100 mM Tris pH 9, 500 mM LiCl, 1% NP40, 1% sodium-deoxycholate). Samples were eluted with freshly prepared elution buffer (1% SDS, 50 mM NaHCO_3) for 10 min at 65°C followed by 15 min of medium vortexing at room temperature. After centrifugation, elution steps were repeated once and pooled samples as well as inputs were supplemented with 0.2 M NaCl and reverse-crosslinked overnight at 65°C. Samples were precipitated with ice-cold ethanol, resuspended in TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), supplemented with 1 mg/mL RNase A for 30 min at 37°C and then with proteinase K buffer and 20 mg/mL proteinase K for 2h at 45°C.

2.5.8 Microscopy

DCs were stimulated or not overnight with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS to induce maturation. As negative control, one Petri dish was further supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MG-132 (Calbiochem) for 2h. Cells were then harvested, washed with fresh media and plated onto 35 mm glass bottom dishes (MatTek) with RPMI 1640 media without phenol red (Life Technologies), supplemented

with 25mM HEPES (Life Technologies). Cells were incubated for 2h with 200mM proteasome-bodipy fluorescent probe (generously provided by Dr Huib Ovaa from the Netherlands Cancer Institute), or without compound for the unstained control. We found the proteasome-specific probe to be more reliable than antibodies because it allowed us to have a reliable negative control: this consisted of a 2h-treatment with MG132, an unlabeled proteasome inhibitor, to block catalytically active sites prior to incubation with the proteasome-bodipy fluorescent probe. After washes, cells were stained for 45min with Hoechst, further washed and visualized by fluorescence microscopy. Imaging was performed on a Delta Vision Personal widefield microscopy system (Applied Precision / GE Healthcare) consisting of an Olympus inverted IX71 fluorescence microscope equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) and a controlled environmental chamber. Cells were imaged at 37°C with a 60X PlanApo oil immersion objective (Olympus, NA 1.42), using DAPI and FITC filter sets (center/bandwidth in nm, DAPI excitation 360/40, emission 455/50; FITC excitation 490/20 emission 525/36) for Hoechst and Bodipy staining, respectively. Stacks of fluorescence images were acquired using Softworx software at 1x1 binning with 1 μ m optical spacing (total 17 μ m thickness), with a reference brightfield image taken at mid-section. Image processing for visualization purposes, consisting of linear contrast adjustment, maximum intensity projection, and multi-channel overlays, was carried out in ImageJ (NIH).

2.5.9 Immunoblot analyses

DCs whole cell lysates were prepared and immunoblotted as previously described⁴. Antibodies against H2A, H2B and IRF7 were purchased from Abcam, calnexin and β -actin from Sigma-Aldrich, ubH2B from Millipore and the rest from Cell Signaling. To detect ubiquitylated proteins, cells were lysed in 20 mM TRIS-HCl, pH7.5, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 10 μ M MG-132 (Calbiochem), 10 mM NEM (Sigma) and a protease inhibitor cocktail (*Complete*; Roche), as described²¹. Immunoblot was performed with anti-Ubiquitin from Santa Cruz and with anti-poly-Ub (FK1 clone) from Enzo Life Sciences. Student's T-test was used to compare means.

2.5.10 Native gel immunoblotting

Sample preparation for native gel immunoblotting was performed as described²². Then, 30 μ g of dialyzed DC lysate was supplemented with 0.05% of NativePAGE™ G-250 sample additive, then run on a 3-12% NativePAGE™ Bis-Tris gel (Life Technologies) in NativePAGE™ running buffer (Life Technologies) at 4 °C for 15 min at 100 V and then increased to 180 V for 4 h. Cathode buffer was supplemented with 0.02% (for the first 15 min of run) or 0.002% (for the last 4 h of run) of Coomassie G-250. For immunoblot with anti-LMP2, gels were briefly boiled in SDS-PAGE Laemmli 1x buffer. Proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride, blocked in 5% milk/TBS and immunoblot analysis was performed with anti-PSMA3 (Cell Signaling), anti-PSMD4 (Cell Signaling) or anti-LMP2 (Abcam).

2.5.11 Adoptive transfer, immunization and evaluation of OT-1 T-cell response

CD8⁺ T cells from female OT-1 (CD45.2⁺) mice were CFSE labeled (Molecular Probes, see manufacturer's instructions) as previously described²³, and 10⁶ labelled cells were injected i.v. into female B6.SJL (CD45.1⁺) mice. 24 h later, recipients were immunized i.v. with 1x10⁶ male WT or dKO DCs stimulated overnight with LPS and pulsed with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (2 μ M)²⁴. Levels of K^b/SIINFEKL at the surface of DCs were monitored by flow cytometry using a PE-conjugated anti-K^b/SIINFEKL antibody (eBioscience). 3 and 5 days (or 45 days for the no recall control) following immunization, spleens were harvested and T cell response was analyzed by flow cytometry. Alternatively, a second immunization with WT or dKO DCs was performed at day 30, and spleens were harvested on day 32 (day 2 post-recall). For Annexin V staining (measurement of apoptosis), splenocytes were incubated with 5 μ l of Alexa Fluor 350 annexin V (Life technologies) in 100 μ l of annexin binding buffer for 15 min at room temperature. After 10 min, 1.25 μ g/ml 7-AAD was added. OT-1 T cells were identified using anti-CD8a (PECy7, BD Bioscience) and anti-CD45.2 (PE, BD Bioscience). Flow cytometry analyses were done on a BD LSR II flow cytometer using FACSDiva (BD Bioscience) and FCS v.3.0 (De Novo Software) softwares. In order to calculate the frequency of responding OT-1 T cells, division peaks (as determined by CFSE-intensity) were labeled from 0 to *n*. Making use

of the experimentally determined number of events under each CFSE fluorescence peak, the absolute and the relative frequency of OT-1 precursors that responded to SIINFEKL-pulsed DCs was calculated as previously described^{25,26} : the sum of the extrapolated responding precursors for division cycles from 1 to n allowed us to determine the relative or the absolute size of the precursor sample pool which responded.

2.6 Results

2.6.1 The effect of IPs on gene expression is cell-autonomous

We generated DCs by culturing bone marrow in the presence of granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF)⁴, which gives rise to a largely homogenous population of CD11c⁺CD11b⁺B220⁻ conventional DCs (cDCs)²⁷. In previous microarray experiments, we identified 226 transcripts that were differentially expressed in WT vs. dKO DCs⁴. This differential expression was cell-autonomous since it persisted whether DCs derived from WT and dKO bone marrow cells were cultured separately or together (Figure 2.1A). Furthermore, RT-PCR analyses at different timepoints of DC culture revealed two major differential expression patterns between WT and dKO cells. A first group of genes was already differentially expressed in bone marrow precursors, and remained as such throughout DC differentiation and maturation (Figure 2.1B left, all genes differed significantly between WT and dKO at all timepoints).

The second group consisted of genes that were affected only in mature DCs (*Bmp2k*, $p < 0.05$ at $t = 9$ days) or in both immature and mature DCs (*C1qb* and *Snf1lk* with $p < 0.05$ at days 8-9) (Figure 2.1B, right). These results show that transcriptomic variations linked to IPs can be differentiation stage-dependent.

2.6.2 Relationship between proteasome subunits and differential gene expression

IP subunits are cooperatively incorporated into nascent proteasomes, and the inclusion of catalytic subunit LMP2 is facilitated by the incorporation of LMP7 and MECL1²⁸. Accordingly, we detected only low levels of LMP2/ β 2/ β 5 mixed proteasomes in dKO DCs (supplemental Figure 2.1A), which thus contained mainly CPs. RT-PCR experiments on DCs isolated from WT, *Lmp7*^{-/-}, *Mecl1*^{-/-} and dKO mice (Figure 2.2A) further showed that for the majority of genes tested (11 out of 13), the absence of both LMP7 and MECL1 was required to affect gene expression.

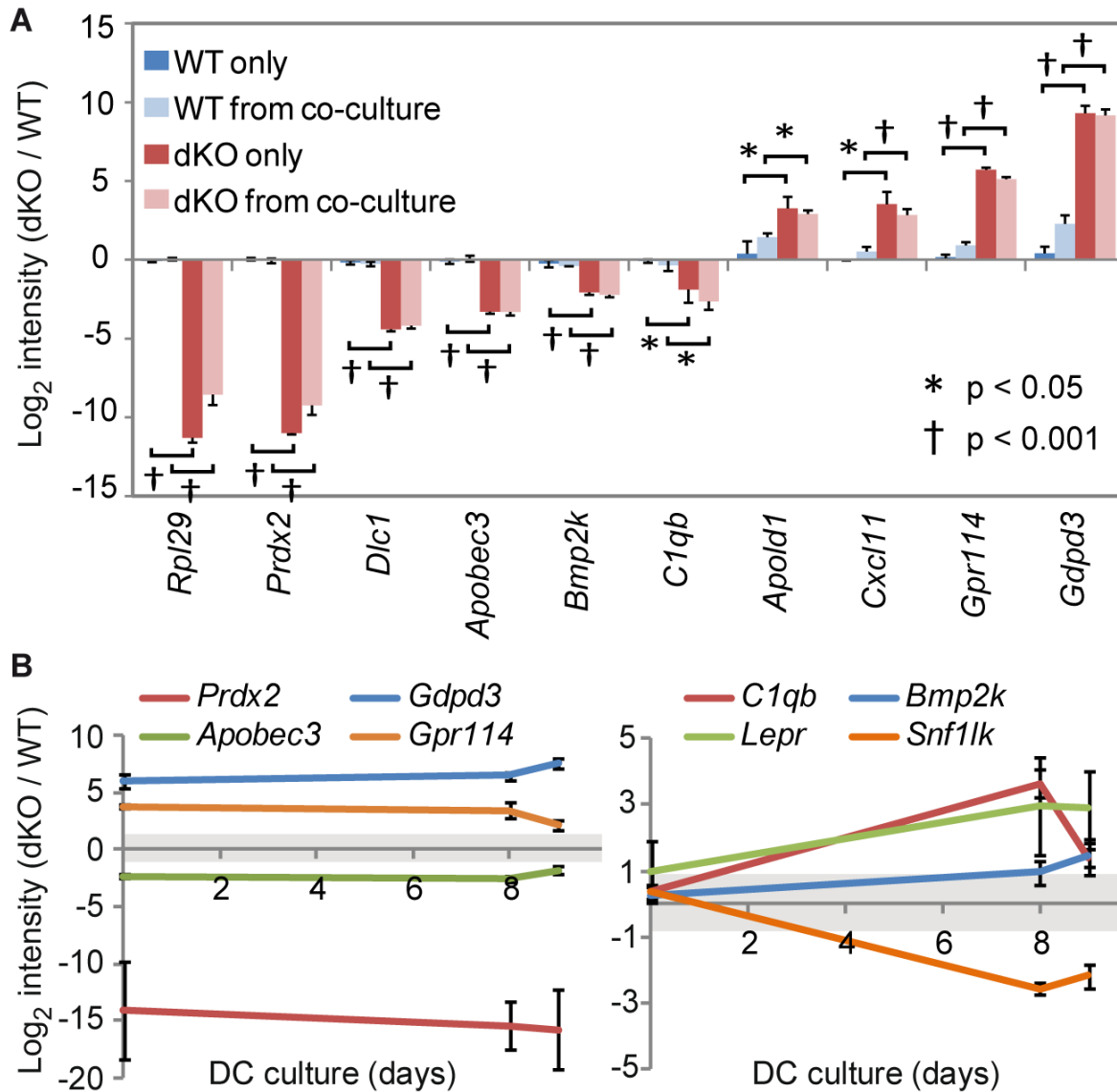


Figure 2.1 Gene expression changes are cell autonomous.

(A) Quantitative RT-PCR experiments were performed on WT and dKO DCs cultured either together or in separate Petri dishes. After overnight stimulation with LPS, cells were harvested and sorted according to their CD45.1 (WT) or CD45.2 (dKO) phenotype. (B) WT and dKO cells were harvested on days 0 (bone marrow cells), 8 (immature DCs), and 9 (overnight LPS-matured DCs) of culture and lysed for RNA extraction and RT-PCR experiments. Left panel, Genes differentially expressed in both bone marrow cells and DCs. Right panel, Genes differentially expressed in immature and/or mature DCs. Data are represented as mean \pm SD of three experimental replicates.

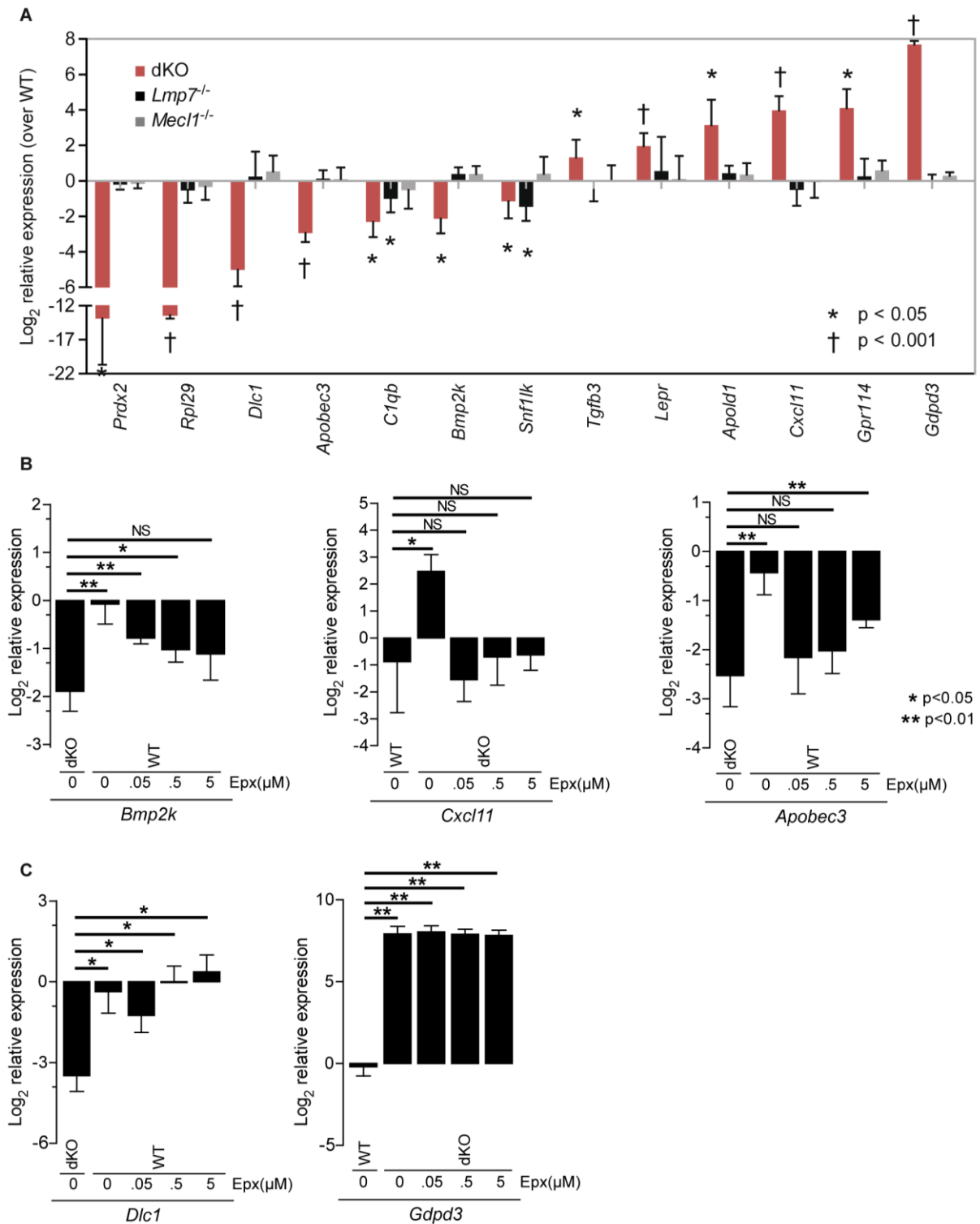


Figure 2.2 Relationship between proteasomes and differential gene expression.

(A) RT-PCR experiments were performed on WT, *Lmp7*^{-/-}, *Mecl1*^{-/-}, and dKO DCs stimulated overnight with LPS. Data are represented as mean ± SD of three to seven experimental replicates.

(B and C) RT-PCR experiments were performed on WT and dKO DCs pretreated for 2 h with graded concentrations of epoxomicin and then stimulated for 6 h with LPS. Data are represented as mean \pm SD of three experimental replicates. See also Supplemental Figure 2.1. Epx, epoxomicin.

A 2h pre-treatment with the selective and potent inhibitor of both CPs and IPs epoxomicin before LPS-stimulation eliminated differential expression of *Bmp2k*, *Cxcl11* and *Apobec3* in WT vs. dKO DCs (Figure 2.2B), but not of *Dlc1* and *Gdgd3* (Figure 2.2C). We therefore conclude that differential expression of some but not all genes is tightly linked to proteasomal degradation. Of note, proteasome inhibition can negatively affect transcription via endoplasmic reticulum stress induction. However, this was not the case in our experimental conditions: mRNA level of *Bip*, a marker of endoplasmic reticulum stress²⁹, was not increased in epoxomicin-treated compared to control DCs (supplemental Figure 2.1C).

Quantitation of proteasome levels using non-denaturing gel analysis of PSMA3, a 20S core subunit present in both IPs and CPs, and PSMD4, a 19S regulatory subunit, showed that WT and dKO DCs contained similar amounts of 20S and 26S proteasomes (supplemental Figure 2.1B). Furthermore, probing active proteasomes by fluorescence microscopy, using a catalytic inhibitor coupled to a fluorochrome, revealed that CPs and IPs presented similar distribution profiles (supplemental Figure 2.1D). Therefore, although differences in gene expression between WT and dKO DCs are at least partly linked to proteasomal activity, these cannot be ascribed to differences in the total abundance or localization of proteasomes and are likely due to differences in proteasome composition.

2.6.3 IPs do not affect mRNA stability and have a minimal influence on mRNA maturation

Because factors involved in both mRNA stability and splicing are regulated by ubiquitylation and proteasomal degradation³⁰⁻³², we wished to compare the stability of transcripts overexpressed in WT or in dKO DCs following treatment with actinomycin D (Figure 2.3A,B). We found that transcript half-lives were similar between WT and dKO DCs, showing that IPs have no impact on mRNA stability. To examine the effect on mRNA maturation, we compared by RT-PCR the level of both spliced (mature) and unspliced

(unprocessed) transcripts derived from differentially expressed genes (Figure 2.3C), using primer pairs spanning exon-exon junctions, or primer pairs within introns or spanning exon-intron junctions³³. For *Rpl29* and *Hebp1*, IP-deficiency respectively decreased or increased mature mRNA abundance but had no impact on the unprocessed transcripts (Figure 2.3C, right). However, for 14/16 transcripts (87%), absence of IP-subunits resulted in parallel upregulation or downregulation of both mature and unprocessed mRNAs (Figure 2.3C, left). Overall, these results strongly suggest that differences in transcripts abundance between WT and dKO DCs i) do not involve variations in mRNA stability, ii) result from differential interactions with the pre-mRNA splicing and maturation machinery in a few cases (~13%), and iii) must therefore be regulated at the level of mRNA synthesis in most cases (~87%).

2.6.4 IPs have a broad impact on the transcriptional program of maturing DCs

To evaluate the overall impact of IPs on the transcriptional program and the biology of DCs, RNA-sequencing analyses were performed at different timepoints of LPS-induced DC maturation (0, 1, 2, 6h). By comparing the transcriptome of WT and dKO DCs at each timepoint, we found a total of 8,104 differentially expressed genes (DEGs, Figure 2.4A). Out of these, 19% (1,570) were affected at all stages of maturation, 38% (3,107) were altered at only one specific timepoint, and 43% were affected at 2-3 timepoints (Figure 2.4A). IPs had a greater impact on mature than on immature DCs (Figure 2.4A,B) and, strikingly, 64.7% of all the genes affected by LPS in WT cells were differentially expressed in WT vs. dKO DCs (7,419 out of the 11,455 DEGs affected after 1h, 2h or 6h of LPS, data not shown). We conclude that 1) the impact of IPs on the transcriptome is highly dependent on the maturation state of DCs, and that 2) a great proportion of genes modulated by LPS are regulated by IPs. Because we did not perform co-culture experiments between WT and dKO DCs (as in Figure 2.1), we could not formally assess whether some variations in the transcriptional landscape were due to autocrine or paracrine secretion of cytokines.

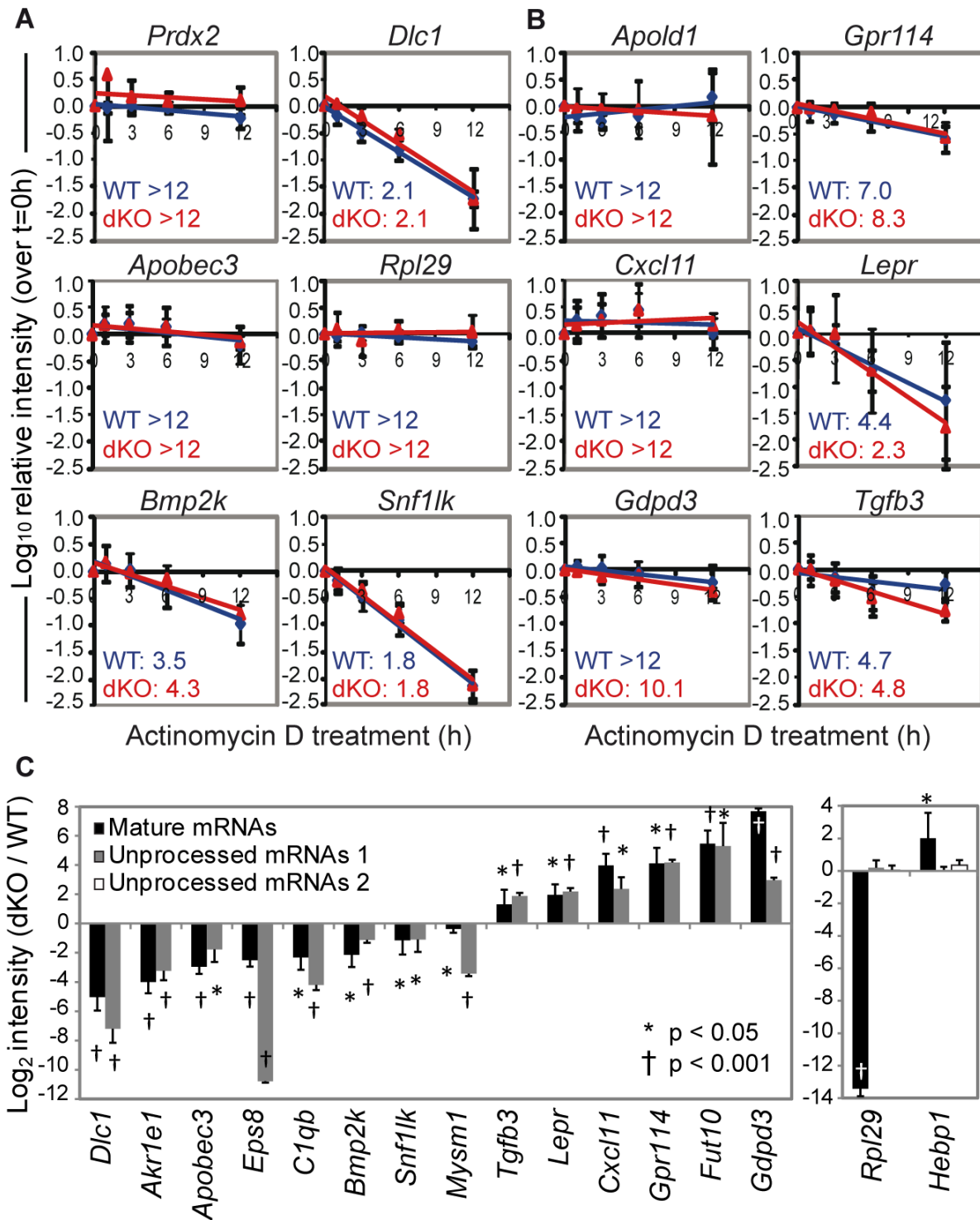


Figure 2.3 IPs do not globally affect mRNA stability or maturation.

Quantitative RT-PCR experiments were performed following actinomycin D treatment. Mean mRNA $t_{1/2}$ (indicated in each graph) was calculated in WT (blue) and dKO (red) DCs for transcripts

previously showed to be overexpressed (A) or downregulated (B) in WT compared with dKO DCs. Data are represented as mean \pm SD of three to seven experimental replicates. (C) RT-PCR experiments were performed on DNase-treated RNA samples from WT and dKO DCs with primers designed to target exon–exon junctions (mature mRNAs) or primers either spanning exon–intron junctions or within introns (unprocessed mRNAs). Data are represented as mean \pm SD of three to seven experimental replicates.

Given the complexity of gene expression variations we stratified our analyses by focusing on groups of genes that had similar kinetics of differential expression over time. The total 8,104 DEGs were unbiasedly separated into different groups, using the k-means clustering algorithm, as a function of their dKO/WT fold change at each timepoint (Figure 2.4C). We found 15 different kinetic patterns, each including from 205 to 1278 genes. Different groups of DEGs were affected at early (1h LPS, clusters 4 and 12), intermediate (2h LPS, clusters 3 and 11) or late timepoints (6h LPS, clusters 1 and 10), and others were modulated at more than one timepoint. The complexity of the transcriptional cascade regulated by IPs and the emergence of discrete gene clusters at various timepoints suggest that IPs may control transcription through distinct mechanisms at different stages of DC maturation. We surmised that such broad transcriptomic variations could result from two non-mutually exclusive mechanisms: variations in histone ubiquitylation and proteolysis of transcription factors.

2.6.5 Variations in histone monoubiquitylation cannot explain the impact of IPs on the transcriptome

The amount of free ubiquitin in cells is very small. Therefore, upon activation of the ubiquitin-proteasome system, the ubiquitin supply is largely obtained from ubiquitylated histones³⁴. Hence, we speculated that widespread changes in the pool of ubiquitylated histones, which affects transcriptional activity¹⁶, might explain the broad impact of IPs on the transcriptome. While no differences were observed in total levels of ubH2A or total ubiquitylated proteins at any stage of DC maturation, dKO immature DCs contained more ubH2B than WT DCs (Figure 2.5A and supplemental Figure 2.2A). This discrepancy disappeared after LPS treatment. Nonetheless, in immature cells, following chromatin immunoprecipitation of ubH2B and quantitative PCR amplification of coding regions of a

subset of DEGs, we observed no differences in ubH2B enrichment between WT and dKO DCs (Figure 2.5B). In line with this, while unstimulated *Lmp7*^{-/-} DCs contained increased amounts of ubH2B (supplemental Figure 2.2B), they did not show changes in gene expression relative to WT DCs (Figure 2.2A). We conclude that increased levels of ubH2B was not responsible for discrepancies in the transcriptomic profile of WT vs. dKO DCs.

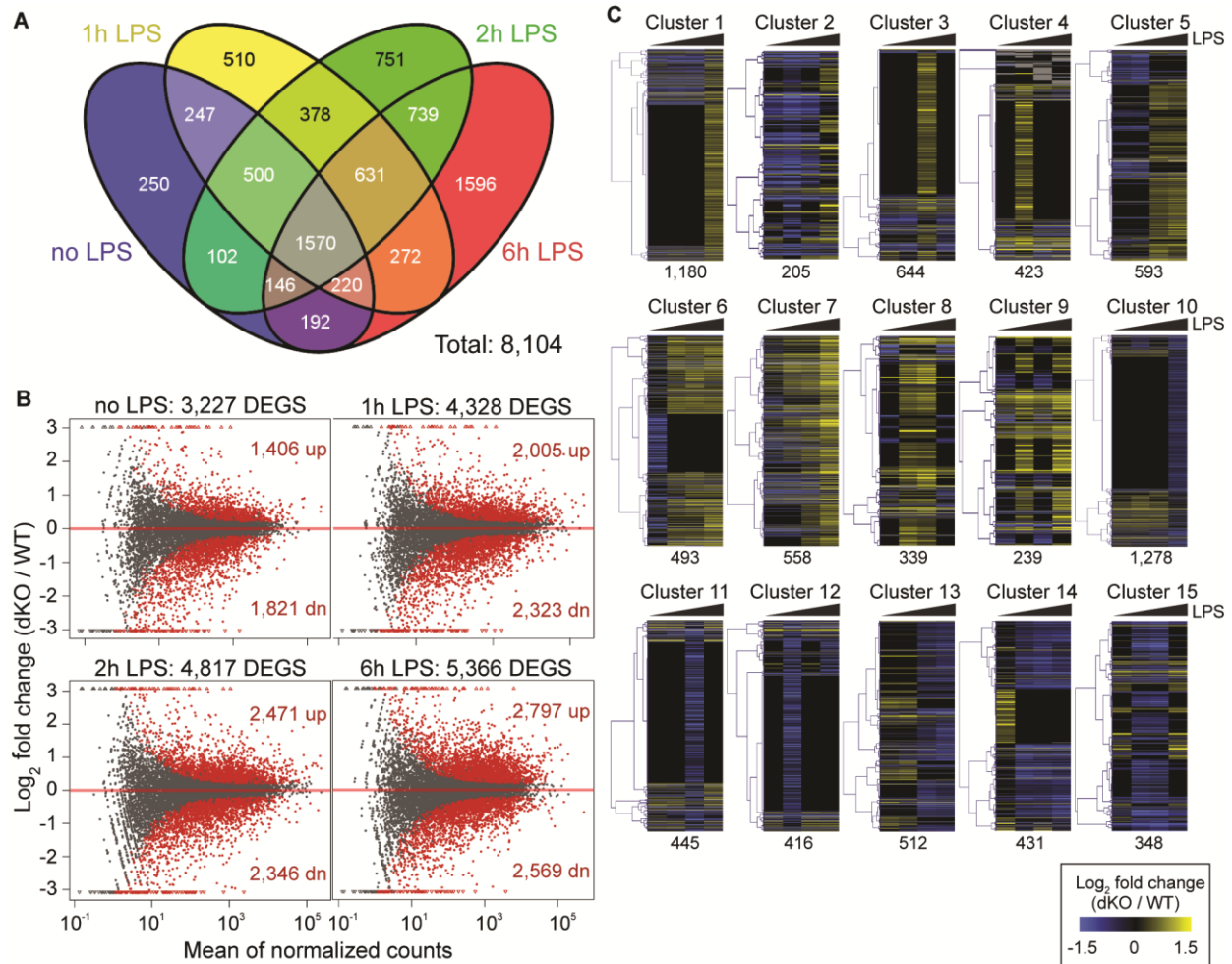


Figure 2.4 IPs have a broad impact on the transcriptional program of maturing DCs.

(A) Venn diagram showing the 8104 DEGs in RNA-sequencing experiments. (B) Differential expression of genes between WT and dKO DCs untreated or stimulated with LPS for 1, 2, or 6 h. Red dots represent DEGs with a significant adjusted p value ($p < 0.1$, Benjamini-Hochberg algorithm). (C) All 8104 DEGs were clustered into 15 different groups as a function of their expression pattern using k-means clustering. Each heat map represents one cluster with color-coded fold changes at each time point of LPS stimulation, with the number of genes included written underneath. Based on RNA-sequencing data submitted to the Gene Expression Omnibus database under accession number GSE52616.

2.6.6 STAT, IRF and NF- κ B signaling pathways are perturbed in IP-deficient DCs

Using the Upstream Regulator prediction tool from the IPA software, we sought to identify putative regulators of transcription that would be specifically targeted by IPs. Since genes following similar kinetics of differential expression are expected to be regulated by shared transcriptional regulators, we analyzed DEGs partitioned into k-means clusters (Figure 2.4C). For each cluster, a map was generated including every transcriptional regulator that had a z-score ≥ 2 or ≤ -2 (activity predicted to be respectively increased or decreased in dKO), and significant enrichment ($p \leq 0.05$), for at least one of the timepoints (Figure 2.6A). A total of 155 regulators were identified, of which 88 were non-redundant: 53 were predicted to be differentially active (i.e. to target DEGs) in a single cluster and 35 were predicted to be differentially active in ≥ 2 clusters. These included STAT1, Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7), IRF1 and STAT4. Protein-protein interaction analysis using STRING³⁵ also showed that members of the IRF and STAT families formed nodes of strong connectivity within regulator-rich clusters 1, 6 and 7 (data not shown), placing them as likely master regulators differentially affected by CPs and IPs.

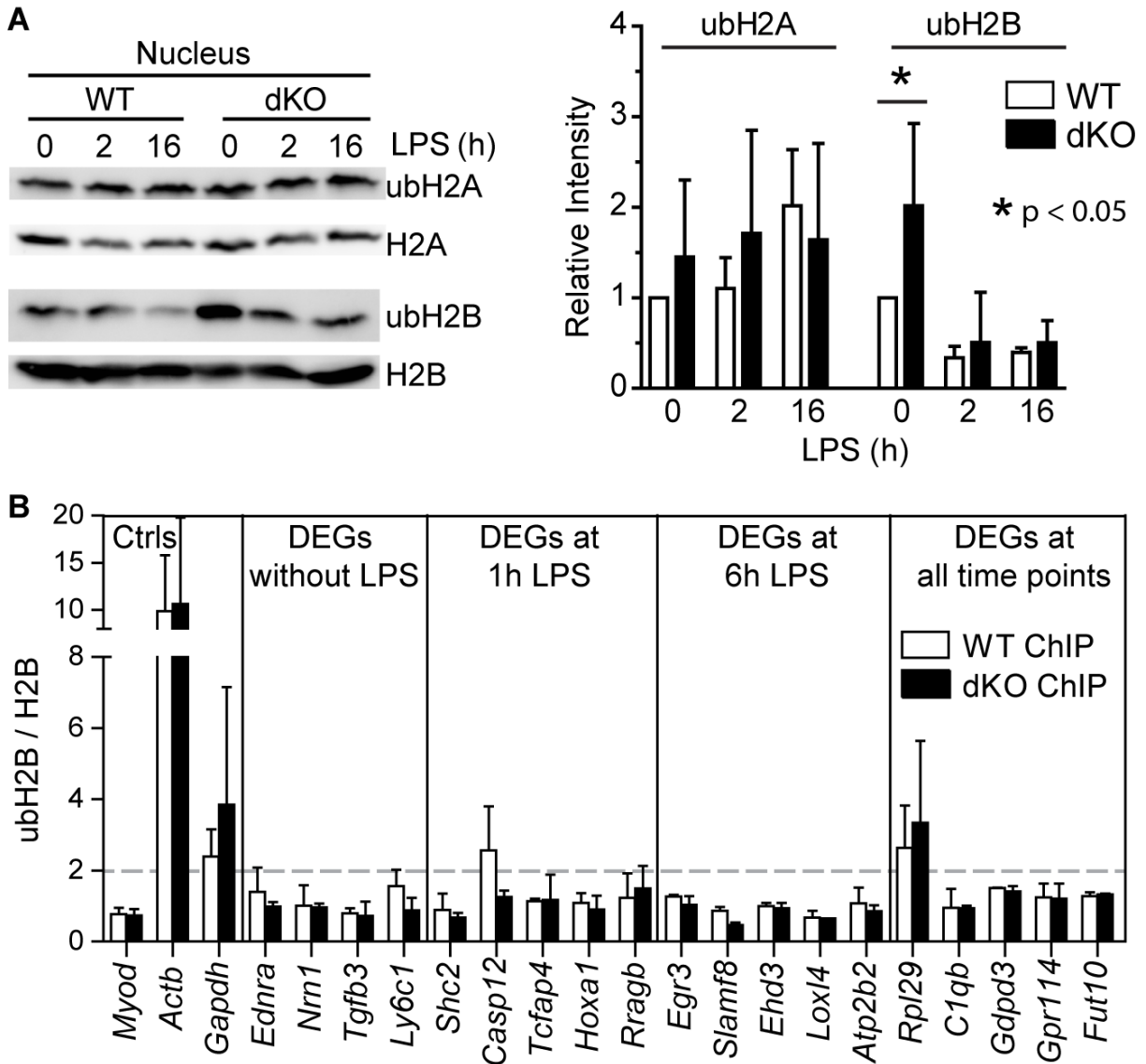


Figure 2.5 The broad gene expression changes cannot be explained by variations in histone monoubiquitylation.

(A) Nuclear extracts were prepared from WT and dKO DCs stimulated for the indicated time duration with LPS and immunoblotted with Abs against total or monoubiquitylated H2A or H2B. Histograms represent the mean \pm SD of five experimental replicates. (B) Chromatin immunoprecipitations (ChIP) were performed using an anti-ubH2B Ab in WT and dKO immature (LPS-unstimulated) DCs. Precipitated DNA was subjected to quantitative PCR analysis with primers targeting genes found differentially expressed at indicated time points. A parallel reaction was performed with anti-H2B for normalization. Data are represented as mean \pm SD of two experimental replicates. See also Supplemental Figure 2.2A and 2B. Ctrl, controls.

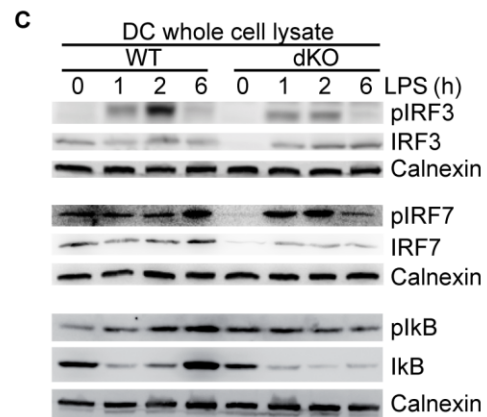
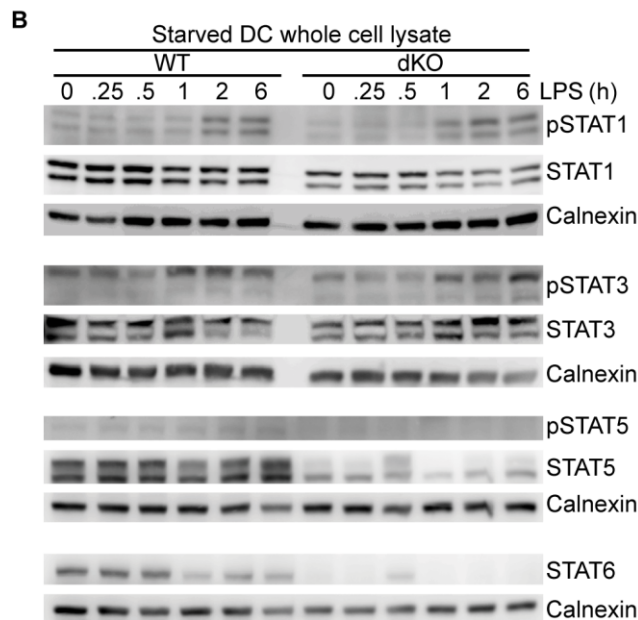
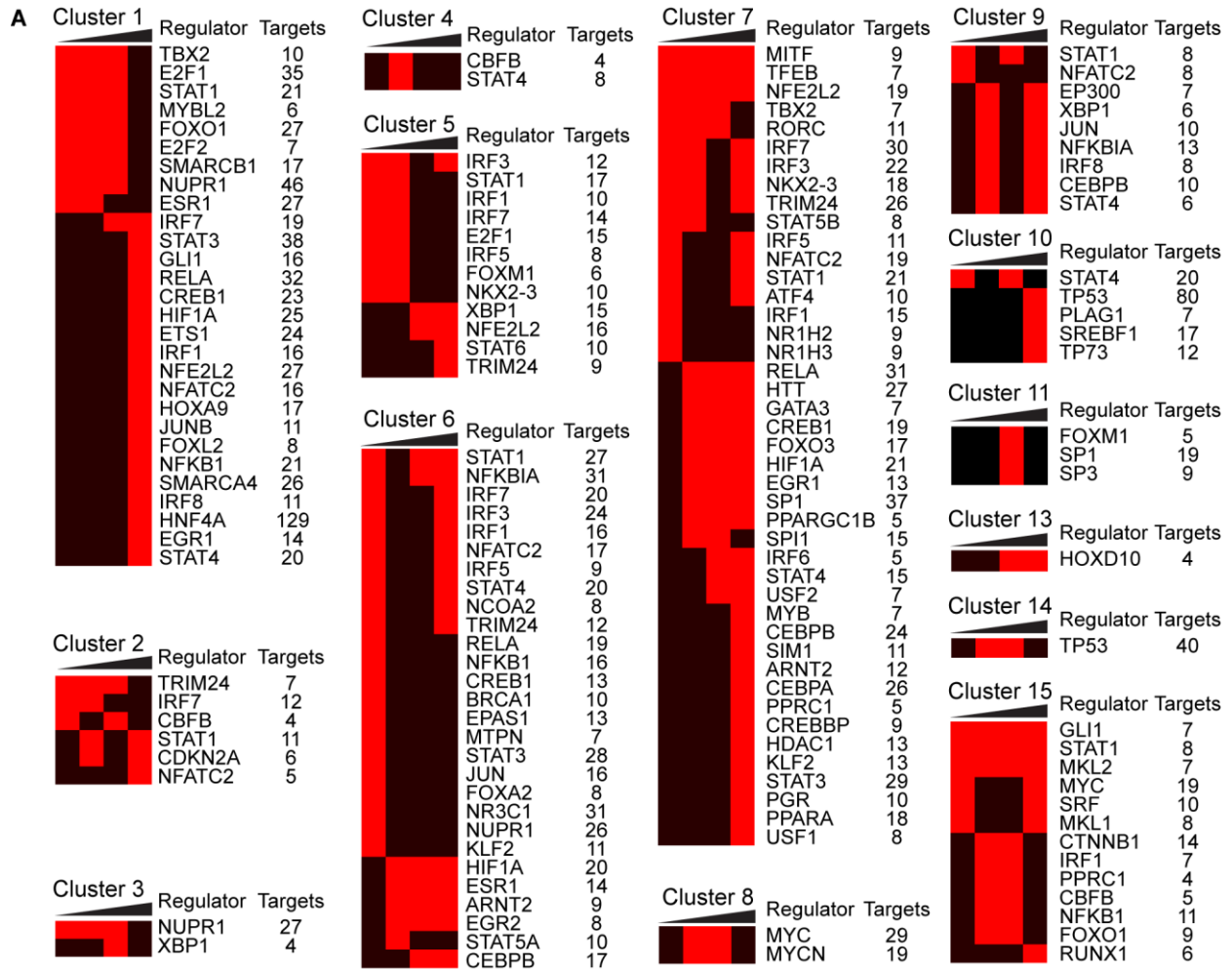


Figure 2.6 STAT, IRF, and NF- κ B pathways are perturbed in IP-deficient DCs.

(A) For each k-means cluster (**Figure 2.4C**), IPA software was used to identify regulators of transcription, along with their number of target genes, significantly enriched ($p < 0.05$ with Fisher algorithm) and predicted to be more activated in dKO ($z\text{-score} \geq 2$) or in WT ($z\text{-score} \leq -2$) (both designated in red) for at least one time point of LPS stimulation. No regulator was found significantly enriched in cluster 12. Immunoblot analyses of whole-cell lysates from DCs either deprived of FBS for 3 h (**B**) or left unstarved (**C**) and then stimulated with LPS for the indicated time. See also Supplemental Figure 2.2C.

To validate IPA-based predictions concerning the activity of IRF, STAT and NF- κ B pathways, we analyzed the expression of some of their members by immunoblotting. RELA (p65), the transcriptional activator of the canonical NF- κ B pathway, showed increased predicted activity in mature dKO DCs (6h) for clusters 1 and 7. In line with this, protein levels of I κ B α , the pathway inhibitor, were decreased at 2-6h in dKO DCs, coinciding with an increased ratio of pI κ B α /total I κ B α at 0h ($p = 0.01$) (Figure 2.6C and supplemental Figure 2.2C). In accordance with predictions, IRF3 and IRF7 levels were also markedly reduced in immature dKO DCs, as well as STAT1, STAT5 and STAT6 at all time points, and STAT3 for up to 1h of LPS treatment (Figure 2.6B,C and supplemental Figure 2.2C). For STAT3, STAT5 and IRF3, ratios of activated (phosphorylated) over total protein abundance were similar in WT and dKO DCs, suggesting that IPs regulated protein abundance but not phosphorylation efficiency. Together, IPA analyses and immunoblotting experiments strongly suggest that, at least in DCs, IPs have a non-redundant effect on key signaling pathways including STATs, IRFs and NF- κ B.

2.6.7 IP-deficiency affects key DC genes and functions

As a complement to our analyses of signaling pathways, we sought to identify specific genes and biological processes that were most affected by IPs. We found that nine of the top DEGs between WT and dKO DCs (≥ 10 -fold difference) were involved in DC function (Table 2.1). Genes expressed at low levels (≤ 0.1 RPKM) were excluded from this analysis. Interestingly, the six transcripts overexpressed in WT DCs encode proteins that have a positive effect on DC function (ex. CD207 and TLR11). By contrast, the top dKO-overexpressed genes encode proteins associated with negative regulation of the immune response (ex. MASP2 and GDPD3).

To obtain a broader perspective of the processes affected by IP-deficiency at different timepoints, we performed gene ontology (GO-) term enrichment analyses for each of the 15 gene clusters displayed in Figure 2.4C (Figure 2.7A). Two main points can be made from these analyses. First, GO-terms enriched in WT vs. dKO DCs encompassed housekeeping processes which are tightly regulated during DC activation (cell cycle, transcription and translation, protein transport and ubiquitylation)⁴⁵ and more specific immune roles (immune and inflammatory response). Second, the maturation programs of dKO and WT DCs did not progress simultaneously. Thus, genes related to cell cycle regulation were enriched early in WT DCs and late in dKO DCs. Furthermore, the kinetics of genes associated to immune-related biological processes was particularly complex and groups of transcripts followed at least four discrete patterns upon LPS stimulation (data not shown): i) overexpression at all timepoints in dKO compared to WT DCs (e.g. *Ccl4*, *Il6*, *Cxcl1*), ii) more prolonged upregulation in dKO than WT DCs (e.g. *Cxcl10*), iii) delayed response in dKO DCs (e.g. *Ccl5*) and iv) overexpressed in WT DCs at all timepoints (e.g. *Ccl22*, *Ccr7* and *Tnfsf4*). Collectively, top differentially expressed genes and GO-term enrichment analyses strongly support the idea that IPs have profound and pleiotropic effects on DC maturation and function. Furthermore, relative to WT DCs, IP-deficient DCs showed defective or delayed expression of genes involved in DC maturation and function (Figure 2.7A and Table 2.1). Consistent with this, we observed that LPS-induced CD86 upregulation at the cell surface, a hallmark of DC maturation, was delayed in IP-deficient DCs (Figure 2.7B).

2.6.8 IP-deficient DCs are phenotypically more similar to macrophages than WT DCs

Exhaustive analyses of the transcriptional landscape of cDCs and macrophages have yielded fundamental insights into the biology of these two subsets of mononuclear phagocytes. By analyzing the transcriptome of our DC populations with regards to recently uncovered key features of these cell populations, we observed that five genes involved in cDC development, *Batf3*, *Irf4*, *Irf8*, *Relb* and *Bcl6*^{46, 47}, were overexpressed slightly, but significantly, in WT relative to IP-deficient DCs (Figure 2.7C). On the contrary, *Mafb*, a key element of the core transcriptional signature of macrophages⁴⁶, was overexpressed in IP-deficient DCs. To further

explore the relationship between our DC populations and macrophages, we used the robust and comprehensive data generated by the Immunological Genome Project, which has defined core signatures for these cell types^{48, 49}. Out of the 24 transcripts composing the core cDC signature, 2 were overexpressed in dKO DCs and 18 were overexpressed in WT DCs (Table 2.2). Among the 39 transcripts defining the macrophage signature, 26 were overexpressed in dKO DCs and 1 was overexpressed in WT DCs (Table 2.2). Overall, comparing cDC and macrophage signature genes overexpressed in WT vs. dKO DCs provided compelling evidence that IP-deficient DCs are more similar to macrophages than WT DCs are ($p < 0.001$, Fisher's exact test).

Table 2.1. Selected top differentially expressed genes between WT and dKO DCs.

	Genes	Log2 dKO/WT (t=6h LPS)	Function of coding protein	Reference
WT > dKO	<i>Cd300e</i>	-4.48	Induces cytokine production (IL-12 and TNF- α) from stimulated DCs	36
	<i>Tlr11</i>	-3.30	Induces cytokine production (IL-12 and TNF- α) from stimulated DCs and binds to parasites	37
	<i>Cd207</i> (<i>Langerin</i>)	-6.44	Binder of carbohydrates at the surface of viral envelopes	38
	<i>Siglech</i>	-4.14 (t=0h)	Involved in endocytosis and antigen uptake	39
	<i>Epcam</i>	-2.44	Promotes DC migration from the epidermis to lymph nodes and regulates cell-cell interactions	40
	<i>Gpr77</i>	-3.76	Contributes to DC maturation and response to chemoattractants	41
WT < dKO	<i>Masp2</i>	3.66	Attenuates DC maturation and pro-inflammatory cytokine production	42

<i>Gdpd3</i>	5.31	Putative negative regulator of DC migration	43
<i>Cxcl11</i>	3.56	When bound to CXCR7, inhibits migration of DCs in response to CXCL4	44

Top differentially expressed genes (> 10-fold) in immature (untreated) and mature (6h LPS-treated) DCs that were reported to play a role in DC function. The expression level of these genes was compared between WT and dKO DCs based on RNA-sequencing data (available in the Gene Expression Omnibus database under accession number GSE52616). Values are included only for one timepoint (6h LPS).

A Representative biological processes for each cluster

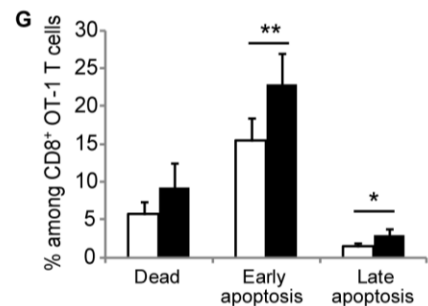
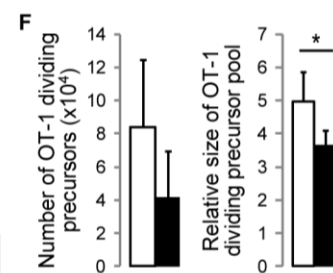
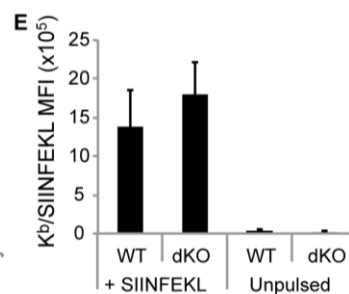
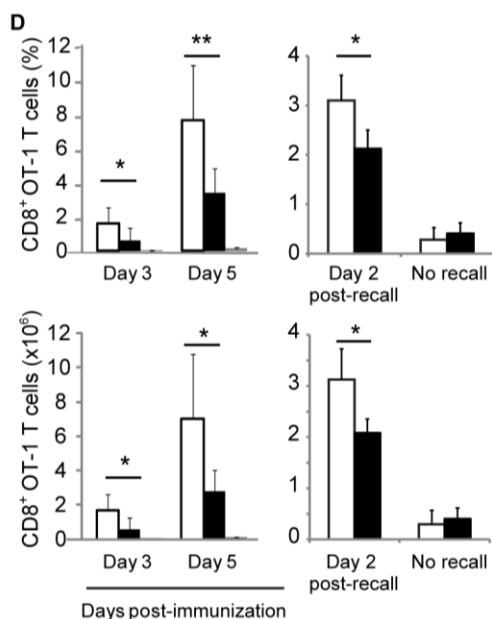
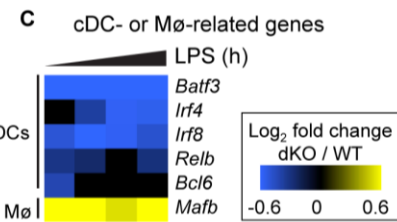
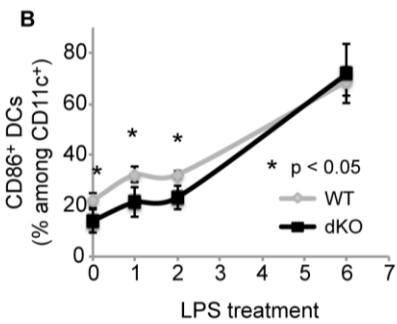
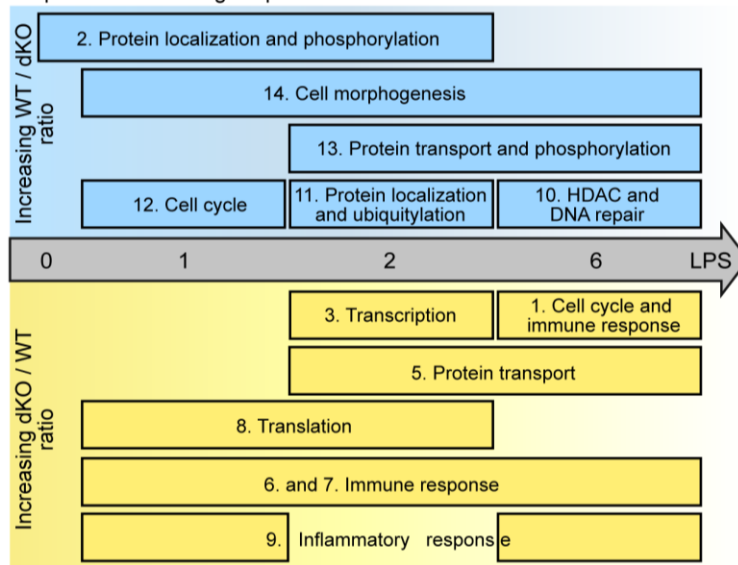


Figure 2.7 Presence of IPs is important to maintain DC functional integrity.

(A) InnateDB was used to identify biological processes significantly enriched in genes associated to each k-means cluster (Figure 2.4C). Boxes represent clusters with a particular kinetic of differential expression between WT and dKO (cluster identification numbers are shown in each box). The size of a box is representative of the time frame for differential expression. Biological processes indicated had the highest *p*value, or were the most representative, among significantly enriched GO terms for each cluster. Clusters 4 and 15 were not represented either because no biological process was found significantly enriched or because no pattern was found within enriched terms. (B) Percentage of CD86⁺ cells among total CD11c⁺ DCs during LPS stimulation; mean \pm SD of four experimental replicates. (C) Relative expression of core genes involved in cDC development or part of the transcriptional signature of macrophages (M ϕ). Blue and yellow colors indicate overexpression in WT and dKO DCs, respectively. (D) CFSE-labeled OT-1 T cells were injected into WT mice prior to immunization with LPS-treated and SIINFEKL-pulsed WT or dKO DCs. Spleens were harvested 3 or 5 d postimmunization or 2 d after a second immunization on day 30. Absolute numbers of OT-1 T cells and percentages of OT-1 among total splenocytes are presented as the mean \pm SD of 4–13 experimental replicates. (E) K^b/SIINFEKL levels measured by flow cytometry at the surface of WT and dKO DCs pulsed or not for 3 h with the model SIINFEKL (OVA_{257–264}) peptide. Data are represented as mean \pm SEM of six experimental replicates. (F) The absolute and relative size of OT-1 T cell populations that responded to SIINFEKL-pulsed DCs were calculated from CFSE labeling profiles on day 3 postimmunization. Data are represented as mean \pm SD of six experimental replicates. (G) Proportion of dead and apoptotic OT-1 T cells on day 3 after priming with WT or dKO DCs. Data are represented as mean \pm SD of seven experimental replicates.

2.6.9 dKO DCs are functionally deficient in vivo

If the transcriptomic differences between WT and dKO DCs are biologically relevant, they should affect the quintessential role of DCs: Ag presentation to T lymphocytes^{50, 51}. We therefore compared the T-cell priming ability of WT and dKO DCs presenting similar cell surface density of the model epitope SIINFEKL (Figure 2.7E), taking into account the fact that dKO DCs are not immunogenic for WT mice. We found that adoptively transferred OT-1 T cells, which recognize H2K^b/SIINFEKL, expanded more extensively 3-5 days following priming with WT than with dKO SIINFEKL-pulsed DCs (Figure 2.7D). This difference could be explained by two factors: an increased frequency of responding T cells and decreased proportion of apoptotic T cells following immunization with WT than dKO DCs (Figure 2.7F,G). Interestingly, the decreased capacity of dKO DCs to prime T cells was maintained when mice were challenged with a second DC immunization at day 30 (Figure 2.7D). Hence,

WT DCs were more effective than dKO DCs for priming both naïve and memory CD8 T cells, even when both DC populations were engineered to present similar epitope density.

Table 2.2. Genes comprised in the core conventional DC and macrophage signatures and their expression level between WT and dKO dendritic cells.

Signature	Ratio of expression	Gene	no LPS		6h LPS	
			dKO/WT log ratio	p-val	dKO/WT log ratio	p-val
Conventional DCs	dKO < WT	<i>Adam19</i>	-0,8937	0,0000		
	dKO < WT	<i>Apl1s3</i>	-0,5552	0,0001		
	dKO < WT	<i>Btla</i>	-0,9533	0,0000		
	dKO < WT	<i>Ccr7</i>	-1,1482	0,0000		
	dKO < WT	<i>Flt3</i>	-1,6566	0,0001		
	dKO < WT	<i>Gpr132</i>	-0,5637	0,0000		
	dKO < WT	<i>Gpr82</i>	-3,6725	0,0000		
	dKO < WT	<i>Hmgn3</i>	-1,3367	0,0000		
	dKO < WT	<i>Kit</i>	-1,0403	0,0000		
	dKO < WT	<i>Kmo</i>	-0,9504	0,0000		
	dKO < WT	<i>P2ry10</i>	-0,9956	0,0000		
	dKO < WT	<i>Pvrl1</i>	-1,4228	0,0000		
	dKO < WT	<i>Traf1</i>	-0,9006	0,0000		
	dKO < WT	<i>Zbtb46</i>	-0,5060	0,0000		
	dKO < WT	<i>Sept6</i>	-0,3918	0,0003		
	dKO < WT	<i>H2-Eb2</i>	-1,7082	0,0000		
	dKO < WT	<i>Rab30</i>	-1,0600	0,0004		
	dKO < WT	<i>Slamf7</i>	-0,5217	0,0000		
	dKO > WT	<i>Gpr114</i>	2,2491	0,0000		
	dKO > WT	<i>Ass1</i>	0,2415	0,0065		
dKO = WT	<i>Klri1</i>	NA	NA			
dKO = WT	<i>Gpr68</i>	NA	NA			
dKO = WT	<i>Amical</i>	NA	NA			
dKO = WT	<i>Bcl11a</i>	NA	NA			

Macrophages	dKO > WT	<i>Ptplad2</i>			0,7357	0,0000
	dKO > WT	<i>Tlr4</i>			1,4221	0,0000
	dKO > WT	<i>Pon3</i>			1,3728	0,0000
			no LPS		6h LPS	
Signature	Ratio of expression	Gene	dKO/WT log ratio	p-val	dKO/WT log ratio	p-val
Macrophages	dKO > WT	<i>Fgd4</i>			0,9340	0,0000
	dKO > WT	<i>Pld3</i>			0,9351	0,0000
	dKO > WT	<i>Tpp1</i>			0,8506	0,0000
	dKO > WT	<i>Ctsd</i>			0,8303	0,0000
	dKO > WT	<i>Lamp2</i>			0,8135	0,0000
	dKO > WT	<i>Mertk</i>			0,5227	0,0000
	dKO > WT	<i>Tlr7</i>			1,0882	0,0000
	dKO > WT	<i>Cd14</i>			0,6300	0,0000
	dKO > WT	<i>Tbxas1</i>			0,5136	0,0000
	dKO > WT	<i>Sepp1</i>			1,1539	0,0000
	dKO > WT	<i>Tcn2</i>			0,6867	0,0000
	dKO > WT	<i>Tmem77/Dram2</i>			0,5690	0,0000
	dKO > WT	<i>Abca1</i>			1,1577	0,0000
	dKO > WT	<i>Mr1</i>			0,4057	0,0228
	dKO > WT	<i>Sqrdl</i>			0,6635	0,0000
	dKO > WT	<i>Plod1</i>			0,6920	0,0000
	dKO > WT	<i>Pla2g4a</i>			0,5504	0,0002
	dKO > WT	<i>Fcgr3</i>			0,5077	0,0000
	dKO > WT	<i>Ctsl</i>			2,2838	0,0000
	dKO > WT	<i>Tom1</i>			1,3745	0,0000
	dKO > WT	<i>Cd164</i>			0,4108	0,0000
	dKO > WT	<i>Fcgr1</i>			0,8546	0,0000
	dKO > WT	<i>Csf3r</i>			0,4493	0,0251
	dKO < WT	<i>Pla2g15</i>			-0,9239	0,0000
	dKO = WT	<i>Fert2</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>Dok3</i>			NA	NA

	dKO = WT	<i>Myo7a</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>Tmem195/Agmo</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>Tspan14</i>			NA	NA
			no LPS		6h LPS	
Signature	Ratio of expression	Gene	dKO/WT log ratio	p-val	dKO/WT log ratio	p-val
Macrophages						
	dKO = WT	<i>Comt1/Comt</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>Arsg</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>1810011H11Rik</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>Pecr</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>Camk1</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>A930039A15Rik</i>			NA	NA
	dKO = WT	<i>Glul</i>			NA	NA

List of genes from core conventional dendritic cells (DCs) and macrophages were retrieved from Miller et al⁴⁸ and Gautier et al⁴⁹. The expression level of these genes was compared between WT and dKO DCs based on RNA-sequencing data (available in the Gene Expression Omnibus database under accession number GSE52616). Values are included only for one timepoint (no LPS for the core DC signature and 6h LPS for the core macrophage signature). The other timepoints showed similar results (data not shown).

2.7 Discussion

The dominant paradigm holds that the ultimate non-redundant role of IPs vs. CPs is to generate a highly diverse MIP repertoire. The present work shows that non-redundant roles of IPs go well beyond MIP generation. We report that IPs regulate the expression of >8,000 transcripts in DCs. Of note, IPs may affect the expression of additional genes redundantly with CPs, but our study design was poised to selectively identify genes differentially regulated by IPs and CPs.

The impact of IPs was cell-autonomous and, at least for genes tested in Figure 2.2, required deletion of both *Mecl1* and *Lmp7* subunits. Consistent with the fact that incorporation of LMP2 in proteasomes is impaired in the absence of MECL1 and LMP7, we found in our dKO DCs only low amounts of LMP2-containing “mixed proteasomes” (here, LMP2/β2/β5). Hence, dKO mice used herein were practically deficient for the three IP catalytic subunits. That we observed gene expression changes in dKO DCs but not in DCs deficient only for MECL1 or LMP7 could be explained by two alternatives: i) MECL1 and LMP7 have redundant roles or ii) they have different but synergistic effects on gene expression. Nevertheless, it is formally possible that some transcripts that were not included in Figure 2.2 might be differentially expressed in WT DCs and DCs lacking a single IP subunit. Such differential expression could be due to a loss of function (of IPs) or a gain of function linked to the presence of increased amounts of mixed proteasomes in DCs deficient for a single IP subunit.

In various cell types, including DCs, about 80% of the observed variance in mRNA levels is shaped by transcription rates rather than post-transcriptional regulation⁵². Accordingly, our data strongly suggest that IPs shape the transcriptome mainly via regulation of transcription factors and not by affecting mRNA stability. Nonetheless, expression of a few transcripts (*Rpl29* and *Hebp1*) reflected an impact of IPs on pre-mRNA processing events (Figure 2.3). It is well recognized that CPs control the activity of most transcription factors¹⁶. However, the breadth of non-redundant effects of IPs on the transcriptome was somewhat unanticipated. Treatment of WT and dKO DCs with a selective proteasome inhibitor swiftly abolished differences in the abundance of *Bmp2k*, *Cxcl11* and *Apobec3* transcripts (Figure 2.2B). These cases probably

involved proteolysis of short-lived transcription factors or their regulators. Contrarily, differential abundance of *Dlc1* and *Gdpd3* was not tightly linked to proteasomal activity (Figure 2.2C), probably because it was regulated by proteolysis of transcription factors with longer half-life, which would be missed within the time frame of our proteasome-inhibition experiment.

Clustering of the genes according to their kinetics of differential expression showed that the imprint of IPs on gene expression was extensive, dynamic and affected all stages of DC maturation. Nonetheless, the impact was greater in mature than in unstimulated DCs. Thus, as much as 64.5% of genes induced or repressed by LPS stimulation were regulated by IPs. With over 8,000 DEGs, the effects of IPs were obviously complex, but IPA analysis suggests that a major proportion of DEGs were regulated by 88 unique transcription regulators, many of which were related to the STAT, IRF and NF- κ B pathways. Immunoblotting confirmed the variable abundance of regulators' protein levels in WT and dKO. Since IPs and CPs show distinct processing kinetics⁵³ and cleavage preferences^{4, 54}, we surmise that STATs, IRFs and I κ B are processed at different rates in WT DCs (containing both CPs and IPs) vs. dKO DCs (containing almost exclusively CPs), leading to alterations in the transcriptome profile. Notably, altered I κ B α degradation has previously been linked to mixed proteasomes in *Lmp2^{-/-}* B lymphocytes¹¹. Additionally, WT DCs overexpressed genes associated to core cDC signature whereas dKO DCs overexpressed various macrophage-specific genes, suggesting that dKO DCs are more similar to macrophages than WT DCs are.

Previous studies have shown that IP-deficient DCs were inefficient for priming of CD8 T-cell responses⁵. Heretofore, the role of IPs in MIP processing has been held primarily responsible for this impaired ability. We show herein that, even when engineered to present the same epitope density as WT DCs, dKO DCs remained defective antigen-presenting cells (Figure 2.7D-G). Relative to WT DCs, dKO DCs showed two defects: they primed limited number of naïve and memory T cells, and these primed T cells were unduly susceptible to apoptosis. Further work will be necessary to uncover the mechanistic underpinnings of these defects. Nonetheless, they clearly show that the functional role of IPs in DCs goes well beyond MIP production. They also suggest that the level of IP expression, which is maturation stage-dependent in DCs⁵⁵, may be relevant to DC-based vaccination trials⁵⁶.

The imprint of IPs on the transcriptome of DCs was not limited to immune genes. Indeed, in the present work, IPs regulated genes involved in numerous fundamental processes including transcription, translation, protein economy and cell cycle regulation. In various models, IPs have been associated to maintenance of stemness, cell differentiation, response to injury and neoplastic transformation¹²⁻¹⁵. We therefore speculate that, if found in other cell types, the dramatic effect of IPs on the transcriptional landscape could explain the various immune and non-immune phenotypes observed in vertebrates with IP deficiency or mutations.

2.8 Acknowledgments

We are grateful to Sébastien Lemieux, Jean-Philippe Laverdure, Joël Ryan and Hassan Khanafer for useful suggestions. We acknowledge the assistance of the staff of the following core facilities at the IRIC: animal care, flow cytometry, genomics and bioinformatics.

2.9 Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

2.10 References

1. Glickman, M. H., and A. Ciechanover. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82: 373-428.
2. Osterloh, P., K. Linkemann, S. Tenzer, H. G. Rammensee, M. P. Radsak, D. H. Busch, and H. Schild. 2006. Proteasomes shape the repertoire of T cells participating in antigen-specific immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 5042-5047.
3. Dalet, A., V. Stroobant, N. Vigneron, and B. J. Van den Eynde. 2011. Differences in the production of spliced antigenic peptides by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Eur. J. Immunol.* 41: 39-46.
4. de Verteuil, D., T. L. Muratore-Schroeder, D. P. Granados, M. H. Fortier, M. P. Hardy, A. Bramoullé, E. Caron, K. Vincent, S. Mader, S. Lemieux, P. Thibault, and C. Perreault. 2010. Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol Cell Proteomics* 9: 2034-2047.
5. Kincaid, E. Z., J. W. Che, I. York, H. Escobar, E. Reyes-Vargas, J. C. Delgado, R. M. Welsh, M. L. Karow, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, and K. L. Rock. 2012. Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat Immunol.* 13: 129-135.
6. Princiotta, M. F., D. Finzi, S. B. Qian, J. Gibbs, S. Schuchmann, F. Buttgerit, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2003. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18: 343-354.
7. Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194-1217.
8. van Deventer, S., and J. Neefjes. 2010. The immunoproteasome cleans up after inflammation. *Cell* 142: 517-518.
9. Spaapen, R. M., and J. Neefjes. 2012. Immuno-waste exposure and further management. *Nat. Immunol.* 13: 109-111.
10. Muchamuel, T., M. Basler, M. A. Aujay, E. Suzuki, K. W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E. R. Ring, J. Shields, J. Jiang, P. Shwonek, F. Parlati, S. D. Demo, M. K. Bennett, C. J. Kirk, and M. Groettrup. 2009. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.* 15: 781-787.
11. Hensley, S. E., D. Zanker, B. P. Dolan, A. David, H. D. Hickman, A. C. Embry, C. N. Skon, K. M. Grebe, T. A. Griffin, W. Chen, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2010. Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. *J. Immunol.* 184: 4115-4122.
12. Kitamura, A., Y. Maekawa, H. Uehara, K. Izumi, I. Kawachi, M. Nishizawa, Y. Toyoshima, H. Takahashi, D. M. Standley, K. Tanaka, J. Hamazaki, S. Murata, K.

- Obara, I. Toyoshima, and K. Yasutomo. 2011. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J. Clin. Invest* 121: 4150-4160.
13. Atkinson, S. P., J. Collin, N. Irina, G. Anyfantis, B. K. Kyung, M. Lako, and L. Armstrong. 2012. A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 30: 1373-1384.
 14. Ferrington, D. A., S. A. Hussong, H. Roehrich, R. J. Kapphahn, S. M. Kavanaugh, N. D. Heuss, and D. S. Gregerson. 2008. Immunoproteasome responds to injury in the retina and brain. *J. Neurochem.* 106: 158-169.
 15. Catalgol, B. 2012. Proteasome and cancer. *Prog. Mol Biol Transl. Sci.* 109: 277-293.
 16. Geng, F., S. Wenzel, and W. P. Tansey. 2012. Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 177-201.
 17. Huber, E. M., M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, and M. Groll. 2012. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 148: 727-738.
 18. St-Pierre, C., S. Brochu, J. R. Vanegas, M. Dumont-Lagace, S. Lemieux, and C. Perreault. 2013. Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* 3: 1860.
 19. Anders, S., and W. Huber. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11: R106.
 20. Breuer, K., A. K. Foroushani, M. R. Laird, C. Chen, A. Sribnaia, R. Lo, G. L. Winsor, R. E. Hancock, F. S. Brinkman, and D. J. Lynn. 2013. InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond--recent updates and continuing curation. *Nucleic Acids Res.* 41: D1228-D1233.
 21. Ebstein, F., A. Voigt, N. Lange, A. Warnatsch, F. Schroter, T. Prozorovski, U. Kuckelkorn, O. Aktas, U. Seifert, P. M. Kloetzel, and E. Kruger. 2013. Immunoproteasomes are important for proteostasis in immune responses. *Cell* 152: 935-937.
 22. Fiala, G. J., W. W. Schamel, and B. Blumenthal. 2011. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular lysates. *J. Vis. Exp.* 48: e2164.
 23. Meunier, M. C., C. Baron, and C. Perreault. 2009. Two host factors regulate persistence of H7^a-specific T cells injected in tumor bearing mice. *PLoS One* 4: e4116.
 24. Leignadier, J., M. P. Hardy, M. Cloutier, J. Rooney, and N. Labrecque. 2008. Memory T-lymphocyte survival does not require T-cell receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105: 20446-20451.
 25. Gudmundsdottir, H., A. D. Wells, and L. A. Turka. 1999. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion *in vivo* at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J. Immunol.* 162: 5212-5223.

26. Blais, M. E., S. Brochu, M. Giroux, M. P. Bélanger, G. Dulude, R. P. Sékaly, and C. Perreault. 2008. Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different. *J. Immunol.* 180: 2299-2312.
27. Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 563-604.
28. Guillaume, B., J. Chapiro, V. Stroobant, D. Colau, B. Van Holle, G. Parvizi, M. P. Bousquet-Dubouch, I. Théate, N. Parmentier, and B. J. Van den Eynde. 2010. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107: 18599-18604.
29. Granados, D. P., P. L. Tanguay, M. P. Hardy, E. Caron, D. De Verteuil, S. Meloche, and C. Perreault. 2009. ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol.* 10: 10.
30. Krishnan N, Lam TT, Fritz A, Rempinski D, O'Loughlin K, Minderman H, Berezney R, Marzluff WF, and Thapar R. 2012. The prolyl isomerase Pin1 targets stem-loop binding protein (SLBP) to dissociate the SLBP-histone mRNA complex linking histone mRNA decay with SLBP ubiquitination. *Mol. Cell Biol.* 32: 4306-4322.
31. Li ML, Defren J, and Brewer G. 2013. Hsp27 and F-box protein γ -TrCP promote degradation of mRNA decay factor AUF1. *Mol. Cell Biol.* 33: 2315-2326.
32. Breig O, and Baklouti F. 2013. Proteasome-mediated proteolysis of SRSF5 splicing factor intriguingly co-occurs with SRSF5 mRNA upregulation during late erythroid differentiation. *PLoS One* 8: e59137.
33. Abramson, J., M. Giraud, C. Benoist, and D. Mathis. 2010. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140: 123-135.
34. Dantuma, N. P., T. A. Groothuis, F. A. Salomons, and J. Neefjes. 2006. A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J. Cell Biol.* 173: 19-26.
35. Szklarczyk, D., A. Franceschini, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, P. Minguéz, T. Doerks, M. Stark, J. Müller, P. Bork, L. J. Jensen, and M. C. von. 2011. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* 39: D561-D568.
36. Brckalo, T., F. Calzetti, B. Perez-Cabezas, F. E. Borrás, M. A. Cassatella, and M. Lopez-Botet. 2010. Functional analysis of the CD300e receptor in human monocytes and myeloid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 40: 722-732.
37. Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308: 1626-1629.
38. Stoitznier, P., and N. Romani. 2011. Langerin, the "Catcher in the Rye": an important receptor for pathogens on Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* 41: 2526-2529.

39. Blasius, A. L., and M. Colonna. 2006. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol.* 27: 255-260.
40. Gaiser, M. R., T. Lammermann, X. Feng, B. Z. Igyarto, D. H. Kaplan, L. Tessarollo, R. N. Germain, and M. C. Udey. 2012. Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109: E889-E897.
41. Ohno M, Hirata T, Enomoto M, Araki T, Ishimaru H, and Takahashi TA. 2000. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol. Immunol.* 37: 407-412.
42. Wang, M., Y. Zhang, Y. Chen, L. Zhang, X. Lu, and Z. Chen. 2011. Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide. *BMC. Immunol.* 12: 1.
43. Eisenbarth, S. C., A. Williams, O. R. Colegio, H. Meng, T. Strowig, A. Rongvaux, J. Henao-Mejia, C. A. Thaiss, S. Joly, D. G. Gonzalez, L. Xu, L. A. Zenewicz, A. M. Haberman, E. Elinav, S. H. Kleinstein, F. S. Sutterwala, and R. A. Flavell. 2012. NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells. *Nature* 484: 510-513.
44. Struyf S, Salogni L, Burdick MD, Vandercappellen J, Gouwy M, Noppen S, Proost P, Opdenakker G, Parmentier M, Gerard C, Sozzani S, Strieter RM, and Van Damme J. 2011. Angiostatic and chemotactic activities of the CXC chemokine CXCL4L1 (platelet factor-4 variant) are mediated by CXCR3. *Blood* 117: 480-488.
45. Pierre, P. 2009. Immunity and the regulation of protein synthesis: surprising connections. *Curr. Opin. Immunol.* 21: 70-77.
46. Satpathy, A. T., X. Wu, J. C. Albring, and K. M. Murphy. 2012. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13: 1145-1154.
47. Murphy, K. M. 2013. Transcriptional control of dendritic cell development. *Adv. Immunol.* 120: 239-267.
48. Miller, J. C., B. D. Brown, T. Shay, E. L. Gautier, V. Jojic, A. Cohain, G. Pandey, M. Leboeuf, K. G. Elpek, J. Helft, D. Hashimoto, A. Chow, J. Price, M. Greter, M. Bogunovic, A. Bellemare-Pelletier, P. S. Frenette, G. J. Randolph, S. J. Turley, and M. Merad. 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13: 888-899.
49. Gautier, E. L., T. Shay, J. Miller, M. Greter, C. Jakubzick, S. Ivanov, J. Helft, A. Chow, K. G. Elpek, S. Gordonov, A. R. Mazloom, A. Ma'ayan, W. J. Chua, T. H. Hansen, S. J. Turley, M. Merad, and G. J. Randolph. 2012. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 13: 1118-1128.
50. Joffre, O., M. A. Nolte, R. Sporri, and C. Reis e Sousa. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227: 234-247.

51. Sancho, D., O. P. Joffre, A. M. Keller, N. C. Rogers, D. Martinez, P. Hernanz-Falcon, I. Rosewell, and C. Reis e Sousa. 2009. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458: 899-903.
52. Tippmann, S. C., R. Ivanek, D. Gaidatzis, A. Scholer, L. Hoerner, N. E. van, P. F. Stadler, M. B. Stadler, and D. Schubeler. 2012. Chromatin measurements reveal contributions of synthesis and decay to steady-state mRNA levels. *Mol. Syst. Biol.* 8: 593.
53. Mishto, M., F. Luciani, H. G. Holzhutter, E. Bellavista, A. Santoro, K. Textoris-Taube, C. Franceschi, P. M. Kloetzel, and A. Zaikin. 2008. Modeling the in vitro 20S proteasome activity: the effect of PA28-ab and of the sequence and length of polypeptides on the degradation kinetics. *J. Mol. Biol.* 377: 1607-1617.
54. Toes, R. E., A. K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N. P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwinderman, T. P. Dick, J. Muller, B. Schonfisch, C. Schmid, H. J. Fehling, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and H. Schild. 2001. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp. Med.* 194: 1-12.
55. Macagno, A., M. Gilliet, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, F. O. Nestle, and M. Groettrup. 1999. Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur. J. Immunol.* 29: 4037-4042.
56. Vacchelli, E., I. Vitale, A. Eggermont, W. H. Fridman, J. Fucikova, I. Cremer, J. Galon, E. Tartour, L. Zitvogel, G. Kroemer, and L. Galluzzi. 2013. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2: e25771.

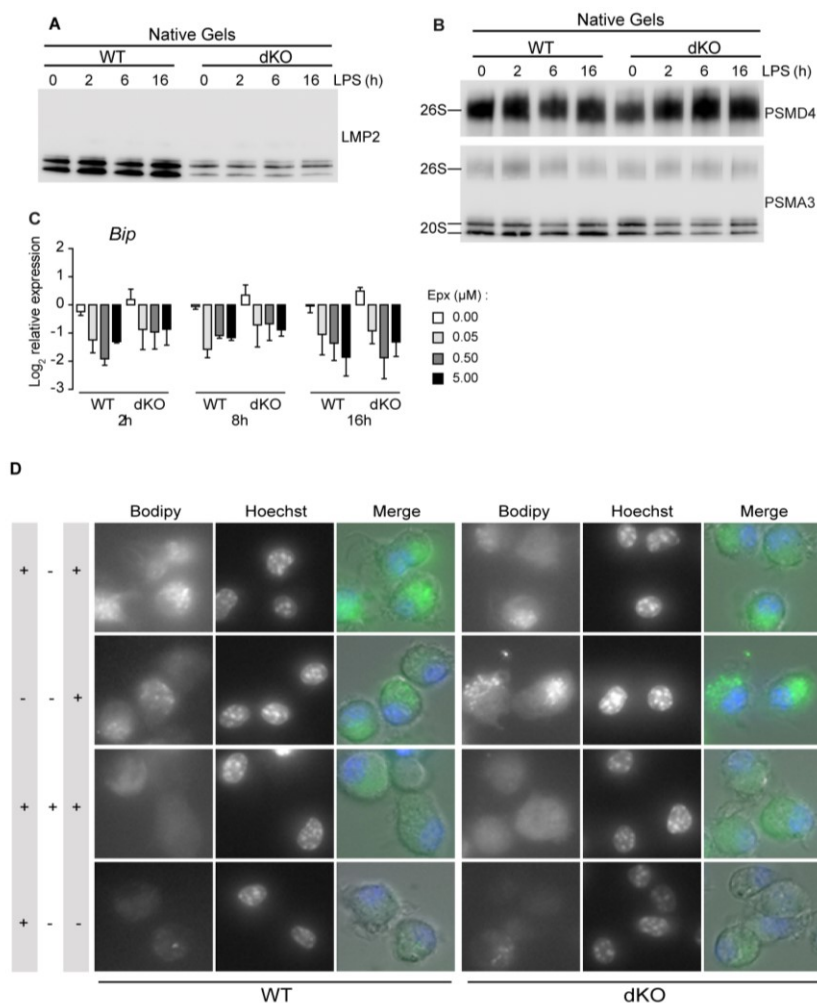
2.11 Footnotes

¹The IRIC is supported in part by the Canada Foundation for Innovation and the Fonds de Recherche Québec Santé (FRQS). This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP 42384) and the Canadian Cancer Society (grant #701564). D.d.V. and A.R. were supported by doctoral research awards from the FRQS and the CIHR, respectively. E.G. was supported by a studentship from the Défi Persévérance-Famille Gosselin Fund. C.P. holds a Canada Research Chair in Immunobiology.

²Address correspondence and reprint requests to Pr. Claude Perreault (claude.perreault@umontreal.ca), Institute for Research in Immunology and Cancer, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7. Phone: 514-343-6126; Fax: 514-343-5839.

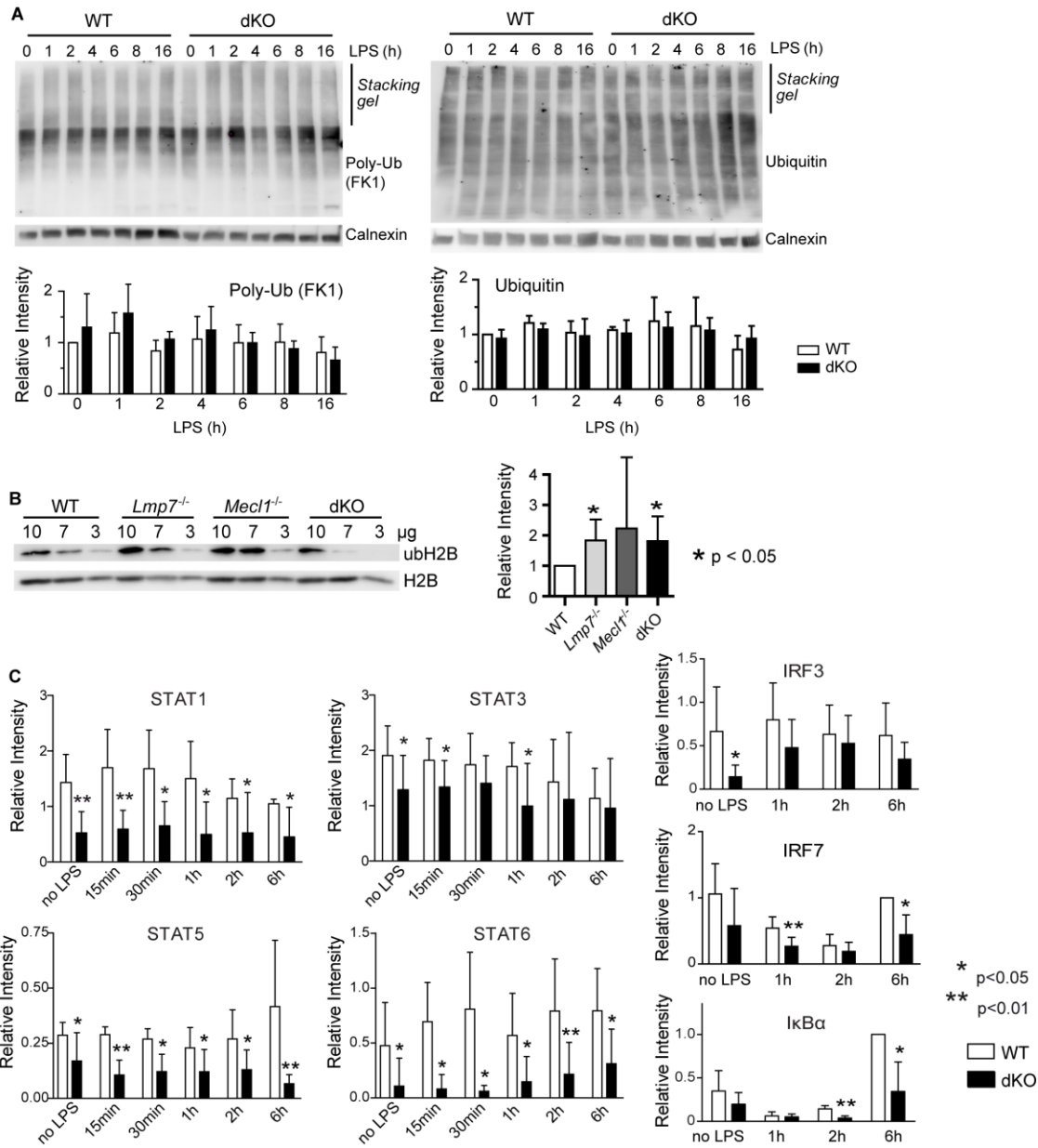
³Abbreviations used in this paper: CP, constitutive proteasome; DC, dendritic cell; DEG, differentially expressed gene; dKO, double knock-out; IP, immunoproteasome; GO, gene ontology; H2A and H2B, histone 2A and histone 2B; IPA, Ingenuity Pathway analysis; IRIC, Institute for Research in Immunology and Cancer; ubH2A and ubH2B, ubiquitylated histone 2A and 2B; WT, wild-type

2.12 Supplemental Material



Supplemental Figure 2.S1 Proteasomal content and stress in WT and dKO DCs.

A-B) Native gel electrophoresis was performed on lysates from WT and dKO DCs stimulated with LPS for the indicated time and was followed by immunoblot with A) anti-LMP2, or B) anti-PSMA3 (20S subunit) and anti-PSMD4 (19S subunit) antibodies. Representative image of 3 independent experiments. C) RT-qPCR experiments were performed on WT and dKO DCs pre-treated for 2, 8 or 16h with the indicated concentration of epoxomicin, then stimulated for 6h with LPS. Data are represented as mean +/- SD of 3 experimental replicates. D) WT and dKO DCs were left untreated or were incubated overnight with LPS. Proteasomes were stained (or left untreated for a negative control) using a proteasome-specific inhibitor coupled to a fluorogenic molecule (Proteasome-bodipy), with or without pre-incubation with the proteasome inhibitor MG-132 as a negative control. Nuclei were stained with Hoechst before monitoring fluorescence by live microscopy. Images are representative of 3 independent experiments.



Supplemental Figure 2.S2 Ubiquitylation and predicted regulators quantification.

A) Whole cell extracts were prepared from WT and dKO DCs stimulated with LPS for the indicated time and immunoblotted with antibodies against poly-ubiquitin or total ubiquitin. Calnexin was used as a loading control. Quantifications are represented as mean \pm SD of 4 experimental replicates. B) Histones from H₂SO₄-treated nuclear extracts were prepared from untreated WT and dKO DCs and immunoblotted with antibodies against ubH2B. Total H2B was used as a loading control. Quantifications are represented as mean \pm SD of 7 experimental replicates. C) Quantifications of immunoblots shown in Figure 6B-C. Data are represented as mean \pm SD of at least 4 experimental replicates (one-sided Student statistical test).

Supplemental Table 2.S1. Primers used for qPCR experiments

Gene name	Approx. region (if within intron or spanning an intron-exon junction)	UPL Probe	Primer LEFT	Primer RIGHT	Experiments		
					Standard qPCR	Unprocessed mRNA	ChIP-qPCR
<i>Actb</i>	Actb_5'UTR	4	agtgtaggcggagcttgc	ggccgattattaccataaaag			X
<i>Akr1e1</i>		2	tcctacagtgggcttgg	gttagtagccaacttaactgcatc	X		
<i>Akr1e1</i>	Akr1e1_ex2	2	tcctgtgttggttatattccag	cccagttgatagccaactta		X	
<i>Apobec3</i>		27	taccagctggagcagttcaa	ctgcatgctgtttgccttt	X		
<i>Apobec3</i>	Apobec3_ex1	25	gcaaatgctattcaccgatca	ccaggaagagactgcagtgaa		X	
<i>Apold1</i>		41	tcaggctctcttccatcat	acaaagcaccaatgcatgac	X		
<i>Atp2b2</i>	Atp2b2_int1	50	gccctctgtccacagttta	ttgccaaaaatctgtttcc			X
<i>Bip</i>		105	ctgaggcgtatttgggaaag	cagcatcttggttccttgc	X		
<i>Bmp2k</i>		2	ccgtcccttcatttctcac	ttggagaatgttccgtcgtt	X		
<i>Bmp2k</i>	Bmp2k_ex1	16	gtcaccctggaggagtcg	cttcacaccggagccact		X	
<i>C1qb</i>		56	gctctgggctctgggaat	tcttcatcagctcagcctca	X		
<i>C1qb</i>	C1qb_ex2	20	tcctcttttctctgattctgtttc	ggtcccttctctcctcaaac		X	X
<i>Casp12</i>	Casp12_ex2	42	caaaggttggccaaggac	acattcttctcaccaggtcat			X
<i>Cxcl11</i>		76	gctgctgagatgaacaggaa	ccctgttgaacataaggaagc	X		
<i>Cxcl11</i>	Cxcl11_ex2	67	gctgcgacaaagtgaagtg	acaaaagcacccataaccattg		X	
<i>Dlc1</i>		102	cggacaccatgatcctaaca	atactgggggaaaccagtca	X		
<i>Dlc1</i>	Dlc1_ex6	81	cggcttcagctgtaagaga	acctcaggagcgtgatg		X	
<i>Ednra</i>	Ednra_int3	99	gggcatcacctcttgaa	aaagagtaaagaaagtgcaca			X
<i>Egr3</i>	Egr3_ex2	16	agacgtggaggccatgtatc	gagtagagatcggcagtt			X
<i>Ehd3</i>	Ehd3_int1	62	cgtgactccactcactcttc	ctcatgcctggaaaatcctg			X
<i>Eps8</i>		95	cgggacagccagagataca	agagctcatcctgaacctcttc	X		
<i>Eps8</i>	Eps8_ex9	85	cgttttctgagctttctaaaagg a	agccctctgtctgcttgtg		X	
<i>Fut10</i>		81	acaggacctccagcatcat	cgaggcaaaggttaagctgtc	X		
<i>Fut10</i>	Fut10_ex2	81	acaggacctccagcatcat	gaggaagggaaccaactc		X	X
<i>Gapdh</i>	Gapdh_ex3	94	tggaagggtcatggtatgt	tccactatggcagggtaa			X
<i>Gdpd3</i>		105	aagagatgcaggctgctaa	ccagaacgatcgccatc	X		
<i>Gdpd3</i>	Gdpd3_ex7	66	ggctgcagagaaaagctcag	taaccctatggcagagaaag		X	X

<i>Gpr114</i>		2	gacagcagtgaggacgtgac	ccgtgtggatccatgtcc	X		
<i>Gpr114</i>	<i>Gpr114_ex1</i>	71	gcccttttcttctacctgtgc	cccctcgcactgtcacctacc		X	X
<i>Hebp1</i>		38	gggcatcactgtctattccac	gggtggcatgagcaacata	X		
<i>Hebp1</i>	<i>Hebp1_ex3</i>	32	cctgagatttacgcctctg	atgccgactcctgaagcat		X	
<i>Hebp1</i>	<i>Hebp1_ex2</i>	80	gttctcactccccgtgtctc	ccttcacaggctctttcctc		X	
<i>Hoxa1</i>	<i>Hoxa1_ex1</i>	77	tctggaacctctcgactcc	ctgtgccccagcataac			X
<i>Lepr</i>		104	gttccaaacccaagaattg	gactcaaagagtgtccgttctc	X		
<i>Lepr</i>	<i>Lepr_ex2</i>	56	tgatggctgttttctctgtctt	tgccaggttaagtgcagctat		X	
<i>Loxl4</i>	<i>Loxl4_ex3</i>	26	aaaccatcctcgcagct	cgctgtaccgtactccaca			X
<i>Ly6c1</i>	<i>Ly6c1_int2</i>	56	tgtctcctatggagctggcta	accaagagccaccattgttc			X
<i>Myod1</i>	<i>Myod1_3'end</i>	71	tcacagcgaaggccactt	gccactcaaggatcagctct			X
<i>Mysm1</i>		12	cgtcaggctcagctcatgg	tgatgtgtactttcatcatttcc	X		
<i>Mysm1</i>	<i>Mysm1_ex5</i>	17	gctgtttgaacaaggactggta	atggattatgtacaatgacaaacagat		X	
<i>No gene</i>	No gene chr 6	18	gttctgcccttggaaact	tcccatagcaacctcaaca			X
<i>Nrn1</i>	<i>Nrn1_ex2</i>	108	tcctccccacagcttacct	gcccttaaagactgcatacaca			X
<i>Prdx2</i>		12	ggactctcagttcaccacct	atattcagggggccaag	X		
<i>Rpl29</i>		70	tccgatgacatcctgacta	ccatttctgtgccatttgc	X		
<i>Rpl29</i>	<i>Rpl29_5'UTR</i>	4	cgatgacatcctgactacag	aatctcgatgccccatagc		X	
<i>Rpl29</i>	<i>Rpl29_int3</i>	1	gatgacagtgggtcataaacta tcc	ttacaagaggccctaccctgt		X	X
<i>Rragb</i>	<i>Rragb_int2</i>	78	gaagaggaatggtcccttt	ggacaaagtaagggaacgtag			X
<i>Shc2</i>	<i>Shc2_ex3</i>	92	atcaatcggctcagtagg	acaaccacaccaccttct			X
<i>Slamf8</i>	<i>Slamf8_ex2</i>	1	ggccgagtcagctatatga	cgctgtctcaggtttcag			X
<i>Snf1lk</i>		74	gacggagagcgtctgatacc	ggtcctcgcatttttctc	X		
<i>Snf1lk</i>	<i>Snf1lk_ex10</i>	89	tcaacctccttgaagtcca	agggcacatttcaagtggtc		X	
<i>Tcfap4</i>	<i>Tcfap4_ex2</i>	68	tggagagaagctcagcaagg	cctgtgagagtacaacacctct			X
<i>Tgfb3</i>		89	cgagtggctgttggaggaga	gctgaaaggtgtgacatgga	X		
<i>Tgfb3</i>	<i>Tgfb3_ex2</i>	20	gcacagagcagagaattgagc	ggaagaggaactggcaccta		X	
<i>Tgfb3</i>	<i>Tgfb3_int2</i>	82	actcgtcccagccttagat	gctcatccggtcgaagtatc			X

CHAPITRE 3

3. Expression of immunoproteasome genes is regulated by cell-intrinsic and –extrinsic factors in human cancers

Alexandre Rouette^{1,2,6}, Assya Trofimov^{1,2,3,6}, David Haberl¹, Geneviève Boucher¹, Vincent-Philippe Lavallée^{1,2,4,5}, Giovanni D'Angelo^{4,5}, Josée Hébert^{1,2,4,5}, Guy Sauvageau^{1,2,4,5}, Sébastien Lemieux^{1,3} and Claude Perreault^{1,2,4,*}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer; ²Department of Medicine and ³Department of Computer Science and Operations Research, Université de Montréal; ⁴Division of Hematology-Oncology and ⁵Quebec Leukemia Cell Bank, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

⁶These authors contributed equally to this work

*CORRESPONDENCE: Claude Perreault (claude.perreault@umontreal.ca), Institute for Research in Immunology and Cancer, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7. Phone: 514-343-6126; Fax: 514-343-5839

Scientific Reports, Online publication, Volume 6, Article number 34019, September 23rd 2014

3.1 Présentation de l'article #2

Le stress protéique, caractérisé par l'accumulation de protéine mal repliées et oxydées, est causé principalement par une augmentation du stress oxydatif et de la synthèse protéique, deux caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses. Consistant avec le fait que le protéasome élimine les protéines mal repliées et oxydées, des inhibiteurs de son activité sont utilisés en milieu clinique pour le traitement du myélome multiple (Section 1.4).

En plus d'exprimer le CP, les vertébrés expriment également l'immunoprotéasome (IP) caractérisé par des préférences de dégradation distinctes. Les phénotypes observés récemment chez des cellules génétiquement modifiées et chez des individus avec des mutations montrent que l'IP est notamment impliqué dans la réponse au stress (Sections 1.2, 1.3 et 1.4). Néanmoins, le rôle de l'IP dans le cancer n'a pas été étudié à ce jour.

Pour étudier le rôle de l'IP dans les cellules cancéreuses, nous avons utilisé des données disponibles publiquement provenant du projet *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Au début de l'analyse, plus de 3000 échantillons primaires provenant de 13 cancers humains étaient disponibles ainsi qu'un petit nombre d'échantillons de tissus non-cancéreux pour fin de comparaison. L'expression des gènes codant pour l'IP et le CP fut obtenue à partir du transcriptome généré par séquençage de l'ARNm des échantillons primaires (RNA-Seq). Ceci permet d'abord de comparer l'expression de l'IP et du CP entre des échantillons cancéreux et non-cancéreux. Puis, des données cliniques ont été utilisées pour comparer directement la survie entre des groupes de patients exprimant beaucoup ou peu d'IP (ou CP). Pour comprendre la régulation de l'IP dans les cancers, des données transcriptomiques génomiques et de méthylation d'ADN ont également été analysées. Puis, des analyses de corrélation ont été effectuées pour identifier des fonctions associées à l'expression d'IP. Finalement, les hypothèses générées par les analyses à l'aide d'outils bio-informatiques ont été testées *in vitro* à l'aide de modèles de culture cellulaire.

3.2 Contributions des auteurs

AR⁶: Planification et design expérimental, exécution des expériences, préparation des figures et analyse des résultats (Figures 3.2A-B, 3.2E, 3.3B-F, 3.4, 3.5, 3.7C-F, Tableaux 3.1, 3.S1 et 3.S1 et Figure supplémentaire 3.S1 et 3.S2), écriture du manuscrit

AT⁶: Planification et design expérimental, exécution des expériences, préparation des figures et analyse des résultats (Figures 3.1, 3.2C-D, 3.3A, 3.6, Tableau 3.S3 et Figures supplémentaires 3.S1A-C et 3.S2), écriture du manuscrit

DH: Exécution et analyse d'expériences (Figure 3.7A-B) et révision du manuscrit

GB: Génération des données TCGA et Leucégene, discussion générale et révision du manuscrit

JH: Analyse des résultats, discussion générale et révision du manuscrit

GS: Analyse des résultats, discussion générale et révision du manuscrit

SL: Planification et design expérimental, analyse des résultats, discussion générale et révision du manuscrit

CP: Planification et design expérimental, analyse des résultats, discussion générale et écriture du manuscrit

3.3 Abstract

Based on transcriptomic analyses of thousands of samples from The Cancer Genome Atlas, we report that expression of constitutive proteasome (CP) genes (PSMB5, PSMB6, PSMB7) and immunoproteasome (IP) genes (PSMB8, PSMB9, PSMB10) is increased in most cancer types. In breast cancer, expression of IP genes was determined by the abundance of tumor infiltrating lymphocytes and high expression of IP genes was associated with longer survival. In contrast, IP upregulation in acute myeloid leukemia (AML) was a cell-intrinsic feature that was not associated with longer survival. Expression of IP genes in AML was IFN-independent, correlated with the methylation status of IP genes, and was particularly high in AML with an M5 phenotype and/or MLL rearrangement. Notably, PSMB8 inhibition led to accumulation of polyubiquitinated proteins and cell death in IP^{high} but not IP^{low} AML cells. Co-clustering analysis revealed that genes correlated with IP subunits in non-M5 AMLs were primarily implicated in immune processes. However, in M5 AML, IP genes were primarily co-regulated with genes involved in cell metabolism and proliferation, mitochondrial activity and stress responses. We conclude that M5 AML cells can upregulate IP genes in a cell-intrinsic manner in order to resist cell stress.

3.4 Introduction

All eukaryotes express constitutive proteasomes (CPs) that possess three catalytic subunits (PSMB5, PSMB6 and PSMB7). In addition to CPs, vertebrates also express immunoproteasomes (IPs), in which the catalytic β -subunits are replaced by IFN- γ -inducible homologues: PSMB8 for PSMB5, PSMB9 for PSMB6 and PSMB10 for PSMB7¹. The first non-redundant role ascribed to IPs was their enhanced ability to generate MHC I-associated peptides². However, recent work has revealed that IPs can be expressed by non-immune cells^{3, 4} and that differential cleavage of transcription factors by CPs and IPs has pleiotropic effects on cell function⁵. Indeed, CPs and IPs differentially modulate the abundance of transcription factors that regulate signaling pathways with prominent roles in cell differentiation, inflammation and neoplastic transformation (e.g., NF-kB, IFNs, STATs and Wnt)⁵.

In cancer cells, genomic instability and oncogene addiction cause proteotoxic and oxidative stress⁶. Indeed, aneuploidy and variations in transcript levels produce imbalances in the stoichiometry of protein complexes and thereby lead to accumulation of misfolded proteins (proteotoxic stress) and formation of aggregates⁷⁻⁹. Moreover, oncogenic signaling and dysregulation of mitochondrial function generate reactive oxygen species which damage DNA and proteins (oxidative stress). Proteasomes are key players in stress response since they degrade damaged (misfolded or oxidized) proteins¹⁰⁻¹². Accordingly, cancer cells are presumed to be unduly dependent on proteasomal function¹³. Besides, tumors are commonly infiltrated by IFN- γ -producing lymphocytes specific for neo-antigens¹⁴, and IFN- γ directly upregulates IP genes¹. Hence, several factors could influence the abundance of proteasomes in neoplastic cells.

The goal of our work was therefore to determine whether CPs and IPs were differentially expressed in normal vs. neoplastic human cells and whether the two types of proteasomes played non-redundant roles in cancer cells. Here we report that overexpression of proteasomes is present in a wide variety of cancer types. Differential expression of CP genes had no impact on survival. However, IP upregulation in breast cancer showed a strong correlation with the abundance of interferon-producing tumor infiltrating lymphocytes and was associated with a good prognosis. In contrast, IP upregulation in AML was a cell-intrinsic feature that was not

associated with improved survival. IP expression was particularly high in AML with an M5 phenotype according to the French-American-British (FAB) classification or in AML with an *MLL* rearrangement. IP expression in AML correlated with the methylation status of IP genes, and specific IP inhibition led to accumulation of polyubiquitinated proteins and cell death in IP^{high} but not IP^{low} AML cells. We conclude that expression of IP genes in human cancers is regulated by cancer cell-extrinsic (IFN- γ) and -intrinsic (cell stress) factors. Furthermore, our work identifies a functional vulnerability in IP^{high} AML cells because of an undue sensitivity to treatment with an IP-specific inhibitor.

3.5 Results

3.5.1 Genes encoding proteasome catalytic subunits are overexpressed in several cancer types

In order to evaluate the expression of proteasome catalytic subunits in cancer, we first downloaded RNA-Seq data from TCGA, along with clinical metadata, from the Cancer Genomics Hub (see Materials and Methods). The initial analysis covered primary samples from thirteen tumor types from eleven different tissues, with normal tissue controls available for eight cancer types (Figure 3.1). We analyzed the expression of the three CP- and the three IP-specific catalytic subunits. For the eight cancer types with available normal tissue controls, we found that a mean of five (out of six) proteasome catalytic subunits were slightly, but significantly, overexpressed in cancer samples (range 3-6) relative to normal tissue (Figure 3.1). We conclude that proteasome upregulation is a general feature of cancer tissues.

3.5.2 High expression of IP genes is associated with improved survival in breast cancer

We then sought to determine whether expression of CP- or IP-encoding genes correlated with survival in patients with various cancer types. For each patient in the TCGA cancer cohorts, expression of CP- or IP-encoding genes was transformed in z-score and summed. Based on this score, patient cohorts were separated in two or three groups of similar size (see Methods). This allowed us to evaluate the survival of patients with low or high expression of proteasome genes

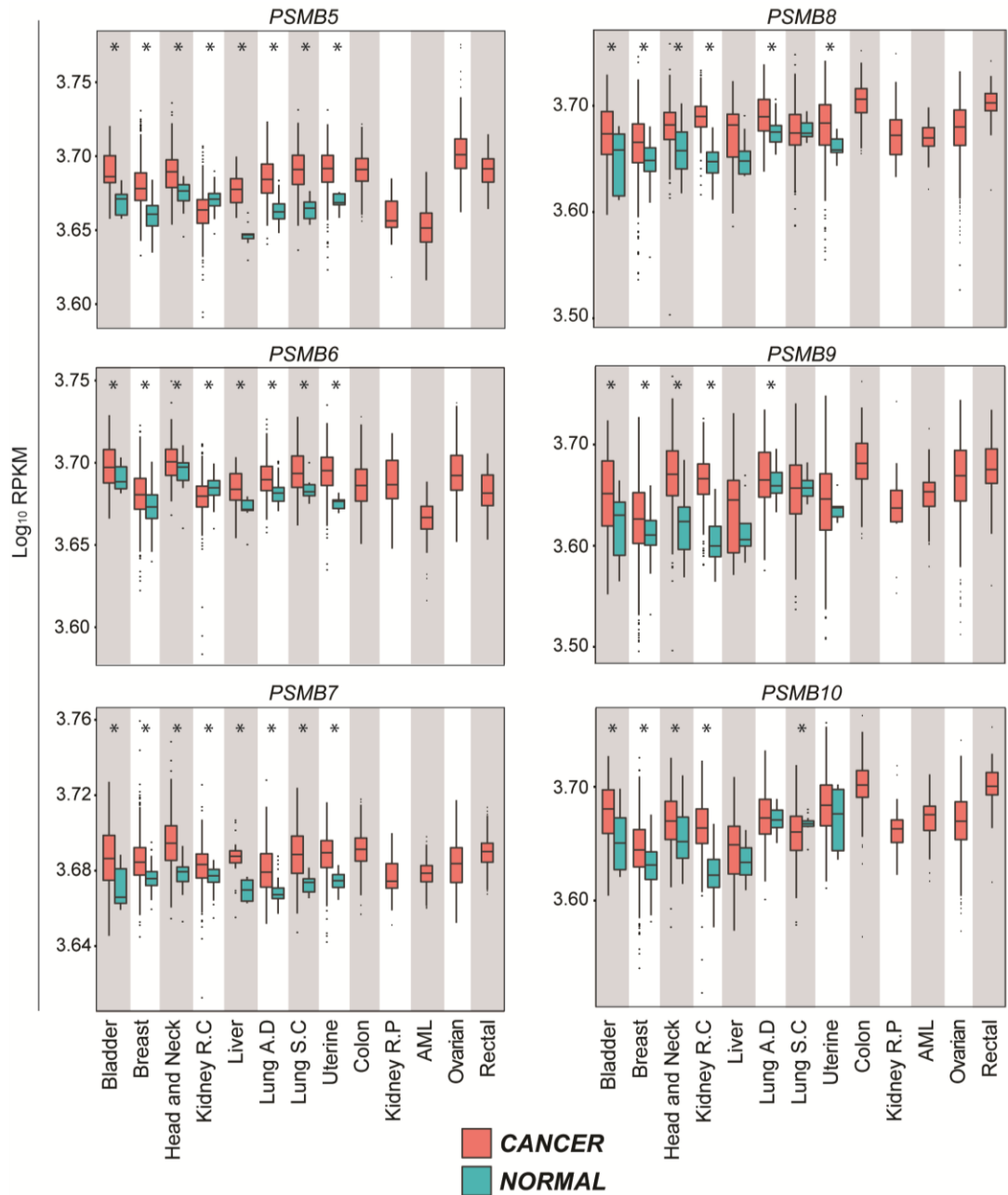


Figure 3.1 Genes encoding proteasome catalytic subunits are overexpressed in several cancer types.

Boxplots of $\log_{10} [1000 \times \text{RPKM} + 1]$ values for genes encoding proteasome catalytic subunits were drawn for the indicated cancer types. CP genes (on the left) are *PSMB5*, *PSMB6* and *PSMB7*, whereas IP genes (on the right) are *PSMB8*, *PSMB9* and *PSMB10*. Red boxplots represent cancer samples and blue boxplots represent normal samples (when data are available). Differences in mean values between groups were determined by two-tailed unpaired Student's t-tests. *Indicates $p < 0.05$. R.C: Renal Cell; R.P: Renal Papillary; AML: Acute Myeloid Leukemia; A.D: Adenocarcinoma; S.C: Squamous Cell.

in their tumor sample. For most cancer types, expression of CP and IP genes showed no correlation with survival (Supplementary Fig. 3.S1). However, IP gene expression did correlate with survival in breast cancer, as IP^{high} status was associated with a decreased risk of death (hazard ratio = 0.53 for 2 groups - Fig. 3.2a & Table 3.1). Indeed, survival at ten years was $61.9\% \pm 11.7\%$ for patients whose IP gene expression ranked in the top third of the cohort (IP^{high}) relative to $36.1\% \pm 8.0\%$ for those in the bottom third (IP^{low}) (Fig. 3.2a). Furthermore, expression of individual IP genes *PSMB8* and *PSMB10* was associated with a decreased risk of death (Supplementary Table 3.S1). However, expression of CP genes did not correlate with survival in breast cancer: i) high global expression of CP genes was not associated better prognosis when the cohort was separated in two or three groups (Fig. 3.2a), and ii) no individual CP gene was associated with prolonged survival (Supplementary Table 3.S1).

Table 3.1 Correlation between risk of death and proteasome expression.

Breast cancer			
Category	# of groups	Hazard Ratio [95% CI]	<i>p</i> -value
CP^{high} vs CP^{low}	2	1.30 [0.83 – 2.02]	0.245
CP^{high} vs CP^{low}	3	1.02 [0.78 – 1.33]	0.887
IP^{high} vs IP^{low}	2	0.53 [0.35 – 0.82]	0.003
IP^{high} vs IP^{low}	3	0.74 [0.56 – 0.97]	0.026
AML			
Category	# of groups	Hazard Ratio [95% CI]	<i>p</i> -value
CP^{high} vs CP^{low}	2	1.35 [0.91 – 1.99]	0.133
CP^{high} vs CP^{low}	3	1.28 [0.79 – 2.08]	0.404
IP^{high} vs IP^{low}	2	1.42 [0.96 – 2.11]	0.076
IP^{high} vs IP^{low}	3	1.54 [0.95 – 2.51]	0.099

Patients were divided into two or three equal groups based on CP or IP z-score. Patients with M3 AML (n = 16) were not included in the analysis because they were not treated with the same chemotherapy regimen as other AML patients. Cox proportional hazards models were used to estimate hazard ratios (high group/low group) and 95% confidence intervals. The log-rank test was used to calculate *p*-values.

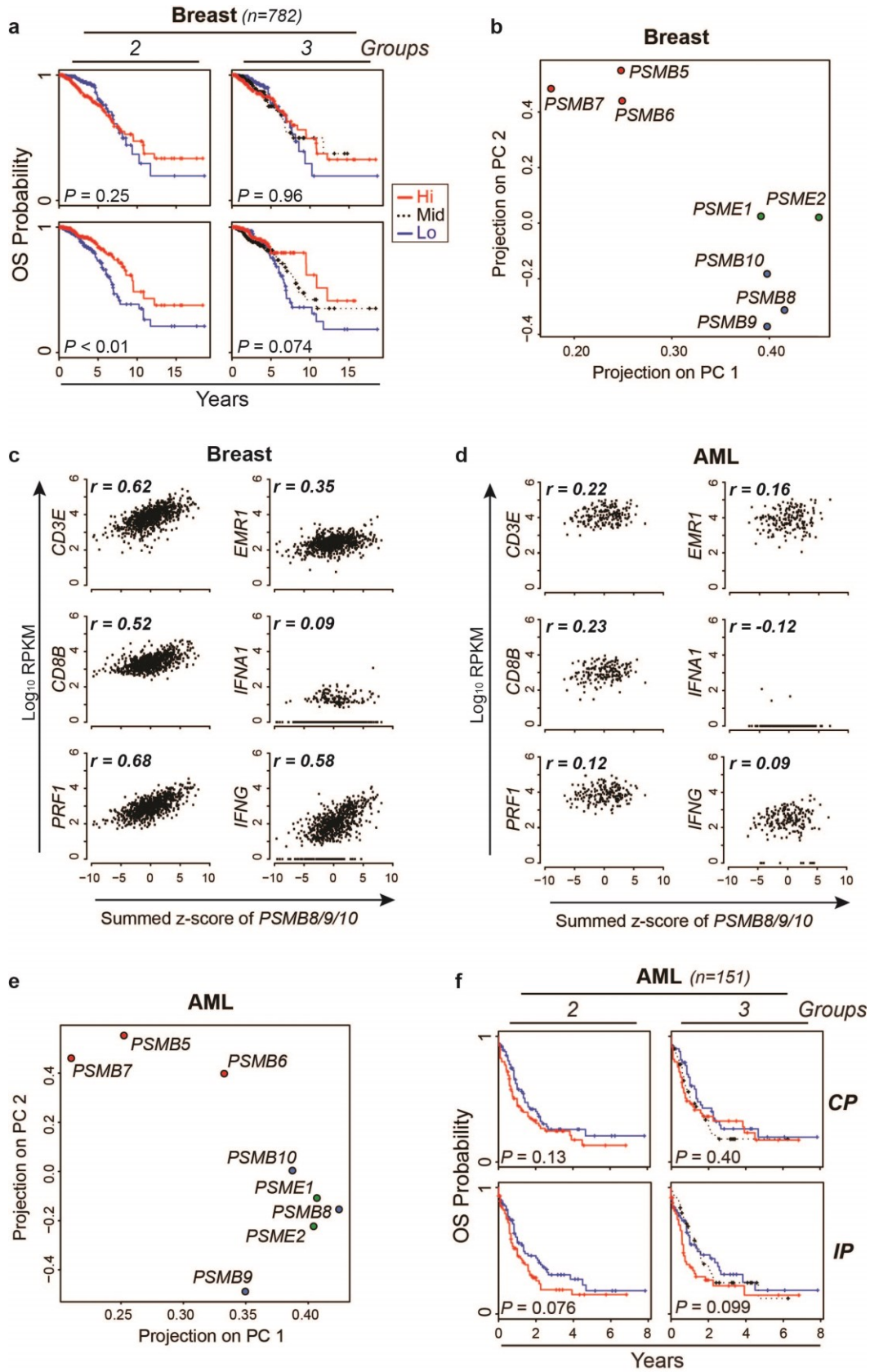


Figure 3.2 Expression of IP subunits is cell-autonomous and correlates with poor outcome in AML.

(a) Kaplan-Meier plots of overall survival (OS) for CP^{high} vs. CP^{low} patients or IP^{high} vs. IP^{low} patients with breast cancer. The log-rank test was used to calculate *p*-values. (b) Principal component analysis was performed on log₁₀ RPKM values for genes encoding CP, IP and regulatory cap subunits (PSME1 and PSME2) in breast cancer. Plots represent the projections on the first and second principal components (PC). (c,d) For AML and breast cancer samples from TCGA, the summed z-scores of *PSMB8/9/10* were plotted against log₁₀ RPKM values of the indicated genes and Pearson's correlation coefficient (*r*) was calculated. (e) Principal component analysis was performed for AML samples as described above. (f) Kaplan-Meier plots of overall survival (OS) for CP^{high} vs. CP^{low} patients or IP^{high} vs. IP^{low} patients in non-M3 AML samples. The log-rank test was used to calculate *p*-values.

3.5.3 IP subunits are co-expressed in breast cancer samples

In normal cells, assembly of IPs is cooperative: the three catalytic subunits (PSMB8, 9 and 10) interact with each other to favor their common incorporation in homogenous IPs¹⁵. However, intermediate proteasomes, containing CP and IP subunits, can be assembled and display some unusual proteolytic cleavage preferences¹⁶. To assess whether CP and IP catalytic subunits were co-expressed in breast cancer samples, we performed a principal component analysis (PCA) on gene expression data for CP- and IP-encoding genes and regulatory subunits PA28 α and PA28 β (encoded by *PSME1* and *PSME2*). PCA enriches for differences and variations by finding a rotation of the input data matrix that maximises the data variations in the first few dimensions. We found that, IP catalytic subunits clustered together with *PSME1* and *PSME2*, apart from the CP subunits (Fig. 3.2b). These results suggest that, like what is found in normal cells³, expression of IP subunits occurs in a coordinated manner in breast cancer cells.

3.5.4 IP expression is cell-autonomous in AML but not in breast cancer

Expression of IPs can be upregulated by cell autonomous signaling or via paracrine secretion of IFN- γ by surrounding NK cells and CD8 T lymphocytes¹⁷. This is particularly relevant in tumors where CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) secrete copious amounts of IFN- γ ^{18, 19}. We therefore asked whether IP expression correlated with the abundance of transcripts reflecting infiltration by CD8 TILs (*CD3E*, *CD8*, *PRF1*), macrophages (*EMRI*) and IFN secretion (*IFNA1*, *IFNG*). Based on RNA-Seq data from TCGA, expression of IP genes

showed a strong correlation with expression of *IFNG* and T-cell genes in breast cancer (Fig. 3.2c). Since infiltration by CD8 TILs is associated with a good prognosis in many cancer types (including breast cancer)²⁰, we surmise that the IP^{high} status in breast cancer is a marker of TIL infiltration and thereby correlates with prolonged survival (Figure 3.2a). IP expression also correlated with the expression of *CD3E*, *CD8* and *PRF1* in colon cancer, another form of solid tumor infiltrated by TILs²¹ (data not shown).

Because infiltration by TILs has not been reported in hematologic malignancies such as AML, we then studied how IP expression was regulated in AML. We found that expression of IP subunits was coordinated in AML, but showed no significant correlation with infiltration by TILs nor with abundance of IFN transcripts (Fig. 3.2d-e). Furthermore, we observed a trend toward better prognosis in patients with IP^{low} relative to IP^{high} AML (Fig. 3.2f, Table 3.1 and Supplementary Table 3.S1), but this trend did not reach statistical significance ($p = 0.07$ taking into consideration all AML subtypes except for acute promyelocytic leukemia – see Methods). Studies on additional patient cohorts will therefore be necessary in order to determine whether IP expression is a prognostic marker in AML. Nonetheless, these data reveal a clear dichotomy in IP regulation between breast cancer and AML, and beg the question: what is the nature of the cell autonomous (TIL-independent) signals that regulate IP levels in AML?

3.5.5 IP subunits are highly expressed in myeloid and lymphoid cancer cell lines

We reasoned that if IP upregulation is cell-intrinsic in AML but TIL-dependent in breast cancer, we should detect higher IP levels in AML cell lines than in breast cancer cell lines (since cell lines contain no TILs). The transcriptional portrait of 675 human cancer cell lines was recently reported²². When we interrogated this resource, we found that, as predicted, IP genes were expressed at higher levels in myeloid leukemias ($n = 21$) than in breast cancer cell lines ($n = 70$) (Supplementary Fig. 3.S2). When we analyzed other types of hematopoietic cancer cell lines, we found high expression of IP genes in lymphoid leukemia and lymphoma cell lines (Supplementary Fig. 3.S2). Two points can be made from these data. First, they support the concept that high expression of IP genes is an intrinsic feature of AML but not breast cancer.

Second, they suggest that overexpression of IP genes may be found not only in AML but also in other types of hematolymphoid malignancies.

3.5.6 IP expression is upregulated in AML with an M5 phenotype or *MLL* rearrangements

AML is a complex and heterogeneous disease, which can be divided into distinct classes based on cytogenetic and molecular profiles²³. Hence, to gain insights into IP regulation and function in primary AML samples, we performed a hierarchical clustering analysis of all TCGA AML samples based solely on the expression of IP-encoding genes (see Methods). This analysis led to the identification of five clusters of AML patients (Fig. 3.3a). Then, enrichment analyses were performed on each cluster for known cytogenetic markers, major translocations or morphologic subtypes (FAB classification) (see Methods). Only enrichment in FAB categories are shown since they yielded significant enrichments: patients with M3 AMLs were found to be enriched in clusters 1 and 2, which express low levels of IP, while M5 AMLs were enriched in clusters 3 and 5, which express high levels of IP (Fig. 3.3a-b). Furthermore, targeted classification of samples according to FAB subtypes confirmed that M5 AMLs expressed higher levels of IP than other FAB classes whereas M3 AMLs expressed lower IP levels (Fig. 3.3c). We also confirmed the overexpression of IP genes in M5 AMLs using the Leucegene cohort (415 samples), an independent cohort of AML samples with RNA-Seq data (Fig. 3.3d)^{24,25}. In AML, *MLL* rearrangements are frequently associated to the M4 and M5 morphologic subtypes, while M3 AML are caused by promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor- α (PML-RARA) oncoproteins²⁶⁻²⁷. Accordingly, we found superior IP gene expression in AMLs with *MLL* fusions in both the TCGA and Leucegene cohorts (Fig. 3.3c,d). Overall, these data show that IP expression is particularly high in AML with an M5 phenotype and/or *MLL* rearrangement.

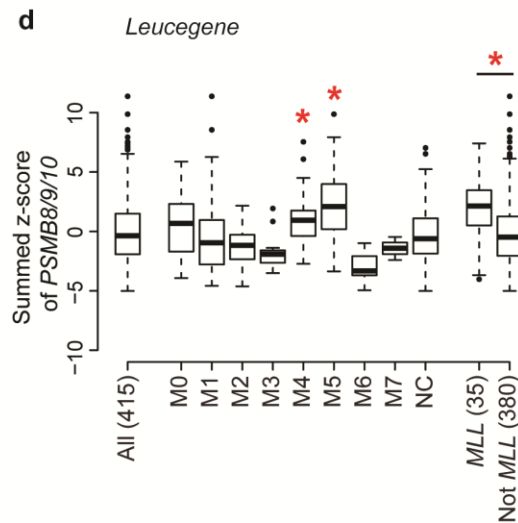
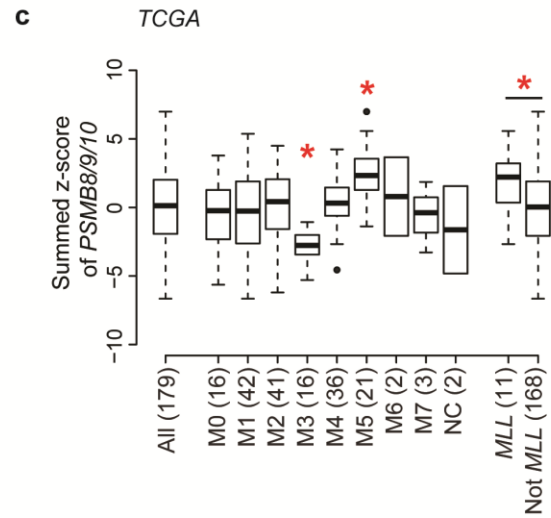
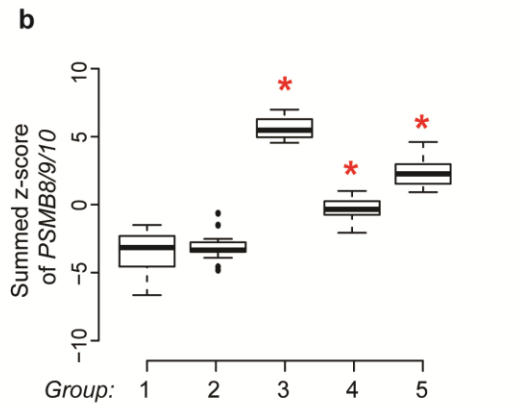
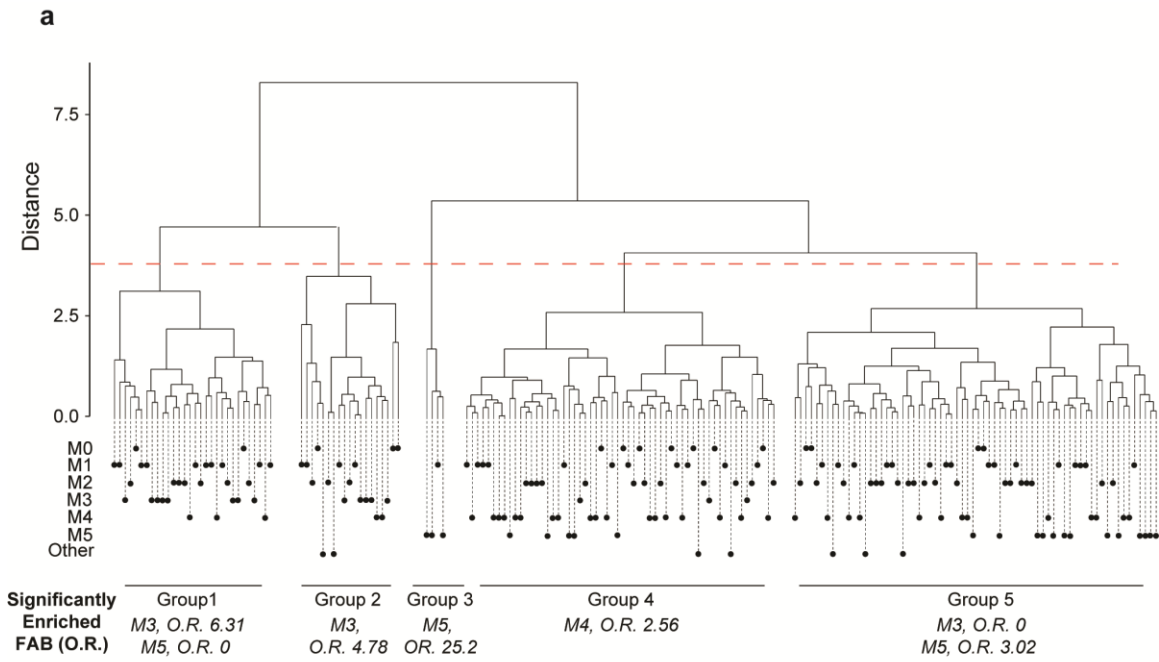


Figure 3.3 IP expression is upregulated in AML with an M5 phenotype or *MLL* rearrangements.

(a) AML samples from TCGA were subjected to hierarchical clustering based on the expression of IP-encoding genes and separated into 5 clusters. Leafs of the dendrogram are annotated with circles that represent individual samples and their FAB subgroup. Enrichment in specific FAB classes within groups was determined by Fisher's exact test and overall enrichment (O.R.) is shown. (b) Summed z-score of *PSMB8/9/10* in groups of patients separated by hierarchical clustering in (a). (c,d) Summed z-score of *PSMB8/9/10* expression in primary AML samples from (c) TCGA or (d) Leucegene cohorts were analyzed according to FAB classification and presence of *MLL* rearrangement. Differences between means of FAB groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, and difference between means as a function of *MLL* status was determined by Student's t-test (*indicates $p < 0.05$). Numbers in parentheses indicate number of samples.

3.5.7 IP expression is regulated by DNA methylation

Next, we sought to investigate the mechanisms responsible for the differential expression of IP subunits in AML, using M5 vs. M3 AMLs as a model for high and low IP-expressing cancer types. First, we analyzed whole-exome and whole-genome sequencing data available from TCGA for AML samples²⁸. No recurrent mutation was present in the coding sequences of IP genes, or in upstream or downstream regulatory sequences ($\pm 9\ 000$ kb; data not shown), leaving epigenetics as a possible mechanism for dysregulation of IP expression in AML. Methylation of DNA is a stable epigenetic modification leading to transcriptional repression²⁹. Interestingly, enzymes that control DNA methylation (*DNMT1* and *DNMT3A/B*) were differentially expressed between M3 and M5 AMLs (Fig. 3.4a). Furthermore, the intensity of DNA methylation on several cytosines located in the coding regions of *PSMB8* and *PSMB9* was inversely correlated to their gene expression (Fig. 3.4b-d). In order to investigate the role of DNA methylation in IP expression, we studied two cell lines: NB4 (M3, PML-RARA+) and THP1 (M5, *MLL-AF9* rearrangement). In accordance with our observations in primary AML samples, NB4 cells expressed low levels of IP genes, relative to the THP1 cells (Fig. 3.5a-b). Treatment with 5-azacytidine, an analog of cytidine inhibiting DNA methyltransferases³⁰, reduced levels of DNMT1 and DNMT3A in NB4 cells after 24 and 48 hours (Fig. 3.5c). Notably, 5-azacytidine treatment increased the expression of *PSMB8* and *PSMB9*, both at the mRNA (Fig. 3.5d) and protein level (Fig. 3.5e-f). We conclude that differential methylation of

IP genes or their promoters can explain their contrasting expression levels in M3 vs. M5 AML. Nonetheless, further studies will be useful to determine the precise mechanisms responsible for the upregulation of IP genes by 5-azacytidine.

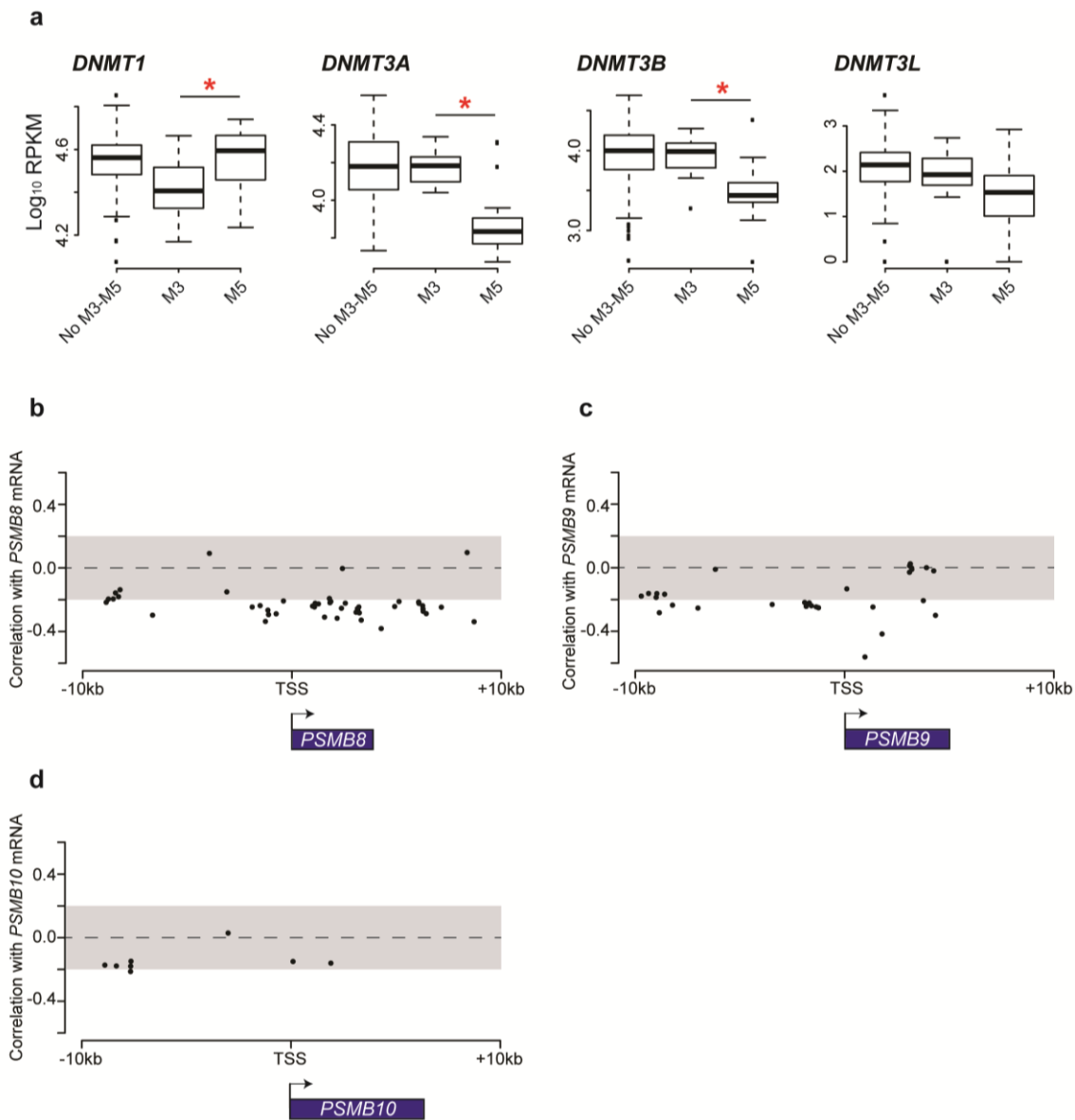


Figure 3.4 DNA methylation in primary AML samples.

(a) Boxplots of log₁₀ [1000 x RPKM + 1] values for the indicated genes in FAB M3 and M5 AMLs. Differences between means were determined by Student's t-test. * indicates $p < 0.05$. (b-d) Correlation coefficient between mRNA expression of (b) *PSMB8*, (c) *PSMB9* and (d) *PSMB10* and intensity of DNA methylation on cytosines located near coding sequences of *PSMB8/9/10* for all AML TCGA samples. Arrows indicates direction of transcription. TSS: Transcription Start Site.

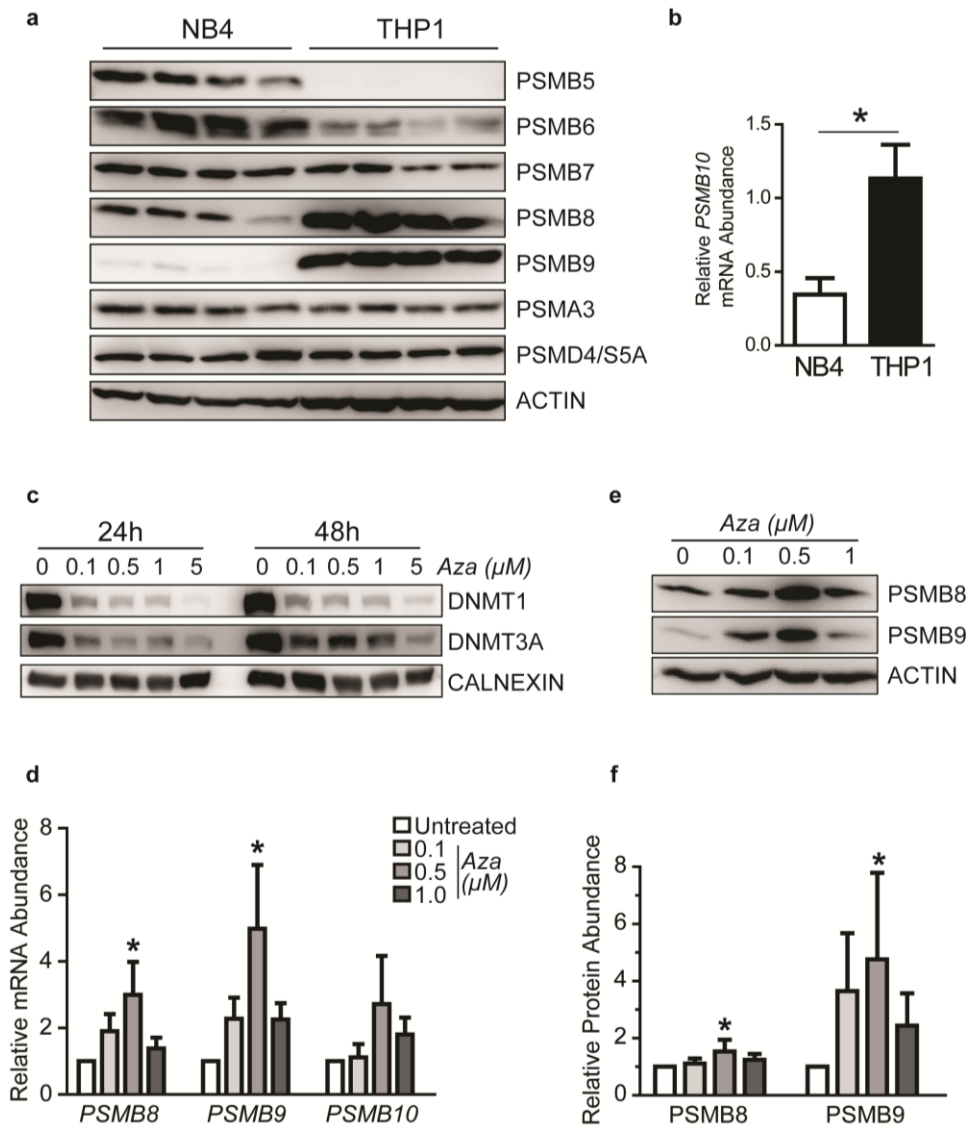


Figure 3.5 5-azacytidine treatment increases levels of *PSMB8* and *PSMB9* in NB4 cells.

(a) Western blot analysis was performed to evaluate expression of proteasome subunits at the protein level in untreated THP1 and NB4 cells. β -actin serves as loading control. (b) Quantitative PCR analysis was performed on untreated THP1 and NB4 cells to determine total levels of *PSMB10* transcripts and data were normalized according to expression of *ACTB* and *TBP* (mean \pm SD of four independent experiments). (c–f) NB4 cells were treated with the indicated concentrations of 5-azacytidine for (c) 24, 48 or (e,f) 72 hours followed by western blot analysis, or (d) for 48 hours followed by quantitative PCR analysis (mean \pm SD of three independent experiments). Data were normalized according to expression of *ACTB* and *TBP* for quantitative PCR and β -actin or Calnexin served as loading control for western blot. Blots are representative of three independent experiments and were quantified using ImageJ software. Differences in means between groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett’s post-hoc test. (*Indicates $p < 0.05$). Aza: 5-azacytidine.

3.5.8 IP expression correlates with distinct functional networks in M5 vs. non-M5 AML

Gene co-expression can yield systems-level insights into the function of genes and networks³¹. In order to investigate the role of IPs in AML subsets we split TCGA AMLs into two classes: M5 and non-M5. We then created correlation networks for each class and performed co-clustering using *OrthoClust* for both networks (Fig. 3.6a). We then retrieved the genes correlated to IP genes within each cluster and performed GO term enrichment on each gene set. Enriched GO terms were grouped into general categories and their distributions were compared (Fig. 3.6b and Supplementary Table 3.S2). We found that genes correlated with IP subunits in non-M5 AMLs were primarily implicated in immune processes. In stark contrast, genes correlated with IP subunits in M5 AMLs were involved in metabolic and cell cycle processes, but not in immune processes. Moreover, genes correlated with PSMB8 and PSMB9 in M5 AMLs were enriched in processes linked to mitochondrial activity and stress responses, respectively. We conclude that while IP genes are mainly instrumental in immune processes in non-M5 AMLs, they are primarily connected to cell metabolism, proliferation and mitochondrial activity in M5 AMLs.

3.5.9 THP1 cells are addicted to IPs

If IP overexpression is linked to vital cell processes specifically in M5 AMLs, then M5 AMLs should be overly sensitive to IP inhibition. To test this hypothesis, we treated THP1 cells (M5, *MLL-AF9* rearrangement) and NB4 cells (M3, PML-RARA+) with non-selective proteasome inhibitors (MG132 and Bortezomib) and with the PSMB8-specific inhibitor ONX-0914³². THP1 and NB4 cells showed high and low IP expression, respectively (Fig. 3.5a-b). MG132 and Bortezomib increased the amounts of polyubiquitinated proteins and decreased the viability of both NB4 and THP1 cells (Fig. 3.7a-d). However, the two cell lines showed divergent responses to ONX-0914. Indeed, ONX-0914 caused a massive accumulation of polyubiquitinated proteins and decreased the viability of THP1 cells, but had no effect on NB4 cells (Fig. 3.7a-d). These data show that, at least for the THP1 cell line, IP overexpression in AML cells correlates with susceptibility to a selective IP inhibitor.

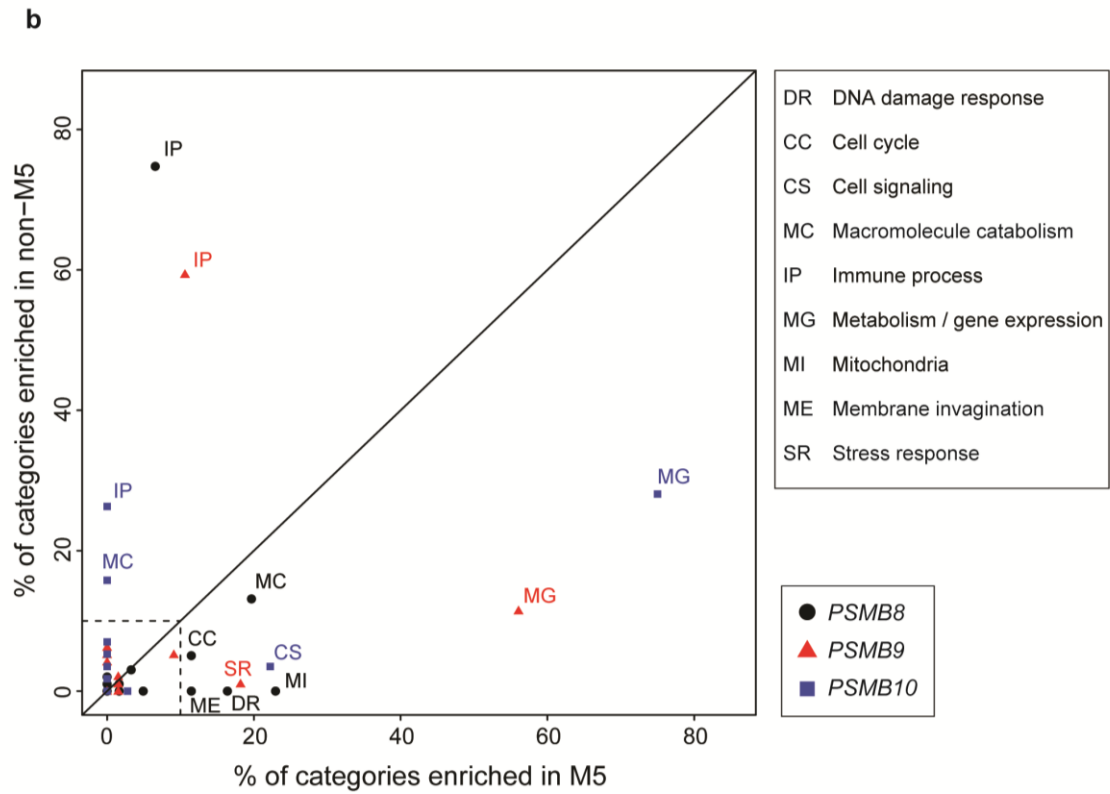
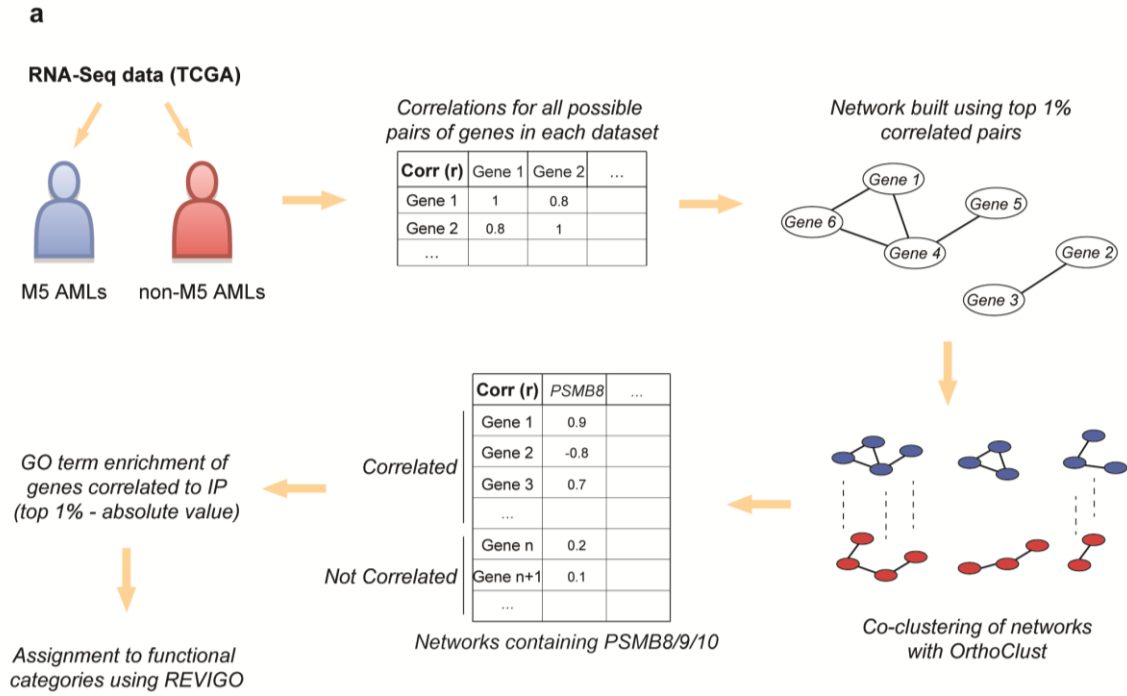


Figure 3.6 IP expression correlates with distinct functional networks in M5 vs. non-M5 AMLs.

(a) Workflow for the analysis of functional networks in M5 vs. non-M5 AMLs. (b) Co-clustering was performed on aligned correlation networks derived from expression of all genes in M5 and non-M5 AMLs. GO term enrichment was performed on genes correlating with IP subunits within their respective cluster. Significantly enriched GO terms were split into general semantically similar process categories using Revigo. The plot represents the % of functional categories for each IP subunit, in M5 and non-M5 AMLs. Categories representing less than 10% are not shown.

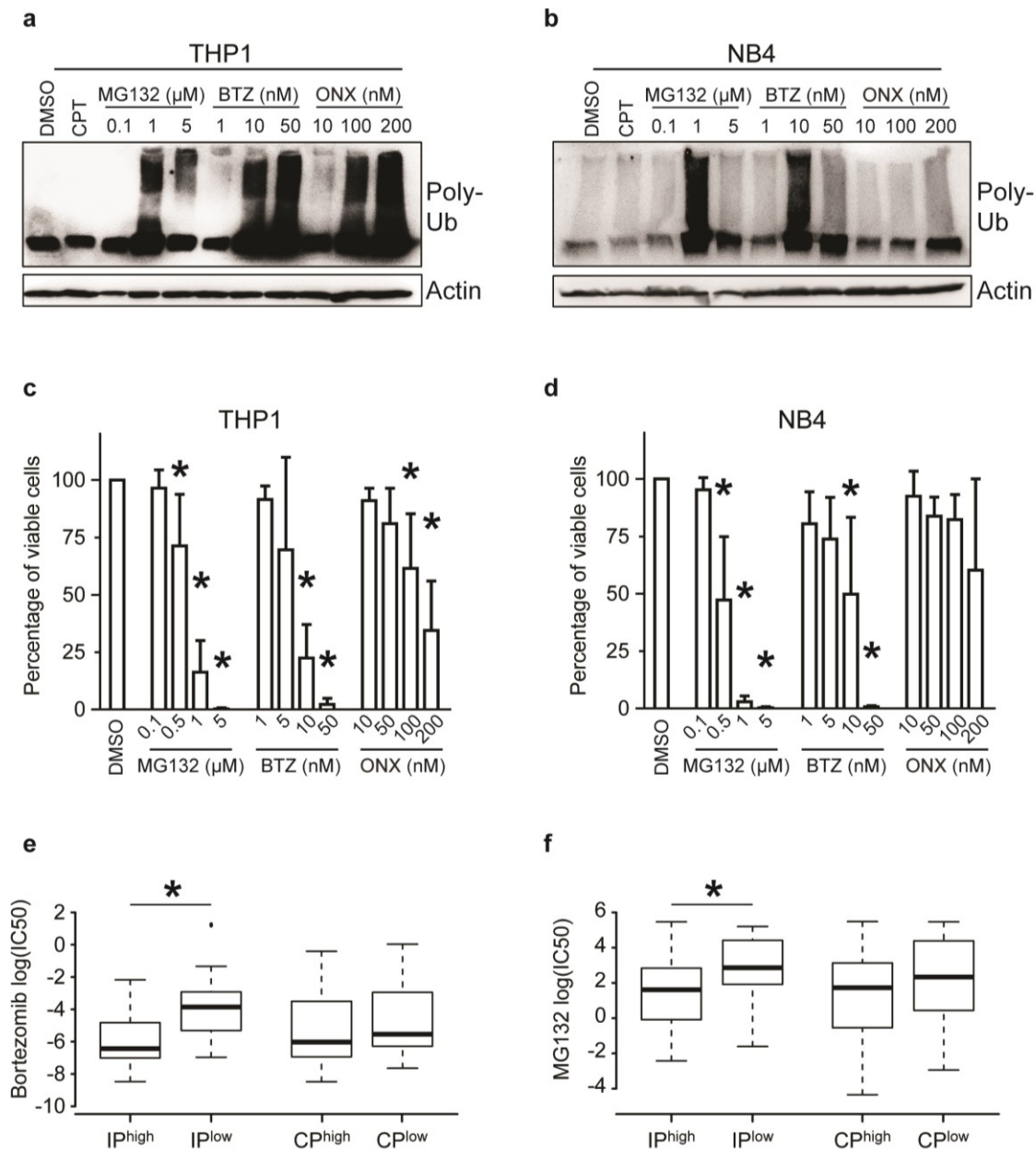


Figure 3.7 THP1 cells are addicted to IPs.

(a) THP1 or (b) NB4 cells were treated for 24 hours with DMSO, 5 μ M camptothecin (CPT), or with the indicated concentrations of MG132, Bortezomib (BTZ) or ONYX-0914 (ONX). Then, western blot analysis was performed to estimate total levels of polyubiquitinated proteins. β -actin served as loading control and blots are representative of three independent experiments. (c) THP1 or (d) NB4 cells were treated for 72 hours with DMSO or with the indicated concentrations of MG132, Bortezomib (BTZ) or ONYX-0914 (ONX), then cell viability was monitored using cell viability luminescence assay (mean \pm SD of four independent experiments). Intensities were normalized as a percentage of viable cells relative to the DMSO control. Differences in means between groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test. (*Indicates $p < 0.05$). (e,f) Cell lines from the Genomics of Drug Sensitivity in Cancer database ($n = 309$) were ranked according to their mean expression of IP or CP genes. Cell lines that ranked above the 90th percentile and below the 10% percentile with regards to proteasome expression were used to create IP^{high}/IP^{low} and CP^{high}/CP^{low} groups. We compared these groups for their sensitivity to (e) Bortezomib and (f) MG132. Differences in log (IC50) between groups were determined by paired Mann-Whitney test (*indicates $p < 0.05$).

3.5.10 IP expression correlates with sensitivity to non-selective proteasome inhibitors

While inhibition of proteasome activity is effective for treatment of several cancer types¹³, there is limited knowledge about mechanisms of resistance to proteasome inhibitors³³. To directly evaluate whether IP expression might regulate resistance to proteasome inhibition, we downloaded data from the Genomics of Drug Sensitivity in Cancer database, a public resource of drug responsiveness and gene expression data collected from a large panel of human cancer cell lines³⁴. We ranked the 309 cell lines with available pharmacogenomic data according to their expression of IP or CP (irrespective of their cell lineage). Then top 10% and bottom 10% groups were used to compare their sensitivity to Bortezomib and MG132. Interestingly, IP^{high} cells were more sensitive to Bortezomib or MG132 treatment than IP^{low} cells, while no differences were observed between CP^{high} and CP^{low} cells (Fig. 3.7e-f). These analyses show that high IP expression is a marker of sensitivity to non-selective proteasome inhibitors.

3.6 Discussion

The present work shows that expression of CP and IP genes is increased in most cancer types. Regulation of IP genes is of particular interest because it is regulated by both cell-intrinsic and –extrinsic factors in different types of cancer. We found that in breast cancer, upregulation of IP genes is a cancer cell-extrinsic process correlating with the presence of IFN- γ -secreting tumor-infiltrating lymphocytes. Hence, in accordance with the fact that lymphocyte infiltrates and IFN- γ secretion in solid tumors are favorable prognostic markers^{14,35,36}, high expression of IP genes correlated with improved survival in patients with breast cancer. In contrast, in AML, upregulation of IP genes did not correlate with improved survival. Furthermore, levels of IP transcripts in AML were found to be IFN-independent and cell-intrinsic features associated with hypomethylation of IP genes. In AML, the three CP genes (PSMB5, 6 and 7) are co-expressed, as are the three IP genes (PSMB8, 9 and 10), but the CP and the IP trios are regulated independently (Fig. 3.2d). In line with this, the total amounts of proteasomes were similar in NB4 and THP1 cells (cf the non-catalytic subunits PSMA3 and PSMD4), but NB4 cells express mainly PSMB5, 6 and 7 CP units whereas THP1 contain mainly PSMB8, 9 and 10 IP units (Fig. 3.5a-b). This is consistent with evidence that IP gene upregulation leads to replacement of CPs with IPs rather than to the addition of IPs to CPs³⁷. Replacement of CPs with IPs can have far reaching consequences. Indeed, these two types of proteasomes show differences in kinetics of substrate processing and in cleavage preferences that can lead to differential expression of thousands of genes^{5,38,39}.

What can explain the cell-autonomous upregulation of IP genes in some cancers, and particularly in AML? One IFN- γ -independent factor was shown to preferentially induce transcription of IPs over CPs: oxidative stress. Indeed, IP upregulation has been reported in cells affected by several degenerative diseases linked to oxidative stress including amyotrophic lateral sclerosis (neurons), Duchenne muscular dystrophy (myocytes) and macular degeneration (retinal cells)⁴⁰⁻⁴³. Notably, relative to normal hematopoietic cells, AML cells have an increased reliance on oxidative phosphorylation and a higher mitochondrial mass, suffer from dysregulated mitochondrial biogenesis and metabolism, and are more susceptible to oxidative stress^{44,45}. Consistent with this, we found that in M5 AML, the IP network was enriched in genes

involved in metabolic processes, mitochondrial function and stress responses (Fig. 3.6). We therefore speculate that IP upregulation in AML cells may be driven by oxidative stress. In fact, from an evolutionary perspective, dealing with oxidative and other forms of cell stress may be the most conserved role of IPs. *PSMB8* and *PSMB9* orthologues have been found in invertebrates (who have no adaptive immune system), including the most basal branch of Metazoans—the placozoan *Trichoplax adhaerens*⁴⁶. In invertebrates, the role of *PSMB8* and *PSMB9* orthologues is to help cells dealing with oxidative and proteotoxic stress. The notion that IPs are important for response to proteotoxic and oxidative stress is consistent with their expression in non-immune cells and their implication in functional processes such as cell differentiation and self-renewal^{3,5,47}. Furthermore, we noted that cells expressing high levels of IP (but not CPs) were unduly sensitive to both selective IP inhibitors and unselective proteasome inhibition (Fig. 3.7). This supports the notion that cell-autonomous IP upregulation is driven by proteotoxic and oxidative stress in cancer cells.

Irrespective of the mechanisms causing IP upregulation in M5 AML cells, their susceptibility to a selective IP inhibitor (Fig. 3.7) identifies a functional vulnerability that warrants further studies. Unselective proteasome inhibitors have anti-myeloma and anti-AML activity¹³. However, since proteasomal activity is required for normal cell function and survival, unselective proteasome inhibitors cause substantial side effects and their therapeutic window is relatively narrow¹³. In contrast, transient inhibition of IPs has no effect on normal cells⁴⁸. Hence, we propose that recently discovered IP-specific inhibitors⁴⁹⁻⁵⁰ could have substantial efficacy for treatment of IP^{high} AMLs (mostly AML with an M5 phenotype and/or MLL rearrangements), and perhaps other types of IP^{high} cancers, particularly those of hematopoietic origin (Supplementary Fig. 3.S2). Systematic analyses using various IP-specific inhibitors on a large panel of hematopoietic cancer cell lines will be required in order to evaluate the potential clinical relevance of IP-specific inhibitors. The correlation that we found between IP gene methylation and expression could also be relevant to AML treatment regimens containing hypomethylating agents, which are being used particularly often in elderly subjects. Indeed, expression of DNMT3A is decreased in M5 AMLs (Fig. 3.4a), and mutations affecting this gene are known to be common and to have a negative impact on prognosis in AML⁵¹. Furthermore, we noted that treatment of the NB4 cell line with the hypomethylating drug 5-azacytidine increased IP

expression (Fig. 3.5d-f). Hence, since our work suggests that IPs help AML cells to withstand oxidative stress, it might be advantageous to include IP-specific inhibitors to regimens containing hypomethylating agents.

3.7 Methods

3.7.1 Gene expression data

For normal and cancer tissues, RNA sequencing (RNA-Seq) datasets were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) Data Portal Hub (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>; BLCAv3.1.1, BRCAv3.1.2, COADv3.3.4, HNSCv3.1.4, KIRCv3.1.1, KIRPv3.1.1, LAMLv3.1.7, LIHCv3.1.0, LUADv3.1.2, LUSCv3.1.3, OVv3.1.5, READv3.1.2, and UCECv3.2.7). RPKM values from each patient were log-transformed ($\log_{10} [1000 * \text{RPKM} + 1]$) for normal/cancer comparison. For all other analyses, log-transformed expression of individual proteasome catalytic subunits (*PSMB5*, *PSMB6* and *PSMB7* for CP, and *PSMB8*, *PSMB9* and *PSMB10* for IP) was transformed to z-score and summed to get global CP or IP z-scores. We defined z-scores as [gene X expression for a given sample – mean gene X expression of all samples] / standard deviation for gene X expression values in all samples]. Pearson's correlation coefficients were calculated between global IP z-scores and log-transformed RPKM expression of indicated genes. For analysis human cancer cell lines, RNA-Seq datasets were obtained from the ArrayExpress database under accession number E-MTAB-2706 (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-2706/>)²². Mean expression of IP genes (Gene IDs for *PSMB8*: 5696, *PSMB9*: 5698 and *PSMB10*: 5699) was calculated for specific cancer cell lineages according to Klijn et al.²². The IC50 values for Bortezomib and MG132 as well as gene expression data across 309 cancer cell lines were obtained from <http://www.cancerrxgene.org/>³⁴. Cell lines were ranked according to their mean expression of IP or CP genes, then top 10% (“high”) and bottom 10% (“low”) groups were isolated and IC50 values of Bortezomib and MG132 were compared between both groups.

3.7.2 Kaplan-Meier curves and survival analyses

For all cancer types, clinical datasets were downloaded from the TCGA Data Portal Hub and relevant information was extracted from `clinical_patient_XXX.txt` files. Columns labeled “vital_status” were used for patient status (expired or living) and columns labeled “days_to_death” and “days_to_last_followup” were used for survival analysis. Analyses were conducted using the R package *survival* (<https://cran.r->

project.org/web/packages/survival/index.html). Samples were divided in two or three equal groups based on global CP or IP z-scores. Cox proportional hazards models were used to estimate hazard ratios (high group/low group) and 95% confidence intervals. The log-rank test was used to calculate *p*-values corrected for three or more comparisons. Since they were not treated with cytarabine-based protocols (like other AML sub-groups), patients with acute promyelocytic leukemia (n=16) were not included in analyses of patient survival (Fig. 3.2 and Table 3.1).

3.7.3 Analysis of DNA methylation

For AML, DNA methylation datasets were downloaded from the TCGA Data Portal Hub and methylation intensity (Beta-value) was retrieved for all sites (n = 485,577). We kept CpG sites for which Beta-value was correlated > 0.2 or < -0.2 with the log-transformed RPKM expression of either *PSMB8*, *PSMB9* or *PSMB10* (Pearson's correlation) in all AML samples. CpG sites present < 10 kb upstream or downstream of the transcription start site of *PSMB8*, *PSMB9* or *PSMB10* were plotted against their level of correlation with expression of *PSMB8*, *PSMB9* or *PSMB10*.

3.7.4 Cell culture

THP-1 and NB4 cell lines were obtained from Dr. Brian Wilhelm (IRIC, Université de Montréal, Canada) and maintained in RPMI-1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). For cell viability assays, THP1 and NB4 cells were seeded at 5×10^4 cells in 100 μ l in 96-well plates and treated for 72 hours with MG132 (EMD millipore, Etobicoke, Canada), Bortezomib (New England Biolabs, Whitby, Canada) or ONX-0914 (Cayman Chemicals, Ann Harbor, MI). CellTiter-Glo Luminescent Viability reagent (Promega, Madison, WI) was added to the wells according to manufacturer's instructions and signal was read using a plate reader. For inhibition of DNA methylation assays, NB4 cells were seeded at 5×10^5 cells in 1 mL in 24-well plates and treated 48 or 72 hours with 5-azacytidine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO).

3.7.5 RT-qPCR analyses

Total RNA was extracted from cells with TRIzol RNA reagent (Thermo Fisher Scientific) and retro-transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCRs were performed using Taqman technology with ViiA™ 7 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) and results were analysed with the ViiA™ 7 software. Primer sequences were designed with the Universal Probe Library system (Roche Life Sciences, Madison, WI) as follows: PSMB8 (Fwd: accccgcgtgacactact, Rev: gggactggaagaattctgtgg, Probe #17), PSMB9 (Fwd: accaaccggggacttacc, Rev: tcaaacactcggttcaccac, Probe #86), PSMB10 (Fwd: ggttcagccgaacatga, Rev: gccaggtcacccaagat, Probe #31).

3.7.6 Western blot analyses

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) containing complete protease inhibitor mixture (Roche Life Sciences), 1 mmol/L Na₃VO₄ pH 9, 5 mmol/L NaF and 10mM NEM (Sigma-Aldrich). Samples were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the following antibodies: anti-β1/PSMB6, anti-β5/PSMB5, anti-LMP2/PSMB10, anti-LMP7/PSMB8 (Abcam, Cambridge, UK); anti-β2/PSMB7, anti-poly-Ub (FK1 clone) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY); anti-PSMA3, anti-S5A/PSMD4 (New England Biolabs); anti-β-actin (AC-15) (Sigma-Aldrich). After incubation with anti-mouse (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) or anti-rabbit (New England Biolabs) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, chemiluminescent signal was detected using SuperSignal™ West Femto Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) and an ImageQuant LAS-4000 imaging system (Fujifilm, GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC, Canada).

3.7.7 Hierarchical clustering

Using R statistical software, the Euclidean distance was calculated for all TCGA AML samples (n = 179), according to expression of *PSMB8*, *PSMB9*, *PSMB10*, followed by hierarchical clustering. The clustering results are shown in a dendrogram tree, built using the R

package *ggdendro* (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggdendro/index.html>). The tree was manually separated into 5 clusters and Fisher's exact tests were performed to determine enrichment in FAB categories within each cluster.

3.7.8 Co-clustering analysis

TCGA AML samples were split into M5 (n = 21) and non-M5 groups (n = 158). Correlation networks were built within each group based on log-transformed RPKM expression values. Network edges were drawn between two genes only when Pearson's correlation absolute value between them was in the first centile. Networks were aligned using distribution similarity (Mann-Whitney-Wilcoxon test, p-value <0.05) of a given gene in both groups, in order to enrich for gene similarities (same distribution and correlations) between groups during the co-clustering. Both networks and their alignment were fed to the computational framework *OrthoClust*⁵², which performed co-clustering of all genes.

3.7.9 GO term enrichment

Within clusters containing IP-encoding genes (*PSMB8*, *PSMB9*, *PSMB10*), all genes correlating with individual IP subunits were extracted, according to the top 1% threshold used previously. GO term enrichment was performed on these gene lists using an in-house written tool (<https://github.com/TrofimovAssya/GOrichr>) that implements a modified threshold Fisher's exact test (Odds Ratio > 2) to avoid detection of slightly enriched terms in large groups. GO terms that passed these thresholds were grouped under general categories using REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>)⁵³ (Supplementary Table S2).

3.7.10 Principal component analysis

The expression of each IP- and CP-encoding genes and of regulatory subunits *PSME1* and *PSME2* was normalized to z-score and put through a principal component analysis using R Statistical Software for breast cancer and AML samples. Samples were projected in two dimensions using the two components accounting for most of the sample variation.

3.8 References

1. Basler,M., Kirk,C.J., & Groettrup,M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 74-80 (2013).
2. de Verteuil,D. *et al.* Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol Cell Proteomics* **9**, 2034-2047 (2010).
3. Wilhelm,M. *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* **509**, 582-587 (2014).
4. Keller,I.E. *et al.* Regulation of immunoproteasome function in the lung. *Sci. Rep.* **5**, 10230 (2015).
5. de Verteuil,D.A. *et al.* Immunoproteasomes shape the transcriptome and regulate the function of dendritic cells. *J Immunol* **193**, 1121-1132 (2014).
6. Luo,J., Solimini,N.L., & Elledge,S.J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* **136**, 823-837 (2009).
7. Wang,S. & Kaufman,R.J. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell Biol.* **197**, 857-867 (2012).
8. Nogueira,V. & Hay,N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4309-4314 (2013).
9. Salomons,F.A. *et al.* Selective accumulation of aggregation-prone proteasome substrates in response to proteotoxic stress. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1774-1785 (2009).
10. Flick,K. & Kaiser,P. Protein degradation and the stress response. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 515-522 (2012).
11. Granados,D.P. *et al.* ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol.* **10**, 10 (2009).
12. Meiners,S. & Eickelberg,O. What shall we do with the damaged proteins in lung disease? Ask the proteasome! *Eur. Respir. J.* **40**, 1260-1268 (2012).
13. Weathington,N.M. & Mallampalli,R.K. Emerging therapies targeting the ubiquitin proteasome system in cancer. *J. Clin. Invest* **124**, 6-12 (2014).
14. Mlecnik,B. *et al.* The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci. Transl. Med.* **8**, 327ra26 (2016).
15. Guillaume,B. *et al.* Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 18599-18604 (2010).
16. Guillaume,B. *et al.* Analysis of the processing of seven human tumor antigens by intermediate proteasomes. *J Immunol* **189**, 3538-3547 (2012).

17. Heink,S., Ludwig,D., Kloetzel,P.M., & Kruger,E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 9241-9246 (2005).
18. Meunier,M.C. *et al.* T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat. Med.* **11**, 1222-1229 (2005).
19. Willimsky,G. & Blankenstein,T. The adaptive immune response to sporadic cancer. *Immunol. Rev.* **220**, 102-112 (2007).
20. Fridman,W.H. *et al.* Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.*(2011).
21. Mlecnik,B. *et al.* Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity* **44**, 698-711 (2016).
22. Klijn,C. *et al.* A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nat Biotechnol.* **33**, 306-312 (2015).
23. Dohner,H., Weisdorf,D.J., & Bloomfield,C.D. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J Med* **373**, 1136-1152 (2015).
24. Lavalley,V.P. *et al.* The transcriptomic landscape and directed chemical interrogation of MLL-rearranged acute myeloid leukemias. *Nat. Genet.* **47**, 1030-1037 (2015).
25. Lavalley,V.P. *et al.* EVI1-rearranged acute myeloid leukemias are characterized by distinct molecular alterations. *Blood* **125**, 140-143 (2015).
26. Munoz,L. *et al.* Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* **17**, 76-82 (2003).
27. Dos Santos,G.A., Kats,L., & Pandolfi,P.P. Synergy against PML-RARa: targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *J Exp. Med.* **210**, 2793-2802 (2013).
28. Cancer Genome Atlas Research Network Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2059-2074 (2013).
29. Baylin,S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2 Suppl 1**, S4-11 (2005).
30. Christman,J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483-5495 (2002).
31. Wang,X. *et al.* Transcription factor-pathway coexpression analysis reveals cooperation between SP1 and ESR1 on dysregulating cell cycle arrest in non-hyperdiploid multiple myeloma. *Leukemia* **28**, 894-903 (2014).
32. Muchamuel,T. *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.* **15**, 781-787 (2009).

33. Kale,A.J. & Moore,B.S. Molecular mechanisms of acquired proteasome inhibitor resistance. *J Med Chem.* **55**, 10317-10327 (2012).
34. Garnett,M.J. *et al.* Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* **483**, 570-575 (2012).
35. Kelderman,S., Schumacher,T.N., & Haanen,J.B. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Mol Oncol.* **8**, 1132-1139 (2014).
36. Webb,J.R., Milne,K., Watson,P., Deleuw,R.J., & Nelson,B.H. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with Increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 434-444 (2014).
37. Khan,S. *et al.* Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol* **167**, 6859-6868 (2001).
38. Toes,R.E. *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* **194**, 1-12 (2001).
39. Mishto,M. *et al.* Modeling the in vitro 20S proteasome activity: the effect of PA28-ab and of the sequence and length of polypeptides on the degradation kinetics. *J. Mol. Biol.* **377**, 1607-1617 (2008).
40. Ethen,C.M. *et al.* Transformation of the proteasome with age-related macular degeneration. *FEBS Lett.* **581**, 885-890 (2007).
41. Bendotti,C. *et al.* Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* **97**, 101-126 (2012).
42. Chen,C.N., Graber,T.G., Bratten,W.M., Ferrington,D.A., & Thompson,L.V. Immunoproteasome in animal models of Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res. Cell Motil.* **35**, 191-201 (2014).
43. Dantuma,N.P. & Bott,L.C. The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Front Mol. Neurosci.* **7**, 70 (2014).
44. Sriskanthadevan,S. *et al.* AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood* **125**, 2120-2130 (2015).
45. Lagadinou,E.D. *et al.* BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 329-341 (2013).
46. Suurvali,J. *et al.* The proto-MHC of placozoans, a region specialized in cellular stress and ubiquitination/proteasome pathways. *J. Immunol.* **193**, 2891-2901 (2014).
47. Atkinson,S.P. *et al.* A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **30**, 1373-1384 (2012).
48. Basler,M. *et al.* Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *EMBO Mol. Med.* **6**, 226-238 (2014).

49. de Bruin,G. *et al.* Structure-based design of either beta1i or beta5i specific inhibitors of human immunoproteasomes. *J Med. Chem.* **57**, 6197-6209 (2014).
50. Miller,Z., Lee,W., & Kim,K.B. The immunoproteasome as a therapeutic target for hematological malignancies. *Curr Cancer Drug Targets.* **14**, 537-548 (2014).
51. Yang,L., Rau,R., & Goodell,M.A. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* **15**, 152-165 (2015).
52. Yan,K.K. *et al.* OrthoClust: an orthology-based network framework for clustering data across multiple species. *Genome Biol.* **15**, R100 (2014).
53. Supek,F., Bosnjak,M., Skunca,N., & Smuc,T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS. One.* **6**, e21800 (2011).

3.9 Acknowledgements

We thank the personnel of the bioinformatics, genomics and screening core facilities of the Institute for Research in Immunology and Cancer for assistance. We acknowledge the team of the Banque de cellules leucémiques du Québec (BCLQ) who provided and characterized all AML samples included in the Leucegene cohort. The BCLQ is supported by grants from the Cancer Research network of the Fonds de Recherche du Québec-Santé. This work was supported by the Canadian Cancer Society (Grant number 701564). A. Rouette was supported by studentships from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Cole Foundation. A. Trofimov is supported by a CIHR studentship. C. Perreault and G. Sauvageau hold Canada Research Chairs in Immunobiology, and in Molecular Genetics of Stem Cells, respectively. J. Hébert holds a Université de Montréal Research Chair in Leukemia, supported by Industrielle-Alliance.

3.10 Author Contributions

AR, AT, SL and CP designed experiments. AR, AT, DH, GB, VPL and GD performed experiments. AR and AT wrote the first draft of the manuscript. SL, GS, JH and CP analyzed data and edited the final manuscript.

3.11 Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

3.12 Supplementary Information

Expression of immunoproteasome genes is regulated by cell-intrinsic and –extrinsic factors in human cancers

Alexandre Rouette^{1,2,6}, Assya Trofimov^{1,2,3,6}, David Haber¹, Geneviève Boucher¹, Vincent-Philippe Lavallée^{1,2,4,5}, Giovanni D’Angelo^{4,5}, Josée Hébert^{1,2,4,5}, Guy Sauvageau^{1,2,4,5}, Sébastien Lemieux^{1,3} and Claude Perreault^{1,2,4,*}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer; ²Department of Medicine and ³Department of Computer Science and Operations Research, Université de Montréal; ⁴Division of Hematology-Oncology and ⁵Quebec Leukemia Cell Bank, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

⁶These authors contributed equally to this work

*CORRESPONDENCE: Claude Perreault (claude.perreault@umontreal.ca), Institute for Research in Immunology and Cancer, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7. Phone: 514-343-6126; Fax: 514-343-5839

Supplemental Table 3.S1. Risk of death associated to expression of proteasome encoding genes.

Supplemental Table 3.S2. Functional categories associated to genes specifically correlating with IP in M5 or non-M5 AMLs

Supplemental Figure 3.S1. Correlation of CP or IP expression with survival outcome.

Supplemental Figure 3.S2. IP expression in human cancer cell lines.

Breast cancer		
Gene Name	Hazard Ratio [95% Confidence Interval]	<i>p</i> -value
<i>PSMB5</i>	0.56 [0.15 – 2.12]	0.393
<i>PSMB6</i>	0.47 [0.11 – 2.06]	0.316
<i>PSMB7</i>	1.49 [0.29 – 7.65]	0.634
<i>PSMB8</i>	0.34 [0.18 – 0.63]	0.001
<i>PSMB9</i>	0.60 [0.34 – 1.04]	0.067
<i>PSMB10</i>	0.31 [0.14 – 0.66]	0.003
AML		
Gene Name	Hazard Ratio [95% Confidence Interval]	<i>p</i> -value
<i>PSMB5</i>	2.95 [0.82 – 10.7]	0.099
<i>PSMB6</i>	2.82 [0.66 – 12.1]	0.162
<i>PSMB7</i>	2.14 [0.19 – 24.4]	0.541
<i>PSMB8</i>	6.30 [1.56 – 25.6]	0.001
<i>PSMB9</i>	2.25 [0.88 – 5.73]	0.088
<i>PSMB10</i>	2.85 [0.91 – 8.93]	0.072

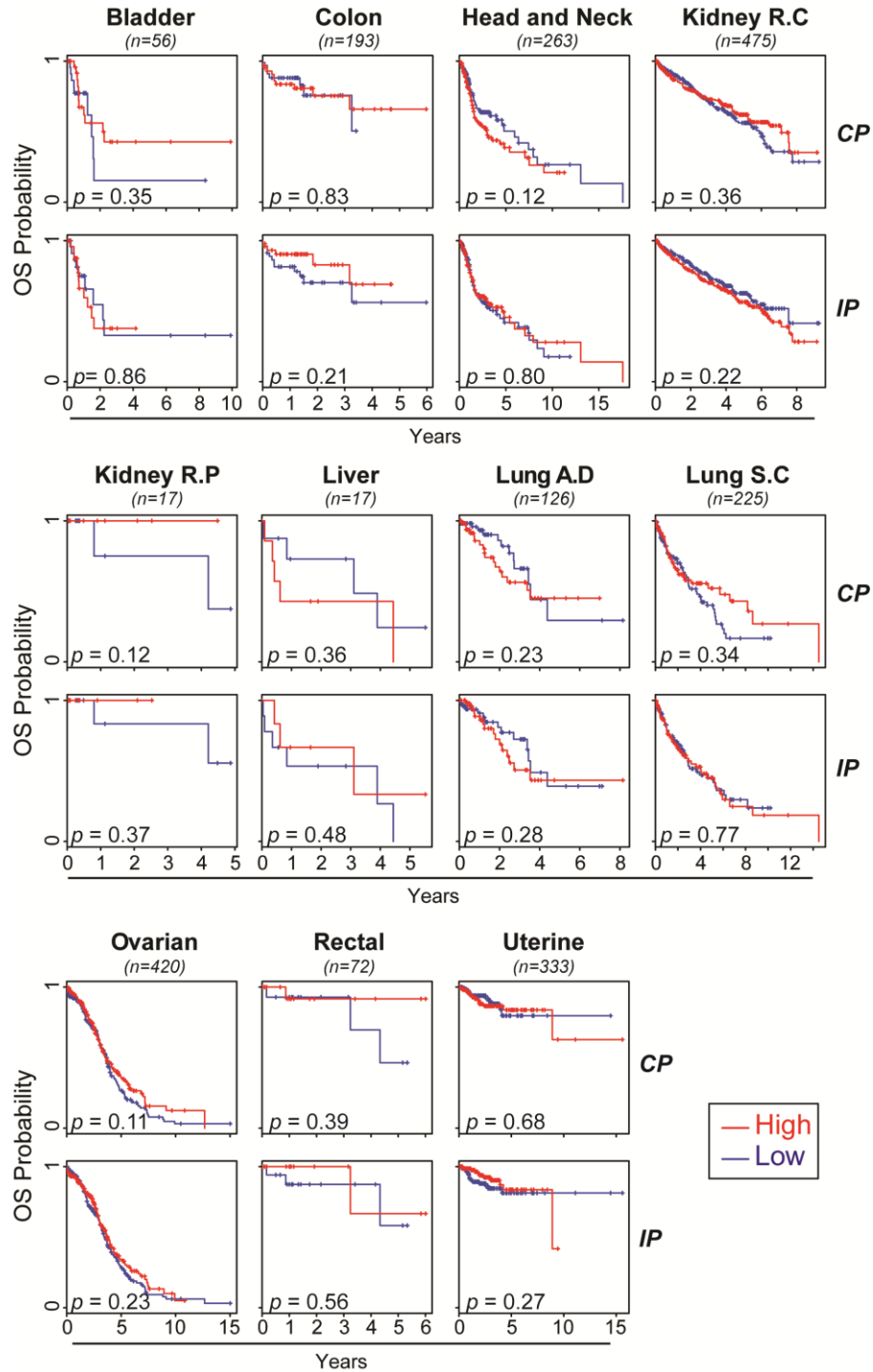
Supplementary Table 3.S1 Risk of death associated to expression of proteasome encoding genes.

Cox proportional hazards models were used to estimate hazard ratios, 95% confidence intervals and *p*-values associated with expression of proteasome-encoding genes as linear covariates.

Functional Category	M5 <i>PSMB8</i>	M5 <i>PSMB9</i>	M5 <i>PSMB1</i> 0	non-M5 <i>PSMB8</i>	non-M5 <i>PSMB9</i>	non-M5 <i>PSMB1</i> 0
Apoptotic process	3.3	1.5	0.0	3.0	2.1	0.0
Cell cycle	11.5	9.1	0.0	5.1	5.2	7.0
Death	1.6	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0
DNA damage response	16.4	0.0	0.0	0.0	4.2	1.8
Immune process	6.6	10.6	0.0	74.8	59.4	26.3
Macromolecule catabolism	19.7	0.0	0.0	13.1	5.2	15.8
Membrane invagination	11.5	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0
Mitochondria	23.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5
Multi-organism process	1.6	1.5	0.0	1.0	1.0	5.3
Viral process	4.9	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0
Metabolism and gene expression	0.0	56.1	75.0	1.0	11.5	28.1
Stress response	0.0	18.2	0.0	0.0	1.0	3.5
Cell signaling	0.0	0.0	22.2	2.0	6.3	3.5
Extracellular transport	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	0.0
Cellular component organisation	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3

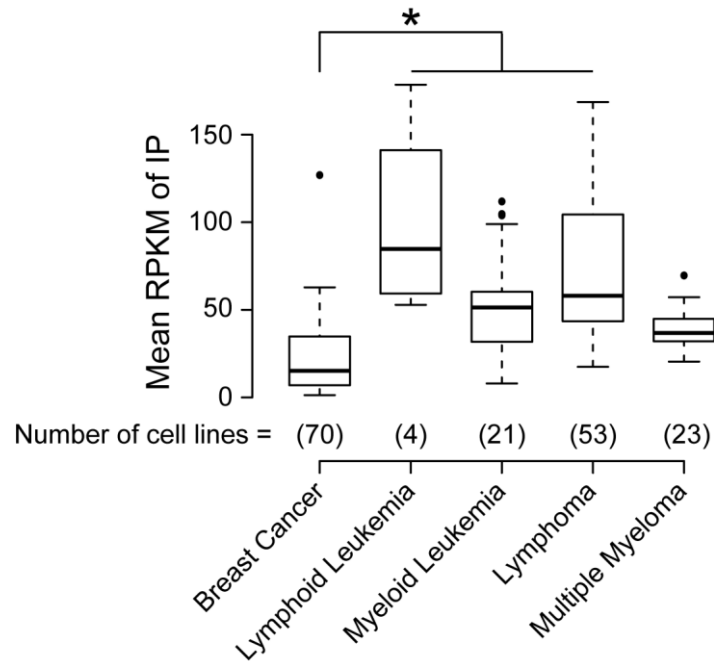
Supplementary Table 3.S2 Functional categories associated to genes specifically correlating with IP in M5 or non-M5 AMLs.

Enriched gene-ontology terms for genes specifically correlated to IP genes in M5 and non-M5 AMLs were assigned to functional categories using Revigo (see Figure 3.6 and Methods). Each functional category is depicted as a percentage of total categories for its column and plotted in Figure 3.6.



Supplementary Figure 3.S1 Correlation of CP or IP expression with survival outcome.

Patients were divided in two equal groups based on CP or IP z-score. Kaplan-Meier plots of overall survival (OS) for CP^{high}/CP^{low} patients, or IP^{high}/IP^{low} patients are shown for the indicated cancer type. *p*-values were calculated using the log-rank test. R.C: Renal Cell; R.P: Renal Papillary; A.D: Adenocarcinoma; S.C: Squamous Cell.



Supplementary Figure 3.S2 IP expression in human cancer cell lines.

Boxplots of the mean RPKM of *PSMB8*, *PSMB9* and *PSMB10*. Numbers in parenthesis indicate the number of cell lines per disease type. Differences between means were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test. * indicates $p < 0.01$.

CHAPITRE 4

4. Discussion

Deux voies majeures de dégradation ont été décrites pour la plupart des protéines chez les eucaryotes : le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie. Le système ubiquitine-protéasome est responsable de la dégradation de la majorité des protéines incluant des protéines instables, anormales et à courte durée de vie. L'autophagie est principalement responsable de la dégradation de protéines à longue durée de vie, d'agrégats insolubles ainsi que d'organelles endommagées. Dans la présente thèse, nous avons étudié le système de dégradation du protéasome et la fonction des différentes sous-unités catalytiques qui le composent³¹⁰. Le protéasome est exprimé et actif chez tous les organismes eucaryotes, de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* à l'humain, et possède une remarquable conservation de structure et fonction. En plus des sous-unités catalytiques formant le protéasome standard (CP), les vertébrés expriment également des sous-unités catalytiques additionnelles pour former l'immunoprotéasome (IP) et le thymoprotéasome (TP). Dans la présente thèse, nous avons découvert un rôle inédit pour l'IP dans la régulation de l'expression de milliers de gènes. Cette découverte élargit le champ des connaissances sur les fonctions biologiques déjà connues de l'IP non reliées à la génération d'antigènes pour le complexe majeur histocompatibilité de classe I (CMH-I). De plus, elle possède des implications mécanistiques et biologiques importantes pour les cellules qui expriment l'IP de façon constitutive ou en réponse à l'interféron- γ (IFN- γ). Nous avons également découvert que l'IP est surexprimé chez des cancers non-hématologiques et hématologiques respectivement de façon dépendante et indépendante de l'IFN- γ . Nous avons aussi démontré que l'inhibition de l'IP à l'aide d'un inhibiteur spécifique est cytotoxique pour des cellules leucémiques en culture. Sachant que des inhibiteurs du protéasome sont utilisés dans le milieu clinique, cette découverte pourrait avoir de potentielles implications thérapeutiques. Dans ce chapitre, nous allons discuter des implications de ces découvertes par rapport aux connaissances actuelles et des mécanismes moléculaires par lequel l'IP possède un impact sur ces fonctions biologiques et pathologique de façon non-redondante avec le CP.

4.1 Un rôle pour l'IP dans la régulation de l'expression génique

Bien que certaines observations laissent croire initialement que l'IP puisse affecter l'expression de plusieurs gènes de façon non-redondante avec le CP (Section 1.3.3), l'ampleur de son impact fut inattendue. La principale conclusion de la section 4.1 est qu'un IP homogène affecte la transcription de plusieurs gènes à tous les stades de la maturation des cellules dendritiques à travers son activité catalytique.

4.1.1 L'effet de l'IP sur l'expression des gènes est vaste, complexe et dynamique

La délétion des sous-unités de l'IP chez les cellules dendritiques *PSMB8^{-/-}/PSMB10^{-/-}* (double *knock-out* [dKO]) affecte l'abondance de l'ARNm de plus de 8 000 gènes au cours de leur maturation (Chapitre 2). Afin de mieux en comprendre l'étendue, il est important de noter que l'absence d'IP affecte l'abondance de 64,5% des ~10 000 gènes qui sont normalement modulés par le traitement au lipopolysaccharide (LPS) dans les cellules provenant de souris de type sauvage. De plus, l'impact de l'IP sur la transcription est complexe, puisque les 8 000 gènes peuvent être subdivisés en 15 groupes différents sur la base de leur ratio d'expression dKO par rapport à type sauvage à chaque temps de stimulation au LPS (Figure 2.4). Cet impact est également très dynamique car l'IP peut retarder ou accélérer l'induction ainsi que la répression de gènes à un temps précis de la stimulation au LPS. Pour ces gènes, l'IP affecte probablement des régulateurs activés ou réprimés à un temps très spécifique de la maturation. D'autres gènes sont différentiellement abondants à tous les temps de traitement, impliquant probablement des régulateurs ubiquitaires ou des modifications épigénétiques stables. Finalement, on observe chez les cellules dKO, à tous les stades de maturation, des nombres similaires de gènes réprimés et surexprimés (Figure 2.4B), indiquant que la délétion de l'IP affecte des processus d'activation et de répression transcriptionnelle de façon équivalente.

4.1.2 Un IP homogène est nécessaire pour affecter le transcriptome

Les cellules dendritiques de type sauvage et les cellules dKO possèdent des quantités équivalentes de protéasome (Figure 2.S1A). Cependant, alors que les cellules de type sauvage

possèdent à la fois de l'IP et du CP¹⁴², les cellules dKO ont des protéasomes CP quasi-homogènes dû à la perte de stabilité de la sous-unité PSMB9 de l'IP en absence des deux autres sous-unités (Figure 2.S1B et Section 1.2.3). La délétion d'une seule sous-unité de l'IP n'affectant pas l'expression de la majorité des gènes testés (*Psm8*^{-/-} ou *Psm10*^{-/-}, Figure 2.2A), ceci suggère que PSMB8 et PSMB10 ont soit des rôles redondants ou soit des rôles différents mais synergiques sur l'expression différentielles des gènes testés. Ces données suggèrent également que des protéasomes mixtes, incorporant des sous-unités de l'IP et du CP et abondants chez les cellules dendritiques¹⁴⁸ (Section 1.2.2.3), ne sont pas responsables des différences observés dans l'abondance des gènes entre cellules de type sauvage et dKO. Nos données montrent donc que la formation d'un IP homogène est nécessaire pour affecter l'abondance des gènes testés.

Parmi les gènes non-testés, il est possible que des gènes différentiellement abondants entre cellules de type sauvage et dKO puissent être affectés par la perte d'une seule sous-unité mais aussi que l'absence d'une sous-unité de l'IP puisse affecter l'expression de gènes qui ne sont pas différentiellement abondants entre cellules de type sauvage et dKO. Ces possibilités pourraient être expliquées par un rôle spécifique d'une sous-unité de l'IP ou par un gain de fonction lié à l'apparition de protéasomes mixtes.

4.1.3 L'IP affecte la transcription de l'ARNm

Des différences dans l'abondance d'un ARNm peuvent être dues à trois facteurs : la synthèse *de novo* (i.e. transcription), la vitesse de maturation du pré-ARNm et la vitesse de dégradation de l'ARNm (Figure 4.1). Nos résultats montrent que la délétion des sous-unités de l'IP n'affecte pas la vitesse de dégradation de l'ARNm, puisque la demi-vie de l'ARNm est similaire entre les cellules dendritiques de type sauvage et dKO pour les gènes testés (Figure 2.3A-B). De plus, elle n'affecte pas la vitesse de maturation du pré-ARNm, étant donné que pour la majorité des gènes testés les différences d'abondance entre cellules de type sauvage et dKO sont conservées entre les formes matures et immatures de l'ARNm (Figure 2.3C). Nous concluons donc que les différences d'abondance de gènes entre les cellules dendritiques de type sauvage et dKO sont dues à des différences dans le taux de transcription, c'est-à-dire

l'expression génique (Figures 4.1 et 4.2). De façon concordante, il a été montré que l'abondance d'un ARNm est expliquée par le taux de transcription dans 80% des cas dans plusieurs types cellulaires³¹¹, notamment chez les cellules dendritiques en cours de maturation³¹². La manière de confirmer que l'IP affecte le taux de transcription sera discuté dans les perspectives (Section 4.9).

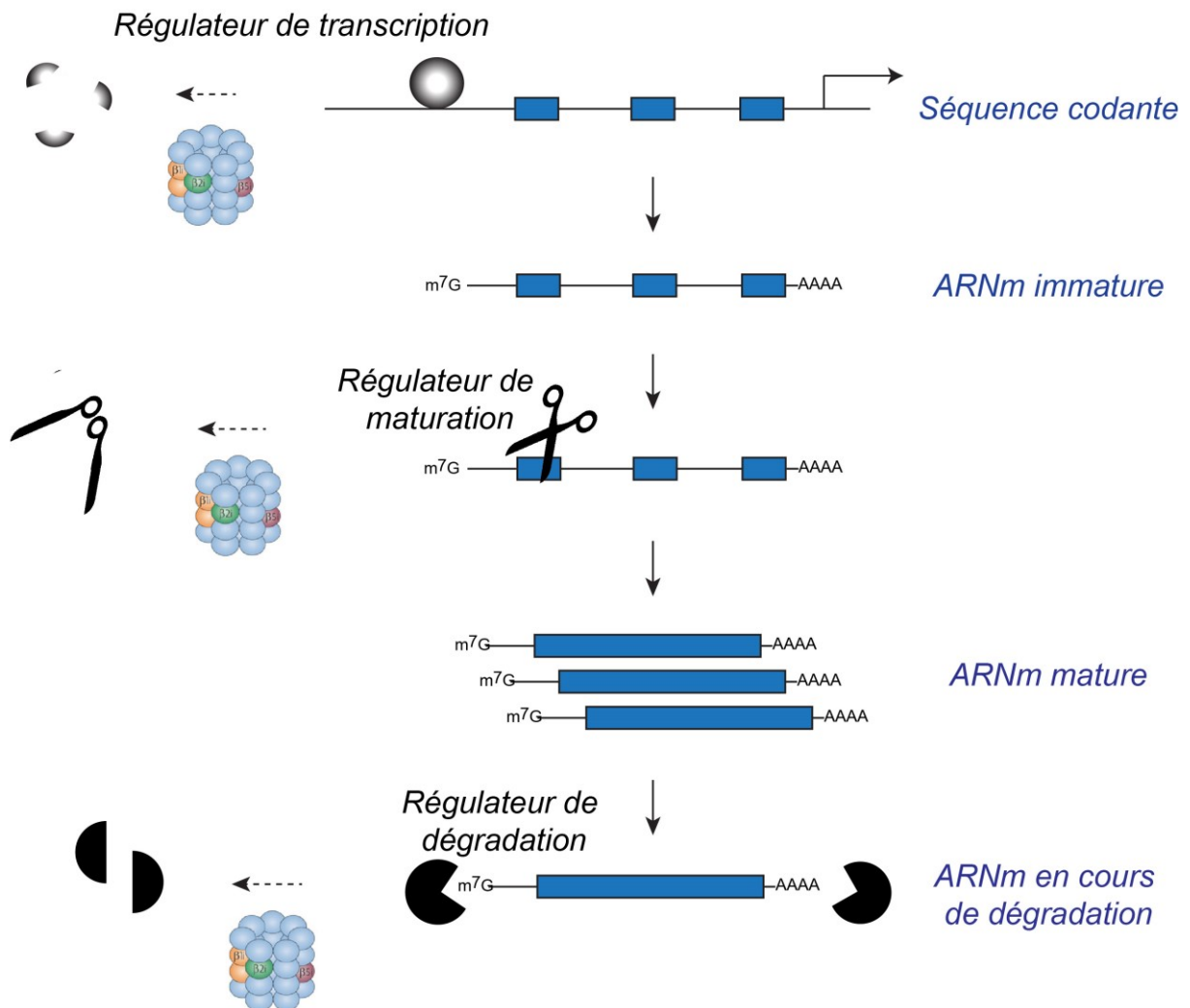


Figure 4.1 Comment l'IP pourrait affecter l'expression génique.

Des différences dans l'abondance d'un ARNm peuvent être dues à trois facteurs : la synthèse *de novo* (i.e. transcription) de l'ARNm immature à partir de la séquence codante d'un gène, la vitesse de maturation de l'ARNm et la vitesse de dégradation de l'ARNm. Ces trois processus sont contrôlés par des régulateurs dont l'abondance est dépendante du protéasome.

4.1.4 L'activité catalytique du protéasome est couplée aux différences d'expression génique entre cellules de type sauvage et dKO

Pour tester l'impact de l'activité catalytique sur l'expression génique, cinq gènes parmi les plus fortement exprimés et montrant une grande différence d'expression entre les cellules de type sauvage et dKO ont été sélectionnés (Figure 2.2B-C). L'inhibition non-sélective de l'activité du protéasome pendant deux heures est capable d'abolir les différences dans l'expression de *Bmp2k*, *Cxcl11* et *Apobec3*. Ceci montre un lien étroit entre l'expression de ces gènes et l'activité du protéasome. En revanche, les différences d'expression de *Dlc1* et *Gdgd3* ne sont pas affectées par l'inhibition de l'activité du protéasome. Ces résultats suggèrent que l'IP affecte la protéolyse de régulateurs de transcription à courte et longue durée de vie. En effet il a été montré d'une part que l'inhibition du protéasome pendant deux heures est suffisante pour bloquer la dégradation du suppresseur de tumeur P53 et augmenter l'expression de ses gènes en quelques heures³¹³. D'autre part, sachant que la médiane de demi-vie d'une protéine est de 46 heures³¹⁴, l'IP pourrait également affecter la protéolyse de régulateurs de transcription avec une durée de vie plus longue que la durée de l'expérience, soit supérieure à 16h pour *Dlc1* et *Gdgd3*.

4.2 L'IP affecte la protéolyse de régulateurs de transcription

Il a été montré que le protéasome, sans égard à la nature des sous-unités catalytiques, peut exercer un impact sur la transcription par la protéolyse de régulateurs de transcription^{226, 227} (Section 1.3.3). Les cellules dendritiques en cours de maturation établissent une réponse transcriptionnelle vaste et rapide par l'activation de plusieurs régulateurs de transcription^{304, 305}. L'IP pourrait affecter la protéolyse de ces régulateurs.

4.2.1 L'IP affecte l'activité et l'abondance de facteurs de transcription

Avec plus de 8 000 gènes différentiellement exprimés pouvant être divisés en 15 groupes de cinétique différents, l'impact de la délétion de l'IP sur la transcription est complexe.

Néanmoins, nos analyses bio-informatiques montrent que les différences d'expression génique sont causées par l'activation différentielle de 88 régulateurs de transcription uniques (Figure 2.6 et Annexe A.1). L'IP et le CP montrant des différences d'activité catalytique, ces prédictions de différences d'activité sont probablement dues à des différences dans le taux de dégradation de ces 88 régulateurs (Section 1.2.4). Si tel est le cas, il n'y aurait pas ou peu de corrélation entre le ratio d'expression du gène codant pour le régulateur et son intensité d'activation prédite entre les cellules de type sauvage et dKO. Or, plus de 80% de ces régulateurs (71/88) ne montrent pas ou peu de corrélation (Annexe A.2). Ces données montrent que l'IP et le CP ont des effets différentiels sur le taux de dégradation de plusieurs régulateurs de transcription chez les cellules dendritiques. En effet, l'absence d'IP module l'abondance de la plupart des régulateurs testés (Figure 2.6B-C). Puisqu'une centaine de régulateurs de transcription sont responsables de la réponse transcriptionnelle à la stimulation au LPS chez les cellules dendritiques générées *in vitro*³⁰⁵, nos travaux suggèrent ainsi que l'IP peut réguler l'abondance de la majorité d'entre eux.

La complexité des différents groupes de gènes séparés par expression différentielle pourrait s'expliquer par l'action coordonnée et hiérarchique des régulateurs de transcription sur l'expression des gènes dans les cellules dendritiques³⁰⁴ (Figure 2.4C). En effet, nos analyses bio-informatiques permettent d'identifier des régulateurs de transcription affectant différentiellement l'expression de milliers de gènes entre cellules de type sauvage et dKO. Cependant 75% des gènes différentiellement exprimés ne sont pas des cibles prédites des 88 régulateurs uniques (Annexe A.1). Ce faible pourcentage peut s'expliquer par (i) une connaissance incomplète des interactions régulateurs-gènes dans la banque de données utilisée, (ii) les critères de filtration contraignants utilisés pour identifier les régulateurs, (iii) les critères de filtration peu contraignants pour les gènes différentiellement exprimés, ou (iv) l'abondance différentielle d'une fraction de gènes est expliquée par d'autres mécanismes que la protéolyse de régulateurs de transcription.

Parmi les 88 régulateurs de transcription régulés par l'IP, 29 sont impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire (analyse non-publiée). Les membres des familles STAT, IRF et NF- κ B sont des régulateurs majeurs de la différenciation des cellules

dendritiques, ainsi que de la réponse inflammatoire et antivirale en réponse au lipopolysaccharide³⁰³⁻³⁰⁵. Nos analyses de prédiction montrent que l'activité de plusieurs membres de ces familles est affectée en absence d'IP (Figure 2.6A et Figure 4.2). Bien que le lien entre l'IP et la voie Nf- κ B soit controversé (Section 1.3.3), nos données montrent qu'I κ B, le régulateur négatif de la voie Nf- κ B, est dégradé de façon différentielle entre les cellules de type sauvage et dKO (Figure 2.6C). Ceci suggère donc que l'IP affecte la voie Nf- κ B chez les cellules dendritiques.

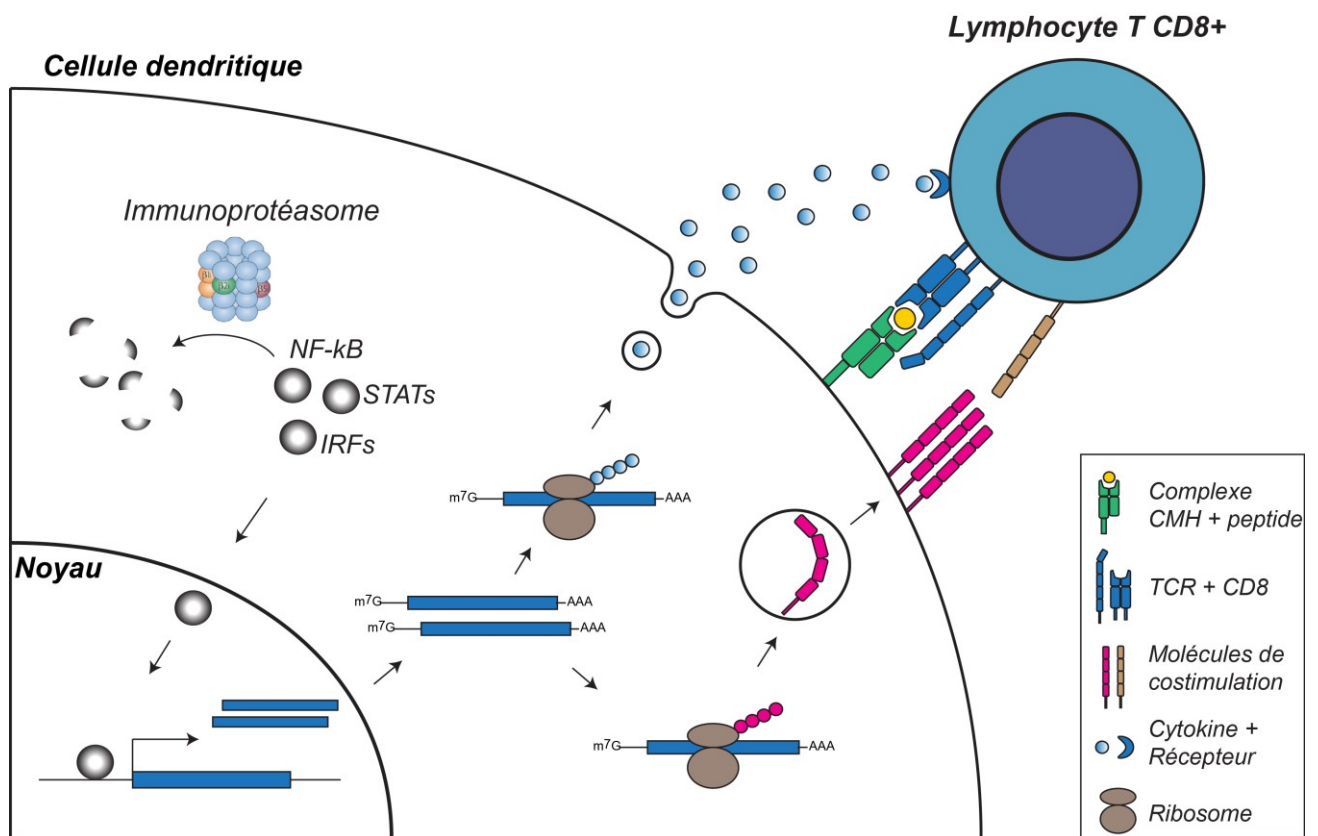


Figure 4.2 L'IP module la transcription génique et affecte l'activation des cellules dendritiques.

Selon notre modèle, la présence d'immunoprotéasome chez la cellule dendritique modifie le taux de dégradation de régulateurs de transcription (incluant les membres des familles STATs, IRFs et Nf- κ B). Ces régulateurs sont normalement impliqués dans la transcription de gènes codants pour plusieurs médiateurs de l'activation des cellules dendritiques (cytokines, molécules de costimulation, etc). Les transcrits générés sont traduits par les ribosomes, et l'expression subséquente de ces médiateurs permet l'activation complète des lymphocytes T par les cellules dendritiques.

4.2.2 Des modèles pour la dégradation sélective par l'IP

Les différences d'expression génique entre les cellules dendritiques de type sauvage et dKO ne peuvent pas être expliquées par des différences dans la quantité de protéasome ou de particule régulatrice (Figure 2.S1B – chambre catalytique seule ou couplée à des particules régulatrices) ou de protéines poly-ubiquitinées (Figure 2.S2A).

Ces résultats suggèrent que les différences d'activité et d'abondance de régulateurs de transcription entre cellules de type sauvage et dKO (Figure 2.6) sont causées par les spécificités catalytiques uniques à l'IP. Cela implique également que le taux de dégradation de ces régulateurs est différent entre les cellules de type sauvage et dKO. Plusieurs possibilités peuvent être considérées pour expliquer ce phénomène et la façon de tester ces hypothèses sera discutée dans les perspectives (Section 4.9).

Premièrement, la structure cristallographique suggère que l'augmentation de polarité autour du site actif de PSMB8 pourrait augmenter la vitesse de dégradation des liens peptidiques (Section 1.2.5). Ainsi sa capacité à dégrader les protéines entrant dans sa chambre catalytique serait augmentée. Cela entraînerait une augmentation de l'abondance des régulateurs de transcription chez les cellules dKO ainsi que de la quantité totale de protéines poly-ubiquitinées. Néanmoins, puisqu'aucune augmentation totale de protéines ubiquitinées n'est observée, cette hypothèse ne semble pas correcte (Figure 2.6B-C et Figure 2.S2).

Une autre possibilité est que les régulateurs différentiellement abondants puissent être dégradés sans ubiquitination, ce qui expliquerait pourquoi la quantité de protéines poly-ubiquitinées ne varie pas même si l'abondance de ces régulateurs varie entre les cellules de type sauvage et dKO. En effet, HIF-1 α et la sous-unité p105 de Nf- κ B, appartenant à notre liste de régulateurs, peuvent être dégradés sans être ubiquitinés (Section 1.1.8 et Figure 2.6A).

Enfin, selon le modèle de dégradation processive, un nouveau substrat ne peut être dégradé dans le protéasome sans que l'ancien substrat ne soit complètement dégradé (Section 1.1.4). L'activité catalytique de type hydrophobe étant limitante, le contenu en résidus hydrophobes d'un substrat spécifique pourrait influencer sa vitesse de dégradation et donc influencer l'entrée

de nouveaux substrats. Puisque que l'IP et le CP montrent des différences dans la vitesse de dégradation d'un polypeptide contenant plusieurs résidus hydrophobes (Section 1.2.4), le type de protéasome exprimé pourrait influencer la vitesse de dégradation d'un substrat dans le protéasome, modifier l'influx des substrats et ainsi leur abondance intracellulaire. Concordant avec cette idée, des différences de cinétique de dégradation des substrats polypeptidiques entre les sous-unités catalytiques de l'IP et du CP ont été observées^{188, 315}.

4.2.3 L'IP affecte l'expression génique au niveau des thymocytes

Nous avons comparé le transcriptome de lymphocytes T en cours de développement (thymocytes) CD4⁺/CD8⁺ double-positifs (DP) extraits de souris de type sauvage ou dKO par micro-puces d'ADN. Ainsi nous avons trouvé plus de 100 gènes différentiellement abondants et des analyses d'enrichissement montrent qu'une partie est connectée au cycle cellulaire. Ceci est concordant avec le fait que les thymocytes DP sont en phase de prolifération active ainsi que des lymphocytes T de souris dKO montrent des défauts de prolifération et d'expansion (Section 1.3.2). De plus, plusieurs gènes différentiellement exprimés entre cellules de type sauvage et dKO chez les cellules dendritiques sont connectés au cycle cellulaire (Figure 2.7A), incluant des gènes codant pour des kinases dépendantes des cyclines (CDK) et des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines p21 et Arf. Ces résultats non-publiés obtenus pendant mon doctorat suggèrent que l'impact de l'IP sur l'expression des gènes de façon non-redondante au CP n'est pas limité aux cellules dendritiques.

4.3 L'impact de l'IP sur l'expression génique affecte des processus biologiques

Nos travaux montrent que l'IP peut réguler le système immunitaire de façon indépendante de la production d'antigènes pour le CMH-I (Section 1.3) puisque l'absence d'IP affecte l'habilité des cellules dendritiques à activer des lymphocytes T CD8⁺ (Figure 2.7E-G). Ceci rejoint d'autres études montrant que l'absence d'IP peut affecter la prolifération et la survie des lymphocytes T et B, la sécrétion de cytokines par les monocytes et lymphocytes T (Section

1.3). L'impact de l'IP sur l'expression de milliers de gènes chez les cellules dendritiques pourrait permettre d'expliquer ces différents phénotypes. En effet, des analyses d'enrichissement montrent que ces gènes sont principalement connectés à la réponse immunitaire ainsi qu'à des processus biologiques fondamentaux pour le fonctionnement cellulaire, tels que la réparation d'ADN, la transcription génique, la traduction et la localisation des protéines et la régulation du cycle cellulaire (Figure 2.7A).

Est-ce qu'un autre système de dégradation tel que l'autophagie pourrait moduler la dégradation de régulateurs de transcription et ainsi moduler l'expression génique? Rien n'est moins certain, puisque aucune étude ne démontre un rôle pour l'autophagie dans la dégradation ciblée et spécifique de régulateurs de transcription, tandis que le système ubiquitine-protéasome peut cibler spécifiquement un régulateur pour la dégradation via son ubiquitination. Par contre, l'autophagie est impliquée dans la régulation du système immunitaire par différents mécanismes. Il peut internaliser des protéines intracellulaires ou extracellulaires et les dégrader en antigènes potentiels pour le CMH-I ou -II^{316, 317}. Il peut également éliminer des micro-organismes intracellulaires ou contrôler l'inflammation³¹⁸. Il sera intéressant de comparer l'impact d'inhibiteurs d'autophagie avec des inhibiteurs du protéasome ou de l'immunoprotéasome sur l'activation des cellules dendritiques. Ces données pourraient ensuite être utilisées à des fins thérapeutiques.

4.3.1 Fonction des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques dKO sont moins efficaces que les cellules de type sauvage pour activer des cellules T CD8⁺ (Figure 2.7D-G) entraînant un délai d'activation pouvant avoir des conséquences majeures lors d'une réponse immunitaire (Figure 4.3). Ce défaut d'activation des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par les cellules dendritiques dKO n'est pas dû à une différence avec les cellules de type sauvage dans la quantité de CMH-I à la surface cellulaire puisque les deux ont été chargées avec des quantités équivalentes d'antigène artificiel. En revanche, ce délai d'activation peut être dû à des défauts dans l'expression de gènes codant pour des molécules de co-stimulation à la surface cellulaire étant donné que la molécule de co-stimulation CD86 est moins exprimée à la surface des cellules dKO (Figure 2.7B). De plus, ce défaut d'activation

pourrait être dû à une différence dans l'expression des cytokines sécrétées pouvant activer les lymphocytes T. En effet les gènes *Cd300e* et *Tlr11*, qui stimulent la production d'IL-12 et de TNF α , sont réprimés chez dKO tandis que *Masp2*, qui bloque la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dendritiques, est surexprimé chez dKO (tableau 2.1). Ce délai peut aussi s'expliquer par des défauts dans l'expression de molécules impliquées dans la migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes³⁰³. Le gène *Epcam*, dont l'expression est nécessaire pour la migration des cellules dendritiques, est réprimé chez dKO tandis que les gènes *Cxcl11* et *Gdgd3*, des régulateurs négatifs de migration, sont surexprimés chez dKO. Enfin les analyses d'enrichissement montrent que plusieurs gènes affectés par la délétion de l'IP sont liés au transport de protéines (Figure 2.7A), en lien avec les fonctions phagocytaires et sécrétoires des cellules dendritiques dKO. L'expression différentielle de ces gènes chez dKO pourrait être la cause des défauts dans la capacité d'activation de lymphocytes T par les cellules dendritiques (Figures 4.2 et 4.3).

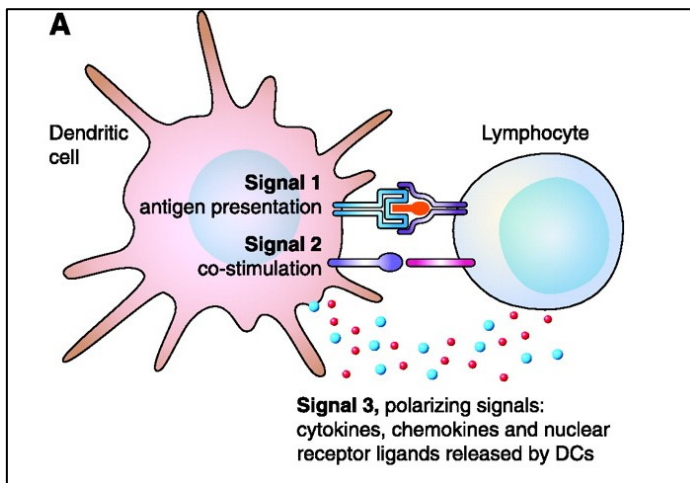


Figure 4.3 Activation d'un lymphocyte T par une cellule dendritique mature.

Résumé des interactions entre une cellule dendritique mature et un lymphocyte T. Les signaux nécessaires à l'activation du lymphocyte T inclut la présentation d'un antigène, des molécules de co-stimulation et la sécrétion de cytokines. Reproduit avec la permission de l'*American Society of Physiology* (Nagy L et al³¹⁹).

4.3.2 Production de médiateurs inflammatoires

La maturation des cellules dendritiques suite au contact avec le LPS induit la synthèse de gènes codant pour des médiateurs importants dans la réponse inflammatoire et antivirale^{304, 305}. Nos analyses montrent que la délétion de l'IP affecte ces processus (Figure 2.7.A et Annexe A.3). En effet, l'induction des gènes pro-inflammatoires *Ccl22*, *Ccr7* et *Serpinb9* par le LPS chez les cellules de type sauvage, mais cette induction est retardée chez les dKO. De plus, parmi

les 24 gènes de la réponse antivirale également induits par le LPS et affectés par la délétion de l'IP, 19 montrent une induction plus faible ou retardée chez dKO, tels qu'*Ifit3*, *Ifitm3*, *Dhx56* et *Bst2*. Finalement, nos résultats suggèrent que l'absence d'IP affecte plusieurs médiateurs inflammatoires et antiviraux. Puisque l'inhibition de l'IP permet d'atténuer la progression de maladies auto-immunes en bloquant la sécrétion de cytokines et l'activation de cellules immunitaires (Section 1.3.2), il sera intéressant de pouvoir étudier l'impact de ces interactions en contexte inflammatoire ou d'auto-immunité. De plus, les maladies génétiques impliquant une inactivation de la sous-unité PSMB8 de l'IP montrent fréquemment une signature inflammatoire chronique (Section 1.4). Il est donc possible que ce soit lié à l'effet de l'IP sur l'expression de gènes codants pour des médiateurs inflammatoires, s'ajoutant au rôle de l'IP dans la dégradation de protéines endommagées en réponse au stress.

4.3.3 Sécrétion de cytokines

Il a été montré que la délétion d'IP affecte la production de cytokines chez les monocytes et lymphocytes T (Section 1.3.2). Ainsi l'expression différentielle de cytokines dans les cellules dendritiques dKO pourrait affecter l'expression génique de façon autocrine ou paracrine³²⁰. Cependant des expériences de co-culture de cellules de type sauvage et dKO montrent que l'impact de l'IP sur l'expression génique n'est pas causé par des facteurs extrinsèques (Figure 2.1A). Nos travaux montrent que l'expression des gènes codant pour Il-2, Il-4, Il-6, Il-23, TNF- α et IFN- α fortement induits en réponse au LPS chez les cellules de type sauvage sont modulés par l'absence d'IP (Section 1.3.2 et Annexe A.3) comme cela a été montré pour d'autres types cellulaires. L'IP module également l'expression de gènes codant pour plusieurs cytokines de la famille des interleukines et chemokines fortement synthétisé en réponse au LPS et dont l'implication du protéasome n'était pas connu, tels qu'*Il1*, *Il13*, *Il18*, *Il19*, *Il33*, *Ccl1*, *Ccl4*, *Ccl12*, *Ccl17*, *Ccl22*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* et *Cxcl10*. Ces cytokines sont régulées au niveau transcriptionnel par des membres de la famille STAT (Stat1, Stat2, Stat4 et Stat5a), IRF (Irf1, Irf2, Irf4, Irf5, Irf8 et Irf9) et Nf- κ B, dont la plupart font partie de nos 88 régulateurs prédits³⁰⁵ (Figure 4.2).

4.3.4 Les cellules dendritiques dans les pathologies humaines

Les cellules dendritiques dKO sont moins efficaces que les cellules de type sauvage pour activer des lymphocytes T CD8+ entraînant un délai d'activation du système immunitaire (Chapitre 2). Ceci implique que la présence d'IP chez les cellules dendritiques est importante pour la réponse immune efficace contre les infections. Mais qu'en est-il du rôle de l'IP chez les cellules dendritiques dans des conditions pathologiques où le système immunitaire est dysfonctionnel, tel que l'auto-immunité et le cancer?

4.3.4.1 Cellules dendritiques et auto-immunité

L'inhibition d'IP limite l'activation pathologique de lymphocytes T et macrophages contribuant à certaines pathologies auto-immunitaires chez la souris (Voir Section 1.3.2.3). Il est possible que l'inhibition d'IP affecte également l'activation des cellules dendritiques dans ces contextes, ce qui n'a pas été étudié par les auteurs de ces études. En effet, nous avons montré que l'IP est nécessaire pour la fonction et l'activation des cellules dendritiques. De plus, les cellules dendritiques sont impliquées dans plusieurs pathologies auto-immunes. Leur implication est complexe et bidirectionnel : elles peuvent promouvoir la tolérance par la génération de lymphocytes T régulateurs, ou activer fortement les lymphocytes T réactifs au soi de façon dépendante ou indépendante de la génération d'antigènes³²¹.

Limiter l'activation des cellules dendritiques pourrait donc représenter une avenue thérapeutique chez certaines maladies auto-immunes. En effet, l'inhibition d'IP chez les cellules dendritiques pourrait être utilisée pour limiter la progression de ces pathologies, puisque notre laboratoire et d'autres ont découvert que : (i) l'IP augmente la diversité et l'abondance des antigènes associés au CMH-I, (ii) la présence d'IP permet l'activation complète des cellules dendritiques et (iii) la délétion d'IP affecte l'abondance de Stat3, un inhibiteur de l'activation des cellules dendritiques^{142, 322} (Chapitre 2).

4.3.4.2 Cellules dendritiques et cancer

Les cellules dendritiques peuvent être également utilisées pour la thérapie anti-cancer. Cette thérapie implique la génération de cellules dendritiques *ex vivo* à partir du sang d'un

patient atteint d'une tumeur. Les cellules dendritiques générées sont ensuite réinjectées au patient dans le but d'induire l'expansion et l'activation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques pour des antigènes tumoraux. Cette forme de thérapie a montré des bénéfices pour les patients atteints de cancer de prostate et de colon, de mélanome, de myélome et de gliome. Par contre, une hétérogénéité dans la réponse anti-tumorale est fréquemment observée, probablement due à des différences intrinsèques à la tumeur et au protocole utilisé pour générer les cellules dendritiques^{323, 324}.

Notre laboratoire a découvert que *(i)* l'IP augmente la diversité et l'abondance des antigènes associés au CMH-I et que *(ii)* la présence d'IP permet l'activation complète des cellules dendritiques¹⁴² (Chapitre 2). Nos données suggèrent donc que les cellules dendritiques exprimant une grande quantité d'IP offriraient une meilleure réponse anti-tumorale que celles exprimant peu d'IP. Donc, le traitement avec des inhibiteurs de méthylation d'ADN à l'aide du 5-azacytidine pourrait être inclus dans le protocole de génération des cellules dendritiques, puisque nos travaux montrent que le traitement avec cet agent augmente l'expression d'IP (Chapitre 3).

4.4 L'importance de l'IP dans la survie des leucémies

L'homéostasie cellulaire est cruciale pour le fonctionnement normal d'un tissu, et des défauts d'homéostasie sont fréquemment observés chez les cellules cancéreuses. En effet, les deux systèmes de dégradation principaux des protéines sont impliqués au niveau du cancer à plusieurs niveaux. D'une part, une suractivation du protéasome a été observée chez plusieurs cancers et des inhibiteurs de l'activité du protéasome sont maintenant utilisés en clinique pour le traitement du myélome multiple. (Section 1.4). D'autre part, l'autophagie peut promouvoir la résistance aux traitements de chimiothérapie chez les tumeurs solides et hématologiques, mais aussi bloquer le développement de tumeurs³²⁵. Ainsi, plusieurs régions chromosomiques fréquemment délétées chez la leucémie englobe des gènes qui encodent des protéines impliquées dans l'autophagie³²⁶. Nos travaux se sont concentrés sur le rôle des sous-types de protéasome dans la survie des cellules cancéreuses. En revanche, il pourrait être intéressant de comparer le rôle de l'autophagie avec celui du protéasome constitutif ou de l'immunoprotéasome sur la viabilité et la survie des leucémies et autres cancers hématologiques.

L'expression des sous-unités catalytiques n'ayant jamais fait l'objet d'études à large-échelle chez des échantillons primaires de cancers humains, nous avons été intéressés à leur expression entre des tissus normaux et cancéreux ainsi qu'au lien entre leur expression et le pronostic de survie. Nos analyses ont d'abord montré que la plupart des cancers étudiés surexpriment les gènes codants pour l'IP et le CP comparé à des tissus normaux. Ceci suggère que ces cancers sont dépendants d'une forte activité catalytique du protéasome. Ces analyses préliminaires fournissent une base pour l'étude du protéasome chez certains types de cancers où son implication est peu documentée, tel que le cancer de foie, les cancers de poumon ainsi que les cancers de la tête et du cou.

Puisque nous avons divisé les patients de chaque type de cancer en deux grands groupes, nos analyses de survie ne permettent pas d'identifier les cancers qui pourraient contenir un petit nombre d'échantillons avec une forte expression d'IP ou de CP. Une analyse de distribution de la fréquence d'expression du protéasome dans les échantillons³²⁷ permettrait d'identifier la proportion d'échantillons qui surexpriment le CP ou l'IP par rapport à la moyenne pour chaque

type de cancer. Ceci pourrait permettre d'identifier de petits groupes d'échantillons exprimant fortement un type de protéasome. Néanmoins, nos paramètres de division permettent d'identifier deux types de cancer où l'expression d'IP est prédictive de survie: le cancer du sein et la leucémie myéloïde aigue (lorsque tous les échantillons de leucémies myéloïdes aigues sont considérés, incluant ceux de sous-type M3 - promyélocyaires).

4.4.1 L'IP chez le cancer du sein

L'expression d'IP, corrélée à l'infiltration de lymphocytes T sécrétant d'IFN- γ , est associée à un pronostic favorable au niveau du cancer du sein. (Figure 3.2). Nous avons pu confirmer que l'expression d'IP était liée à ces lymphocytes infiltrant chez le cancer du sein, puisque les gènes de l'IP n'étaient pas surexprimés chez des lignées humaines de cancer du sein (Figure 3.S2). Cependant, les échantillons primaires de *The Cancer Genome Atlas* étant hétérogènes, nos analyses ne permettent pas de déterminer si les niveaux élevés d'IP observés proviennent de lymphocytes T infiltrant ou bien de cellules cancéreuses stimulées par l'IFN- γ sécrété par ces mêmes lymphocytes. Ainsi l'IP pourrait ne pas être exprimé dans les cellules cancéreuses et seulement représenter un marqueur de la présence des lymphocytes. L'infiltration de lymphocytes T dans la tumeur est en effet un fort indicateur d'une survie prolongée³²⁸. Mais l'IP pourrait aussi être présent dans les cellules cancéreuses du sein, menant à la génération d'un répertoire d'antigènes cancer-spécifiques et permettant leur élimination préférentielle par le système immunitaire. Une façon conceptuellement simple de tester ces deux hypothèses serait de séparer les populations de cellules immunitaires des cellules cancéreuses provenant d'un échantillon primaire par cytométrie en flux. L'analyse de l'expression d'IP entre les lymphocytes T, les cellules cancéreuses et le mélange cellulaire permettrait de déterminer quelle fraction exprime l'IP de façon prédominante. Nous avons également observé une corrélation entre l'expression d'IP et la présence de lymphocytes T au niveau du cancer du côlon (résultats non-montrés). Ceci montre que l'analyse de l'IP au niveau de tumeurs solides est compliquée par la présence de lymphocytes T.

4.4.2 L'IP comme facteur pronostic de leucémie

Contrairement aux tumeurs solides, l'expression d'IP n'est pas corrélée à l'infiltration de lymphocytes T sécréteurs d'IFN- γ chez les leucémies myéloïdes aiguës (LMA). De plus, contrairement au cancer du sein, une forte expression d'IP n'est pas associée à un bon pronostic chez la leucémie myéloïde aiguë (Chapitre 3). Elle est plutôt associée à une tendance envers un mauvais pronostic lorsque sont considérés seulement les échantillons de patients traités de façon similaire (excluant les échantillons du sous-type M3 - promyélocytaire). Une plus grande cohorte de patients sera nécessaire pour déterminer si l'expression d'IP est associée à un mauvais pronostic lorsque les patients sont traités avec un protocole basé sur la cytarabine³²⁹. Néanmoins, il serait pertinent d'évaluer si l'expression d'IP permet de prédire le pronostic de leucémies traitées avec d'autres types de thérapies.

Le bortezomib est un inhibiteur du protéasome testé en phase clinique pour les LMA^{330,331}. Nos travaux montrent que les cellules cancéreuses avec beaucoup d'IP sont sensibles à l'inhibition du protéasome par le bortezomib (Figure 3.7). En accord avec nos données, une étude a montré que les LMA de type monocytaire (de type M4 et M5) sont particulièrement sensibles à l'inhibition du protéasome²⁷⁸. Dans ce cas, il sera intéressant d'étudier l'expression d'IP comme marqueur pronostic et prédicteur de la réponse au traitement par des inhibiteurs du protéasome chez les lymphomes et leucémies. Dans l'éventualité où ces études identifient l'IP comme marqueur pronostic, une signature d'expression pourrait être utile pour sélectionner les patients qui ont une expression élevée d'IP. En ce sens, un test d'immunohistochimie à partir d'une biopsie pourrait être mis au point pour sélectionner les patients avec des tumeurs hématologiques possédant beaucoup d'IP et les inclure dans un protocole de traitement avec un inhibiteur du protéasome. Des travaux cliniques récents corroborent avec cette idée, puisque l'expression d'IP chez le myélome multiple semble être associée à une meilleure réponse clinique au carfilzomib³³². Ces perspectives ouvrent de nouvelles possibilités de pronostic et de classification des LMA et autres cancers hématologiques.

4.4.3 L'IP et le traitement de la leucémie

Nos travaux permettent d'identifier une vulnérabilité chez les LMA de type M5 et/ou avec un réarrangement *MLL* puisque l'inhibition de l'activité de la sous-unité PSMB8 de l'IP est cytotoxique les cellules THP-1 (dérivés de M5 et possédant le réarrangement *MLL-AF9*). Ceci est important puisque la présence de LMA de type M5 est un facteur de risque pour la rechute suite à une transplantation allogénique de cellules souches et que la présence d'un réarrangement *MLL* est également associée à un mauvais pronostic³³³⁻³³⁹. De plus, l'inhibition du protéasome par le bortezomib est présentement testée en phase clinique pour les LMA^{330, 331}. Des études suggèrent également que la présence d'un réarrangement *MLL* rend les LMA plus sensibles à l'inhibition du protéasome^{279, 340, 341}. L'inhibition du protéasome représente donc une avenue thérapeutique potentielle pour traiter les LMA de type M5 et/ou avec un réarrangement *MLL*.

Par contre, la forte toxicité observée chez les patients atteints de myélome multiple traités avec le bortezomib limite les doses pouvant être utilisées (Section 1.4). En effet, puisque toutes les cellules ont besoin d'un protéasome fonctionnel, l'inhibition non-sélective du protéasome par le bortezomib engendre beaucoup d'effets secondaires. En revanche, l'IP n'étant pas exprimé de façon ubiquitaire contrairement au CP, l'inhibition de la sous-unité PSMB8 de l'IP est bien tolérée chez la souris²¹¹. En inhibant spécifiquement l'IP, il pourrait donc être possible de limiter la toxicité. Ceci permettrait d'augmenter l'efficacité anti-tumorale par l'augmentation des doses de traitement tolérables par le patient.

Plusieurs inhibiteurs spécifiques de certaines sous-unités de l'IP ont déjà été synthétisés : UK-101 et IPSI-001 inhibe PSMB9 et montrent une activité anti-tumorale contre les myélomes résistants au bortezomib^{342, 343}, ONX-0914 inhibe PSMB8 et a été utilisé dans des modèles murins d'auto-immunité et d'inflammation²¹¹. La spécificité de ces inhibiteurs envers des sous-unités de l'IP est possible grâce aux acides aminés localisés près de la pochette inhibitrice et qui sont distincts entre les sous-unités homologues du CP et de l'IP^{127, 344}. Le criblage d'une série d'inhibiteurs sur des protéasomes purifiés (CP ou IP) permettrait d'identifier des inhibiteurs spécifiques de PSMB8 ou PSMB9. Ensuite, l'efficacité de ces composés devra être testée en

phase préclinique chez des modèles *in vitro* et *in vivo*. Puis, des essais cliniques permettront de mesurer l'efficacité et la toxicité de ces inhibiteurs IP-spécifique chez les patients atteints de LMA comparé avec les inhibiteurs généraux du protéasome (bortezomib, carfilzomib). Nos travaux ont également montré que l'IP est surexprimé chez une série de lignées cellulaires humaines provenant de différents cancers hématologiques, ce qui permettrait d'étendre les tests précliniques et cliniques aux lymphomes, myélomes et leucémies lymphoïdes. Les perspectives (Section 4.9) offre un aperçu des travaux précliniques nécessaires avant de commencer à utiliser des inhibiteurs d'IP comme traitement clinique. Ces études fourniraient les premières données concernant l'utilisation d'inhibiteurs d'IP chez des patients humains.

4.5 Les leucémies ont une dépendance non-oncogénique à l'IP

Nos données montrent que l'IP est fortement exprimé chez les LMA, notamment de type M5. De plus, les LMA de type M5 sont dérivés de monocytes/macrophages³⁴⁵. Bien que nous n'ayons pas comparé les niveaux d'IP entre les LMA de type M5 et des monocytes/macrophages primaires, des données préliminaires provenant du transcriptome de monocytes humains (projet leucégène, gracieuseté du Dr. Josée Hébert) montrent une forte expression d'IP. Il est donc probable que l'IP ne contribue pas directement à la formation des leucémies. Néanmoins la présence d'IP est requise pour la viabilité des cellules leucémiques car son inhibition entraîne la mort cellulaire. Ce phénomène a déjà été observé plusieurs fois et a été nommé « dépendance non-oncogénique » : l'activation d'un oncogène contribue directement à la formation d'un cancer, ce qui introduit des changements physiologiques secondaires menant à un stress cellulaire. En conséquence, les cellules cancéreuses deviennent dépendantes de fonctions biologiques qui n'ont pas contribué directement à la formation du cancer (non-oncogène) mais qui permettent de compenser l'apparition de stress cellulaire additionnel^{295, 346}. L'inactivation de cette fonction biologique chez les cellules non-cancéreuses n'est généralement pas toxique, étant donné qu'elles n'en sont pas aussi dépendantes que les cellules cancéreuses. Des exemples ont été décrits pour démontrer l'impact de certaines dépendances non-oncogéniques sur la survie de cellules cancéreuses : (i) la suractivation de la voie EGFR chez un sous-type de glioblastome

mène à une production accrue de stress oxydatif, ce qui rend les cellules très vulnérables à l'inhibition de protéines impliquées dans la réparation d'ADN³⁴⁷ et (ii) des cellules cancéreuses du colon dont l'oncogène Ras est hyperactif à cause d'une mutation sont sensibles à l'inhibition non-sélective du protéasome³⁴⁶. Nos travaux suggèrent donc que les LMA ont une dépendance non-oncogénique à l'IP, qui leur permet de se débarrasser des effets nuisibles du stress cellulaire acquis. Or, l'accumulation de protéines endommagées est un effet direct du stress cellulaire (Section 1.1.7). En effet, nos travaux montrent que l'inhibition de la sous-unité PSMB8 de l'IP chez les cellules THP-1 entraîne une forte accumulation de protéine poly-ubiquitinées.

4.6 L'IP et la réponse au stress

Dans la littérature, des observations suggèrent que les sous-unités de l'IP sont plus performantes dans la dégradation de protéines endommagées par le stress oxydatif que les sous-unités catalytiques du CP (Section 1.3.4). De plus, nos analyses montrent que l'expression d'IP est associée à des gènes dont la fonction est liée au fonctionnement de la mitochondrie, à la réponse au stress et au métabolisme cellulaire (Figure 3.6B), ce qui consistant avec un rôle dans la réponse au stress cellulaire. Or, une particularité intéressante des LMA est leur dépendance à la respiration mitochondriale. Elles montrent en effet une masse mitochondriale et une consommation d'oxygène élevée ainsi qu'une dépendance accrue à la phosphorylation oxydative comparé aux cellules hématopoïétique normales. Ces caractéristiques les rendent très sensibles au stress oxydatif et aux perturbateurs du fonctionnement mitochondrial³⁴⁸⁻³⁵². Nos travaux suggèrent donc que l'IP est fortement exprimé chez les LMA à cause d'un stress oxydatif élevé puisqu'il est nécessaire pour la dégradation des protéines endommagées par oxydation (Figure 4.4). De plus, ce modèle est consistant avec des observations montrant que la délétion ou des mutations de l'IP entraîne une accumulation de protéines endommagées suite à un stress oxydatif chez des cellules de souris ou humaines (Sections 1.3.4 et 1.4.1). Le rôle de l'IP dans la dégradation de protéines oxydées chez les LMA pourrait donc être une extension de son rôle dans la réponse au stress chez des cellules et tissus non-transformés. Cela pourrait s'expliquer au niveau moléculaire par une protéolyse accrue des liens peptidiques par l'IP,

comme le suggère sa structure (Section 1.2.5) ainsi que des expériences de dégradation *in vitro*^{188, 315}. Puisque peu d'études ont comparé directement la capacité des deux types de protéasome dans la dégradation de protéines oxydées, il serait important de valider ce modèle en comparant les niveaux de protéines oxydées ainsi que la viabilité en réponse à un stress oxydatif entre des LMA possédant du CP ou de l'IP ainsi qu'en mesurant le taux de dégradation de plusieurs substrats oxydés par le CP ou l'IP *in vitro* (Section 4.9 - Perspectives).

La cause exacte de la dépendance des LMA à la respiration mitochondriale est inconnue. L'expression du cytochrome c oxydase IV (COX-IV), une sous-unité catalytique de la chaîne respiratoire, est régulée par les niveaux d'oxygène de façon dépendante du facteur de transcription HIF-1 α , ce qui influence l'activité de la chaîne mitochondriale, la consommation d'oxygène ainsi que la génération d'espèces réactives de l'oxygène³⁵³. De plus, les cellules souches leucémiques myéloïdes et lymphoïdes sont caractérisées par une activité élevée d'HIF-1 α ^{354, 355}, suggérant un rôle pour ce régulateur de transcription dans la dépendance des cellules leucémiques à la respiration mitochondriale. Or, parmi les régulateurs dont l'activité est modulée par l'IP chez les cellules dendritiques se trouve HIF-1 α (Figure 2.6A) et l'abondance des gènes codant pour COX-IV est affectée par la délétion de l'IP chez les cellules dendritiques. L'intégration de ces données avec notre modèle suggère que la présence d'IP pourrait limiter la dégradation d'HIF-1 α chez les cellules leucémiques, entraînant une augmentation de leur dépendance à la respiration mitochondriale et de la génération de stress oxydatif. Les protéines endommagées par le stress oxydatif seraient ensuite dégradées efficacement par la présence d'IP.

4.7 Régulation de l'expression d'IP chez les leucémies

Chez les LMA, la forte expression d'IP n'est pas expliquée par la présence de lymphocytes T ou la sécrétion d'IFN- γ . En revanche, elle est liée à une diminution de la méthylation d'ADN dans les régions codantes de l'IP. En effet, la méthylation d'ADN sur le promoteur ou dans la région codante d'un gène réprime son expression en bloquant la liaison de

la machinerie transcriptionnelle³⁵⁶. De plus, le traitement de cellules exprimant peu d'IP avec l'azacytidine, un inhibiteur des enzymes catalysant la méthylation d'ADN, augmente l'expression des gènes d'IP (Figure 3.4 et Figure 3.5). Ces données suggèrent qu'une diminution de la méthylation de l'ADN dans les régions codantes des gènes d'IP chez les leucémies de type M5 mène à une augmentation de l'expression des transcrits d'IP. Puisque l'azacytidine est utilisé en clinique chez les LMA³⁵⁷, il pourrait être avantageux d'inclure un inhibiteur de PSMB8 dans le traitement.

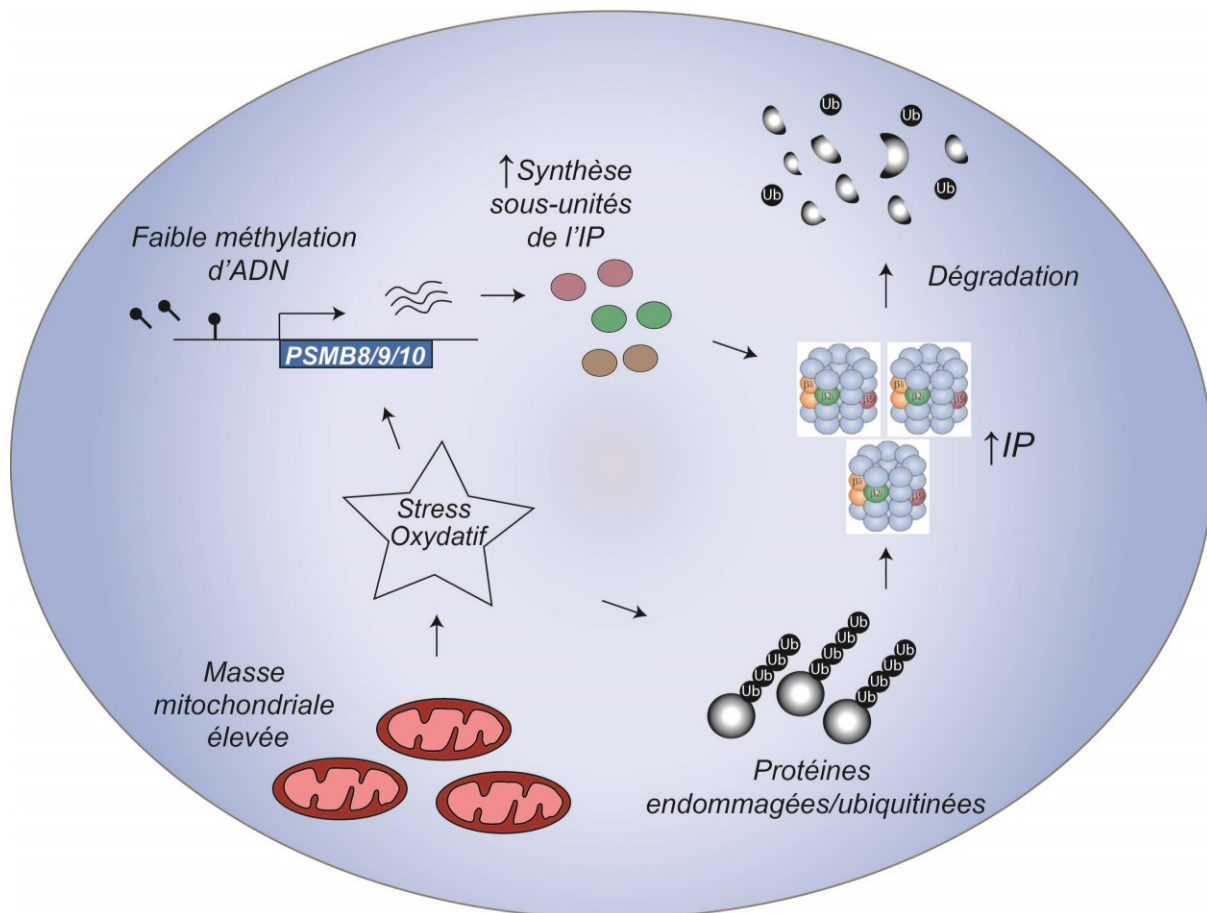


Figure 4.4 Une forte expression d'IP est essentielle chez les leucémies de type M5 ou possédant un réarrangement *MLL* pour résister au stress cellulaire de type oxydatif.

Les leucémies de type M5 ou possédant un réarrangement *MLL* expriment fortement les sous-unités d'IP. Cette expression corrèle avec un faible niveau de méthylation dans la séquence codante des gènes d'IP. Selon notre modèle, cette expression est nécessaire pour dégrader le surplus de protéines endommagées générées par un stress oxydatif et un métabolisme mitochondrial élevé.

Quelle voie de signalisation stimule l'expression de l'IP lorsque l'ADN n'est pas méthylée dans les LMA de type M5 ou possédant un réarrangement *MLL*? De plus en plus d'études impliquent le stress oxydatif comme régulateur de l'expression d'IP dans plusieurs pathologies. Or, l'expression des sous-unités de l'IP est augmentée dans plusieurs tissus atteints de pathologies dont l'étiologie implique un stress oxydatif chronique : (i) la rétine de patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge, (ii) la moelle épinière atteinte par la sclérose latérale amyotrophique, ainsi que (iii) chez un modèle animal de dystrophie musculaire de Duchenne^{248, 254, 255, 358, 359}. Nos données mises en contexte avec ces observations suggèrent donc qu'un stress oxydatif permet d'augmenter l'expression des gènes codant pour les sous-unités d'IP seulement lorsque l'ADN est peu méthylée dans leur région codante, ce qui favorise la dégradation des protéines endommagées par oxydation (Figure 4.4).

4.8 Le thymoprotéasome et la sélection des lymphocytes T CD8⁺

Une 7^e sous-unité catalytique du protéasome, PSMB11, a été découverte dans la dernière décennie. Cette sous-unité est exprimée spécifiquement chez les cellules épithéliales du cortex thymique (cTEC) pour former le thymoprotéasome (TP) (murata, 2007, science). Le TP serait important pour la génération des lymphocytes T CD8⁺ via la production d'un répertoire unique d'antigènes liée au CMH-I. En effet, plusieurs observations appuient cette hypothèse : (i) la présence de CMH-I est nécessaire pour la génération des lymphocytes T CD8⁺, (ii) les cTEC sont responsables de la sélection positive des lymphocytes T, (iii) le protéasome génère la majorité d'antigènes associés au CMH-I, (iv) les souris déficientes pour PSMB11 montrent un déficit important du nombre de lymphocytes T CD8⁺ générés par le thymus et (v) l'incorporation de PSMB11 dans le protéasome en modifie les préférences catalytiques^{128, 194, 195, 206, 360}. En revanche, il a été impossible de directement évaluer le répertoire des antigènes CMH-I présent à la surface des cTEC de souris PSMB11^{-/-}, étant donné que le nombre de cTEC est très petit avec 10⁴ cTEC par thymus de souris et que l'analyse des antigènes par spectrométrie de masse requiert plus de 10⁸ cellules^{361, 362}.

Des résultats obtenus au laboratoire viennent mettre en doute cette hypothèse, puisque nous avons observé que la sous-unité PSMB11 est exprimée seulement chez les cTEC provenant de souris âgées d'une semaine alors que les cTEC de souris plus âgées (4 et 8 semaines) n'expriment plus la sous-unité PSMB11. Pourtant, les souris déficientes en PSMB11 montrent des déficits dans la sélection positive de lymphocytes T CD8⁺ à tout âge. Ces données suggèrent que l'effet de PSMB11 sur la génération de lymphocytes T CD8⁺ n'est pas lié principalement à la génération d'antigènes uniques pour le CMH-I. D'ailleurs plus de 300 gènes sont différentiellement exprimés chez les cTEC extraits de souris PSMB11^{-/-} âgées de 8 semaines. Ces gènes sont liés à des processus importants pour le développement des lymphocytes T, tels que la migration et l'adhésion cellulaires ainsi que la sécrétion de cytokines. D'une part, puisque PSMB11 n'est plus exprimée chez les cTEC de souris de 8 semaines, les différences d'expression génique sont possiblement causées par des modifications épigénétiques stables ayant eu lieu lorsque PSMB11 était exprimée (cTEC de souris âgées d'une semaine). D'autre part, l'expression différentielle de ces gènes pourrait être la cause du déficit dans la génération de lymphocytes T CD8⁺ chez les souris PSMB11^{-/-} et leur implication sera vérifiée.

4.9 Perspectives

L'IP affecte l'expression génique : plusieurs niveaux de régulation impliqués

Nos travaux démontrent que l'IP est important pour la fonction des cellules dendritiques et influence l'expression de plus de 8 000 gènes en modulant l'abondance de régulateurs de transcription. L'idée qu'un type de protéasome affecte l'expression de gènes n'est pas nouvelle, mais l'étendue de l'impact de l'IP était inattendue. L'étude du contrôle de l'expression génique par l'IP chez les cellules dendritiques ouvre de nouvelles perspectives en biologie des systèmes puisqu'elle implique plusieurs couches de régulation successives : protéasome et dégradation de substrat, régulateur de transcription et gène-cible, transcrite exprimé et effet biologique. Grâce aux avancements dans les domaines de la transcriptomique, de la protéomique et de la bio-informatique, les expériences nécessaires pour disséquer les différentes étapes de régulation sont maintenant possibles.

D'abord, il faudrait mesurer la contribution de l'activité catalytique de l'IP sur le taux de dégradation de régulateurs de transcription prédits pour être différentiellement activés entre cellules provenant de souris de type sauvage ou de souris dont les gènes codant pour les sous-unités PSMB8 et PSMB10 ont été inactivés (dKO). Par exemple, l'analyse de l'abondance des protéines intracellulaires par spectrométrie de masse en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique permettrait de comparer le taux de dégradation de chaque régulateur entre des cellules exprimant ou non l'IP³⁶³. En plus de confirmer les régulateurs de transcription dont l'abondance dépend spécifiquement de l'IP, cela permettrait de faire l'inventaire des substrats préférentiellement dégradés par l'IP, par le CP ou bien dégradés de façon similaire par les deux. De même, pour mesurer la contribution relative du taux de transcription génique sur l'abondance des transcrits, l'analyse de la liaison de la Polymérase-II (Pol-II) par ChIP-Seq entre cellules de type sauvage et dKO permettrait de mesurer directement les différences dans le taux de transcription des gènes³⁶⁴. Il serait aussi possible de mesurer directement la liaison des régulateurs de transcription sur les promoteurs de leurs gène-cibles prédits par ChIP-Seq entre les cellules de type sauvage et dKO.

Le développement récent de la méthode CRISPR/Cas9 permet maintenant de supprimer des éléments génomiques de façon permanente, rapide et systématique chez les mammifères³⁶⁵. Le contrôle précis de l'expression d'un gène par son activation ou sa répression est également possible grâce à des modifications dans l'activité endonucléase de Cas9³⁶⁶. L'inactivation des régulateurs de transcription à l'aide de la technique CRISPR chez les cellules dendritiques permettrait d'étudier leur contribution relative sur l'expression des gènes différentiellement exprimés soit de manière globale soit de manière ciblée. De plus, cette technique permettrait aussi de déterminer la contribution des régulateurs pour l'activation des lymphocytes T CD8⁺ par les cellules dendritiques. L'étude de ces paramètres permettrait d'avoir une perspective globale de l'effet de l'IP sur l'expression génique.

Le fait que l'IP affecte l'expression de gènes impliqués dans plusieurs processus cellulaires soutient l'hypothèse que ce phénomène n'est pas limité aux cellules dendritiques. Les lymphocytes T et B expriment l'IP et initient une forte réponse transcriptionnelle suite à leur activation, tout comme les cellules dendritiques^{367, 368}. L'analyse de leur transcriptome chez des souris dKO infectées par un pathogène permettrait d'évaluer si l'impact de l'IP sur l'expression génique peut s'étendre à d'autres types cellulaires mais aussi de déterminer si parmi ces potentiels gènes régulés certains sont communs avec les gènes IP-dépendants des cellules dendritiques. De plus, cela pourrait permettre d'expliquer les phénotypes associés aux défauts de prolifération et de survie chez les lymphocytes T et B de souris déficientes pour l'IP (Section 1.3.2).

Est-ce que l'IP affecte la survie des LMA *in vivo*?

Nous avons montré que l'IP est surexprimé chez des échantillons primaires de LMA de type M5 et/ou possédant un réarrangement *MLL*. Plusieurs inhibiteurs de l'IP ayant été récemment synthétisés^{211, 342, 369-371}, il serait envisageable de traiter des patients atteints de LMA, ou tout autre cancer hématologique exprimant beaucoup d'IP, à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. Cependant, plusieurs obstacles doivent être surmontés avant de pouvoir tester ce traitement en essai clinique.

Le premier obstacle est la confirmation que les cellules LMA ont besoin de l'IP pour survivre. L'utilisation de la technique CRISPR pour inactiver l'expression des gènes d'IP et activer ceux du CP serait particulièrement utile en ce sens pour comparer la survie de lignées cellulaires ou de cellules primaires exprimant soit de l'IP (LMA non modifiée) ou soit du CP (LMA CRISPR modifiée)³⁶⁶.

Le second inconvénient est le manque de validation chez des modèles de souris. Des lignées cellulaires ainsi que des échantillons primaires de LMA exprimant beaucoup d'IP pourraient être injectés chez des souris, tout comme les lignées et échantillons exprimant du CP (LMA CRISPR modifiée). Ensuite, ces souris seraient traitées avec différents inhibiteurs d'IP et la croissance de la tumeur ainsi que la survie des souris seraient étudiés.

La dernière contrainte est le manque d'analyses approfondies sur la toxicité potentielle d'inhibiteurs d'IP. Pour y remédier, il faudrait évaluer *in vitro* l'effet de l'inhibition d'IP chez des cellules hématopoïétiques primaires et des cellules primaires LMA. Puis il faudrait évaluer l'impact des inhibiteurs d'IP *in vivo* après injection chez des souris en analysant le nombre et la conservation des fonctions des cellules hématopoïétique ainsi qu'en vérifiant l'intégrité des différents organes murins. Ces expériences permettront d'établir l'utilité, l'efficacité ainsi que la toxicité d'inhibiteurs de l'IP contre les LMA *in vitro* et *in vivo*.

La réponse au stress par les différents types de protéasome

Connaître l'importance relative de l'IP et du CP dans la réponse au stress cellulaire est important non seulement dans des contextes biologiques, tels que celui du système immunitaire, mais aussi au niveau de pathologies caractérisés par un stress chronique endommageant les tissus. Nos travaux apportent une nouvelle perspective sur un rôle de l'IP dans la réponse au stress au niveau pathologique. Cependant, l'idée qu'un type de protéasome est meilleur qu'un autre dans la réponse au stress doit être approfondie. L'utilisation d'une lignée cellulaire génétiquement modifiée par CRISPR dont l'expression du CP et la répression de l'IP sont inductibles permettrait de répondre à cette question. Le stress cellulaire peut être induit à l'aide d'agents oxydants et d'analogues d'acides aminés. Il peut ensuite être mesuré par l'analyse du

taux de dégradation des protéines oxydés/ubiquitinées et par l'impact sur la viabilité cellulaire. Finalement, une comparaison du taux de dégradation *in vitro* de modèles de substrats oxydés ou mal repliés entre le CP et l'IP purifiés confirmerait directement l'habileté de chaque type de protéasome à dégrader des protéines endommagées. Plusieurs pathologies liées à l'âge, incluant des maladies neurodégénératives, sont caractérisées par l'accumulation de protéines endommagées^{372, 373}. Puisque les stratégies thérapeutiques potentielles incluent l'augmentation de l'activité du protéasome³⁷⁴⁻³⁷⁷, il est primordial de savoir si un type de protéasome peut dégrader plus efficacement les protéines endommagées.

Conclusion

Nous avons utilisé des approches expérimentales variées pour éclaircir et comprendre les rôles de l'IP qui ne sont pas reliés à la génération d'antigènes associés au CMH-I en situation immunitaire ou pathologique.

Notre première découverte est que l'immunoprotéasome exerce un impact étendu et complexe sur l'expression de plus de 8 000 gènes chez les cellules dendritiques en cours de maturation. L'immunoprotéasome affecte la transcription de ces gènes en régulant l'abondance et l'activité de 88 régulateurs de transcription. Nos travaux supportent un modèle où l'immunoprotéasome influence le taux de dégradation de régulateurs transcriptionnels de façon différente du protéasome standard (Figure 4.2).

En second lieu, des analyses bio-informatiques montrent que l'immunoprotéasome est fortement exprimé chez la leucémie myéloïde aigue et que cette expression est indépendante de la présence de lymphocytes sécréteurs d'IFN- γ , est enrichie chez les leucémies de type M5 et/ou présentant un réarrangement *MLL* et est connectée à des gènes impliqués dans la réponse au stress. De plus, l'inhibition de la sous-unité PSMB8 de l'immunoprotéasome mène à l'accumulation de protéines ubiquitinées et à la mort de cellules leucémiques de type M5 présentant un réarrangement *MLL*. Nos travaux supportent un modèle où l'immunoprotéasome est surexprimé chez les cellules leucémiques pour éliminer le surplus de protéines endommagées par un métabolisme oxydatif hyperactif (Figure 4.4).

Nos résultats pourraient permettre d'expliquer les phénotypes associés à la délétion ou à la perte de fonction de l'immunoprotéasome en contexte immunitaire ou non-immunitaire. En effet, les fonctions associées à ces phénotypes sont contrôlées au niveau transcriptionnel. De plus, nos travaux montrent que l'immunoprotéasome est impliqué dans la réponse au stress en contexte pathologique. Des inhibiteurs d'immunoprotéasome ont été synthétisés et nos travaux suggèrent qu'ils pourraient être testés en essais cliniques pour traiter la leucémie myéloïde aigue.

Bibliographie

1. Glickman,M.H. & Ciechanover,A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**, 373-428 (2002).
2. Groll,M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471 (1997).
3. Unno,M. *et al.* Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75 Å resolution. *J. Biochem.* **131**, 171-173 (2002).
4. Unno,M. *et al.* The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure.* **10**, 609-618 (2002).
5. Schwartz,A.L. & Ciechanover,A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 73-96 (2009).
6. Ye,Y. & Rape,M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 755-764 (2009).
7. Schulman,B.A. & Harper,J.W. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 319-331 (2009).
8. Ardley,H.C. & Robinson,P.A. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.* **41**, 15-30 (2005).
9. Hochstrasser,M. Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell* **124**, 27-34 (2006).
10. Deshaies,R.J. & Joazeiro,C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399-434 (2009).
11. Magori,S. & Citovsky,V. Hijacking of the Host SCF Ubiquitin Ligase Machinery by Plant Pathogens. *Front Plant Sci.* **2**, 87 (2011).
12. Li,W. & Ye,Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 2397-2406 (2008).
13. Xu,P. *et al.* Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133-145 (2009).
14. Reyes-Turcu,F.E., Ventii,K.H., & Wilkinson,K.D. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 363-397 (2009).
15. Eletr,Z.M. & Wilkinson,K.D. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 114-128 (2014).

16. Kisselev,A.F., Akopian,T.N., Castillo,V., & Goldberg,A.L. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol. Cell* **4**, 395-402 (1999).
17. Tanaka,K. The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles. *Keio J. Med.* **62**, 1-12 (2013).
18. Glickman,M.H., Rubin,D.M., Fried,V.A., & Finley,D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3149-3162 (1998).
19. Walz,J. *et al.* 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **121**, 19-29 (1998).
20. Peters,J.M., Cejka,Z., Harris,J.R., Kleinschmidt,J.A., & Baumeister,W. Structural features of the 26 S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* **234**, 932-937 (1993).
21. Ikai,A., Nishigai,M., Tanaka,K., & Ichihara,A. Electron microscopy of 26 S complex containing 20 S proteasome. *FEBS Lett.* **292**, 21-24 (1991).
22. Yoshimura,T. *et al.* Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J. Struct. Biol.* **111**, 200-211 (1993).
23. Barthelme,D. & Sauer,R.T. Identification of the Cdc48*20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science* **337**, 843-846 (2012).
24. Katayama-Fujimura,Y., Gottesman,S., & Maurizi,M.R. A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 4477-4485 (1987).
25. Finley,D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 477-513 (2009).
26. Thrower,J.S., Hoffman,L., Rechsteiner,M., & Pickart,C.M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**, 94-102 (2000).
27. Glickman,M.H. *et al.* A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-623 (1998).
28. Peth,A., Nathan,J.A., & Goldberg,A.L. The ATP costs and time required to degrade ubiquitinated proteins by the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* **288**, 29215-29222 (2013).
29. Lam,Y.A., Xu,W., DeMartino,G.N., & Cohen,R.E. Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* **385**, 737-740 (1997).
30. Tanaka,K., Mizushima,T., & Saeki,Y. The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol. Chem.* **393**, 217-234 (2012).
31. Benaroudj,N., Zwickl,P., Seemuller,E., Baumeister,W., & Goldberg,A.L. ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation. *Mol. Cell* **11**, 69-78 (2003).
32. Liu,C.W. *et al.* ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol. Cell* **24**, 39-50 (2006).

33. Smith,D.M. *et al.* ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Mol. Cell* **20**, 687-698 (2005).
34. Mao,I., Liu,J., Li,X., & Luo,H. REGgamma, a proteasome activator and beyond? *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 3971-3980 (2008).
35. Dubiel,W., Pratt,G., Ferrell,K., & Rechsteiner,M. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* **267**, 22369-22377 (1992).
36. Ma,C.P., Slaughter,C.A., & DeMartino,G.N. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J. Biol. Chem.* **267**, 10515-10523 (1992).
37. Dick,T.P. *et al.* Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* **86**, 253-262 (1996).
38. Li,J. *et al.* Lysine 188 substitutions convert the pattern of proteasome activation by REGgamma to that of REGs alpha and beta. *EMBO J.* **20**, 3359-3369 (2001).
39. Whitby,F.G. *et al.* Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**, 115-120 (2000).
40. Cascio,P. PA28alphabeta: the enigmatic magic ring of the proteasome? *Biomolecules.* **4**, 566-584 (2014).
41. Zhang,Z. & Zhang,R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J.* **27**, 852-864 (2008).
42. Li,X. *et al.* The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell* **124**, 381-392 (2006).
43. Li,X. *et al.* Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol. Cell* **26**, 831-842 (2007).
44. Sun,J. *et al.* The 11S Proteasome Subunit PSME3 Is a Positive Feedforward Regulator of NF-kappaB and Important for Host Defense against Bacterial Pathogens. *Cell Rep.* **14**, 737-749 (2016).
45. Murata,S. *et al.* Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J. Biol. Chem.* **274**, 38211-38215 (1999).
46. Rechsteiner,M. & Hill,C.P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* **15**, 27-33 (2005).
47. Groll,M. *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1062-1067 (2000).
48. Bajorek,M., Finley,D., & Glickman,M.H. Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. *Curr. Biol.* **13**, 1140-1144 (2003).
49. Chen,P. & Hochstrasser,M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* **86**, 961-972 (1996).

50. Arendt,C.S. & Hochstrasser,M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 7156-7161 (1997).
51. Heinemeyer,W., Fischer,M., Krimmer,T., Stachon,U., & Wolf,D.H. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* **272**, 25200-25209 (1997).
52. Dick,T.P. *et al.* Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* **273**, 25637-25646 (1998).
53. Kisselev,A.F., Callard,A., & Goldberg,A.L. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.* **281**, 8582-8590 (2006).
54. Toes,R.E. *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* **194**, 1-12 (2001).
55. Kniepert,A. & Groettrup,M. The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 17-24 (2014).
56. Lowe,J. *et al.* Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539 (1995).
57. Tamura,T. *et al.* The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr. Biol.* **5**, 766-774 (1995).
58. Kisselev,A.F., Akopian,T.N., & Goldberg,A.L. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 1982-1989 (1998).
59. Kisselev,A.F., Akopian,T.N., Woo,K.M., & Goldberg,A.L. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **274**, 3363-3371 (1999).
60. Yao,T. & Cohen,R.E. Giant proteases: beyond the proteasome. *Curr. Biol.* **9**, R551-R553 (1999).
61. McGrath,J.P., Jentsch,S., & Varshavsky,A. UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.* **10**, 227-236 (1991).
62. Kulkarni,M. & Smith,H.E. E1 ubiquitin-activating enzyme UBA-1 plays multiple roles throughout *C. elegans* development. *PLoS. Genet.* **4**, e1000131 (2008).
63. Chiu,Y.H., Sun,Q., & Chen,Z.J. E1-L2 activates both ubiquitin and FAT10. *Mol. Cell* **27**, 1014-1023 (2007).
64. Ciechanover,A., Finley,D., & Varshavsky,A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**, 57-66 (1984).

65. Kaiser,S.E. *et al.* Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat. Methods* **8**, 691-696 (2011).
66. Lu,Y., Lee,B.H., King,R.W., Finley,D., & Kirschner,M.W. Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis. *Science* **348**, 1250834 (2015).
67. Ravid,T. & Hochstrasser,M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 679-690 (2008).
68. Lu,Y., Lee,B.H., King,R.W., Finley,D., & Kirschner,M.W. Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis. *Science* **348**, 1250834 (2015).
69. Shabek,N. *et al.* The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation. *Mol. Cell* **48**, 87-97 (2012).
70. Fishbain,S., Prakash,S., Herrig,A., Elsasser,S., & Matouschek,A. Rad23 escapes degradation because it lacks a proteasome initiation region. *Nat. Commun.* **2**, 192 (2011).
71. Alberti,S. *et al.* Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J. Biol. Chem.* **277**, 45920-45927 (2002).
72. Rao,H. & Sastry,A. Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J. Biol. Chem.* **277**, 11691-11695 (2002).
73. Elsasser,S. *et al.* Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat. Cell Biol.* **4**, 725-730 (2002).
74. Inobe,T., Fishbain,S., Prakash,S., & Matouschek,A. Defining the geometry of the two-component proteasome degron. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 161-167 (2011).
75. van der Lee,R. *et al.* Intrinsically disordered segments affect protein half-life in the cell and during evolution. *Cell Rep.* **8**, 1832-1844 (2014).
76. van der Lee,R. *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589-6631 (2014).
77. Fedyukina,D.V. & Cavagnero,S. Protein folding at the exit tunnel. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 337-359 (2011).
78. Schubert,U. *et al.* Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-774 (2000).
79. Seufert,W. & Jentsch,S. Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* **9**, 543-550 (1990).
80. Eisenlohr,L.C., Huang,L., & Golovina,T.N. Rethinking peptide supply to MHC class I molecules. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 403-410 (2007).

81. Kim,Y.E., Hipp,M.S., Bracher,A., Hayer-Hartl,M., & Hartl,F.U. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 323-355 (2013).
82. Daturpalli,S., Waudby,C.A., Meehan,S., & Jackson,S.E. Hsp90 inhibits alpha-synuclein aggregation by interacting with soluble oligomers. *J. Mol. Biol.* **425**, 4614-4628 (2013).
83. Arndt,V., Rogon,C., & Hohfeld,J. To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 2525-2541 (2007).
84. Bustamante,C.J., Kaiser,C.M., Maillard,R.A., Goldman,D.H., & Wilson,C.A. Mechanisms of cellular proteostasis: insights from single-molecule approaches. *Annu. Rev. Biophys.* **43**, 119-140 (2014).
85. Wang,M. & Kaufman,R.J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 581-597 (2014).
86. Nakatsukasa,K. & Brodsky,J.L. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic.* **9**, 861-870 (2008).
87. Nakatsukasa,K., Huyer,G., Michaelis,S., & Brodsky,J.L. Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein. *Cell* **132**, 101-112 (2008).
88. Lekmine,F. *et al.* Interferon-gamma engages the p70 S6 kinase to regulate phosphorylation of the 40S S6 ribosomal protein. *Exp. Cell Res.* **295**, 173-182 (2004).
89. Kaur,S. *et al.* Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 4808-4813 (2008).
90. Kroczyńska,B., Mehrotra,S., Arslan,A.D., Kaur,S., & Plataniias,L.C. Regulation of interferon-dependent mRNA translation of target genes. *J. Interferon Cytokine Res.* **34**, 289-296 (2014).
91. Smith,T.J. & Higgins,P.J. Interferon gamma regulation of de novo protein synthesis in human dermal fibroblasts in culture is anatomic site dependent. *J. Invest Dermatol.* **100**, 288-292 (1993).
92. Lasch,P. *et al.* Hydrogen peroxide-induced structural alterations of RNase A. *J. Biol. Chem.* **276**, 9492-9502 (2001).
93. Pacifici,R.E., Kono,Y., & Davies,K.J. Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* **268**, 15405-15411 (1993).
94. Giulivi,C., Pacifici,R.E., & Davies,K.J. Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 329-341 (1994).
95. Dantuma,N.P. & Lindsten,K. Stressing the ubiquitin-proteasome system. *Cardiovasc. Res.* **85**, 263-271 (2010).

96. Sacksteder,C.A. *et al.* Tertiary structural rearrangements upon oxidation of Methionine145 in calmodulin promotes targeted proteasomal degradation. *Biophys. J.* **91**, 1480-1493 (2006).
97. Shringarpure,R., Grune,T., Mehlhase,J., & Davies,K.J. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**, 311-318 (2003).
98. Bader,N. & Grune,T. Protein oxidation and proteolysis. *Biol. Chem.* **387**, 1351-1355 (2006).
99. Davies,K.J. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* **83**, 301-310 (2001).
100. Grune,T., Reinheckel,T., & Davies,K.J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* **11**, 526-534 (1997).
101. Wang,X., Yen,J., Kaiser,P., & Huang,L. Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress. *Sci. Signal.* **3**, ra88 (2010).
102. Reinheckel,T. *et al.* Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem. J.* **335 (Pt 3)**, 637-642 (1998).
103. Grune,T., Merker,K., Sandig,G., & Davies,K.J. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 709-718 (2003).
104. Jung,T. & Grune,T. The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB. Life* **60**, 743-752 (2008).
105. Ben-Nissan,G. & Sharon,M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules.* **4**, 862-884 (2014).
106. Baugh,J.M., Viktorova,E.G., & Pilipenko,E.V. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J. Mol. Biol.* **386**, 814-827 (2009).
107. Tsvetkov,P., Reuven,N., Prives,C., & Shaul,Y. Susceptibility of p53 unstructured N terminus to 20 S proteasomal degradation programs the stress response. *J. Biol. Chem.* **284**, 26234-26242 (2009).
108. Wiggins,C.M. *et al.* BIM(EL), an intrinsically disordered protein, is degraded by 20S proteasomes in the absence of poly-ubiquitylation. *J. Cell Sci.* **124**, 969-977 (2011).
109. Orlowski,M. & Wilk,S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* **415**, 1-5 (2003).
110. Jariel-Encontre,I., Bossis,G., & Piechaczyk,M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* **1786**, 153-177 (2008).
111. Asher,G., Tsvetkov,P., Kahana,C., & Shaul,Y. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* **19**, 316-321 (2005).

112. Maupin-Furlow, J.A., Wilson, H.L., Kaczowka, S.J., & Ou, M.S. Proteasomes in the archaea: from structure to function. *Front Biosci.* **5**, D837-D865 (2000).
113. Zwickl, P., Baumeister, W., & Steven, A. Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 242-250 (2000).
114. Wojcik, C. & DeMartino, G.N. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 579-589 (2003).
115. von, M.A. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* **119**, 1977-1984 (2006).
116. Djakovic, S.N., Schwarz, L.A., Barylko, B., DeMartino, G.N., & Patrick, G.N. Regulation of the proteasome by neuronal activity and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* **284**, 26655-26665 (2009).
117. Bingol, B. *et al.* Autophosphorylated CaMKIIalpha acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines. *Cell* **140**, 567-578 (2010).
118. Guo, X. *et al.* Site-specific proteasome phosphorylation controls cell proliferation and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **18**, 202-212 (2016).
119. Isasa, M. *et al.* Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Mol. Cell* **38**, 733-745 (2010).
120. Dohmen, R.J., Willers, I., & Marques, A.J. Biting the hand that feeds: Rpn4-dependent feedback regulation of proteasome function. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1599-1604 (2007).
121. Radhakrishnan, S.K. *et al.* Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Mol. Cell* **38**, 17-28 (2010).
122. Sha, Z. & Goldberg, A.L. Proteasome-mediated processing of Nrf1 is essential for coordinate induction of all proteasome subunits and p97. *Curr. Biol.* **24**, 1573-1583 (2014).
123. Kraft, D.C., Deocaris, C.C., Wadhwa, R., & Rattan, S.I. Preincubation with the proteasome inhibitor MG-132 enhances proteasome activity via the Nrf2 transcription factor in aging human skin fibroblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1067**, 420-424 (2006).
124. Pickering, A.M., Linder, R.A., Zhang, H., Forman, H.J., & Davies, K.J. Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28alpha beta regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **287**, 10021-10031 (2012).
125. Pickering, A.M. *et al.* The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28alpha beta proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* **432**, 585-594 (2010).
126. Livnat-Levanon, N. *et al.* Reversible 26S proteasome disassembly upon mitochondrial stress. *Cell Rep.* **7**, 1371-1380 (2014).

127. Huber,E.M. *et al.* Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* **148**, 727-738 (2012).
128. Murata,S. *et al.* Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349-1353 (2007).
129. Groettrup,M., Kirk,C.J., & Basler,M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 73-78 (2010).
130. Ortiz-Navarrete,V. *et al.* Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* **353**, 662-664 (1991).
131. Martinez,C.K. & Monaco,J.J. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature* **353**, 664-667 (1991).
132. Glynne,R. *et al.* A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* **353**, 357-360 (1991).
133. Brown,M.G., Driscoll,J., & Monaco,J.J. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* **353**, 355-357 (1991).
134. Hughes,A.L. Evolution of the proteasome components. *Immunogenetics* **46**, 82-92 (1997).
135. Ohta,Y. & Flajnik,M.F. Coevolution of MHC genes (LMP/TAP/class Ia, NKT-class Ib, Nkp30-B7H6): lessons from cold-blooded vertebrates. *Immunol. Rev.* **267**, 6-15 (2015).
136. Erath,S. & Groettrup,M. No evidence for immunoproteasomes in chicken lymphoid organs and activated lymphocytes. *Immunogenetics* **67**, 51-60 (2015).
137. Groettrup,M. *et al.* A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* **26**, 863-869 (1996).
138. Hisamatsu,H. *et al.* Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J. Exp. Med.* **183**, 1807-1816 (1996).
139. Nandi,D., Jiang,H., & Monaco,J.J. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J. Immunol.* **156**, 2361-2364 (1996).
140. Sutoh,Y. *et al.* Comparative genomic analysis of the proteasome beta5t subunit gene: implications for the origin and evolution of thymoproteasomes. *Immunogenetics* **64**, 49-58 (2012).
141. Tomaru,U. *et al.* Exclusive expression of proteasome subunit {beta}5t in the human thymic cortex. *Blood* **113**, 5186-5191 (2009).
142. de Verteuil,D. *et al.* Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol. Cell Proteomics.* **9**, 2034-2047 (2010).
143. Macagno,A. *et al.* Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur. J. Immunol.* **29**, 4037-4042 (1999).

144. Macagno,A., Kuehn,L., de,G.R., & Groettrup,M. Pronounced up-regulation of the PA28alpha/beta proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3271-3280 (2001).
145. Hensley,S.E. *et al.* Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. *J. Immunol.* **184**, 4115-4122 (2010).
146. Nil,A., Firat,E., Sobek,V., Eichmann,K., & Niedermann,G. Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2681-2689 (2004).
147. Pelletier,S. *et al.* Quantifying cross-tissue diversity in proteasome complexes by mass spectrometry. *Mol. Biosyst.* **6**, 1450-1453 (2010).
148. Guillaume,B. *et al.* Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 18599-18604 (2010).
149. Visekruna,A. *et al.* Expression of catalytic proteasome subunits in the gut of patients with Crohn's disease. *Int. J. Colorectal Dis.* **24**, 1133-1139 (2009).
150. Visekruna,A. *et al.* Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Invest* **116**, 3195-3203 (2006).
151. Schroder,K., Hertzog,P.J., Ravasi,T., & Hume,D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163-189 (2004).
152. Namiki,S. *et al.* IRF-1 mediates upregulation of LMP7 by IFN-gamma and concerted expression of immunosubunits of the proteasome. *FEBS Lett.* **579**, 2781-2787 (2005).
153. White,L.C. *et al.* Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8+ T cells in IRF-1^{-/-} mice. *Immunity.* **5**, 365-376 (1996).
154. Chatterjee-Kishore,M., Kishore,R., Hicklin,D.J., Marincola,F.M., & Ferrone,S. Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **273**, 16177-16183 (1998).
155. Khan,S. *et al.* Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol* **167**, 6859-6868 (2001).
156. Barton,L.F., Cruz,M., Rangwala,R., Deepe,G.S., Jr., & Monaco,J.J. Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection. *J. Immunol.* **169**, 3046-3052 (2002).

157. Heink,S., Ludwig,D., Kloetzel,P.M., & Kruger,E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 9241-9246 (2005).
158. Wilhelm,M. *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* **509**, 582-587 (2014).
159. Zu,L. *et al.* Evidence for a role of immunoproteasomes in regulating cardiac muscle mass in diabetic mice. *J. Mol. Cell Cardiol.* **49**, 5-15 (2010).
160. Chen,M., Tabaczewski,P., Truscott,S.M., Van,K.L., & Stroynowski,I. Hepatocytes express abundant surface class I MHC and efficiently use transporter associated with antigen processing, tapasin, and low molecular weight polypeptide proteasome subunit components of antigen processing and presentation pathway. *J. Immunol.* **175**, 1047-1055 (2005).
161. Vasuri,F. *et al.* Studies on immunoproteasome in human liver. Part I: absence in fetuses, presence in normal subjects, and increased levels in chronic active hepatitis and cirrhosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**, 301-306 (2010).
162. Kitamura,A. *et al.* A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J. Clin. Invest* **121**, 4150-4160 (2011).
163. Atkinson,S.P. *et al.* A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **30**, 1373-1384 (2012).
164. Ferrington,D.A. *et al.* Immunoproteasome responds to injury in the retina and brain. *J. Neurochem.* **106**, 158-169 (2008).
165. Cui,Z., Hwang,S.M., & Gomes,A.V. Identification of the immunoproteasome as a novel regulator of skeletal muscle differentiation. *Mol. Cell Biol.* **34**, 96-109 (2014).
166. Basler,M. *et al.* Why the structure but not the activity of the immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide 2 rescues antigen presentation. *J. Immunol.* **189**, 1868-1877 (2012).
167. Guillaume,B. *et al.* Analysis of the processing of seven human tumor antigens by intermediate proteasomes. *J Immunol* **189**, 3538-3547 (2012).
168. Murata,S., Yashiroda,H., & Tanaka,K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 104-115 (2009).
169. Griffin,T.A. *et al.* Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J. Exp. Med.* **187**, 97-104 (1998).
170. Groettrup,M., Standera,S., Stohwasser,R., & Kloetzel,P.M. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 8970-8975 (1997).
171. De,M. *et al.* Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly. *J. Biol. Chem.* **278**, 6153-6159 (2003).

172. Kingsbury,D.J., Griffin,T.A., & Colbert,R.A. Novel propeptide function in 20 S proteasome assembly influences beta subunit composition. *J. Biol. Chem.* **275**, 24156-24162 (2000).
173. Basler,M., Moebius,J., Elenich,L., Groettrup,M., & Monaco,J.J. An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice. *J. Immunol.* **176**, 6665-6672 (2006).
174. Kisselev,A.F. & Goldberg,A.L. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol.* **398**, 364-378 (2005).
175. Van,K.L. *et al.* Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity.* **1**, 533-541 (1994).
176. Gaczynska,M., Rock,K.L., & Goldberg,A.L. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* **365**, 264-267 (1993).
177. Groettrup,M. *et al.* The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. *J. Biol. Chem.* **270**, 23808-23815 (1995).
178. Gaczynska,M., Rock,K.L., Spies,T., & Goldberg,A.L. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 9213-9217 (1994).
179. Salzmann,U. *et al.* Mutational analysis of subunit i beta2 (MECL-1) demonstrates conservation of cleavage specificity between yeast and mammalian proteasomes. *FEBS Lett.* **454**, 11-15 (1999).
180. Driscoll,J., Brown,M.G., Finley,D., & Monaco,J.J. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* **365**, 262-264 (1993).
181. Nathan,J.A. *et al.* Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. *Cell* **152**, 1184-1194 (2013).
182. Boes,B. *et al.* Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.* **179**, 901-909 (1994).
183. Aki,M. *et al.* Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J. Biochem.* **115**, 257-269 (1994).
184. Stohwasser,R., Kuckelkorn,U., Kraft,R., Kostka,S., & Kloetzel,P.M. 20S proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences. *FEBS Lett.* **383**, 109-113 (1996).
185. Ma,W. *et al.* A MAGE-C2 antigenic peptide processed by the immunoproteasome is recognized by cytolytic T cells isolated from a melanoma patient after successful immunotherapy. *Int. J. Cancer* **129**, 2427-2434 (2011).

186. Schultz,E.S. *et al.* The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J. Exp. Med.* **195**, 391-399 (2002).
187. Deol,P., Zaiss,D.M., Monaco,J.J., & Sijts,A.J. Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J. Immunol.* **178**, 7557-7562 (2007).
188. Mishto,M. *et al.* Modeling the in vitro 20S proteasome activity: the effect of PA28-ab and of the sequence and length of polypeptides on the degradation kinetics. *J. Mol. Biol.* **377**, 1607-1617 (2008).
189. Loda,M. *et al.* Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat. Med.* **3**, 231-234 (1997).
190. Hu,X. *et al.* Ubiquitin/proteasome-dependent degradation of D-type cyclins is linked to tumor necrosis factor-induced cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **277**, 16528-16537 (2002).
191. Mitch,W.E. & Goldberg,A.L. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1897-1905 (1996).
192. Suraweera,A., Munch,C., Hanssum,A., & Bertolotti,A. Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. *Mol. Cell* **48**, 242-253 (2012).
193. Dantuma,N.P., Groothuis,T.A., Salomons,F.A., & Neefjes,J. A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J. Cell Biol.* **173**, 19-26 (2006).
194. Neefjes,J., Jongmsma,M.L., Paul,P., & Bakke,O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823-836 (2011).
195. Rock,K.L. *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761-771 (1994).
196. Howard,J.C. & Seelig,A. Antigen processing. Peptides and the proteasome. *Nature* **365**, 211-212 (1993).
197. Kincaid,E.Z. *et al.* Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat. Immunol.* **13**, 129-135 (2012).
198. Fehling,H.J. *et al.* MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* **265**, 1234-1237 (1994).
199. Caudill,C.M. *et al.* T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. *J. Immunol.* **176**, 4075-4082 (2006).
200. Sewell,A.K. *et al.* IFN-gamma exposes a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope in HIV-1 reverse transcriptase. *J. Immunol.* **162**, 7075-7079 (1999).

201. Morel,S. *et al.* Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity*. **12**, 107-117 (2000).
202. Chen,W., Norbury,C.C., Cho,Y., Yewdell,J.W., & Bennink,J.R. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* **193**, 1319-1326 (2001).
203. Chapiro,J. *et al.* Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J. Immunol.* **176**, 1053-1061 (2006).
204. Dalet,A., Stroobant,V., Vigneron,N., & Van den Eynde,B.J. Differences in the production of spliced antigenic peptides by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Eur. J. Immunol.* **41**, 39-46 (2011).
205. Osterloh,P. *et al.* Proteasomes shape the repertoire of T cells participating in antigen-specific immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 5042-5047 (2006).
206. Zijlstra,M. *et al.* Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* **344**, 742-746 (1990).
207. Zaiss,D.M., de,G.N., & Sijts,A.J. The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *Infect. Immun.* **76**, 1207-1213 (2008).
208. Moebius,J., van den Broek,M., Groettrup,M., & Basler,M. Immunoproteasomes are essential for survival and expansion of T cells in virus-infected mice. *Eur. J. Immunol.* **40**, 3439-3449 (2010).
209. Qureshi,N. *et al.* The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function. *Immunol. Res.* **31**, 243-260 (2005).
210. Naujokat,C. *et al.* Proteasomal chymotrypsin-like peptidase activity is required for essential functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* **120**, 120-132 (2007).
211. Muchamuel,T. *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.* **15**, 781-787 (2009).
212. Rockwell,C.E., Monaco,J.J., & Qureshi,N. A critical role for the inducible proteasomal subunits LMP7 and MECL1 in cytokine production by activated murine splenocytes. *Pharmacology* **89**, 117-126 (2012).
213. Reis,J. *et al.* The immunoproteasomes regulate LPS-induced TRIF/TRAM signaling pathway in murine macrophages. *Cell Biochem. Biophys.* **60**, 119-126 (2011).
214. Palombella,V.J. *et al.* Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 15671-15676 (1998).

215. Elliott,P.J., Pien,C.S., McCormack,T.A., Chapman,I.D., & Adams,J. Proteasome inhibition: A novel mechanism to combat asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 294-300 (1999).
216. Berti,R. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **22**, 1068-1079 (2002).
217. Pye,J. *et al.* Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **284**, H919-H926 (2003).
218. Basler,M., Mundt,S., Bitzer,A., Schmidt,C., & Groettrup,M. The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **33**, S74-S79 (2015).
219. Schmidt,N. *et al.* Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. *Gut* **59**, 896-906 (2010).
220. Basler,M., Dajee,M., Moll,C., Groettrup,M., & Kirk,C.J. Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *J. Immunol.* **185**, 634-641 (2010).
221. Fitzpatrick,L.R., Khare,V., Small,J.S., & Koltun,W.A. Dextran sulfate sodium-induced colitis is associated with enhanced low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) expression and is attenuated in LMP2 knockout mice. *Dig. Dis. Sci.* **51**, 1269-1276 (2006).
222. Basler,M. *et al.* Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *EMBO Mol. Med.* **6**, 226-238 (2014).
223. Ichikawa,H.T. *et al.* Beneficial effect of novel proteasome inhibitors in murine lupus via dual inhibition of type I interferon and autoantibody-secreting cells. *Arthritis Rheum.* **64**, 493-503 (2012).
224. Nagayama,Y. *et al.* Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **168**, 268-273 (2012).
225. Ebstein,F., Kloetzel,P.M., Kruger,E., & Seifert,U. Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cell Mol. Life Sci.* **69**, 2543-2558 (2012).
226. Muratani,M. & Tansey,W.P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 192-201 (2003).
227. Lipford,J.R. & Deshaies,R.J. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 845-850 (2003).
228. Haupt,Y., Maya,R., Kazaz,A., & Oren,M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299 (1997).

229. Kim,S.Y., Herbst,A., Tworkowski,K.A., Salghetti,S.E., & Tansey,W.P. Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol. Cell* **11**, 1177-1188 (2003).
230. von der,L.N. *et al.* The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol. Cell* **11**, 1189-1200 (2003).
231. Palombella,V.J., Rando,O.J., Goldberg,A.L., & Maniatis,T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**, 773-785 (1994).
232. Chen,Z. *et al.* Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **9**, 1586-1597 (1995).
233. Geng,F., Wenzel,S., & Tansey,W.P. Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 177-201 (2012).
234. Cao,J. & Yan,Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol.* **2**, 26 (2012).
235. Minsky,N. *et al.* Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat. Cell Biol.* **10**, 483-488 (2008).
236. Kim,J., Hake,S.B., & Roeder,R.G. The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Mol. Cell* **20**, 759-770 (2005).
237. Hayashi,T. & Faustman,D. NOD mice are defective in proteasome production and activation of NF-kappaB. *Mol. Cell Biol.* **19**, 8646-8659 (1999).
238. Seifert,U. *et al.* Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**, 613-624 (2010).
239. Hayashi,T., Kodama,S., & Faustman,D.L. Reply to 'LMP2 expression and proteasome activity in NOD mice'. *Nat. Med.* **6**, 1065-1066 (2000).
240. Runnels,H.A., Watkins,W.A., & Monaco,J.J. LMP2 expression and proteasome activity in NOD mice. *Nat. Med.* **6**, 1064-1065 (2000).
241. Pearl-Yafe,M. *et al.* An oxidative mechanism of interferon induced priming of the Fas pathway in Fanconi anemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 833-842 (2003).
242. Sasaki,M., Ikeda,H., Sato,Y., & Nakanuma,Y. Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: a culture study. *Free Radic. Res.* **42**, 625-632 (2008).
243. Watanabe,Y., Suzuki,O., Haruyama,T., & Akaike,T. Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J. Cell Biochem.* **89**, 244-253 (2003).
244. Rada,B. & Leto,T.L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib. Microbiol.* **15**, 164-187 (2008).
245. Spaapen,R.M. & Neefjes,J. Immuno-waste exposure and further management. *Nat. Immunol.* **13**, 109-111 (2012).

246. Ding,Q., Martin,S., Dimayuga,E., Bruce-Keller,A.J., & Keller,J.N. LMP2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**, 130-135 (2006).
247. Opitz,E. *et al.* Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. *PLoS. Pathog.* **7**, e1002233 (2011).
248. Ethen,C.M. *et al.* Transformation of the proteasome with age-related macular degeneration. *FEBS Lett.* **581**, 885-890 (2007).
249. Hussong,S.A., Kappahn,R.J., Phillips,S.L., Maldonado,M., & Ferrington,D.A. Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress. *J. Neurochem.* **113**, 1481-1490 (2010).
250. Pickering,A.M. & Davies,K.J. Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28alpha, Pa28gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **523**, 181-190 (2012).
251. Suurvali,J. *et al.* The proto-MHC of placozoans, a region specialized in cellular stress and ubiquitination/proteasome pathways. *J. Immunol.* **193**, 2891-2901 (2014).
252. Kotamraju,S. *et al.* Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1034-1044 (2006).
253. Cheroni,C. *et al.* Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 82-96 (2009).
254. Bendotti,C. *et al.* Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* **97**, 101-126 (2012).
255. Chen,C.N., Graber,T.G., Bratten,W.M., Ferrington,D.A., & Thompson,L.V. Immunoproteasome in animal models of Duchenne muscular dystrophy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **35**, 191-201 (2014).
256. McDermott,A., Jacks,J., Kessler,M., Emanuel,P.D., & Gao,L. Proteasome-associated autoinflammatory syndromes: advances in pathogenesis, clinical presentations, diagnosis, and management. *Int. J. Dermatol.* **54**, 121-129 (2015).
257. Agarwal,A.K. *et al.* PSMB8 encoding the beta5i proteasome subunit is mutated in joint contractures, muscle atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-induced lipodystrophy syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 866-872 (2010).
258. Arima,K. *et al.* Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 14914-14919 (2011).
259. Liu,Y. *et al.* Mutations in proteasome subunit beta type 8 cause chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature with evidence of genetic and phenotypic heterogeneity. *Arthritis Rheum.* **64**, 895-907 (2012).

260. Brehm,A. *et al.* Additive loss-of-function proteasome subunit mutations in CANDLER/PRAAS patients promote type I IFN production. *J. Clin. Invest* **125**, 4196-4211 (2015).
261. Beg,A.A. & Baltimore,D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* **274**, 782-784 (1996).
262. King,R.W., Deshaies,R.J., Peters,J.M., & Kirschner,M.W. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652-1659 (1996).
263. Berkers,C.R. *et al.* Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat. Methods* **2**, 357-362 (2005).
264. Adams,J. *et al.* Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* **59**, 2615-2622 (1999).
265. Frankland-Searby,S. & Bhaumik,S.R. The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1825**, 64-76 (2012).
266. Adams,J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist.* **7**, 9-16 (2002).
267. Hideshima,T. *et al.* The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* **61**, 3071-3076 (2001).
268. Guzman,M.L. *et al.* Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 16220-16225 (2002).
269. Frankel,A., Man,S., Elliott,P., Adams,J., & Kerbel,R.S. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3719-3728 (2000).
270. Chen,L. & Madura,K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res.* **65**, 5599-5606 (2005).
271. Kane,R.C., Bross,P.F., Farrell,A.T., & Pazdur,R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist.* **8**, 508-513 (2003).
272. Orłowski,R.Z. *et al.* Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res.* **58**, 4342-4348 (1998).
273. Dou,Q.P. & Li,B. Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist. Updat.* **2**, 215-223 (1999).
274. Mujtaba,T. & Dou,Q.P. Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discov. Med.* **12**, 471-480 (2011).
275. Adams,J. & Kauffman,M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* **22**, 304-311 (2004).
276. Richardson,P.G. *et al.* A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2609-2617 (2003).

277. Jagannath,S. *et al.* Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **129**, 776-783 (2005).
278. Riccioni,R. *et al.* M4 and M5 acute myeloid leukaemias display a high sensitivity to Bortezomib-mediated apoptosis. *Br. J. Haematol.* **139**, 194-205 (2007).
279. Bernot,K.M. *et al.* Eradicating acute myeloid leukemia in a Mll(PTD/wt):Flt3(ITD/wt) murine model: a path to novel therapeutic approaches for human disease. *Blood* **122**, 3778-3783 (2013).
280. Howard,D.S. *et al.* A phase I study using bortezomib with weekly idarubicin for treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **37**, 1502-1508 (2013).
281. Walker,A.R. *et al.* Phase I study of azacitidine and bortezomib in adults with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **55**, 1304-1308 (2014).
282. Orłowski,R.Z. *et al.* Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* **105**, 3058-3065 (2005).
283. Niewerth,D. *et al.* Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies. *Drug Resist. Updat.* **18**, 18-35 (2015).
284. Stewart,A.K. Carfilzomib for the treatment of patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Future. Oncol.* **11**, 2121-2136 (2015).
285. Shirley,M. Ixazomib: First Global Approval. *Drugs* **76**, 405-411 (2016).
286. Kisselev,A.F., van der Linden,W.A., & Overkleeft,H.S. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem. Biol.* **19**, 99-115 (2012).
287. Meister,S. *et al.* Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* **67**, 1783-1792 (2007).
288. Kyle,R.A. & Rajkumar,S.V. Multiple myeloma. *Blood* **111**, 2962-2972 (2008).
289. Gu,H., Chen,X., Gao,G., & Dong,H. Caspase-2 functions upstream of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by bortezomib in human myeloma cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2298-2307 (2008).
290. Obeng,E.A. *et al.* Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* **107**, 4907-4916 (2006).
291. Ling,S.C. *et al.* Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1. *Haematologica* **97**, 64-72 (2012).
292. Gordon,D.J., Resio,B., & Pellman,D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 189-203 (2012).
293. Ganem,N.J., Storchova,Z., & Pellman,D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 157-162 (2007).

294. Tsafrir,D. *et al.* Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 2129-2137 (2006).
295. Luo,J., Solimini,N.L., & Elledge,S.J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* **136**, 823-837 (2009).
296. Chen,S. *et al.* Genome-wide siRNA screen for modulators of cell death induced by proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Res.* **70**, 4318-4326 (2010).
297. Torres,E.M. *et al.* Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* **317**, 916-924 (2007).
298. Wang,C.Y., Mayo,M.W., & Baldwin,A.S., Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* **274**, 784-787 (1996).
299. Van Antwerp,D.J., Martin,S.J., Kafri,T., Green,D.R., & Verma,I.M. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* **274**, 787-789 (1996).
300. Read,M.A. *et al.* The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity.* **2**, 493-506 (1995).
301. Zetter,B.R. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **4**, 219-229 (1993).
302. Qin,J.Z. *et al.* Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res.* **65**, 6282-6293 (2005).
303. Merad,M., Sathe,P., Helft,J., Miller,J., & Mortha,A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563-604 (2013).
304. Garber,M. *et al.* A high-throughput chromatin immunoprecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol. Cell* **47**, 810-822 (2012).
305. Amit,I. *et al.* Unbiased reconstruction of a mammalian transcriptional network mediating pathogen responses. *Science* **326**, 257-263 (2009).
306. Bornstein,C. *et al.* A negative feedback loop of transcription factors specifies alternative dendritic cell chromatin States. *Mol. Cell* **56**, 749-762 (2014).
307. Parnas,O. *et al.* A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks. *Cell* **162**, 675-686 (2015).
308. Gat-Viks,I. *et al.* Deciphering molecular circuits from genetic variation underlying transcriptional responsiveness to stimuli. *Nat. Biotechnol.* **31**, 342-349 (2013).
309. Jovanovic,M. *et al.* Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science* **347**, 1259038 (2015).
310. Lilienbaum,A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **4**, 1-26 (2013).
311. Tippmann,S.C. *et al.* Chromatin measurements reveal contributions of synthesis and decay to steady-state mRNA levels. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 593 (2012).

312. Rabani,M. *et al.* Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 436-442 (2011).
313. Lopes,U.G., Erhardt,P., Yao,R., & Cooper,G.M. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J. Biol. Chem.* **272**, 12893-12896 (1997).
314. Schwanhäusser B *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473[7347], 337-342. 2011.
315. Peters,B., Janek,K., Kuckelkorn,U., & Holzhutter,H.G. Assessment of proteasomal cleavage probabilities from kinetic analysis of time-dependent product formation. *J. Mol. Biol.* **318**, 847-862 (2002).
316. Munz,C. Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. *Immunol. Rev.* **272**, 17-27 (2016).
317. Munz,C. Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends Immunol.*(2016).
318. Deretic,V., Saitoh,T., & Akira,S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 722-737 (2013).
319. Nagy,L., Szanto,A., Szatmari,I., & Szeles,L. Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol Rev.* **92**, 739-789 (2012).
320. Samarajiwa,S.A., Forster,S., Auchetl,K., & Hertzog,P.J. INTERFEROME: the database of interferon regulated genes. *Nucleic Acids Res.* **37**, D852-D857 (2009).
321. Ganguly,D., Haak,S., Sisirak,V., & Reizis,B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 566-577 (2013).
322. Melillo,J.A. *et al.* Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. *J. Immunol.* **184**, 2638-2645 (2010).
323. Palucka,K. & Banchereau,J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 265-277 (2012).
324. Anguille,S., Smits,E.L., Lion,E., van Tendeloo,V.F., & Berneman,Z.N. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol.* **15**, e257-e267 (2014).
325. Sehgal,A.R. *et al.* You eat what you are: autophagy inhibition as a therapeutic strategy in leukemia. *Leukemia* **29**, 517-525 (2015).
326. Watson,A.S., Mortensen,M., & Simon,A.K. Autophagy in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Cell Cycle* **10**, 1719-1725 (2011).
327. Budczies,J. *et al.* Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS. One.* **7**, e1862 (2012).
328. Fridman,W.H. *et al.* Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.*(2011).

329. Lowenberg,B. *et al.* Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1027-1036 (2011).
330. Sarlo,C. *et al.* Phase II Study of Bortezomib as a Single Agent in Patients with Previously Untreated or Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia Ineligible for Intensive Therapy. *Leuk. Res. Treatment.* **2013**, 705714 (2013).
331. Attar,E.C. *et al.* Bortezomib added to daunorubicin and cytarabine during induction therapy and to intermediate-dose cytarabine for consolidation in patients with previously untreated acute myeloid leukemia age 60 to 75 years: CALGB (Alliance) study 10502. *J. Clin. Oncol.* **31**, 923-929 (2013).
332. Lee,S.J. *et al.* Clinical activity of carfilzomib correlates with inhibition of multiple proteasome subunits: application of a novel pharmacodynamic assay. *Br. J. Haematol.* **173**, 884-895 (2016).
333. Bostrom,B. *et al.* Bone marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia in first remission: analysis of prognostic factors. *Blood* **65**, 1191-1196 (1985).
334. McGlave,P.B. *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia in first remission. *Blood* **72**, 1512-1517 (1988).
335. Copelan,E.A. *et al.* Treatment for acute myelocytic leukemia with allogeneic bone marrow transplantation following preparation with BuCy2. *Blood* **78**, 838-843 (1991).
336. Frassoni,F. *et al.* Results of allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia have improved in Europe with time--a report of the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* **17**, 13-18 (1996).
337. Meyer,C. *et al.* New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* **23**, 1490-1499 (2009).
338. Meyer,C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* **27**, 2165-2176 (2013).
339. Lavalley,V.P. *et al.* The transcriptomic landscape and directed chemical interrogation of MLL-rearranged acute myeloid leukemias. *Nat. Genet.*(2015).
340. Bilardi,R.A. *et al.* Impact of loss of BH3-only proteins on the development and treatment of MLL-fusion gene-driven AML in mice. *Cell Death. Dis.* **7**, e2351 (2016).
341. Liu,H. *et al.* Proteasome inhibitors evoke latent tumor suppression programs in pro-B MLL leukemias through MLL-AF4. *Cancer Cell* **25**, 530-542 (2014).
342. Wehenkel,M. *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP2 induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses tumour growth in nude mice. *Br. J. Cancer* **107**, 53-62 (2012).
343. Kuhn,D.J. *et al.* Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood* **113**, 4667-4676 (2009).

344. Miller,Z., Ao,L., Kim,K.B., & Lee,W. Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions. *Curr. Pharm. Des* **19**, 4140-4151 (2013).
345. Berger,R. *et al.* Acute monocytic leukemia chromosome studies. *Leuk. Res.* **6**, 17-26 (1982).
346. Luo,J. *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* **137**, 835-848 (2009).
347. Nitta,M. *et al.* Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. *PLoS. One.* **5**, e10767 (2010).
348. Skrtic,M. *et al.* Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **20**, 674-688 (2011).
349. Sriskanthadevan,S. *et al.* AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood* **125**, 2120-2130 (2015).
350. Lagadinou,E.D. *et al.* BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 329-341 (2013).
351. Cole,A. *et al.* Inhibition of the Mitochondrial Protease ClpP as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **27**, 864-876 (2015).
352. Larkin,K. & Byrd,J.C. Antagonizing ClpP: A New Power Play in Targeted Therapy for AML. *Cancer Cell* **27**, 747-749 (2015).
353. Fukuda,R. *et al.* HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **129**, 111-122 (2007).
354. Wang,Y., Liu,Y., Malek,S.N., Zheng,P., & Liu,Y. Targeting HIF1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell* **8**, 399-411 (2011).
355. Giambra,V. *et al.* Leukemia stem cells in T-ALL require active Hif1alpha and Wnt signaling. *Blood* **125**, 3917-3927 (2015).
356. Wang,H. *et al.* Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* **22**, 1680-1688 (2012).
357. Ivanoff,S. *et al.* 5-Azacytidine treatment for relapsed or refractory acute myeloid leukemia after intensive chemotherapy. *Am. J. Hematol.* **88**, 601-605 (2013).
358. Cheroni,C. *et al.* Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 82-96 (2009).
359. D'Amico,E., Factor-Litvak,P., Santella,R.M., & Mitsumoto,H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 509-527 (2013).
360. Klein,L., Kyewski,B., Allen,P.M., & Hogquist,K.A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377-391 (2014).

361. Granados,D.P. *et al.* Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat. Commun.* **5**, 3600 (2014).
362. Dumont-Lagace,M., Brochu,S., St-Pierre,C., & Perreault,C. Adult thymic epithelium contains nonsenescent label-retaining cells. *J. Immunol.* **192**, 2219-2226 (2014).
363. Larance,M., Ahmad,Y., Kirkwood,K.J., Ly,T., & Lamond,A.I. Global subcellular characterization of protein degradation using quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics.* **12**, 638-650 (2013).
364. Aparicio,O., Geisberg,J.V., & Struhl,K. Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 17**, Unit (2004).
365. Shalem,O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**, 84-87 (2014).
366. Gilbert,L.A. *et al.* Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* **159**, 647-661 (2014).
367. Miyazaki,K., Miyazaki,M., & Murre,C. The establishment of B versus T cell identity. *Trends Immunol.* **35**, 205-210 (2014).
368. Best,J.A. *et al.* Transcriptional insights into the CD8(+) T cell response to infection and memory T cell formation. *Nat. Immunol.* **14**, 404-412 (2013).
369. de Bruin,G. *et al.* Structure-based design of either beta1i or beta5i specific inhibitors of human immunoproteasomes. *J Med. Chem.* **57**, 6197-6209 (2014).
370. Huber,E.M. *et al.* Systematic Analyses of Substrate Preferences of 20S Proteasomes Using Peptidic Epoxyketone Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 7835-7842 (2015).
371. Kasam,V., Lee,N.R., Kim,K.B., & Zhan,C.G. Selective immunoproteasome inhibitors with non-peptide scaffolds identified from structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 3614-3617 (2014).
372. Balch,W.E., Morimoto,R.I., Dillin,A., & Kelly,J.W. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* **319**, 916-919 (2008).
373. Tonoki,A. *et al.* Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1095-1106 (2009).
374. Lee,B.H. *et al.* Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* **467**, 179-184 (2010).
375. Eisele,Y.S. *et al.* Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 759-780 (2015).
376. Ranek,M.J., Terpstra,E.J., Li,J., Kass,D.A., & Wang,X. Protein kinase g positively regulates proteasome-mediated degradation of misfolded proteins. *Circulation* **128**, 365-376 (2013).

377. Li, J. *et al.* Enhancement of proteasomal function protects against cardiac proteinopathy and ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Clin. Invest* **121**, 3689-3700 (2011).

Annexe

Analyses bio-informatiques supplémentaires effectuées sur les gènes différentiellement exprimés entre les cellules dendritiques de type sauvage et *Psm8^{-/-}/Psm10^{-/-}* (dKO) (Chapitre 2)

Comprend :

A.1 Liste de régulateurs prédits par l'outil *Ingenuity Pathway Analysis* pour chaque groupe de gènes différentiellement exprimés

A.2 Corrélation entre l'expression d'ARNm et l'activité des régulateurs

A.3 Gènes différentiellement exprimés inclus dans les termes d'ontologie « Réponse inflammatoire » et « Réponse antivirale »

A.1 Liste de régulateurs prédits par l'outil *Ingenuity Pathway*

Analysis pour chaque groupe de gènes différentiellement exprimés

Le numéro des *clusters* fait référence à la Figure 2.4. Seulement les régulateurs avec un z-score < -2 ou > 2 ainsi qu'une *p*-value < 0.05 sont montrés. La valeur du z-score est calculée avec l'outil *Ingenuity Pathway Analysis* et est basé sur le ratio dKO/WT des gène-cibles prédites. Un régulateur avec un z-score positif est plus actif chez dKO, et un régulateur avec z-score négatif est plus actif chez WT.

Cluster	Régulateur	Z-score				Cibles prédites
		0h	1h	2h	6h	
#1	NUPR1	2,982	3,130	3,300	-0,354	46
	SMARCB1	2,135	2,135	2,135	1,844	17
	E2F2	-2,000	-2,000	-2,000	0,000	7
	ESR1	-2,102	-2,102	-1,675	0,131	27
	FOXO1	-2,114	-2,331	-2,509	1,787	27
	MYBL2	-2,236	-2,236	-2,236	0,000	6
	STAT1	-2,607	-2,787	-2,787	1,757	21
	E2F1	-2,898	-2,898	-2,898	0,995	35
	TBX2	-3,000	-3,000	-3,000	-1,633	10
	IRF7	-1,480	-1,781	-2,181	3,761	19
	STAT4	1,425	1,137	0,346	4,321	20
	NFATC2	0,000	-1,000	0,000	3,555	16
	HIF1A	-0,104	0,172	-0,104	3,494	25
	NFE2L2	0,000	-1,087	-0,760	3,111	27
	SMARCA4	0,958	0,537	0,537	3,070	26
	RELA	-0,363	-0,363	-0,652	3,039	32
	IRF8	1,000	1,000	1,000	2,919	11
	ETS1	-0,041	-0,041	0,020	2,836	24
	IRF1	0,000	-1,165	-1,165	2,602	16
	CREB1	-0,323	0,000	-1,951	2,596	23
	NFKB1	0,000	0,000	0,000	2,595	21
	HNF4A	1,213	1,213	1,213	2,359	129
	GLI1	-0,785	-0,415	-0,415	2,251	16
	FOXL2	0,000	0,000	0,000	2,178	8
	EGR1	1,277	1,277	0,881	2,150	14
	STAT3	-1,320	-1,547	-1,547	2,029	38
HOXA9	0,000	0,000	0,000	2,000	17	
JUNB	0,000	0,000	0,000	2,000	11	
#2	TRIM24	2,236	2,646	2,236	-1,000	7
	CBFB	-2,000	0,000	-2,000	0,000	4

	IRF7	-2,121	-3,302	-1,890	1,929	12
	CDKN2A	0,000	2,449	0,000	-2,236	6
	STAT1	-1,758	-2,582	-1,477	2,699	11
	NFATC2	0,000	-1,342	0,000	2,000	5
#3	NUPR1	2,357	2,183	2,500	1,606	27
	XBP1	0,000	0,000	3,500	0,000	14
#4	STAT4	0,000	2,797	0,000	0,000	8
	CBFB	0,000	-2,000	0,000	0,000	4
	NKX2-3	2,828	2,646	0,000	-0,816	10
	STAT1	-3,450	-3,316	-0,478	1,348	17
	IRF1	-2,947	-2,772	-1,091	0,000	10
	IRF7	-2,913	-2,913	-0,847	1,408	14
	E2F1	-2,813	-2,813	0,068	0,440	15
#5	IRF3	-2,422	-2,422	-0,761	2,236	12
	IRF5	-2,393	-2,393	-1,455	0,000	8
	FOXM1	-2,177	-2,177	0,000	0,000	6
	XBP1	0,000	0,000	3,719	3,719	15
	NFE2L2	1,091	1,091	3,206	3,206	16
	STAT6	-1,342	-1,342	0,000	2,000	10
	TRIM24	1,765	1,765	0,391	-2,000	9
	TRIM24	3,302	0,000	0,000	-2,433	12
	NR3C1	2,298	1,858	1,094	-0,550	31
	NUPR1	2,496	1,213	1,213	0,688	26
	KLF2	2,593	-0,434	-0,787	-1,095	11
	FOXA2	2,000	1,000	1,000	1,000	8
	IRF3	-3,712	0,337	1,272	2,940	24
	STAT1	-3,793	0,663	2,355	3,358	27
	IRF7	-4,025	0,610	1,878	3,650	20
	NFKBIA	-2,459	1,165	2,259	2,807	31
	STAT3	-2,176	1,400	1,400	1,878	28
#6	NFATC2	-2,945	0,745	1,480	2,714	17
	STAT4	-2,433	1,796	1,915	2,458	20
	IRF1	-3,307	0,838	1,204	2,571	16
	IRF5	-2,772	-0,311	0,000	2,190	9
	NCOA2	-2,219	-0,365	0,000	2,401	8
	NFKB1	-2,951	0,000	0,000	0,000	16
	EPAS1	-2,236	1,131	1,980	1,980	13
	RELA	-3,102	-1,411	0,152	1,037	19
	MTPN	-2,216	0,000	0,000	1,966	7
	BRCA1	-2,410	0,151	-0,254	0,919	10
	CREB1	-2,415	0,000	0,000	0,000	13
	JUN	-2,085	0,394	0,103	0,423	16

	ARNT2	0,000	2,828	2,333	2,333	9
	EGR2	0,555	2,433	2,433	2,433	8
	HIF1A	-1,393	2,370	2,866	2,866	20
	ESR1	-0,288	2,236	2,236	2,236	14
	STAT5A	0,557	2,000	1,342	1,342	10
	CEBPB	-1,013	1,524	2,596	2,156	17
	TRIM24	4,451	3,014	1,352	-3,630	26
	NFE2L2	2,932	2,893	2,503	2,202	19
	SP1	1,513	2,756	2,873	3,185	37
	MITF	2,381	2,745	2,913	2,913	9
	HIF1A	1,273	2,663	2,826	3,119	21
	TFEB	2,438	2,635	2,635	2,635	7
	NKX2-3	3,737	2,510	1,758	-2,240	18
	FOXO3	1,081	2,452	2,637	3,023	17
	STAT5B	2,219	2,425	1,650	1,404	8
	RELA	-0,672	2,374	2,852	3,644	31
	EGR1	1,458	2,272	2,663	2,699	13
	GATA3	0,000	2,211	2,426	2,211	7
	PPARGC1B	1,960	2,190	2,190	2,190	5
	SPI1	1,206	2,170	2,387	1,948	15
	CREB1	0,213	2,126	2,328	2,708	19
	RORC	2,000	2,000	2,000	0,000	11
	HTT	0,000	2,000	2,000	2,000	27
#7	TBX2	-2,433	-2,000	-2,236	-0,640	7
	IRF7	-4,755	-3,122	-1,266	4,335	30
	IRF3	-4,478	-3,228	-1,575	3,494	22
	IRF5	-2,927	-1,539	-0,387	2,596	11
	NFATC2	-2,875	-1,630	0,262	2,856	19
	IRF1	-2,403	-1,982	-1,605	1,103	15
	STAT1	-2,102	-1,423	0,371	2,662	21
	NR1H2	2,002	1,158	1,077	0,091	9
	NR1H3	2,031	1,537	1,454	0,531	9
	STAT4	1,037	1,836	2,606	3,568	15
	USF2	1,224	1,534	2,166	2,386	7
	IRF6	0,000	0,000	2,000	2,219	5
	CEBPB	-0,902	1,038	1,451	2,973	24
	STAT3	0,364	1,264	1,737	2,920	29
	ARNT2	-0,508	0,102	1,066	2,538	12
	SIM1	-0,853	-0,213	0,788	2,345	11
	MYB	-1,131	0,000	0,762	2,219	7
	PGR	0,404	1,942	1,942	2,217	10
	CREBBP	0,000	0,000	1,406	2,176	9

	USF1	1,121	1,938	1,938	2,166	8
	CEBPA	-0,261	0,913	1,057	2,109	26
	ATF4	0,515	1,658	1,908	2,089	10
	PPARA	0,571	1,151	1,441	2,004	18
	PPRC1	0,000	0,000	1,000	2,000	5
	HDAC1	0,218	-0,557	-0,557	-2,000	13
	KLF2	0,293	-1,145	-1,145	-2,067	13
#8	MYC	-0,203	3,661	3,661	0,076	29
	MYCN	0,946	2,735	2,735	1,230	19
	STAT1	-2,204	0,346	-2,186	0,346	8
	NFATC2	-2,000	1,412	0,000	1,412	8
	JUN	0,000	2,604	1,874	2,604	10
	STAT4	1,987	2,434	1,987	2,434	6
#9	CEBPB	1,566	2,423	1,858	2,423	10
	NFKBIA	0,393	2,383	0,771	2,383	13
	IRF8	1,131	2,178	1,477	2,178	8
	XBP1	0,000	2,173	0,000	2,173	6
	EP300	0,000	2,025	1,145	2,025	7
	STAT4	2,049	1,686	2,049	-1,942	20
	SREBF1	0,000	0,000	0,000	-2,124	17
#10	PLAG1	0,000	0,000	0,000	-2,646	7
	TP73	0,000	0,193	0,000	-2,952	12
	TP53	-1,775	-1,366	-1,186	-3,757	80
	SP1	-0,281	-0,281	-2,251	-0,281	19
#11	FOXM1	-1,994	-1,994	-2,230	-1,994	5
	SP3	0,000	0,000	-2,132	0,000	9
#13	HOXD10	0,000	0,000	-2,000	-2,000	4
#14	TP53	-0,760	-2,162	-2,321	-1,995	40
	MKL1	2,000	1,633	1,633	2,000	8
	MKL2	2,000	2,236	2,236	2,000	7
	SRF	2,000	0,493	0,493	2,000	10
	MYC	-2,170	-1,723	-1,723	-2,170	19
	STAT1	-2,213	-2,804	-2,804	-2,213	8
	GLI1	-2,383	-2,572	-2,572	-2,383	7
#15	CBFB	0,000	2,000	2,000	1,732	5
	PPRC1	0,000	-2,000	-2,000	0,000	4
	NFKB1	0,152	-2,156	-2,156	0,152	11
	IRF1	0,000	-2,387	-2,387	0,000	7
	FOXO1	1,176	-2,393	-2,393	1,114	9
	CTNNB1	0,000	-2,592	-2,400	0,000	14
	RUNX1	1,980	0,000	0,000	2,216	6

A.2 Corrélation entre l'expression d'ARNm et l'activité des régulateurs

Coefficient de corrélation (R) calculé entre le ratio d'expression d'ARNm dKO/WT de et la valeur du z-score pour chaque régulateur à travers les temps de stimulation au LPS. Pour un régulateur présent dans plus d'un groupe, la corrélation fut calculée entre le ratio d'expression d'ARNm dKO/WT et la combinaison des valeurs de z-score de tous les clusters.

Régulateur Prédit	Cluster	log ₂ Fold Change				Z-score				R
		0h	1h	2h	6h	0h	1h	2h	6h	
ARNT2	7	1,82	1,64	1,25	1,37	-0,51	0,10	1,07	2,54	-0,65
	6	1,82	1,64	1,25	1,37	0,00	2,83	2,33	2,33	
ATF4	7	0,22	0,00	0,40	0,46	0,52	1,66	1,91	2,09	0,40
BRCA1	6	-0,94	-1,04	-1,07	-0,97	-2,41	0,15	-0,25	0,92	-0,44
CDKN2A	2	3,18	2,44	2,34	1,45	0,00	2,45	0,00	-2,24	0,55
CEBPB	6	0,00	0,69	0,94	1,31	-1,01	1,52	2,60	2,16	0,80
	7	0,00	0,69	0,94	1,31	-0,90	1,04	1,45	2,97	
	9	0,00	0,69	0,94	1,31	1,57	2,42	1,86	2,42	
CREB1	1	0,00	-0,42	0,00	0,00	-0,32	0,00	-1,95	2,60	-0,10
	7	0,00	-0,42	0,00	0,00	0,21	2,13	2,33	2,71	
	6	0,00	-0,42	0,00	0,00	-2,42	0,00	0,00	0,00	
CTNNB1	15	0,61	0,63	0,51	0,58	0,00	-2,59	-2,40	0,00	0,22
E2F2	1	-0,79	-0,51	-0,39	-0,88	-2,00	-2,00	-2,00	0,00	-0,68
EGR2	6	0,00	0,00	0,90	0,53	0,56	2,43	2,43	2,43	0,54
EP300	9	0,23	0,00	0,00	0,20	0,00	2,03	1,15	2,03	-0,45
ESR1	1	0,29	0,00	0,00	0,42	-2,10	-2,10	-1,68	0,13	0,06
	6	0,29	0,00	0,00	0,42	-0,29	2,24	2,24	2,24	
FOXM1	5	-0,61	-0,61	-0,63	-0,64	-2,18	-2,18	0,00	0,00	-0,56
	11	-0,61	-0,61	-0,63	-0,64	-1,99	-1,99	-2,23	-1,99	
FOXO3	7	0,38	0,41	0,86	0,28	1,08	2,45	2,64	3,02	0,14
GATA3	7	0,00	-2,75	0,00	0,00	0,00	2,21	2,43	2,21	-0,29
GLI1	15	0,00	-2,12	-0,89	0,00	-2,38	-2,57	-2,57	-2,38	0,18
	1	0,00	-2,12	-0,89	0,00	-0,79	-0,42	-0,42	2,25	
HDAC1	7	-1,41	-1,23	-1,42	-1,04	0,22	-0,56	-0,56	-2,00	-0,88
HIF1A	7	0,63	0,79	0,85	1,35	1,27	2,66	2,83	3,12	0,67
	6	0,63	0,79	0,85	1,35	-1,39	2,37	2,87	2,87	
	1	0,63	0,79	0,85	1,35	-0,10	0,17	-0,10	3,49	

HTT	7	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	2,00	2,00	2,00	0,33
IRF1	1	0,00	0,00	0,25	0,48	0,00	-1,17	-1,17	2,60	0,64
	7	0,00	0,00	0,25	0,48	-2,40	-1,98	-1,61	1,10	
	5	0,00	0,00	0,25	0,48	-2,95	-2,77	-1,09	0,00	
	15	0,00	0,00	0,25	0,48	0,00	-2,39	-2,39	0,00	
IRF3	6	0,00	0,00	0,25	0,48	-3,31	0,84	1,20	2,57	
	7	0,00	0,00	-0,27	0,00	-4,48	-3,23	-1,58	3,49	-0,08
	5	0,00	0,00	-0,27	0,00	-2,42	-2,42	-0,76	2,24	
IRF5	6	0,00	0,00	-0,27	0,00	-3,71	0,34	1,27	2,94	
	7	0,00	-0,47	-0,44	-0,28	-2,93	-1,54	-0,39	2,60	-0,35
	5	0,00	-0,47	-0,44	-0,28	-2,39	-2,39	-1,46	0,00	
IRF6	6	0,00	-0,47	-0,44	-0,28	-2,77	-0,31	0,00	2,19	
	7	-1,85	-1,85	-4,42	-1,84	0,00	0,00	2,00	2,22	-0,51
	IRF7	1	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-1,48	-1,78	-2,18	3,76
IRF8	5	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-2,91	-2,91	-0,85	1,41	
	6	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-4,03	0,61	1,88	3,65	
	7	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-4,76	-3,12	-1,27	4,34	
	2	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-2,12	-3,30	-1,89	1,93	
	1	-0,50	-0,88	-0,57	-0,49	1,00	1,00	1,00	2,92	0,11
JUN	9	-0,50	-0,88	-0,57	-0,49	1,13	2,18	1,48	2,18	
	9	0,40	1,37	1,81	0,57	0,00	2,60	1,87	2,60	0,36
JUNB	6	0,40	1,37	1,81	0,57	-2,09	0,39	0,10	0,42	
	1	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00	0,00	0,00	2,00	1,00
KLF2	7	0,46	-0,32	0,00	0,00	0,29	-1,15	-1,15	-2,07	0,67
	6	0,46	-0,32	0,00	0,00	2,59	-0,43	-0,79	-1,10	
MITF	7	0,51	0,59	0,42	0,86	2,38	2,75	2,91	2,91	0,32
MKL1	15	0,00	-0,65	-0,96	-0,44	2,00	1,63	1,63	2,00	0,84
MTPN	6	0,00	0,23	0,36	0,22	-2,22	0,00	0,00	1,97	0,62
MYB	7	-1,82	-1,30	-0,86	0,00	-1,13	0,00	0,76	2,22	1,00
MYBL2	1	-0,90	-1,23	-0,62	-0,66	-2,24	-2,24	-2,24	0,00	0,46
MYC	15	0,00	0,41	0,00	0,00	-2,17	-1,72	-1,72	-2,17	0,26
	8	0,00	0,41	0,00	0,00	-0,20	3,66	3,66	0,08	
	NCOA2	6	0,00	-0,26	-0,42	-0,44	-2,22	-0,37	0,00	2,40
NFATC2	6	0,00	0,00	-0,66	-0,73	-2,95	0,75	1,48	2,71	-0,70
	1	0,00	0,00	-0,66	-0,73	0,00	-1,00	0,00	3,56	
	2	0,00	0,00	-0,66	-0,73	0,00	-1,34	0,00	2,00	
	7	0,00	0,00	-0,66	-0,73	-2,88	-1,63	0,26	2,86	
	9	0,00	0,00	-0,66	-0,73	-2,00	1,41	0,00	1,41	
NFE2L2	5	0,40	0,50	0,64	0,56	1,09	1,09	3,21	3,21	0,19
	7	0,40	0,50	0,64	0,56	2,93	2,89	2,50	2,20	
NFKB1	1	0,40	0,50	0,64	0,56	0,00	-1,09	-0,76	3,11	
	15	-0,31	0,00	0,00	0,00	0,15	-2,16	-2,16	0,15	0,24

	1	-0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,60	
	6	-0,31	0,00	0,00	0,00	-2,95	0,00	0,00	0,00	
NR1H3	7	-1,27	-1,65	-1,15	-0,91	2,03	1,54	1,45	0,53	-0,62
NR3C1	6	0,22	0,53	0,61	0,55	2,30	1,86	1,09	-0,55	-0,61
NUPR1	6	0,00	0,70	0,42	0,00	2,50	1,21	1,21	0,69	0,26
	3	0,00	0,70	0,42	0,00	2,36	2,18	2,50	1,61	
	1	0,00	0,70	0,42	0,00	2,98	3,13	3,30	-0,35	
PLAG1	10	0,00	-0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-2,65	-0,33
PPARGC1B	7	0,00	0,92	1,02	0,00	1,96	2,19	2,19	2,19	0,58
PPRC1	7	0,00	0,00	0,44	-0,49	0,00	0,00	1,00	2,00	-0,43
	15	0,00	0,00	0,44	-0,49	0,00	-2,00	-2,00	0,00	
RELA	1	0,00	0,00	0,00	0,32	-0,36	-0,36	-0,65	3,04	0,59
	7	0,00	0,00	0,00	0,32	-0,67	2,37	2,85	3,64	
	6	0,00	0,00	0,00	0,32	-3,10	-1,41	0,15	1,04	
RUNX1	15	0,00	0,34	0,00	0,43	1,98	0,00	0,00	2,22	0,18
SMARCA4	1	0,00	0,00	0,00	0,23	0,96	0,54	0,54	3,07	0,99
SP1	11	0,00	0,00	0,25	0,00	-0,28	-0,28	-2,25	-0,28	-0,19
	7	0,00	0,00	0,25	0,00	1,51	2,76	2,87	3,19	
SP3	11	0,24	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	-2,13	0,00	0,58
STAT1	2	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-1,76	-2,58	-1,48	2,70	0,65
	7	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-2,10	-1,42	0,37	2,66	
	5	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-3,45	-3,32	-0,48	1,35	
	6	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-3,79	0,66	2,36	3,36	
	15	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-2,21	-2,80	-2,80	-2,21	
	1	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-2,61	-2,79	-2,79	1,76	
	9	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-2,20	0,35	-2,19	0,35	
STAT3	7	0,00	-0,25	-0,28	0,23	0,36	1,26	1,74	2,92	0,32
	6	0,00	-0,25	-0,28	0,23	-2,18	1,40	1,40	1,88	
	1	0,00	-0,25	-0,28	0,23	-1,32	-1,55	-1,55	2,03	
STAT4	10	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	2,05	1,69	2,05	-1,94	0,19
	1	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	1,43	1,14	0,35	4,32	
	9	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	1,99	2,43	1,99	2,43	
	7	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	1,04	1,84	2,61	3,57	
	4	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	0,00	2,80	0,00	0,00	
	6	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	-2,43	1,80	1,92	2,46	
STAT5A	6	-0,45	-0,85	-0,48	-0,25	0,56	2,00	1,34	1,34	-0,60
STAT5B	7	0,00	0,00	-0,29	0,00	2,22	2,43	1,65	1,40	0,38
TRIM24	7	-0,55	-0,53	-0,85	-1,02	4,45	3,01	1,35	-3,63	0,81
	2	-0,55	-0,53	-0,85	-1,02	2,24	2,65	2,24	-1,00	
	5	-0,55	-0,53	-0,85	-1,02	1,77	1,77	0,39	-2,00	
	6	-0,55	-0,53	-0,85	-1,02	3,30	0,00	0,00	-2,43	
USF1	7	0,00	0,00	-0,32	0,00	1,12	1,94	1,94	2,17	-0,21

USF2	7	0,23	0,38	0,34	0,32	1,22	1,53	2,17	2,39	0,40
XBP1	9	0,00	0,00	0,21	-0,18	0,00	2,17	0,00	2,17	0,13
	5	0,00	0,00	0,21	-0,18	0,00	0,00	3,72	3,72	
	3	0,00	0,00	0,21	-0,18	0,00	0,00	3,50	0,00	

A.3 Gènes différentiellement exprimés inclus dans les termes d'ontologie « Réponse inflammatoire » et « Réponse antivirale »

Le ratio d'expression dKO/WT est montré pour chaque gène à travers les temps de stimulation au LPS. Chaque gène indiqué a un *p*-value ajusté <0.1 (Voir matériel et méthodes chapitre 2). La valeur « NA » est donnée lorsqu'il n'y a pas de différences significatives entre WT et dKO pour un temps donné. Les tendances dominantes pour la cinétique d'expression dKO/WT est indiquée. *Delayed* indique que l'expression du gène est augmentée en réponse au LPS chez WT mais retardée chez dKO. *Sustained* indique que l'expression du gène est diminuée en réponse au LPS chez WT mais maintenue chez dKO dans les temps de stimulation plus tardifs.

GO-terms	dKO kinetic	Gene	log ₂ (dKO/WT)			
			0h LPS	1h LPS	2h LPS	6h LPS
Inflammatory response	dKO < WT	Afap112	-4,3258	-3,1990	-2,8548	-1,8571
	dKO > WT	Aim2	NA	0,2564	0,3322	0,5761
	dKO > WT	C3	0,7467	0,8842	0,8942	1,1993
	dKO < WT	Ccl12	-2,2441	-1,0305	-0,9149	-0,9896
	Delayed	Ccl2	-0,4606	NA	NA	0,7187
	dKO < WT	Ccl22	-1,1728	-0,6857	-0,5960	-0,6385
	dKO > WT	Ccl4	0,3305	0,5707	0,4014	0,5132
	Delayed	Ccl5	-1,3106	-0,2572	NA	0,3105
	Delayed	Ccl7	-1,3290	NA	NA	0,6917
	dKO < WT	Ccr7	-1,1482	-0,9069	-0,6429	-0,4015
	dKO > WT	Ccr12	NA	1,1264	1,3977	1,8213
	dKO > WT	Csf1r	0,3692	0,5724	0,6379	1,0409
	dKO > WT	Cxcl1	0,9980	1,1045	0,9537	1,0631
	Sustained	Cxcl10	-1,0338	NA	0,3691	1,0660
	dKO > WT	Cxcl11	NA	1,0409	1,7867	3,5646
	dKO < WT	Cxcl9	-2,4953	-0,8933	NA	NA
	dKO > WT	Cyba	NA	0,2753	NA	0,2865
	dKO > WT	Ecm1	0,6966	0,8524	0,8443	0,9722
	dKO < WT	Gal	-0,9270	-0,7294	-0,6566	NA
	dKO < WT	Ggt5	-0,4158	NA	NA	NA
	dKO < WT	Hck	-0,2818	NA	NA	NA
	dKO < WT	Il18	-1,2410	-0,9494	-0,9763	-0,2715
	dKO < WT	Il1b	-0,6320	NA	NA	NA
	dKO > WT	Il6	NA	0,3966	0,2367	0,6442
	dKO > WT	Lat	0,8624	1,2100	1,1171	1,4928
	dKO > WT	Lipa	0,2824	0,4599	0,5130	0,9383
	dKO < WT	Lta	-1,8071	NA	NA	NA

	dKO > WT	Mapkapk2	NA	0,3726	0,4063	0,4082
	dKO > WT	Mif	NA	0,3861	0,3107	0,4815
	dKO < WT	Ms4a2	-2,5449	NA	NA	NA
	dKO > WT	Naip2	NA	0,4526	0,7900	0,5387
	dKO > WT	Naip6	NA	0,4516	0,4191	NA
	dKO > WT	Ndst1	NA	0,4703	NA	0,5120
	dKO > WT	Nfkbiz	NA	0,2418	NA	0,2259
	dKO > WT	Nos2	NA	0,7471	NA	0,9851
	Sustained	Pdpn	-0,8895	-0,6379	-0,3460	0,6980
	Delayed	Ptgs2	-0,8960	NA	NA	0,8014
	dKO > WT	Pxk	NA	0,2446	0,2937	0,5543
	dKO > WT	Rps6ka4	NA	NA	0,2567	0,4556
	dKO < WT	Sema7a	-1,4674	-1,3272	-1,3670	-1,1548
	dKO < WT	Serpinb9	-1,3917	-1,5206	-1,4868	-0,9086
	dKO > WT	Smad1	NA	0,6304	0,6432	0,7029
	dKO > WT	Spp1	NA	0,2433	0,2681	0,5588
	dKO > WT	Tgfb1	0,2320	0,2900	0,2702	0,3753
	dKO > WT	Ticam2	0,4266	0,5479	0,7486	1,1531
	dKO < WT	Tlr11	-5,0351	-4,1041	-Inf	-3,2957
	dKO < WT	Tlr12	-1,3382	-2,0781	-2,6308	NA
	dKO > WT	Tlr6	NA	0,5916	NA	0,7993
	dKO > WT	Tnf	NA	0,3736	NA	0,6376
	dKO > WT	Tnfrsf1a	NA	0,2335	NA	0,3952
	Delayed	Tnfrsf1b	-0,3230	0,3885	0,4345	0,6392
	dKO < WT	Tnfrsf4	-1,8118	-1,8525	-1,5824	-0,9622
Response to virus	dKO > WT	Ace2	-3,6792	NA	NA	NA
	Delayed	Bst2	-0,9249	-0,6754	-0,2922	0,3375
	dKO < WT	Clu	-1,3263	-1,0562	-0,9092	NA
	dKO < WT	Dclk1	-2,5558	NA	NA	NA
	Delayed	Ddx58	-0,5388	-0,5918	NA	0,5218
	dKO < WT	Dhx58	-1,0042	-0,8063	-0,3408	NA
	dKO < WT	Ifi2712a	-0,9016	-0,6491	-0,4937	NA
	Delayed	Ifih1	-0,5143	0,3023	0,4785	0,6172
	Delayed	Ifit1	-1,9636	NA	NA	0,9575
	Delayed	Ifit2	-1,7441	NA	NA	1,0031
	Delayed	Ifit3	-2,5100	-1,1249	-1,0525	0,4793
	Delayed	Ifitm3	-0,4106	NA	NA	0,3470
	dKO > WT	Irak3	NA	0,4173	0,2961	0,9803
	dKO < WT	Lcn2	-1,0721	-0,7092	-0,4253	NA
	Delayed	Mx2	-1,2059	0,3759	NA	0,5341
	dKO > WT	Npc2	NA	0,2490	0,2702	0,4587

Both	dKO < WT	Oas3	-1,7990	-1,7203	-0,7473	NA
	Delayed	Oasl1	-2,1942	-0,4279	NA	0,3457
	dKO < WT	Odc1	-1,4187	-0,7727	-0,4143	NA
	dKO > WT	Rsad2	-1,0318	1,1522	0,8068	1,3072
	Delayed	Myd88	-0,2960	-0,3182	NA	0,3071
	dKO > WT	Tlr8	0,6033	1,0980	1,2320	1,2019
	Delayed	Tlr9	-0,7712	NA	NA	0,5133
	dKO < WT	Tnfsf4	-1,5443	-0,7086	-0,5497	-0,9563