

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA VARIANTE PROTÉIQUE P312R DE LA SOUS-UNITÉ PSMC5 DU PROTÉASOME

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE DE BIOCHIMIE

PAR

ÈVE COMEAU

MAI 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais débiter par exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche, Marc Lussier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son soutien dans la complétion de ma maîtrise, après un passage personnel difficile. Je te remercie de m'avoir supporté au cours de cette année et d'avoir cru en moi.

J'aimerais également remercier mes collègues de laboratoire pour le partage de leurs connaissances et leur assistance durant ma période d'apprentissage. Précisément, merci Valérie pour ton expertise en microscopie et merci, Audrey et Marylou, pour votre soutien en immunobuvardage et production de protéines recombinantes. Je souhaite aussi remercier Roxanne Martel, stagiaire dans le laboratoire à l'été 2023, pour sa contribution lors du démarrage du projet.

Je tiens à exprimer mon appréciation envers mon cher ami Charles Lapointe pour avoir cru en moi tout au long de ce processus et pour m'avoir encouragé lorsque j'en avais besoin. Merci encore pour ton soutien au niveau de la microscopie et de l'immunobuvardage.

J'aimerais également remercier la fondation Projet PSMC5 et le CERMO-FC pour le soutien financier relié au projet.

Finalement, je souhaite prendre le temps de remercier la mère de Cassandra, Véronique D'Amour-Dionne, de m'avoir permis d'étudier l'impact de la mutation génétique *PSMC5* de sa chère fille dans le cadre de ma maîtrise. Considérant l'ampleur des connaissances à apprendre sur cette maladie, ma contribution scientifique est certes petite, mais je suis extrêmement fière d'avoir pu apporter certains éclaircissements à des questions auparavant sans réponse.

DÉDICACE

J'aimerais dédier ce travail à ma famille qui m'a supportée et encouragée tout au long de cette étape.

À ma plus grande motivatrice, ma grand-mère Marie-Reine Narreault

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xi
RÉSUMÉ.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	2
1.1 Voies d'élimination des déchets cellulaires.....	2
1.1.1 Système endosomal-lysosomal	2
1.1.2 Autophagie	2
1.1.3 Voie ubiquitine-protéasome.....	3
1.1.3.1 Mécanisme	3
1.1.3.2 Structure du protéasome	5
1.1.3.2.1 19S	5
1.1.3.2.2 20S	7
1.1.3.3 Types de protéasome	7
1.1.3.3.1 Classification des protéasomes selon la fonction cellulaire.....	8
1.1.3.3.2 Classification des protéasomes selon l'assemblage des régions 19S et 20S	10
1.1.3.4 Dynamique structurelle du protéasome	11
1.1.3.5 Rôle du système ubiquitine-protéasome dans le système nerveux	12
1.2 Pathologies liées à un dysfonctionnement du protéasome.....	14
1.2.1 Maladies non associées à une mutation protéasomique.....	14
1.2.1.1 Maladie d'Alzheimer.....	14
1.2.1.2 Maladie de Parkinson	15
1.2.1.3 Maladie de Huntington.....	15
1.2.1.4 Sclérose latérale amyotrophique	16
1.2.2 Maladies causées par une variation génétique du protéasome	16
1.2.2.1 Protéasomopathies	16
1.2.2.2 Maladie génétique <i>PSMC5</i>	16
1.2.2.2.1 Variant c.166+3del.....	19
1.2.2.2.2 Variant c.206A>G (p.Q69R)	19
1.2.2.2.3 Variant c.414G>C (p.M138I).....	19

1.2.2.2.4	Variant c.548C>T (p.P183L)	20
1.2.2.2.5	Variant c.587del (p.K196Rfs*29)	20
1.2.2.2.6	Variant c.601C>T (p.R201W)	20
1.2.2.2.7	Variant c.605C>T (p.A202V)	21
1.2.2.2.8	Variant c.620C>T (p.T207M).....	21
1.2.2.2.9	Variant c.647G>A (p.G216D)	21
1.2.2.2.10	Variant c.662A>G (p.Q221R)	22
1.2.2.2.11	Variant c.749A>T (p.E250V).....	22
1.2.2.2.12	Variant c.749A>G (p.E250G).....	22
1.2.2.2.13	Variant c.754G>A (p.D252N)	23
1.2.2.2.14	Variant c.772C>T (p.R258W)	23
1.2.2.2.15	Variant c.773G>A (p.R258Q)	23
1.2.2.2.16	Variant c.845G>A (p.G282D)	23
1.2.2.2.17	Variant c.959C>G (p.P320R)	24
1.2.2.2.18	Variant c.959C>A (p.P320H)	24
1.2.2.2.19	Variant c.968_969+1del	25
1.2.2.2.20	Variant c.970-2A>G	25
1.2.2.2.21	Variant c.973C>T (p.R325W)	25
1.2.2.2.22	Variant c.1103T>C (p.M368T).....	26
1.2.2.2.23	Variant c.1182_1183del (p.D394Efs*2).....	26
1.2.2.2.24	Variant c.205C>T (p.Q69Ter)	27
1.2.2.2.25	Variant c.479A>C (p.Q160A).....	27
1.3	Problématique	27
1.4	Hypothèse et objectifs	28
1.5	Sélection du modèle cellulaire.....	29
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES		32
2.1	Prédiction de l'impact de la mutation P312R de la sous-unité PSMC5 sur la structure du protéasome	32
2.2	Construction de l'ADN plasmidique.....	32
2.3	Amplification plasmidique et purification	32
2.4	Anticorps	33
2.5	Transfection	34
2.5.1	Transfection transitoire de cellules HeLa	34
2.5.2	Transfection stable de cellules SH-SY5Y	35
2.6	Clonage par dilutions limites et sélection des cellules SH-SY5Y	35
2.7	Cryopréservation des clones stables SH-SY5Y	36
2.8	Immunofluorescence	37
2.8.1	Conditions de culture des clones SH-SY5Y	37
2.8.2	Marquage et acquisition.....	37
2.8.3	Protocole d'analyse bidimensionnelle (2D).....	38
2.8.4	Protocole d'analyse tridimensionnelle (3D)	38

2.9 Lyse cellulaire.....	39
2.10 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE	40
2.11 Immunobuvardage.....	40
2.12 Analyse morphologique des clones SH-SY5Y.....	41
2.13 Activité enzymatique du protéasome	41
2.13.1 Production de la protéine recombinante His-HA-PSMB5 purifiée	41
2.13.2 Dosage du phosphate au vert de malachite combiné à un ELISA quantitatif de la protéine HA-PSMC5	42
2.13.2.1 Lyse cellulaire	42
2.13.2.2 ELISA	43
2.13.2.3 Dosage du phosphate au vert de malachite.....	44
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	46
3.1 Validation préliminaire de l’hypothèse de recherche	46
3.2 Mise au point du modèle cellulaire	48
3.3 Caractérisation des clones PSMC5 WT et P312R chez des cellules SH-SY5Y.....	52
3.3.1 Morphologie	52
3.3.2 Abondance protéique par immunobuvardage	55
3.3.3 Abondance et localisation protéique par immunofluorescence.....	57
3.3.4 Activité d’hydrolyse de l’ATP du protéasome par méthodes enzymatiques	61
CHAPITRE 4 DISCUSSION	71
4.1 Validation préliminaire de l’hypothèse de recherche	71
4.2 Caractérisation des clones HA-PSMC5 WT et P312R.....	73
4.2.1 Morphologie	73
4.2.2 Abondance protéique par immunobuvardage	74
4.2.3 Abondance et localisation protéique par immunofluorescence.....	77
4.3 Influence de la mutation P312R de la sous-unité PSMC5 sur l’activité d’hydrolyse de l’ATP.....	81
4.4 Avenues.....	83
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	86
ANNEXE A IDENTIFICATION DES VARIANTS DE L’ISOFORME 1 DE LA SOUS-UNITÉ <i>PSMC5</i> DANS LES DIFFÉRENTES BASES DE DONNÉES PUBLIQUES	87
ANNEXE B LISTE DES CLONES SH-SY5Y HA-PSMC5 WT ET P312R CONSERVÉS SUITE À LA SÉLECTION CLONALE.....	89
APPENDICE A VECTEUR pcDNA3.1+/N-HA.....	90
APPENDICE B VECTEUR pET-28a(+)-TEV	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Mécanismes d'ubiquitination des protéines via la cascade enzymatique E1, E2, E3 et E4.....	4
Figure 1.2 Implications fonctionnelles principales du protéasome au sein des cellules.....	5
Figure 1.3 Illustration en deux dimensions de la structure du protéasome 30S.....	7
Figure 1.4 Représentation des différentes régions 20S du protéasome et leurs sous-unités catalytiques distinctes.	10
Figure 1.5 Représentation des régulateurs du protéasome 20S.	12
Figure 1.6 Recensement des caractéristiques cliniques des sujets présentant une mutation de l'isoforme 1 de la sous-unité <i>PSMC5</i> du protéasome.	18
Figure 1.7 Schématisation du gène <i>PSMC5</i> et de la séquence primaire de l'isoforme 1 de la sous-unité, avec les variants répertoriés.....	18
Figure 1.8 Chaque ATPase du protéasome assure une fonction cruciale dans le bon fonctionnement du complexe enzymatique.	29
Figure 3.1 Prédiction AlphaFold de l'interaction entre la sous-unité <i>PSMC5</i> WT et P312R du protéasome et une molécule d'ATP.....	47
Figure 3.2 Distribution intracellulaire de HA- <i>PSMC5</i> et de l'ubiquitine suite à la transfection transitoire de <i>PSMC5</i> WT et P312R chez des cellules HeLa.	48
Figure 3.3 Effet de la quantité d'ADN plasmidique sur l'abondance de HA- <i>PSMC5</i> WT et P312R, chez des cellules SH-SY5Y.....	49
Figure 3.4 Première étape de sélection des clones <i>PSMC5</i> WT et P312R, de cellules SH-SY5Y, par immunobuvardage.	50
Figure 3.5 Deuxième étape de sélection des clones <i>PSMC5</i> WT et P312R, de cellules SH-SY5Y, par immunobuvardage.	51
Figure 3.6 Deuxième étape de sélection des clones <i>PSMC5</i> WT et P312R, de cellules SH-SY5Y, par immunofluorescence qualitative.	54
Figure 3.7 Morphologie des clones <i>PSMC5</i> WT et P312R, de cellules SH-SY5Y, suite à une transfection stable de <i>HA-PSMC5</i>	54
Figure 3.8 Caractérisation, par immunobuvardage quantitatif, des clones WT et P312R avec une expression stable de HA- <i>PSMC5</i> chez des cellules SH-SY5Y.....	57
Figure 3.9 Comparaison de la méthode d'analyse quantitative bi- et tridimensionnelle des clones <i>PSMC5</i> WT et P312R par le logiciel Fiji.	59

Figure 3.10 Caractérisation, par immunofluorescence quantitative, des clones WT et P312R avec une expression stable de HA-PSMC5 chez des cellules SH-SY5Y.	60
Figure 3.11 Purification de la protéine recombinante His-HA-PSMB5 produite chez E. coli.	62
Figure 3.12 Optimisation de la concentration du lysat cellulaire et des anticorps pour l'ELISA quantitatif de HA-PSMC5.	63
Figure 3.13 Impact de la concentration du tampon de blocage sur la sensibilité et la spécificité de l'ELISA quantitatif de HA-PSMC5, en fonction des concentrations d'anticorps de détection primaire et secondaire.	65
Figure 3.14 Optimisation de la dilution du lysat cellulaire pour le dosage du phosphate au vert de malachite.	68
Figure 3.15 Validation du protocole ELISA pour la quantification de HA-PSMC5 chez les clones SH-SY5Y.	68
Figure 3.16 Courbe standard ELISA de la protéine recombinante purifiée His-HA-PSMB5 pour le dosage quantitatif de HA-PSMC5.	69
Figure 3.17 La mutation P312R de la sous-unité PSMC5 n'affecte pas l'activité ATPase du protéasome. .	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Liste des anticorps utilisés et leurs applications.	34
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ATP	Adénosine triphosphate
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> , acide bicinchonique
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albumine de sérum bovin
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , dosage d'immunoabsorption enzymatique
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , sérum de veau foetal
G418	Généticine
HA	Hémagglutinine
HCl	Acide chlorhydrique
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxydase de raifort
LB	<i>Lysogeny broth</i> , bouillon lysogène
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné
NT	Non transfecté
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , cellules mononucléées du sang périphérique
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampon phosphate salin
pH	Potentiel hydrogène
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> , polyfluorure de vinylidène
ROI	<i>Region of interest</i> , région d'intérêt
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i> , solution saline tamponnée au Tris avec Tween
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
WT	<i>Wild type</i> , type sauvage

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C	Degré Celsius
h	Heure
mA	Milliampère
min	Minute
mL	Millilitre
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
pg	Picogramme
pM	Picomolaire
rpm	Rotations par minute
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µm	Micromètre
µM	Micromolaire
V	Volt

RÉSUMÉ

Le protéasome assure un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en exécutant la dégradation protéolytique. La maladie *PSMC5*, affectant une vingtaine d'individus mondialement, résulte d'une mutation génétique de la sous-unité *PSMC5* du protéasome. Malgré la présence de retards neurodéveloppementaux chez les enfants atteints, les implications sur la santé demeurent inconnues. Puisque l'ATPase *PSMC5* médie l'entrée des protéines dans la chambre protéolytique suite à leur déubiquitination, l'hypothèse est que la mutation P312R (c.935C>G, p.Pro312Arg) altère l'activité ATPase, réduisant donc l'entrée des protéines dans la chambre catalytique. Une prédiction bio-informatique par AlphaFold a démontré l'obstruction du site de liaison à l'ATP de la sous-unité *PSMC5* lorsque la proline 312 est remplacée par une arginine. Par ailleurs, des résultats provenant de la transfection transitoire de *PSMC5* chez des cellules HeLa ont indiqué une réduction fonctionnelle du protéasome due à la mutation P312R. Précisément, une augmentation de la colocalisation de HA-*PSMC5* P312R avec le signal immunofluorescent de l'ubiquitine était observée. Parallèlement, des lignées cellulaires SH-SY5Y clonales WT et P312R ont été générées et sélectionnées selon une abondance élevée ou faible de HA-*PSMC5*. La caractérisation détaillée des clones par immunobuvardage révèle des niveaux similaires de l'ubiquitine, de la chaîne de polyubiquitine liée à la lysine 48 (K48), ainsi que de plusieurs sous-unités du protéasome entre les conditions WT et P312R. Par ailleurs, un dosage du phosphate au vert de malachite couplé à un ELISA en sandwich a révélé que l'hydrolyse de l'ATP du protéasome n'est pas significativement affectée par la mutation P312R. Cette observation suggère la présence d'un mécanisme compensatoire impliquant les six sous-unités ATPases. Cette recherche permettra de comprendre les mécanismes cellulaires affectés par la variante P312R de la sous-unité *PSMC5* du protéasome. Ceux-ci élucidés, il sera possible d'évaluer la capacité de certaines molécules à augmenter l'activité catalytique du protéasome, ouvrant donc la voie au développement de traitements potentiels.

Mots clés : Protéasome, Mutation P312R, *PSMC5*, Ubiquitine

ABSTRACT

The proteasome plays a key role in maintaining cellular homeostasis through proteolytic degradation. The *PSMC5*-related disease, affecting around twenty individuals worldwide, is caused by a genetic mutation in the *PSMC5* subunit of the proteasome. The health implications remain poorly understood despite the neurodevelopmental delays observed in affected children. As the ATPase *PSMC5* mediates the entry of proteins into the proteolytic chamber after deubiquitination, it is hypothesized that the P312R mutation (c.935C>G, p.Pro312Arg) alters ATPase activity, thereby reducing protein entry into the catalytic chamber. A bioinformatic prediction by AlphaFold revealed the obstruction of the ATP-binding site of the *PSMC5* subunit in the presence of the variant. Additionally, results from transient transfection of *PSMC5* into HeLa cells indicated a functional reduction of the proteasome by the P312R variant. Specifically, an increased colocalization of HA-*PSMC5* P312R with the immunofluorescent signal of ubiquitin was observed. Simultaneously, clonal WT and P312R SH-SY5Y cell lines were generated and selected based on high or low abundance of HA-*PSMC5*. A detailed characterization of the clones by immunoblotting revealed similar levels of ubiquitin, K48-linked polyubiquitin chain and multiple proteasome subunits. Furthermore, a malachite green phosphate assay coupled with a sandwich ELISA revealed that the ATP hydrolysis activity of the proteasome is not significantly altered by the P312R mutation. This finding suggests the presence of a compensatory mechanism involving the six ATPase subunits. This research aims to understand the cellular mechanisms affected by the P312R mutation of the proteasome's *PSMC5* subunit. Once understood, certain molecules may be evaluated for their ability to enhance proteasome catalytic activity, thus paving the way for the development of potential treatment options.

Keywords : Proteasome, P312R mutation, *PSMC5*, Ubiquitin

INTRODUCTION

La maladie *PSMC5* est une pathologie génétique rare, causée par une mutation de la sous-unité *PSMC5* du protéasome. À ce jour, seulement une vingtaine de cas ont été répertoriés à travers le monde, dont Cassandra, une jeune montréalaise de six ans. Les connaissances scientifiques actuelles en lien avec l'évolution de la maladie, les symptômes neurologiques et son impact global sur la qualité de vie demeurent très limitées. Par ailleurs, l'absence de traitement soumet les personnes atteintes, ainsi que leurs proches, à un état d'incertitude considérable.

À la demande de la famille de Cassandra, le laboratoire du Professeur Marc Lussier, affilié au Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois de l'Université du Québec à Montréal, a mis sur pied un nouveau projet de recherche. Plus précisément, cette étude vise à caractériser les mécanismes cellulaires altérés par la mutation génétique P312R de l'isoforme 2 de la sous-unité *PSMC5* du protéasome.

À cet effet, une lignée cellulaire modèle SH-SY5Y exprimant la forme sauvage ou mutée de *PSMC5* a premièrement été développée. Cette approche a permis d'évaluer l'impact de la variante P312R sur l'abondance et la distribution cellulaire de l'ubiquitine, ainsi que sur la capacité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome. Diverses techniques ont été utilisées, telles que l'immunobuvardage, l'immunofluorescence et le dosage du phosphate au vert de malachite.

Étant donné que la mutation P312R n'a été identifiée que très récemment par la communauté scientifique, cette étude constitue une avancée importante quant à la compréhension de ses effets au niveau cellulaire, et ce dans un cadre de recherche fondamentale.

Ce mémoire est structuré en plusieurs sections. Il débute par une revue de la littérature, suivie d'une description détaillée du matériel et des méthodes employées, ainsi que des résultats obtenus. Il se conclut par une discussion mettant en relation les résultats et la littérature, tout en abordant les forces et les faiblesses du travail ainsi que les perspectives de recherche.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Voies d'élimination des déchets cellulaires

Pour maintenir leur homéostasie, les cellules doivent évacuer les déchets au fur et à mesure qu'ils sont produits. Chez les cellules procaryotes, par la simplicité de leur structure, les éléments à éliminer sont majoritairement diffusés hors de l'hôte par exocytose. À l'inverse, la complexité structurelle des cellules eucaryotes a nécessité le développement de diverses procédures d'évacuation des substances non désirées, c'est-à-dire le système endosomal-lysosomal, l'autophagie et la voie ubiquitine-protéasome (Appelqvist *et al.*, 2013; Birgisdottir et Johansen, 2020). Dans le cadre du projet présenté, un intérêt particulier sera porté sur le dernier mécanisme mentionné.

1.1.1 Système endosomal-lysosomal

Ce mécanisme d'élimination consiste en une série de vésicules se déplaçant au travers de la cellule et fusionnant entre elles pour en dégrader leurs contenus. Plus précisément, des molécules, telles que des débris extracellulaires, sont englobées par endocytose et relarguées au niveau des endosomes précoces. Ces derniers déterminent ensuite si elles doivent être recyclées vers la membrane plasmique, et donc transférées vers des endosomes de recyclage, ou éliminées par le système lysosomal (Hu *et al.*, 2015). Dans le cas où la deuxième voie est empruntée, les endosomes précoces se convertissent, tout d'abord, en endosomes tardifs après quoi ceux-ci fusionnent avec des lysosomes, où la dégradation est effectuée (Hu *et al.*, 2015). Les lysosomes étant chargés de protéases, lipases et glycosidases, ces vésicules assurent la suppression d'un contenu moléculaire varié (Tooze *et al.*, 2014).

1.1.2 Autophagie

Comme deuxième voie de dégradation des déchets cellulaires, l'autophagie se distingue du système endosomal-lysosomal de par son initiation mécanistique. Effectivement, contrairement au système précédent agissant au niveau du matériel extracellulaire, ce processus est mis en marche lorsque du contenu intracellulaire, tel que des protéines et des organites, doit être supprimé (Tooze *et al.*, 2014). Au sein du cytoplasme, une vésicule dénommée phagophore englobe les molécules non désirées de manière à former un autophagosome (Mizushima *et al.*, 2011). Suite à la fusion de sa membrane avec celle d'un lysosome, l'autolysosome résultant assure la dégradation moléculaire par ses hydrolases (Mizushima *et*

al., 2011; Tooze *et al.*, 2014). Il est à noter qu'il existe également des processus autophagiques ne nécessitant aucune vésicule intermédiaire entre le contenu à dégrader et le lysosome, comme la microautophagie et l'autophagie médiée par des chaperonnes (Tooze *et al.*, 2014).

1.1.3 Voie ubiquitine-protéasome

1.1.3.1 Mécanisme

La voie ubiquitine-protéasome permet, par la présence d'une étiquette sur les protéines en excès et/ou mal repliées, de modifier ou d'éliminer des molécules, et ce de manière spécifique. L'évacuation de ces protéines s'effectue à la suite de (1) l'attachement d'une chaîne de polyubiquitine à la protéine d'intérêt qui (2) est reconnue par le protéasome, (3) qui entraîne sa dégradation par protéolyse (Glickman et Ciechanover, 2002; Tanaka, 2009). La première étape est effectuée par une cascade enzymatique composée des enzymes E1 activatrice de l'ubiquitine, E2 conjugatrice de l'ubiquitine et E3 ligase d'ubiquitine. Premièrement, par une liaison dépendante de l'adénosine triphosphate (ATP), la E1 active et lie une molécule d'ubiquitine. Le transfert de celle-ci à la E2 est ensuite effectué par une réaction de transthiolation. À ce stade, la E2 peut soit catalyser la liaison covalente de l'ubiquitine à la protéine d'intérêt ou transférer l'ubiquitine à E3. Dans l'éventualité où la E2 emprunte la première voie, la E3 intervient comme protéine d'échafaudage entre la E2 et la protéine cible, assurant donc la liaison covalente entre la protéine à dégrader et l'ubiquitine (Glickman et Ciechanover, 2002; Tanaka, 2009). En comparaison, si la E2 emprunte la deuxième voie, elle lie la E3 pour transférer la molécule d'ubiquitine sur un résidu cystéine, après quoi la E3 assure le transfert de l'ubiquitine à un groupe amine au sein de la protéine d'intérêt (Glickman et Ciechanover, 2002; Tanaka, 2009). Il est à noter qu'il existe également un sous-groupe d'enzymes E3, intitulé E4, agissant comme protéine d'échafaudage afin d'assurer le transfert de molécules d'ubiquitine d'une E2 vers une protéine possédant déjà une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (Anton *et al.*, 2023; Antoniou *et al.*, 2019; Grabarczyk *et al.*, 2024). Sachant que l'ubiquitine peut former des chaînes au niveau de huit résidus lysine et que chacune de celles-ci possède des fonctions propres, une chaîne de polyubiquitine à la lysine 48 est nécessaire pour être reconnue et dégradée par le protéasome (Glickman et Ciechanover, 2002; Tanaka, 2009). Les étapes de la cascade enzymatique médiée par les enzymes E1, E2, E3 et E4 sont schématisées à la figure 1.1.

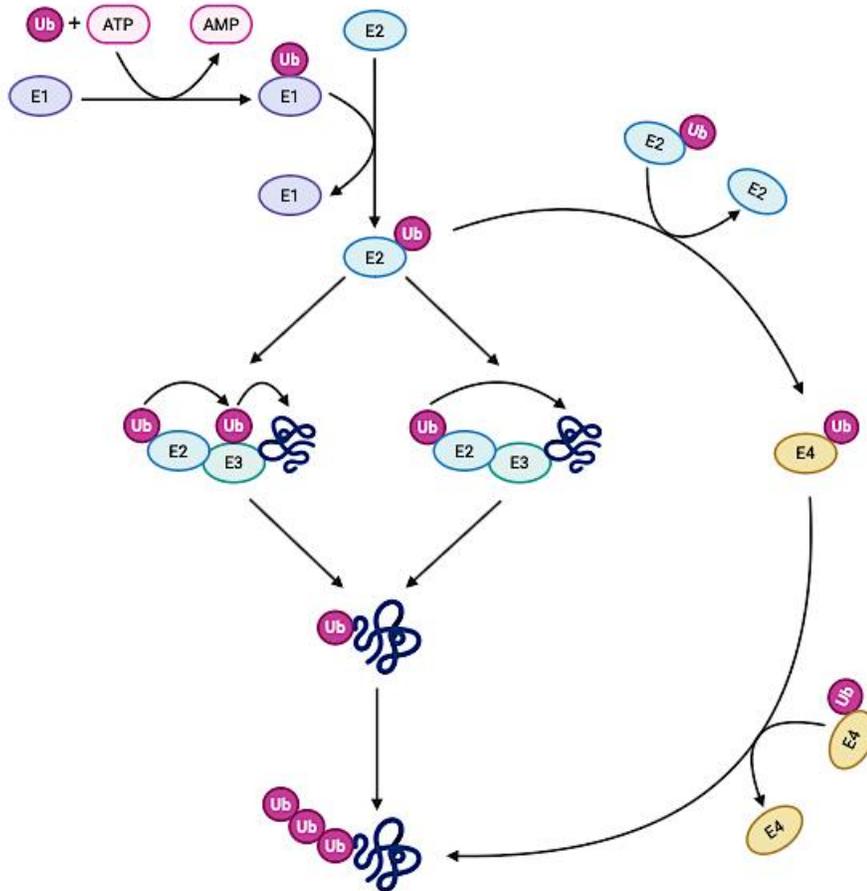


Figure 1.1 Mécanismes d'ubiquitination des protéines via la cascade enzymatique E1, E2, E3 et E4. Adaptée de LaPlante et Zhang, 2021.

Lorsqu'une protéine présentant une chaîne de polyubiquitine à sa lysine 48 est dans la périphérie d'un protéasome, celle-ci est reconnue et déubiquitinée par la section 19S du complexe multiprotéique. Ensuite, l'ouverture du canal catalytique du protéasome permet l'acheminement de la protéine en question vers ce site protéolytique (Glickman et Ciechanover, 2002; Tanaka, 2009). Suite à cette activité enzymatique, les peptides produits peuvent emprunter différentes voies (fig. 1.2), telles qu'une dégradation supplémentaire en peptides ou acides aminés, une liaison au transporteur associé au traitement des antigènes (TAP) pour la présentation antigénique ou bien une modification protéique permettant la réalisation d'une nouvelle fonction cellulaire (Glickman et Ciechanover, 2002).

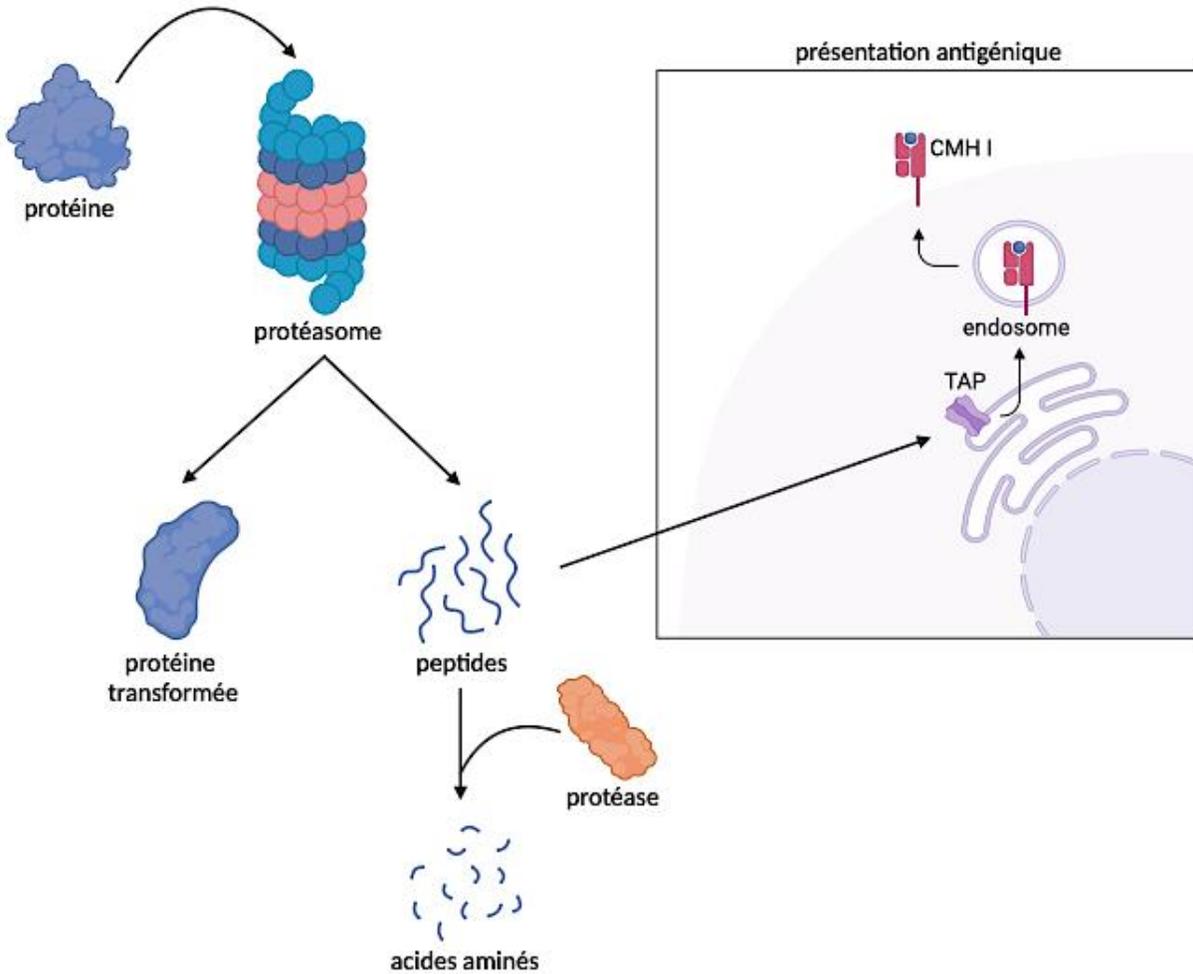


Figure 1.2 Implications fonctionnelles principales du protéasome au sein des cellules. CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; TAP, transporteur associé au traitement des antigènes. Adaptée de Glickman et Ciechanover, 2002.

1.1.3.2 Structure du protéasome

De manière générale, le protéasome est constitué de deux régions, soit la section régulatrice 19S et le site catalytique 20S (fig. 1.3). La région régulatrice 19S constitue le premier point de rencontre avec les protéines à dégrader tandis que le site catalytique 20S assure l'activité protéolytique du complexe enzymatique (Tanaka, 2009).

1.1.3.2.1 19S

La région régulatrice du protéasome est divisée en deux sections, soit la base et le couvercle (fig. 1.3). Étant responsable de l'interaction entre les protéines d'intérêt et le complexe enzymatique, le couvercle est composé de multiples sous-unités non-ATPases Rpn (*regulatory particle of non-ATPase*), soit Rpn3,

Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11, Rpn12 et Rpn15 (Glickman et Ciechanover, 2002; Tanaka, 2009). Actuellement, seulement Rpn11 possède une activité enzymatique connue, à savoir la déubiquitination de la protéine cible grâce à son activité de métalloisopeptidase (Ehlinger et Walters, 2013; Tanaka, 2009).

Représentant la zone de transition entre la section régulatrice et le canal catalytique, la base 19S assure la préparation des protéines à la dégradation. Effectivement, cette zone est composée des protéines d'échafaudage Rpn1 et Rpn2, qui assure l'interaction du protéasome avec diverses molécules en périphérie, et ce par leur composition en répétitions riches en leucine (Glickman et Ciechanover, 2002). La base est également constituée des récepteurs d'ubiquitine Rpn10 et Rpn13, en plus de Rpn1, exécutant la reconnaissance des protéines cibles. L'enzyme Rpn13 est également connue pour son interaction avec l'enzyme de déubiquitination Uch37. Par sa liaison en C-terminal de Rpn13, cette Uch37 permet de retirer l'étiquette de chaîne de polyubiquitine. Par ailleurs, une étude récente a démontré que Rpn10 serait le principal récepteur d'ubiquitine, les sous-unités Rpn1 et Rpn13 ayant la possibilité d'assister Rpn10 afin d'accélérer la vitesse de dégradation (Martinez-Fonts *et al.*, 2020).

Finalement, la base est aussi constituée de six sous-unités ATPases Rpt1-6 (*regulatory particle of triple-A ATPase*). Celles-ci, par une voie dépendante de l'ATP, entraînent le dépliement des protéines déubiquitinées et l'ouverture du canal alpha de la région 20S du protéasome, permettant ainsi la translocation des protéines vers le site catalytique du complexe multiprotéique (Tanaka, 2009). Bien que le mécanisme emprunté par les ATPases ne soit que partiellement élucidé, des études suggèrent la présence d'une réaction en chaîne quant à leur activité d'hydrolyse de l'ATP (Dong *et al.*, 2019; Peth *et al.*, 2013b; Smith *et al.*, 2011). Toutefois, il semblerait que l'ordre d'activation des sous-unités Rpt1-6 dépend de l'étape à laquelle se situe la protéine cible dans ce processus protéolytique (Dong *et al.*, 2019). Plus spécifiquement, la déubiquitination serait régulée par deux ATPases opposées, la translocation primitive de la protéine cible par deux ATPases adjacentes, puis la translocation continue par l'action séquentielle des six sous-unités Rpt (Dong *et al.*, 2019). Par ailleurs, une étude a démontré que l'activité d'hydrolyse de l'ATP des sous-unités Rpt nécessite la présence d'un substrat approprié (Peth *et al.*, 2013a). Plus précisément, l'activité enzymatique de protéasomes purifiés était stimulée en présence de protéines polyubiquitinées, mais pas sous l'influence de protéines non-ubiquitinées (Peth *et al.*, 2013a). Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin comprendre davantage le mécanisme d'action des sous-unités ATPases du protéasome, notamment en l'absence de ligand.

1.1.3.2.2 20S

La section 20S du protéasome représente le site catalytique même du complexe. Celle-ci est composée d'une multitude de sous-unités de type alpha et bêta, formant un total de quatre anneaux (Tanaka, 2009). Plus précisément, les extrémités du site catalytique sont composées d'un anneau de sous-unités alpha un à sept, tandis que la région interne est constituée de deux anneaux de sous-unités bêta un à sept (fig. 1.3). La localisation intérieure de celles-ci est expliquée par leur fonction enzymatique de type caspase (bêta 1), trypsine (bêta 2) et chymotrypsine (bêta 5). Par contre, il est à noter que la fonction précise de l'intégralité des sous-unités alpha et des molécules bêta 3, 4, 6 et 7 n'est toujours pas claire à ce jour (Tanaka, 2009).

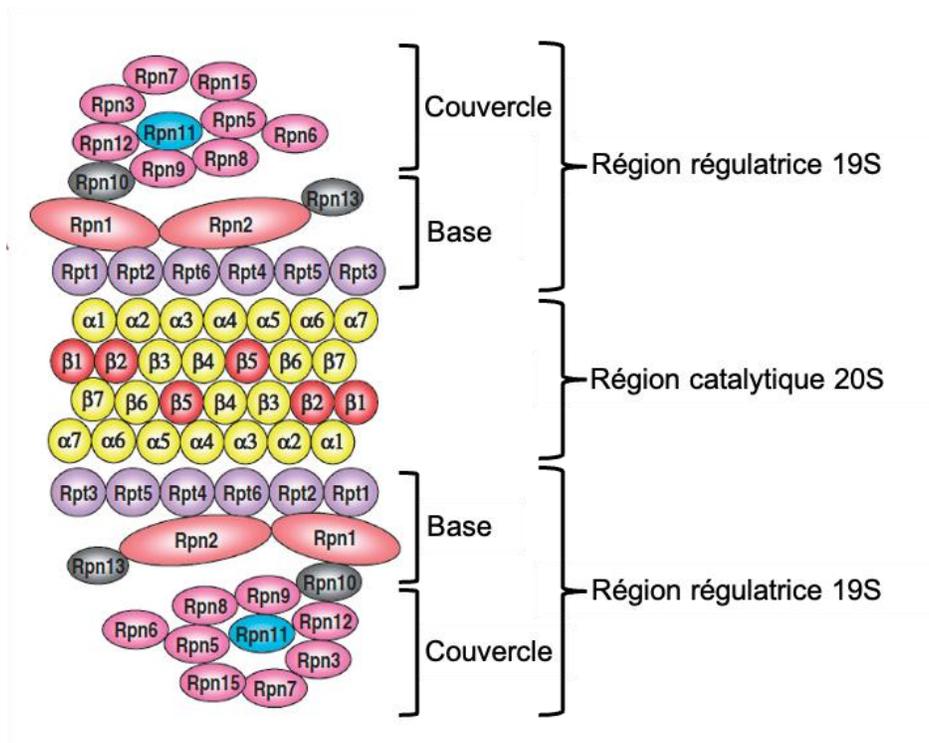


Figure 1.3 Illustration en deux dimensions de la structure du protéasome 30S.

La nomenclature présentée ici (rpn, rpt, alpha, beta) constitue la nomenclature systémique pour parler de l'humain et de la levure (Tanaka, 2009).

Adaptée de Tanaka, 2009.

1.1.3.3 Types de protéasome

En plus d'assurer la dégradation des déchets protéiques cellulaires, la position omniprésente du protéasome dans l'homéostasie amène celui-ci à contrôler divers mécanismes cellulaires (Tanaka, 2009).

En effet, ce complexe protéique participe à plusieurs voies de signalisation liées au cycle et à la mort

cellulaire, à la transduction du signal, mais également à la production de peptides pour la défense immunitaire (Glickman et Ciechanover, 2002). Dans le but d'exécuter ces fonctions variées de manière optimale, la cellule a développé des modifications protéiques au niveau des sous-unités enzymatiques. Sachant cela, en plus du protéasome standard, cinq types spécialisés existent : le protéasome intermédiaire unique et double, l'immunoprotéasome, le thymoprotéasome et le spermatoprotéasome (Glickman et Ciechanover, 2002; Habib *et al.*, 2022; Tanaka, 2009). Il est à noter que ce complexe multiprotéique est également divisé en trois types selon l'assemblage.

1.1.3.3.1 Classification des protéasomes selon la fonction cellulaire

Comme mentionné précédemment, l'activité catalytique du protéasome est assurée par les sous-unités bêta 1, 2 et 5 à fonction caspase, trypsine et chymotrypsine respectivement (Tanaka, 2009). À la figure 1.4, il est possible d'observer la principale caractéristique distinguant les types de protéasome, soit la structure de ces sous-unités. Chez l'immunoprotéasome, les sous-unités bêta 1, 2 et 5 sont remplacées par des sous-unités homologues avec certaines modifications au niveau de leur poche de liaison aux substrats. En effet, contrairement aux acides aminés hydrophiles de la sous-unité bêta 1, la protéine bêta 1i est tapissée de résidus hydrophobes lui conférant une préférence pour une activité catalytique de type chymotrypsine (Basler *et al.*, 2013). La sous-unité bêta 2i, quant à elle, se distingue de la sous-unité bêta 2 par la présence d'une substitution D53E, induisant un changement conformationnel au niveau de son extrémité C-terminale (Abi Habib *et al.*, 2022). Par ailleurs, la poche de liaison de la sous-unité bêta 5i apparaît élargie comparativement à celle standard, permettant donc la protéolyse de protéines de taille supérieure (Abi Habib *et al.*, 2022). Ces distinctions entraînent alors, chez l'immunoprotéasome, le renforcement des activités trypsine et chymotrypsine, au détriment de celle de type caspase (Abi Habib *et al.*, 2022). Présent chez une multitude de cellules immunitaires, l'immunoprotéasome est exprimé de manière constitutive, mais peut également être stimulé en présence de molécules pro-inflammatoires telles que les interférons de type I, le facteur de nécrose tumorale (TNF-alpha) et les interleukines (Abi Habib *et al.*, 2022; McCarthy et Weinberg, 2015). À la vue de fragments antigéniques, l'immunoprotéasome effectue sa fonction protéolytique résultant en l'obtention de courts peptides pouvant être chargés sur le CMH de classe I des cellules immunitaires. Ceci permet ensuite aux cellules T, par leur récepteur de lymphocytes T, de reconnaître les antigènes étrangers et d'activer une réponse immunitaire (McCarthy et Weinberg, 2015).

Le thymoprotéasome, quant à lui, est également impliqué dans le contexte du système immunitaire. Comme son nom l'indique, celui-ci est strictement isolé au thymus, où il est exprimé constitutivement chez

les cellules épithéliales corticales (Abi Habib *et al.*, 2022). Possédant les sous-unités bêta 1i et 2i de l'immunoprotéasome en plus d'une sous-unité bêta 5t unique, celui-ci assure la présentation antigénique pour la sélection positive des lymphocytes T CD8. Bien qu'homologue à celle du protéasome standard et de l'immunoprotéasome, la poche de liaison de la sous-unité bêta 5t est munie d'une multitude de résidus hydrophiles, augmentant ses activités enzymatiques de type caspase et trypsine (Abi Habib *et al.*, 2022; Frantzeskakis *et al.*, 2021). Ceci lui permet donc de produire de courts peptides distincts des autres protéasomes. Cette particularité est à l'origine même de sa fonction dans l'éducation des cellules T, où ceux-ci doivent être soumis à une sélection positive en présence de peptides rarement présents dans les autres systèmes de l'hôte (Frantzeskakis *et al.*, 2021).

Le spermatoprotéasome est un complexe protéique présent exclusivement chez les cellules germinales mâles où il participe à la spermatogenèse (Abi Habib *et al.*, 2022). Muni des mêmes sous-unités bêta que le protéasome standard, celui-ci possède une sous-unité alpha 4s. En dépit du manque d'informations, les distinctions entre les protéines alpha 4 et 4s ne semblent pas être au niveau de la poche de liaison aux substrats, mais bien à leur surface externe. Ceci permettrait donc à la sous-unité alpha 4s du spermatoprotéasome d'interagir avec des molécules spécifiquement impliquées dans le développement des spermatozoïdes par exemple (Uechi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2021).

Depuis quelques années, plusieurs recherches ont démontré la présence de protéasomes partageant des caractéristiques du protéasome standard, mais également de l'immunoprotéasome. Ceux-ci, présentés à la figure 1.4, se distinguent de la forme typique soit par la présence de sous-unités bêta 5i (PIS, protéasome intermédiaire unique) ou de sous-unités bêta 5i et 1i (PID, protéasome intermédiaire double) (Abi Habib *et al.*, 2022; Guillaume *et al.*, 2010; Khilji *et al.*, 2020). Sachant que la poche de liaison des protéines bêta 5i et 1i favorise les protéines hydrophobes, le PID possède une activité chymotrypsine et trypsine supérieure à celle du PIS (Abi Habib *et al.*, 2022). Par contre, la sous-unité bêta 1 étant conservée chez le PIS, celui-ci est muni d'une activité caspase dominante face au PID (Abi Habib *et al.*, 2022). La découverte des protéasomes intermédiaires étant récente, peu d'éléments quant à leur fonction, leur expression et leur localisation sont disponibles. Par contre, le PIS semble être présent au niveau des cellules bêta pancréatiques (Khilji *et al.*, 2020).

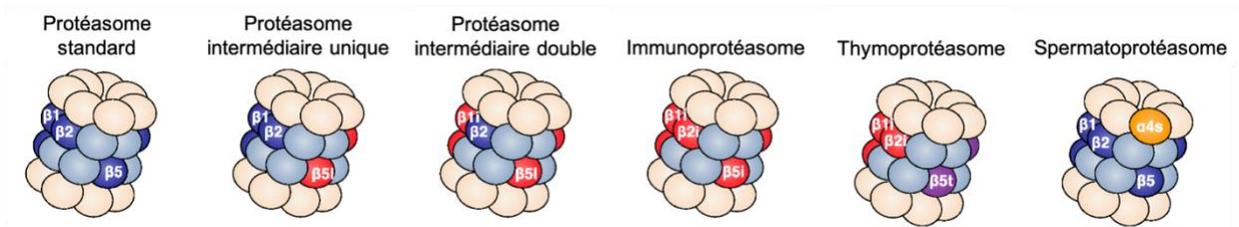


Figure 1.4 Représentation des différentes régions 20S du protéasome et leurs sous-unités catalytiques distinctes.

Adaptée de Habib, 2022.

1.1.3.3.2 Classification des protéasomes selon l'assemblage des régions 19S et 20S

Comme évoqué précédemment, deux régions principales constituent le protéasome, soit la section régulatrice 19S et le site catalytique 20S. Au sein des cellules, il est possible de voir ce complexe adopter trois formes distinctes en fonction des régions enzymatiques qu'il possède: le protéasome 20S, 26S et 30S (Sahu et Glickman, 2021; Sahu *et al.*, 2021; Tanaka, 2009). En effet, ce complexe peut soit posséder un site catalytique 20S lié à une région 19S à une extrémité (26S) ou aux deux (30S). Il convient de noter que, dans la littérature, ces deux conformations sont appelées protéasomes 26S en raison d'un manque de connaissance et donc d'éléments de distinction. Outre la présence d'une ou deux régions 19S, des aspects tels que des fonctions cellulaires spécifiques et un taux d'expression en réponse à certains facteurs environnementaux ne sont pas connus à ce jour (Sahu et Glickman, 2021; Sahu *et al.*, 2021; Tanaka, 2009).

Depuis quelques années, des études attestent l'existence de la région 20S du protéasome sous forme libre dans le cytoplasme. Effectivement, une étude protéomique quantitative sur de multiples lignées cellulaires humaines a révélé qu'approximativement 67% des protéasomes au sein des cellules sont présents sous la forme libre 20S (Fabre *et al.*, 2014). Plus encore, une analyse protéomique de cellules HeLa en présence de protéasomes 20S purifiés a permis d'obtenir une liste de centaines de protéines compatibles à une protéolyse par ce protéasome (Myers *et al.*, 2018). Ces substrats ont un point en commun, soit la présence de régions partiellement dépliées, leur permettant de s'insérer dans le site catalytique 20S. En effet, ne possédant pas de section 19S, la forme libre 20S ne peut permettre l'entrée de protéines avec une forme tridimensionnelle intacte (Kumar Deshmukh *et al.*, 2019). Cependant, il est important de spécifier qu'aucune évidence jusqu'à maintenant ne démontre des substrats avec une préférence distincte pour celle-ci. En plus de sa fonction primaire de dégradation protéique, le protéasome 20S libre semble aussi impliqué dans une multitude de mécanismes biologiques. À titre d'exemple, des études ont démontré la présence de celui-ci au sein de la membrane plasmique des neurones, où il génère des peptides extracellulaires essentiels à la signalisation neuronale (Kumar Deshmukh *et al.*, 2019; Ramachandran et

Margolis, 2017). Également, cette conformation semble être priorisée lors d'un stress oxydatif. En effet, la diminution des taux d'ATP étant un mécanisme compensatoire important lors de ce type de déséquilibre, la protéolyse ne peut être assurée par les protéasomes 26S ATP-dépendant. Finalement, la forme libre 20S est aussi impliquée dans les modifications protéiques post-traductionnelles, et ce par une activité catalytique partielle conférant aux protéines une nouvelle structure et, possiblement, une nouvelle fonction (Kumar Deshmukh *et al.*, 2019).

1.1.3.4 Dynamique structurelle du protéasome

De par son implication variée au sein des cellules, le protéasome a la capacité d'interagir avec de multiples molécules régulatrices. Selon les circonstances, le protéasome 20S peut se dissocier de sa/ses régions 19S afin d'interagir avec un régulateur plus adapté (Tanaka, 2009). Actuellement, les études ont permis d'identifier quatre molécules régulatrices : PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ , PA200 et PI31 (fig. 1.5).

Le régulateur PA28 $\alpha\beta$ est un complexe heptamérique présent dans le cytoplasme des cellules de mammifères. Son expression étant stimulée par l'interféron gamma, celui-ci assure la production de peptides antigéniques pour la présentation par le CMH de classe I. Par une interaction indépendante de l'ATP, ce régulateur accentue la vitesse d'entrée et de sortie des polypeptides au sein de la région catalytique 20S (Thomas *et al.*, 2023). Ceci permet donc l'obtention d'une gamme peptidique plus variée, et ce avec un caractère hydrophobe et une longueur en acides aminés supérieure (Thomas *et al.*, 2023). Son rôle gravitant autour du système immunitaire adaptatif, celui-ci s'associe généralement à l'immunoprotéasome (Thomas *et al.*, 2023). De la même famille que le précédent régulateur, le complexe PA28 γ se distingue non seulement par sa localisation, mais également sa fonction. Exprimé constitutivement au sein du noyau, celui-ci semble renforcer l'activité protéolytique de la région 20S (Thomas *et al.*, 2023). Son mécanisme d'action toujours inconnu de la communauté scientifique, il semble démontrer une interaction préférentielle en présence de protéines désordonnées (Thomas *et al.*, 2023). Mis à part les membres de la famille PA28, la région catalytique du protéasome a également la capacité de se combiner au régulateur PA200. Localisé au noyau, celui-ci s'associe à la région 20S pour la dégradation spécifique des histones acétylées (Thomas *et al.*, 2023). Il a été démontré que son interaction accentue l'entrée des histones au sein du site catalytique, et ce en plus de moduler l'activité enzymatique du protéasome (Thomas *et al.*, 2023).

Contrairement aux complexes PA28 et P200, qui induisent une augmentation de l'activité protéolytique du protéasome, le régulateur PI31 est connu pour son action inhibitrice. Par un phénomène de compétition, celui-ci peut se lier à la région enzymatique 20S, bloquant ainsi les sites d'interaction avec d'autres molécules régulatrices telles que la section 19S (Tanaka, 2009; Thomas *et al.*, 2023). Dernièrement, des recherches ont également illustré le rôle de PI31 dans l'assemblage et le transport des protéasomes au sein du système nerveux (Minis *et al.*, 2019).

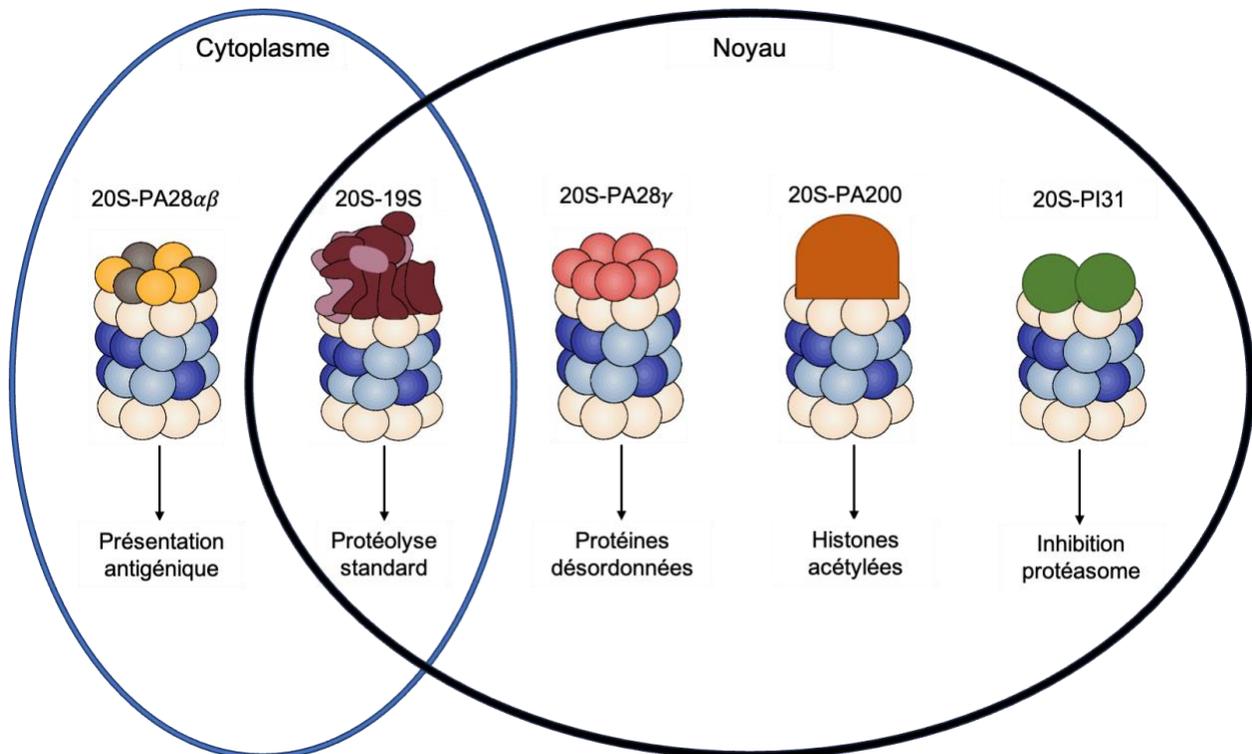


Figure 1.5 Représentation des régulateurs du protéasome 20S. Adaptée de Habib, 2022.

1.1.3.5 Rôle du système ubiquitine-protéasome dans le système nerveux

En plus d'exécuter sa fonction principale, à savoir la dégradation des protéines mal repliées et/ou excédentaires, le système ubiquitine-protéasome est impliqué dans divers mécanismes favorisant la santé et le développement du réseau neuronal (Davidson et Pickering, 2023). Dans ce contexte, le protéasome présente une localisation particulière au sein des neurones, comparativement à sa distribution générale à travers la cellule dans d'autres types cellulaires (Türker *et al.*, 2021). En 2017, des chercheurs ont analysé des hippocampes de souris, par immunomicroscopie électronique, afin de confirmer l'existence d'une organisation spatiale des protéasomes dans les neurones (Ramachandran et Margolis, 2017). En évaluant les sous-unités 20S bêta 2, bêta 5 et alpha 2, ainsi que la sous-unité 19S Rpt5, ils ont démontré

qu'approximativement 40 % des régions 20S du protéasome étaient situées au niveau de la membrane plasmique des neurones, comparativement à la section 19S étant localisée spécifiquement dans le cytoplasme (Ramachandran et Margolis, 2017). À titre comparatif, ce phénomène avait également été observé dans des cultures neuronales primaires de souris, tandis qu'aucune trace de la sous-unité bêta 2 n'avait été détectée dans la membrane plasmique de cellules HEK293 (Ramachandran et Margolis, 2017). Les chercheurs ont également approfondi leurs investigations en illustrant que les protéasomes associés à la membrane plasmique étaient responsables de la signalisation calcique neuronale, et ce par l'intermédiaire de leur segment extracellulaire produisant les peptides responsables de cette signalisation (Ramachandran *et al.*, 2018; Ramachandran et Margolis, 2017). Par ailleurs, des études antérieures ont démontré qu'en réponse à un stimulus, les récepteurs N-méthyl-D-aspartate entraînent la migration des protéasomes du corps dendritique aux épines spécifiquement, et ce dans le but de favoriser la dégradation protéique, et ainsi la croissance de nouvelles épines dendritiques (Bingol et Schuman, 2006; Hamilton *et al.*, 2012; Türker *et al.*, 2021).

Au sein des synapses, des recherches suggèrent que le protéasome régule le processus de potentialisation à long terme (PLT). En 2006, une étude a démontré l'importance de la dégradation protéique par le protéasome lors de la PLT tardive, celle-ci étant réduite lors de l'exposition d'hippocampes de rats à l'inhibiteur de protéasome lactacystine (Fonseca *et al.*, 2006). Par ailleurs, des chercheurs ont également mis en évidence que, chez des hippocampes de souris, l'inhibition des protéasomes par la clasto-lactacystine bêta-lactone induit la PLT, mais empêche sa préservation, en entravant la transcription du facteur neurotrophique dérivé du cerveau et en conservant les répresseurs de la protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPC (Dong *et al.*, 2008).

En plus de son implication dans la communication neuronale, le protéasome assure la régulation du rythme circadien au sein du noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (Eide *et al.*, 2005; van Ooijen *et al.*, 2011). En effet, par son activité de dégradation protéique, le protéasome assure la présence périodique des protéines impliquées dans ce mécanisme, soit CLOCK, BMAL1, ainsi que leurs protéines inhibitrices PER et CRY (Davidson et Pickering, 2023; Eide *et al.*, 2005; van Ooijen *et al.*, 2011). De plus, l'importance de ce complexe enzymatique dans la mémoire est depuis longtemps connue de la communauté scientifique. Une première étude en 2001 a évalué, par un test d'apprentissage d'évitement, le rôle du protéasome sur la mémoire à long terme, et ce par une infusion bilatérale de l'inhibiteur de protéasome I ou de la lactacystine au niveau de la région CA1 de l'hippocampe de rats mâles. Par l'observation d'une

amnésie rétrograde, en lien avec le test comportemental, chez les sujets suite à l'infusion, il a été conclu que le protéasome est essentiel à cette fonction cognitive (Lopez-Salon *et al.*, 2001). Ce lien entre la dégradation protéique par le protéasome et la formation de la mémoire a également été observé chez d'autres espèces, telles que le crabe (Merlo et Romano, 2007), la souris (Artinian *et al.*, 2008) et l'abeille (Felsenberg *et al.*, 2012; Lee, 2008; Rodriguez-Ortiz *et al.*, 2011).

Enfin, le protéasome est également impliqué dans la régulation du fonctionnement des cellules gliales, en particulier les cellules microgliales et les astrocytes (Davidson et Pickering, 2023). Au sein du cerveau, les cellules de la microglie ayant comme fonction principale la réparation des lésions cérébrales, des études ont non seulement démontré leur composition en immunoprotéasomes, mais également la participation de ces complexes enzymatiques dans ce processus de réparation (Chen *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2023; Moritz *et al.*, 2017). Dans le contexte des maladies neurodégénératives, l'accumulation de filaments intermédiaires chez les astrocytes lors de l'astrogliose est une caractéristique commune (Phatnani et Maniatis, 2015; Verkhatsky *et al.*, 2013). Ce phénomène étant observé chez les maladies d'Alzheimer, de Huntington et de Parkinson, ainsi que chez la sclérose latérale amyotrophique, ces pathologies ont également en commun le dysfonctionnement protéasomique (Phatnani et Maniatis, 2015; Verkhatsky *et al.*, 2013). Étonnamment, selon deux études publiées en 2009, l'inhibition du protéasome permettait de réduire la formation de ces filaments chez les astrocytes (Davidson et Pickering, 2023; Goldbaum *et al.*, 2009; Middeldorp *et al.*, 2009). Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires afin d'identifier précisément l'implication du protéasome dans ce mécanisme, et plus précisément, dans un contexte de neurodégénération.

1.2 Pathologies liées à un dysfonctionnement du protéasome

1.2.1 Maladies non associées à une mutation protéasomique

1.2.1.1 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative affectant des millions d'individus, et se classant septième parmi les causes prédominantes de décès à l'échelle mondiale (Ferreira *et al.*, 2015; World Health Organization, 2024). Connue pour entraîner la mort cellulaire des neurones, elle se traduit par une détérioration temporelle de la mémoire et des fonctions cognitives chez les sujets (Ferreira *et al.*, 2015; O'Brien et Wong, 2011; Oddo, 2008; Ribeiro *et al.*, 2023). Par l'étude de l'accumulation de la protéine amyloïde bêta en plaques amyloïdes au sein du cerveau, plusieurs équipes de recherche ont constaté un lien considérable avec un dysfonctionnement protéasomique (Chocron *et al.*, 2022; Oddo,

2008; Ribeiro *et al.*, 2023; Tseng *et al.*, 2008). Effectivement, le traitement de tissus cérébraux humains post-mortem non atteints de la maladie d'Alzheimer avec des oligomères d'amyloïde bêta à 0,5 μM pendant 24 h a démontré l'impact négatif de cette protéine sur l'activité catalytique de type caspase et chymotrypsine du protéasome, réduisant ainsi sa capacité à éliminer les protéines indésirables (Ribeiro *et al.*, 2023). L'accumulation de cette molécule au sein des cellules résulte donc en l'accroissement de protéines mal repliées et en excès (Ribeiro *et al.*, 2023). Par conséquent, chez les sujets atteints d'Alzheimer, l'accumulation de l'amyloïde bêta engendre l'emmagasinage de protéines étiquetées pour la dégradation, contribuant à la détérioration des plaques amyloïdes et ainsi à la progression de la maladie (Lopez Salon *et al.*, 2003; Oddo, 2008; Ribeiro *et al.*, 2023).

1.2.1.2 Maladie de Parkinson

Comme l'Alzheimer, le Parkinson fait partie des maladies neurodégénératives les plus communes à travers le monde. En plus de se manifester sous forme de troubles cognitifs progressifs, cette pathologie est majoritairement connue pour ses symptômes moteurs tels qu'une rigidité musculaire et des tremblements (DeMaagd et Philip, 2015). Caractérisée par une nécrose neuronale, la maladie de Parkinson entraîne l'accumulation de corps de Lewy, résultant en la production massive de molécules d'ubiquitine mal repliées, et donc en un dysfonctionnement du protéasome (DeMaagd et Philip, 2015; Kövari *et al.*, 2009). Chez les individus affectés par cette maladie, des recherches ont révélé une réduction du taux de sous-unités alpha du protéasome 20S en plus d'une diminution des trois types d'activité catalytique du complexe enzymatique, soit caspase, trypsine et chymotrypsine (Blandini *et al.*, 2006; Davidson et Pickering, 2023; McNaught *et al.*, 2003; McNaught et Jenner, 2001).

1.2.1.3 Maladie de Huntington

Avec une prévalence de 4,88 individus par 100 000 habitants, la maladie de Huntington est une pathologie héréditaire rare et neurodégénérative causée par une mutation au niveau du gène *Huntington* (HTT) (Finkbeiner, 2011; Medina *et al.*, 2022). La protéine HTT étant impliquée dans la fonction neuronale, l'accumulation d'agrégats protéiques HTT mutés est à l'origine même de cette maladie (Davidson et Pickering, 2023; Finkbeiner, 2011). Une étude a démontré une diminution de l'activité catalytique de type caspase et chymotrypsine des protéasomes chez les sujets touchés (Jana *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2004). Les premiers symptômes faisant leur apparition entre la trentaine et la cinquantaine, ceux-ci sont majoritairement restreints à des troubles moteurs et cognitifs (Roos, 2010).

1.2.1.4 Sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative entraînant la dégradation des neurones. Cette pathologie, affectant généralement les individus âgés, est traduite par une paralysie musculaire progressive (Davidson et Pickering, 2023). Chez les sujets touchés, une étude a révélé un dysfonctionnement du protéasome causé par la maladie, se traduisant par une réduction des trois types d'activité catalytique et des taux de la sous-unité bêta 5 de la région 20S (Kabashi *et al.*, 2012). Par ailleurs, ce mal fonctionnement du protéasome semble, à son tour, contribuer à la progression de la maladie (Davidson et Pickering, 2023).

1.2.2 Maladies causées par une variation génétique du protéasome

1.2.2.1 Protéasomopathies

Les protéasomopathies regroupent des maladies ayant en commun la présence d'une ou des mutation(s) rares dans les gènes codant pour les sous-unités du protéasome. Actuellement, ces pathologies sont classées en deux catégories : les protéasomopathies auto-inflammatoires (PRAAS) et neurodéveloppementales (Cuinat *et al.*, 2024a; Cuinat *et al.*, 2024b). Découverts depuis 2010, trente-huit cas du type inflammatoire ont été répertoriés mondialement pour un total de trente-six mutants au niveau de sept gènes de la région catalytique 20S du protéasome (Cuinat *et al.*, 2024a). Dans la littérature, les PRAAS sont également connues sous le nom de *chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature* (CANDLE). Comme son nom l'indique, les individus affectés sont au prise de symptômes inflammatoires tels qu'une panniculite et une fièvre continue (Cuinat *et al.*, 2024b). Quant aux protéasomopathies neurodéveloppementales, celles-ci ont commencé à être distinguées des PRAAS seulement à partir de 2017. À l'heure actuelle, soixante-dix-huit cas ont été répertoriés, et ce pour un total de quarante-six variants distincts affectant, dans le trois quarts des situations, un gène de la région régulatrice 19S du protéasome (Cuinat *et al.*, 2024a; Cuinat *et al.*, 2024b). Malgré l'occurrence de signes cliniques variés, les sujets présentent de manière prédominante un retard développemental accompagné d'un trouble de la parole et du comportement (Cuinat *et al.*, 2024b).

1.2.2.2 Maladie génétique *PSMC5*

Selon les informations obtenues d'études observationnelles et des bases de données publiques, diverses caractéristiques cliniques se présentent de manière récurrente chez les quarante-neuf sujets portant une mutation de l'isoforme 1 de la sous-unité *PSMC5* sur le chromosome dix-sept (Annexe A). L'information

principale issue de cette analyse est la prédominance des maladies mentales chez les participants, avec 92% d'entre eux présentant des anomalies neurodéveloppementales telles que des troubles de l'apprentissage et un retard global du développement (fig. 1.6) (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Firth *et al.*, 2009; Küry *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2024). De plus, celles-ci sont conjuguées à des troubles du langage et un handicap intellectuel dans 86% et 52% des cas respectivement (fig. 1.6). Par ailleurs, 60% des individus présentent des troubles du comportement tels que l'autisme, le trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), l'anxiété et la présence de comportements liés à l'agressivité et à l'obsession (fig. 1.6). Des retards moteurs sont également observés chez 72% des sujets (fig. 1.6) (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Firth *et al.*, 2009; Küry *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2024). Lors de l'analyse des variants génétiques répertoriés, une tendance particulière quant à leur localisation au sein du domaine central de l'ATPase PSMC5 a été remarquée (182-321 acides aminés; fig. 1.7). Plus précisément, chez les sujets atteints de troubles du comportement, 63% des variants (12/19) étaient localisés dans cette région tandis que 21% se trouvaient dans le motif de Walker (182-321 acides aminés), à l'extérieur du domaine central et du couvercle de l'ATPase (fig. 1.7).

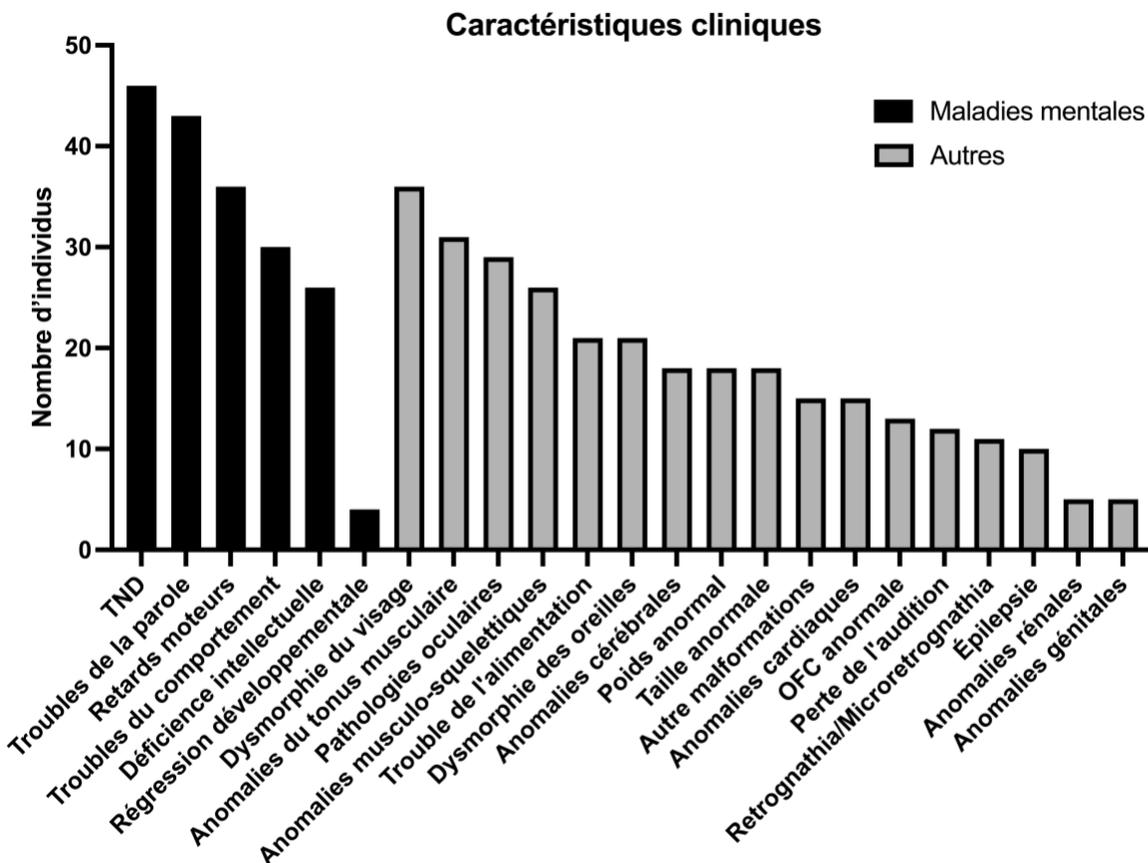


Figure 1.6 Recensement des caractéristiques cliniques des sujets présentant une mutation de l'isoforme 1 de la sous-unité *PSMC5* du protéasome.

Les maladies mentales (bandes noires) sont distinguées des autres attributs (bandes grises). Les données ont été obtenues des bases de données publiques suivantes : Decipher, MobiDetails et GnomAD. TND, troubles neurodéveloppementaux.

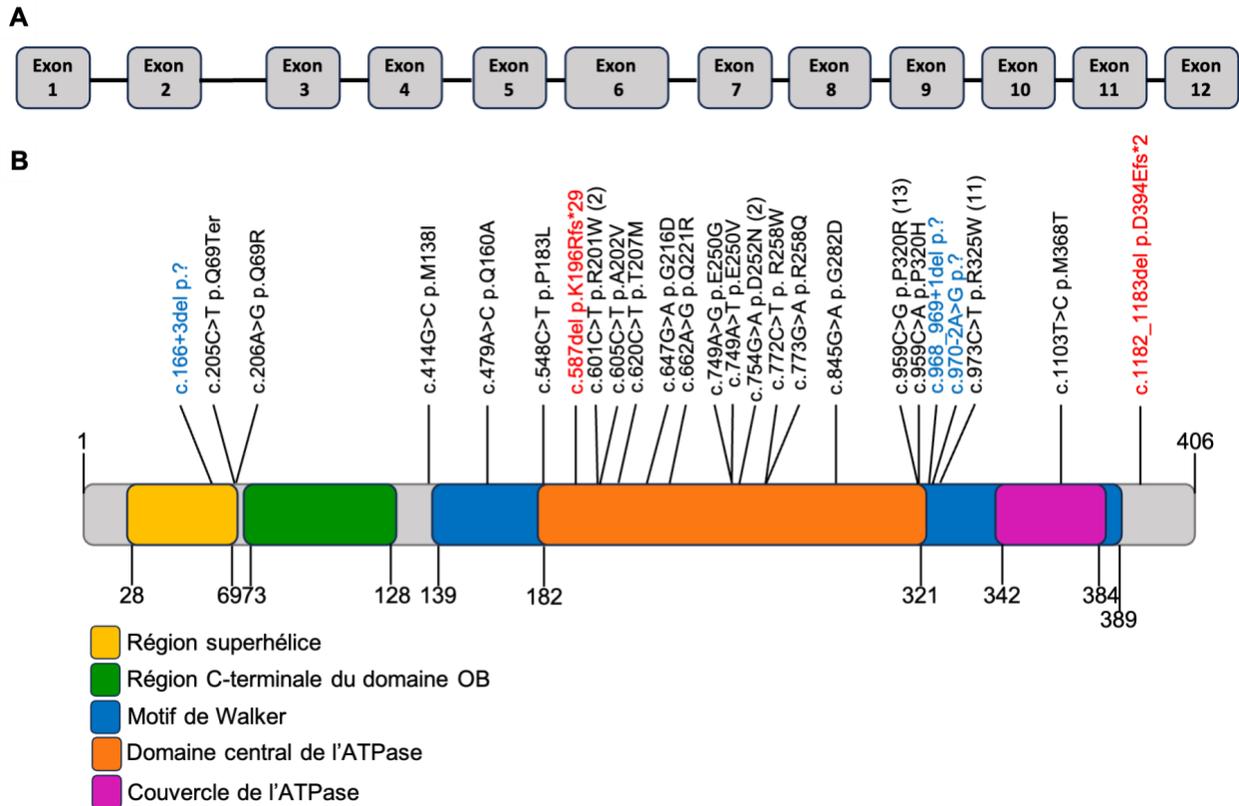


Figure 1.7 Schématisation du gène *PSMC5* et de la séquence primaire de l'isoforme 1 de la sous-unité, avec les variants répertoriés.

(A) Structure du gène *PSMC5*, comprenant 12 exons (carrés gris) et 11 introns (lignes noires reliant les exons). (B) Représentation des 25 variants recensés sur les bases de données publiques, en fonction de leur position respective sur la séquence d'acides aminés de l'isoforme 1 de la sous-unité *PSMC5*. Les cinq régions peptidiques principales de *PSMC5* sont mises en évidence : la région superhélice (jaune), la région C-terminale du domaine OB (vert), le motif de Walker (bleu), le domaine central (orange) et le couvercle de l'ATPase AAA+ (magenta). Les variants sont catégorisés par des couleurs distinctes : les mutations du site d'épissage en bleu, les mutations faux-sens en noir et les mutations du cadre de lecture en rouge. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de sujets porteurs de chaque variant, dans le cas où plusieurs individus sont concernés. Pour les mutations affectant le site d'épissage (variants bleus), un point d'interrogation est présenté signifiant que les modifications au niveau de la protéine produite sont indéterminées. OB, oligonucléotide-oligosaccharide-binding.

Adaptée de Küry *et al.*, 2024.

Outre les symptômes liés à la santé mentale, les individus avec une mutation de la sous-unité *PSMC5* présentent des anomalies à caractère généralisé, allant de malformations morphologiques à des pertes d'audition (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Firth *et al.*, 2009; Küry *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2024). Au niveau de la section «autres» de la figure 1.6, il est possible de constater quatre caractéristiques communes chez plusieurs sujets : la dysmorphie du visage, les anomalies liées au tonus musculaire et au système musculo-squelettique et les pathologies oculaires. La dysmorphie faciale affecte majoritairement la forme du visage, telle qu'une morphologie triangulaire, mais d'autres traits, comme un front proéminent et une fente palpébrale courte, sont aussi observés. Les anomalies du tonus musculaire sont généralement représentées par une hypotonie, et celles du système musculo-squelettique, par des scoliose. Les pathologies oculaires sont, dans la majorité des cas, restreintes à des problèmes de vision (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Firth *et al.*, 2009; Küry *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2024).

1.2.2.2.1 Variant c.166+3del

Un garçon de moins de 5 ans possède une délétion *de novo* hétérozygote à la position 166+3. Bien que les modifications au niveau de la protéine produite ne soient pas actuellement connues, il semble y avoir une modification de l'épissage de la séquence d'acide ribonucléique. Le sujet est atteint de difficultés neurodéveloppementales accompagnées d'un trouble de la parole. Celui-ci présente également des anomalies au niveau de la morphologie du visage, du tonus musculaire, de la taille, du poids et de la circonférence occipito-frontale, ainsi que des retards moteurs, des problèmes ophtalmologiques et de l'épilepsie (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.2 Variant c.206A>G (p.Q69R)

Un garçon de moins de 5 ans a une substitution *de novo* hétérozygote, au niveau de l'ADN codant, d'une adénine pour une guanine à la position 206. Le remplacement d'une glutamine par une arginine résulte en la présence d'une charge positive au niveau de la chaîne latérale. Celui-ci présente des anomalies neurodéveloppementales, des troubles de la parole et une malformation du visage et des oreilles. Par ailleurs, des problèmes d'alimentation, un poids, une taille et une mâchoire anormaux de même que des problèmes cardiaques ont été observés (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.3 Variant c.414G>C (p.M138I)

Un jeune garçon de moins de 5 ans détient une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une guanine pour une cytosine à la position 414. Celui-ci est atteint de difficultés neurodéveloppementales,

de troubles de la parole, de retards moteurs, ainsi qu'une malformation du visage et des oreilles. En outre, il présente une taille, une mâchoire et des comportements anormaux, en plus d'anomalies squelettiques et au niveau des parties génitales (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.4 Variant c.548C>T (p.P183L)

Un jeune garçon de moins de 5 ans possède une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une thymine à la position 548. En plus d'anomalies neurodéveloppementales, le patient présente des retards moteurs, des problèmes ophtalmologiques, un handicap intellectuel et des comportements anormaux. Par ailleurs, le sujet fait état de troubles d'alimentation et d'anomalies au niveau du poids, de la taille, de la circonférence occipito-frontale et des parties génitales (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.5 Variant c.587del (p.K196Rfs*29)

Une jeune fille de moins de 5 ans a une délétion, au niveau de l'ADN codant, à la position 587. Cette variante, héritée de la mère biologique également atteinte de la maladie, provoque un décalage du cadre de lecture au niveau de la protéine produite avec un codon-stop à la position 29. L'enfant présente des difficultés neurodéveloppementales, en plus de troubles de la parole et d'anomalies au niveau du visage, des oreilles, du tonus musculaire et du système musculo-squelettique. De plus, celle-ci démontre des retards cognitifs et moteurs, accompagnés de comportements anormaux et de problèmes au niveau du poids, de la taille et de la circonférence occipito-frontale. Finalement, la patiente est aussi atteinte d'autres malformations non spécifiées (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.6 Variant c.601C>T (p.R201W)

Deux jeunes filles de moins de 10 ans, sans lien familial, ont une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une thymine à la position 601. En plus d'un possible encombrement stérique, le remplacement d'une arginine par un tryptophane entraîne la perte de la charge positive de la chaîne latérale. Selon les informations publiques disponibles, la nature hétérozygote de la mutation a été confirmée chez la fille la plus âgée. Les patientes ont en commun des troubles neurodéveloppementaux et du langage, un tonus musculaire anormal, des retards moteurs et des troubles d'alimentation et de poids. L'une des filles présente également des problèmes ophtalmologiques, un handicap intellectuel ainsi que des comportements anormaux, de l'épilepsie, des anomalies rénales et d'autres malformations non spécifiées. Quant à la deuxième patiente, celle-ci est aussi touchée d'anomalies au niveau du visage, des

oreilles, du système musculo-squelettique, de la taille et de la circonférence occipito-frontale (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.7 Variant c.605C>T (p.A202V)

Une fille entre 16 et 20 ans possède une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une thymine à la position 605. Celle-ci présente des troubles neurodéveloppementaux et de la parole, ainsi que des anomalies au niveau du visage, du tonus musculaire, du système musculo-squelettique et de la circonférence occipito-frontale. Ces symptômes sont également accompagnés de retards moteurs, de troubles ophtalmologiques et comportementaux, et d'anomalies cérébrales (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.8 Variant c.620C>T (p.T207M)

Un adolescent âgé entre 11 et 15 ans a une substitution homozygote récessive, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une thymine à la position 620. Le remplacement d'une thréonine par une méthionine entraîne une modification des propriétés de la chaîne latérale, passant d'une chaîne polaire non chargée à une chaîne hydrophobe. La mutation a été héritée du génotype homozygote récessif des parents biologiques non affectés. En plus de difficultés neurodéveloppementales, de troubles de comportement et de retards moteurs, le patient est atteint d'une forme du visage et des oreilles anormale et de problèmes ophtalmologiques. Celui-ci fait également état d'anomalies squelettiques, de poids, de taille, en plus d'autres malformations non spécifiées et d'une perte de l'audition (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.9 Variant c.647G>A (p.G216D)

Un jeune garçon de moins de 5 ans détient une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une guanine pour une adénine à la position 647. Le remplacement d'une glycine par un acide aspartique entraîne l'apparition d'une charge négative au niveau de la chaîne latérale. Celui-ci présente des troubles neurodéveloppementaux et de la parole, ainsi que des anomalies au niveau du visage, des oreilles et du tonus musculaire. De plus, il souffre de retards moteurs et de problèmes ophtalmologiques. Le sujet manifeste également des anomalies visibles lors de l'imagerie par résonance magnétique cérébrale, des troubles de l'alimentation, une mâchoire anormale et une perte de l'audition (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.10 Variant c.662A>G (p.Q221R)

Une adolescente entre 11 et 15 ans possède une substitution *de novo* hétérozygote, au niveau de l'ADN codant, d'une adénine pour une guanine à la position 662. Le remplacement d'une glutamine par une arginine résulte en la présence d'une charge positive au niveau de la chaîne latérale. Cette mutation, entraînant une modification de l'épissage de la séquence d'acide ribonucléique, conduit à des troubles neurodéveloppementaux, comportementaux et du langage, accompagnés d'un handicap intellectuel chez la patiente. Celle-ci est également atteinte d'anomalies au niveau du poids, de la taille et de la circonférence occipito-frontale. Il est à noter que l'étude ne précise pas l'impact de la modification de l'épissage sur la séquence en acides aminés de la protéine (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.11 Variant c.749A>T (p.E250V)

Une jeune fille entre 6 et 10 ans a une substitution *de novo* hétérozygote, au niveau de l'ADN codant, d'une adénine pour une thymine à la position 749. Le remplacement d'un acide glutamique par une valine entraîne une modification des propriétés de la chaîne latérale, passant d'une chaîne chargée négativement à une chaîne hydrophobe. En plus de problèmes neurodéveloppementaux et de la parole, celle-ci est atteinte de retards moteurs, de troubles ophtalmologiques et de l'alimentation, d'un retard intellectuel et d'anomalies cardiaques (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.12 Variant c.749A>G (p.E250G)

Une fille entre 16 et 20 ans possède une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une adénine pour une guanine à la position 749. Le remplacement d'un acide glutamique par une glycine entraîne la perte de la charge négative de la chaîne latérale. La patiente démontre des troubles neurodéveloppementaux et du langage, ainsi que des malformations morphologiques du visage, de la mâchoire et des oreilles. Des anomalies du tonus musculaire et du système musculo-squelettique, des retards moteurs, des troubles ophtalmologiques, un retard intellectuel et des anomalies cérébrales ont aussi été observés. Par ailleurs, elle présente un poids, une taille et une circonférence occipito-frontale anormaux suivis d'autres malformations non spécifiées, d'anomalies cardiaques et d'épilepsie (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.13 Variant c.754G>A (p.D252N)

Un adolescent entre 11 et 15 ans et une jeune fille de moins de 5 ans ont une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une guanine pour une adénine à la position 754. Le remplacement d'un acide aspartique par une asparagine entraîne une modification des propriétés de la chaîne latérale, passant d'une chaîne chargée négativement à une chaîne polaire non chargée. Les deux individus ont en commun des difficultés neurodéveloppementales, un trouble de la parole, une forme du visage et de la mâchoire et un tonus musculaire anormal, des problèmes ophtalmologiques, un handicap intellectuel et un poids anormal. Le garçon est également atteint de troubles du comportement, d'anomalies cérébrales, d'une forme des oreilles anormale, d'un trouble de l'alimentation et d'autres malformations non spécifiées. La jeune fille présente en addition des anomalies musculo-squelettiques et rénales, de l'épilepsie et une perte de l'audition (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.14 Variant c.772C>T (p.R258W)

Un jeune garçon entre 6 et 10 ans détient une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une thymine à la position 772. En plus d'un possible encombrement stérique, le remplacement d'une arginine par un tryptophane entraîne la perte de la charge positive de la chaîne latérale. Le sujet fait état de troubles neurodéveloppementaux et de problèmes de comportement (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.15 Variant c.773G>A (p.R258Q)

Un homme entre 26 et 30 ans possède une substitution héritée de la mère biologique, au niveau de l'ADN codant, d'une guanine pour une adénine à la position 773. Le remplacement d'une arginine par une glutamine entraîne une modification des propriétés de la chaîne latérale, passant d'une chaîne chargée positivement à une chaîne polaire non chargée. Il est à noter que la mère est également atteinte de la maladie. L'homme présente des difficultés neurodéveloppementales et du comportement en plus d'un trouble de la parole. De plus, il est aux prises d'anomalies cardiaques et d'épilepsie (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.16 Variant c.845G>A (p.G282D)

Un adolescent entre 11 et 15 ans a une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une guanine pour une adénine à la position 845. Le remplacement d'une glycine par un acide aspartique entraîne

l'apparition d'une charge négative au niveau de la chaîne latérale. Le patient est atteint de troubles neurodéveloppementaux et du langage, ainsi qu'une déficience intellectuelle accompagnée de problèmes de comportement. En outre, une régression développementale, de l'épilepsie et d'autres malformations non spécifiées ont été détectées (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.17 Variant c.959C>G (p.P320R)

Treize cas de ce variant ont été répertoriés parmi les différentes bases de données disponibles, notamment DECIPHER et MobiDetails. Invariablement, la substitution d'une cytosine pour une guanine à la position 959 est *de novo*. En plus d'un possible encombrement stérique, le remplacement d'une proline par une arginine entraîne l'apparition d'une charge positive au niveau de la chaîne latérale. Selon les informations publiques accessibles, au moins 7 individus sont porteurs de la mutation hétérozygote. Sur les individus affectés, douze d'entre eux sont aux prises de troubles neurodéveloppementaux. Il convient de noter que le seul sujet ne présentant pas cette caractéristique était âgé de seulement 4 ans et 3 mois lors de sa dernière évaluation clinique. Dans tous les cas, un trouble du langage et des retards moteurs sont présents. Également, des anomalies au niveau du visage ont été identifiées dans 77% des cas (10/13), avec des anomalies du tonus musculaire chez 62% (8/13), des troubles ophtalmologiques chez 38% (5/13), une déficience intellectuelle chez 46% (6/13), des troubles du comportement chez 54% (7/13), des anomalies cérébrales chez 38% (5/13), des problèmes liés au système musculo-squelettique chez 54% (7/13), des anomalies au niveau de la forme des oreilles chez 31% (4/13), des troubles de l'alimentation chez 31% (4/13), ainsi que des poids (8%; 1/13), et tailles anormaux (15%; 2/13). Par ailleurs, des anomalies liées à la circonférence occipito-frontale sont observées chez 8% des cas (1/13), des anomalies cardiaques chez 31% (4/13), une déformation de la mâchoire chez 8% (1/13), ainsi qu'une perte d'audition chez 15% (2/13), des troubles rénaux et des anomalies génitales chez 8% (1/13), une régression développementale chez 15% (2/13) et d'autres malformations non spécifiées chez 23% (3/13). Des treize sujets atteints, 77% sont de sexe masculin (10/13) et 23% de sexe féminin (3/13). Également, 54% des cas s'appliquent à des enfants entre 0-5 ans (7/13), avec 23% dans la tranche des 6 à 10 ans (3/13), 8% chez des adolescents entre 11 et 15 ans (1/13), 8% entre 16 et 20 ans (1/13) et 8% supérieurs à 20 ans (21 ans; 1/13) (Baux *et al.*, 2021; Firth *et al.*, 2009; Küry *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2024).

1.2.2.2.18 Variant c.959C>A (p.P320H)

Une jeune fille entre 6 et 10 ans possède une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une adénine à la position 959. Le remplacement d'une proline par une histidine entraîne

l'apparition d'une charge positive au niveau de la chaîne latérale. Celle-ci présente des difficultés neurodéveloppementales, accompagnées d'un handicap intellectuel, d'une régression développementale et de troubles de la parole et du comportement. La patiente fait également état de problèmes ophtalmologiques et d'anomalies au niveau de la forme du visage, de la mâchoire, du tonus musculaire et du système musculo-squelettique (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.19 Variant c.968_969+1del

Un jeune garçon entre 6 et 10 ans détient une délétion *de novo* aux positions 968_969+1, au niveau de l'ADN codant. Bien que les modifications au niveau de la protéine produite ne soient pas actuellement connues, il semble y avoir une modification de l'épissage de la séquence d'acide ribonucléique. Celui-ci est atteint de troubles de la parole, du comportement et neurodéveloppementaux, avec des anomalies de la forme du visage, du tonus musculaire, du système musculo-squelettique et cérébral. Le sujet présente également des troubles ophtalmologiques et d'autres malformations non spécifiées (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.20 Variant c.970-2A>G

Un adolescent entre 11 et 15 ans a une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN, d'une adénine pour une guanine, dans l'intron 9 adjacent, à la position -2 par rapport à la position 970 de l'exon. Bien que les changements au niveau de la protéine produite soient inconnus, des altérations de l'épissage de la séquence d'acide ribonucléique ont été observées. Le sujet est atteint de troubles de la parole et du comportement, ainsi qu'une déficience intellectuelle et des difficultés neurodéveloppementales. De plus, il présente des anomalies au niveau de la morphologie du visage et des oreilles, de la circonférence occipito-frontale, du système musculo-squelettique, du cerveau, du tonus musculaire, du système cardiaque, du poids et de la taille. Des retards moteurs et des problèmes ophtalmologiques ont également été notés (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.21 Variant c.973C>T (p.R325W)

Onze cas de ce variant ont été répertoriés dans les diverses bases de données disponibles. Cette mutation *de novo* cause une substitution, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une thymine à la position 973. En plus d'un possible encombrement stérique, le remplacement d'une arginine par un tryptophane entraîne la perte de la charge positive de la chaîne latérale. Selon les informations publiques accessibles, au moins 6 individus sont porteurs de la mutation hétérozygote. À l'exception d'une fillette âgée de 6 mois

lors de sa dernière évaluation clinique, cette variante provoque des troubles neurodéveloppementaux chez tous les individus concernés. Notamment, 73% sont aux pris de troubles du langage (8/11), 45% d'un retard intellectuel (5/11) et 55% de troubles du comportement (6/11). Des anomalies de la forme du visage (91%; 10/11), des oreilles (64%; 7/11) et de la mâchoire (18%; 2/11) ont également été observées. D'autre part, 73% présentent un tonus musculaire anormal (8/11), 73% de retards moteurs (8/11), 73% de troubles ophtalmologiques (8/11), 45% d'anomalies cérébrales (5/11), 55% de problèmes musculo-squelettiques (6/11), 73% de troubles d'alimentation (8/11) et 27% de poids anormaux (3/11). Par ailleurs, 36% souffrent d'anomalies liées à la taille (4/11) et 27% à la circonférence occipito-frontale (3/11), 55% de problèmes cardiaques (6/11), 9% d'anomalies rénales (1/11) et 18% au niveau des parties génitales (2/11), 27% d'épilepsie (3/11), ainsi que 64% de perte d'audition (7/11) et 45% d'autres malformations non spécifiées (5/11). De ces onze cas, 73% (8/11) sont de sexe masculin et 27% de sexe féminin (3/11). En plus, 45% des sujets sont dans la tranche d'âge de 0 à 5 ans (5/11), 18% entre 6 et 10 ans (2/11), 18% entre 11 et 15 ans (2/11), 9% entre 16 et 20 ans (1/11) et 9% supérieur à 20 ans (23 ans; 1/11) (Baux *et al.*, 2021; Firth *et al.*, 2009; Küry *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2024).

1.2.2.2.22 Variant c.1103T>C (p.M368T)

Un jeune garçon entre 6 et 10 ans possède une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une thymine pour une cytosine à la position 1103. Le remplacement d'une méthionine par une thréonine entraîne une modification des propriétés de la chaîne latérale, passant d'une chaîne hydrophobe à une chaîne polaire non chargée. Celui-ci présente des troubles neurodéveloppementaux et de la parole en plus d'un retard intellectuel. Par ailleurs, cette mutation provoque des anomalies au niveau de la forme du visage et des oreilles, du tonus musculaire et du système musculo-squelettique, des retards moteurs, des troubles ophtalmologiques, des anomalies cérébrales et rénales ainsi que de l'épilepsie, des troubles d'alimentation et une irrégularité du poids et de la taille (Baux *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.23 Variant c.1182_1183del (p.D394Efs*2)

Une jeune fille de moins de 5 ans détient une délétion *de novo*, au niveau de l'ADN codant, de deux bases à la position 1182 et 1183. Cette variante provoque un décalage du cadre de lecture de la protéine produite avec un codon-stop à la position 2. La patiente est atteinte de difficultés neurodéveloppementales accompagnées d'un trouble de la parole, d'une déficience intellectuelle et de troubles du comportement. Elle présente également des anomalies au niveau de la morphologie du visage et de la mâchoire, du tonus

musculaire et du musculo-squelette, en plus de troubles d'alimentation et ophtalmologiques (Baux *et al.*, 2021; Küry *et al.*, 2024).

1.2.2.2.24 Variant c.205C>T (p.Q69Ter)

Une jeune fille de 5 ans a une substitution *de novo* hétérozygote, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une thymine à la position 205. Cette mutation provoquant l'apparition d'un codon-stop, la protéine produite est donc partielle. La patiente est atteinte de problèmes neurodéveloppementaux accompagnés de troubles du langage et du comportement et d'une déficience intellectuelle. Le sujet souffre également de retards moteurs, de problèmes ophtalmologiques et d'anomalies cérébrales, du tonus musculaire, du poids, de la taille et de la circonférence occipito-frontale (Yu *et al.*, 2024).

1.2.2.2.25 Variant c.479A>C (p.Q160A)

Une femme de 24 ans possède une substitution hétérozygote, au niveau de l'ADN codant, d'une adénine pour une cytosine à la position 479. Il n'est pas établi si la mutation est *de novo* ou héréditaire. Le remplacement d'une glutamine par une alanine entraîne une modification des propriétés de la chaîne latérale, passant d'une chaîne polaire non chargée à une chaîne hydrophobe. Le sujet présente des troubles neurodéveloppementaux, de la parole et du comportement en plus d'un handicap intellectuel. Celle-ci est aussi atteinte de retards moteurs et d'anomalies du système musculo-squelettique (Firth *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2024).

1.3 Problématique

Cassandre est une jeune montréalaise de six ans aux prises avec la variante P312R de l'isoforme 2 de la sous-unité *PSMC5* du protéasome. Plus précisément, la mutation présente chez Cassandre est une substitution *de novo*, au niveau de l'ADN codant, d'une cytosine pour une guanine à la position 935. Malgré un dépistage génétique confirmant la mutation, à l'âge de quatre ans et demi, les connaissances limitées face à cette maladie plongent sa famille dans un état d'incertitude et d'appréhension. Effectivement, les individus atteints de la pathologie génétique *PSMC5* possèdent un pronostic inconnu et aucun traitement n'est actuellement disponible pour réduire ou, du moins, ralentir la progression des symptômes neurologiques. À ce jour, Cassandre présente des retards développementaux ainsi que d'autres symptômes neurologiques et des problèmes ophtalmologiques.

Depuis 2019, une équipe américaine étudie exclusivement la variante P312R du gène *PSMC5*. La *PSMC5 Foundation*, établie à l'université Harvard et de Cambridge, est un projet de recherche collaboratif visant à comprendre davantage l'impact de la mutation sur les divers mécanismes cellulaires. Cette étude vise également à identifier des pistes de traitement, tels que des molécules à action stimulatrice du protéasome et la manipulation génétique. Fait intéressant, cette fondation a été fondée suite à la rencontre des experts avec Ollie et Yoni, deux jeunes garçons affectés par la variante P312R du protéasome. Outre cette fondation, quelques équipes de recherche à l'international étudient l'impact des mutations du gène *PSMC5* du protéasome, mais dans un cadre plus général. Par exemple, un article multidisciplinaire publié en janvier 2024 a étudié vingt-trois variants de l'isoforme 1 de la sous-unité *PSMC5* du protéasome, et ce autant par une investigation clinique qu'expérimentale (Küry *et al.*, 2024).

1.4 Hypothèse et objectifs

Un article paru en 2013 dans le *Journal of Biological Chemistry* a étudié l'impact de la variation génétique sur l'activité des sous-unités ATPases du protéasome standard. Plus précisément, à la figure 1.8, une substitution d'une lysine pour une arginine ou une sérine, empêchant la liaison de l'ATP, fut introduite dans le motif A de Walker des sous-unités Rpt3, Rpt5 et Rpt6 (ou *PSMC5*) de manière individuelle chez la levure (Peth *et al.*, 2013b). En plus de comparer le taux basal de l'hydrolyse de l'ATP des protéasomes 26S WT, Rpt3R, Rpt5S et Rpt6R (fig. 1.8 A), ce papier a également analysé l'activité ATPase de ces complexes protéiques en présence de l'ubiquitine ligase E6AP avec ou sans chaîne de polyubiquitine, simulant ainsi une situation avec ou sans protéine ubiquitinée à dégrader (fig. 1.8 B). L'hydrolyse de l'ATP et l'activité ATPase du protéasome ayant diminué significativement suite à la mutation, ce papier a permis de constater que les six ATPases de la région 19S fonctionnent de manière cyclique (Peth *et al.*, 2013b). Ceci signifie donc qu'une mutation chez une seule ATPase pourrait avoir un effet non négligeable sur le protéasome en entier. Cette étude fournissant des informations intéressantes dans le contexte de la maladie *PSMC5*, il est primordial de considérer ses limites, soit le modèle expérimental, les mutations intégrées et l'implication dans le domaine neurologique.

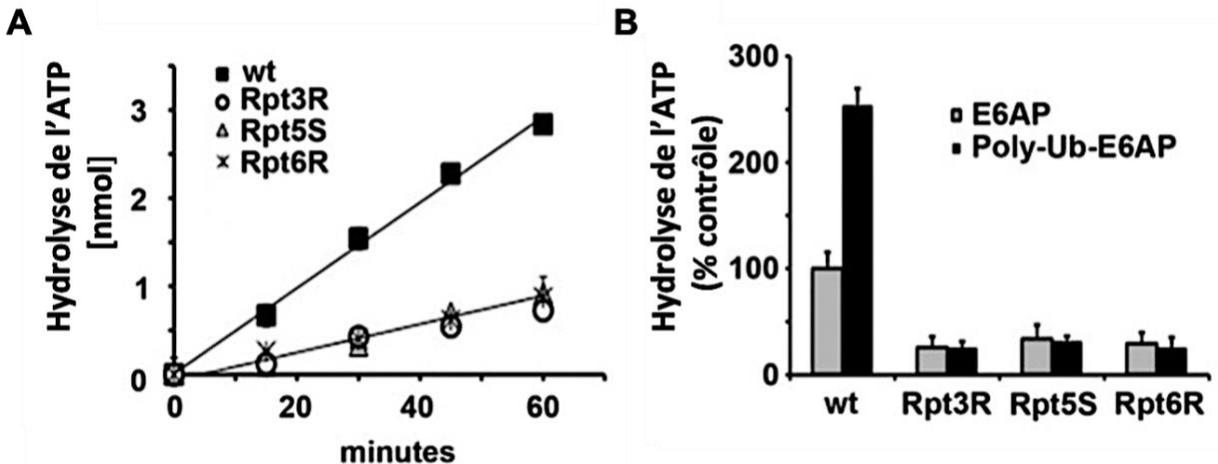


Figure 1.8 Chaque ATPase du protéasome assure une fonction cruciale dans le bon fonctionnement du complexe enzymatique.

(A) Hydrolyse de l'ATP des protéasomes 26S mutés aux ATPases Rpt3, Rpt5 et Rpt6. (B) Hydrolyse de l'ATP des protéasomes 26S mutés aux ATPases Rpt3, Rpt5 et Rpt6 en présence de l'ubiquitine ligase EA6P native ou polyubiquitinée. L'activité d'hydrolyse de la condition sauvage en présence de l'ubiquitine ligase EA6P native a été établie à 100%.

Adaptée de Peth *et al.*, 2013.

Sachant que l'ATPase PSMC5 médie l'entrée des protéines dans la chambre protéolytique, l'hypothèse de l'étude est que la variante P312R (c.935C>G, p.Pro312Arg) altère l'activité ATPase, réduisant donc la capacité catalytique du protéasome. Pour répondre à cela, l'objectif principal de ce projet est de caractériser les mécanismes cellulaires altérés par la mutation génétique P312R de la sous-unité *PSMC5* du protéasome. Plus précisément, deux sous-objectifs ont été établis. Dans un premier temps, il sera question d'établir et de caractériser une lignée cellulaire modèle de type sauvage (WT) et de la variante P312R de *PSMC5*. Ensuite, l'impact de la variante P312R sur l'abondance et la distribution de *PSMC5* et de l'ubiquitine, ainsi que sur la capacité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome seront analysés.

1.5 Sélection du modèle cellulaire

Pour étudier l'impact de la variante P312R de la sous-unité *PSMC5* sur l'activité du protéasome, la lignée cellulaire SH-SY5Y a été sélectionnée. En 1970, une biopsie de la moelle osseuse d'une jeune fille de quatre ans atteinte d'un neuroblastome métastatique a permis de créer la lignée cellulaire SK-N-SH (Shibley *et al.*, 2016). Dans le but d'établir un modèle pour la recherche neurologique, la scientifique June L. Biedler a généré, en 1978, la lignée cellulaire SH-SY5Y (Shibley *et al.*, 2016). Celle-ci fut produite par le sous-clonage de la lignée parentale SK-N-SH en SH-SY, en SH-SY5 et, finalement en SH-SY5Y (Strother *et al.*, 2021). Cette lignée est caractérisée par une population hétérogène de cellules de type épithélial et

neuroblastique. Les cellules épithéliales se distinguent morphologiquement par leur forme plate avec très peu de projections et leur tendance à proliférer en grappes. À l'inverse, les cellules de type neuroblastique possèdent une forme allongée avec de multiples projections imitant les dendrites et axones du système nerveux (Shiple *et al.*, 2016). Il convient de noter que cette lignée cellulaire est également constituée d'une portion de cellules adhérentes et en suspension. Composées de 47 chromosomes, les cellules SH-SY5Y contiennent, au sein du chromosome 1, une copie supplémentaire du segment 1q (Yusuf *et al.*, 2013). Il est à noter que ce segment contient les gènes codant les sous-unités protéasomiques bêta 4 et Rpn10 (National Library of Medicine, 2025a; National Library of Medicine, 2025b).

La particularité des cellules SH-SY5Y justifiant leur popularité dans le domaine de la neurobiologie est leur capacité à se différencier en neurones matures, et ce par l'utilisation de diverses substances stimulatrices. En effet, nombreux sont les articles démontrant la différenciation neuronale dopaminergique, cholinergique et adrénergique par l'utilisation d'acide rétinoïque, de cholestérol, d'estradiol, de dibutyryl AMP cyclique, du facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF), de staurosporine et/ou d'esters de phorbol (Lopes *et al.*, 2010; Shiple *et al.*, 2016; Teppola *et al.*, 2016). Par des marqueurs de neurones matures, tels que la protéine 2 associée aux microtubules (MAP2) et la bêta tubuline III, la progression de la différenciation peut être suivie et contrôlée selon le protocole employé (Dravid *et al.*, 2021; Shiple *et al.*, 2016; Simoes *et al.*, 2021).

Plusieurs sont les avantages justifiant l'utilisation de la lignée cellulaire SH-SY5Y lors d'études neurobiologiques. Comparativement à des neurones primaires murins, ces cellules permettent d'obtenir des résultats dans un court laps de temps et de manière peu onéreuse (Simoes *et al.*, 2021). Également, considérant les normes éthiques entourant la recherche sur les mammifères, celles-ci permettent d'obtenir les preuves scientifiques nécessaires justifiant une continuité vers un modèle plus évolué.

Malgré ces aspects, cette lignée présente certaines limitations expérimentales. Effectivement, lors de leur différenciation, les cellules atteignent irréversiblement la phase quiescente G_0 du cycle cellulaire, empêchant donc toutes proliférations futures (Simoes *et al.*, 2021). Également, sachant qu'une proportion des cellules est perdue au cours des étapes de différenciation, un rendement avec une perte d'environ 30 à 40 % doit être prévu (Shiple *et al.*, 2016). Par ailleurs, malgré les multiples substances stimulatrices connues pour cette lignée, les protocoles de différenciation neuronale standardisés sont une denrée rare. Cette problématique est d'autant plus importante lorsqu'il est question d'un protocole pour un type de

neurone spécifique (Simoes *et al.*, 2021). Par conséquent, les profils phénotypiques de ces cellules différenciées ont tendance à varier d'un article ou d'une équipe de recherche à l'autre, réduisant donc la reproductibilité des résultats (Dravid *et al.*, 2021; Shipley *et al.*, 2016).

Bien qu'elle présente certaines limites, la lignée cellulaire SH-SY5Y reste tout de même le modèle de choix lorsqu'il est question d'études neurobiologiques en raison de son origine humaine. Comme choix alternatif, il est également possible d'employer les lignées cellulaires PC12, B35 et Neuro-2a provenant d'un phéochromocytome de la médullosurrénale de rat, d'un neuroblastome du système nerveux central de rat et de la crête neurale de souris, respectivement (Otey *et al.*, 2003; Tremblay *et al.*, 2010; Wiatrak *et al.*, 2020).

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Prédiction de l'impact de la mutation P312R de la sous-unité PSMC5 sur la structure du protéasome
L'interaction entre une sous-unité PSMC5 de type sauvage (WT) (numéro d'accèsion UniProt P62195-2) ou P312R et une molécule d'ATP a été modélisée avec AlphaFold 3 (Abramson *et al.*, 2024). Une seule copie a été utilisée de la protéine et du ligand. La visualisation du complexe PSMC5-ATP a été effectuée à l'aide du logiciel *PyMOL Molecular Graphics System*, Version 3.0.3 Schrödinger, LLC.

2.2 Construction de l'ADN plasmidique

Pour introduire le gène *PSMC5* WT et P312R au sein de cellules, le plasmide pcDNA3.1+/N-HA de 5450 paires de bases a été utilisé. Celui-ci contient le gène de sélection *NeoR/AmpR*, procurant une résistance contre la néomycine et la généticine (G418) chez les cellules eucaryotes et à l'ampicilline lors de la réplication chez les cellules procaryotes bactériennes. La compagnie GenScript a synthétisé la séquence d'ADN complémentaire pour le transcrit 2 du gène *PSMC5* WT qui a été clonée dans les sites de restriction KpnI et XhoI au sein du plasmide pcDNA3.1+/N-HA. GenScript a également effectué la mutagenèse afin de générer la variante protéique P312R.

Pour introduire le gène *HA-PSMB5* au sein de bactéries, le plasmide pET-28a(+)-TEV de 5400 paires de bases a été utilisé. Celui-ci possède, pour l'amplification, le gène de résistance à la kanamycine. La compagnie GenScript a sous-cloné la séquence du gène *HA-PSMB5* dans le vecteur avec les enzymes de restriction NdeI et EcoRI.

2.3 Amplification plasmidique et purification

Des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5alpha ont été transformées avec 1 µg du plasmide pcDNA3.1+/N-HA codant pour PSMC5 WT ou P312R. Elles ont ensuite étéensemencées sur des géloses de bouillon lysogène Miller (LB; 10 g/L tryptone, 5 g/L extrait de levure, 10 g/L NaCl et 15 g/L agar) contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Une colonie isolée a été sélectionnée etensemencée en culture liquide dans 100 mL de milieu LB avec 100 µg/mL d'ampicilline. Suite à une incubation de 16 h à 37 °C sous agitation à 200 rotations par minute (rpm), la densité optique bactérienne à 600 nm a été prélevée pour confirmer

une croissance cellulaire d'environ 0,6. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait par la technique MidiPrep (Macherey-Nagel, 740410.50).

Des bactéries *E. coli* DH5alpha ont été transformées avec 1 µL du plasmide pET-28a(+)-TEV codant *His-HA-PSMB5*. Elles ont ensuite étéensemencées sur des géloses LB contenant 50 µg/mL de kanamycine. Une colonie isolée a été sélectionnée etensemencée en culture liquide dans 5 mL de milieu LB avec 50 µg/mL de kanamycine. Suite à une incubation de 16 h à 37 °C sous agitation à 200 rpm, la densité optique bactérienne à 600 nm a été prélevée pour confirmer une croissance cellulaire d'environ 0,6. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait par la technique MiniPrep (New England Biolabs, T1010). Une analyse par Nanodrop a révélé une concentration de 76 ng/µL et l'absence de contamination par des acides nucléiques et autres composés organiques (ratio A260/A280 = 2,01; ratio A260/A230 = 2,39).

2.4 Anticorps

Les anticorps suivants ont été employés pour les méthodes d'immunobuvardage (IB), d'immunofluorescence (IF) et ELISA : anti-HA (lapin, clone Poly9023, 1:1000 (IF), BioLegend, 902302), anti-HA.11 (souris, clone 16B12, 1:1000 (IB/IF) ou 5 µg/mL (ELISA), BioLegend, 901502), anti-PSMC2/Rpt1 (lapin, 1:1000 (IB), UBPBio, Y2202-20), anti-PSMC4/Rpt3 (lapin, 1:1000 (IB), UBPBio, Y2222-20), anti-PSMC5/Rpt6 (lapin, 1:1000 (IB), UBPBio, Y2252-20), anti-PSMD1/Rpn2 (lapin, 1:500 (IB), UBPBio, Y2312-20), anti-PSMD11/Rpn6 (lapin, 1:750 (IB), UBPBio, Y2352-20), anti-PSMD14/Rpn11 (lapin, 1:1000 (IB), UBPBio, Y2402-20), anti-PSMB5 (lapin, 0,5 µg/mL (ELISA), Antibodies-Online, ABIN6264477), anti-ubiquitine contre la chaîne K48 (lapin, clone D9D5, 1:1000 (IB), Cell Signaling Technology, 8081T), anti-ubiquitine (souris, clone P4D1, 1:750 (IB) ou 1:200 (IF), Santa Cruz Biotechnology, sc-8017), anti-ubiquitine (souris, clone FK2, 1:200 (IF), Enzo, BML-PW8810), anti-actine bêta (souris, clone BA3R, 1:1000 (IB), Applied Biological Materials, G043), anti-souris IgG conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) (cheval, 1:10000 (IB), Cell Signaling Technology, 7076S) et anti-lapin IgG conjugué à la HRP (chèvre, 1:10000 (IB) ou 0,1 µg/mL (ELISA), Cell Signaling Technology, 7074S), anti-souris IgG conjugué à Alexa Fluor 488 (chèvre, 1:1000 (IF), ThermoFisher Scientific, A-11029), anti-lapin IgG conjugué à Alexa Fluor 488 (chèvre, 1:1000 (IF), ThermoFisher Scientific, A-11034) et anti-souris IgG conjugué à Alexa Fluor 647 (chèvre, 1:1000 (IF), Invitrogen, A32728). La phalloïdine conjuguée à CF640R (1:50 (IF), Biotium, 00050-T) a été utilisée pour le marquage des filaments d'actine. Le tableau 2.1 présente un résumé des anticorps employés pour le projet.

Tableau 2.1 Liste des anticorps utilisés et leurs applications.

Protéine	Clone	Espèce	Dilution	Application	Numéro de catalogue	Compagnie
HA	Poly9023	Lapin	1:1000	IF	902302	BioLegend
HA.11	16B12	Souris	1:1000 1:1000 5 µg/mL	IB IF ELISA	901502	BioLegend
PSMC2/Rpt1	Polyclonal	Lapin	1:1000	IB	Y2202-20	UBPBio
PSMC4/Rpt3	Polyclonal	Lapin	1:1000	IB	Y2222-20	UBPBio
PSMC5/Rpt6	Polyclonal	Lapin	1:1000	IB	Y2252-20	UBPBio
PSMD1/Rpn2	Polyclonal	Lapin	1:500	IB	Y2312-20	UBPBio
PSMD11/Rpn6	Polyclonal	Lapin	1:750	IB	Y2352-20	UBPBio
PSMD14/Rpn11	Polyclonal	Lapin	1:1000	IB	Y2402-20	UBPBio
PSMB5/β5	Polyclonal	Lapin	0,5 µg/mL	ELISA	ABIN6264477	A-O
K48	D9D5	Lapin	1:1000	IB	8081T	CST
Ubiquitine	P4D1	Souris	1:750 1:200	IB IF	sc-8017	SCB
Ubiquitine	FK2	Souris	1:200	IF	BML-PW8810	Enzo
Bêta actine	BA3R	Souris	1:1000	IB	G043	ABM
HRP anti-souris	-	Cheval	1:10000	IB	7076S	CST
HRP anti-lapin	-	Chèvre	1:10000 0,1 µg/mL	IB ELISA	7074S	CST
AF488 anti-souris	-	Chèvre	1:1000	IF	A-11029	TFS
AF488 anti-lapin	-	Chèvre	1:1000	IF	A-11034	TFS
AF647 anti-souris	-	Chèvre	1:1000	IF	A32728	Invitrogen

AF, Alexa Fluor; IB, Immunobuvardage; IF, Immunofluorescence; A-O, Antibodies-Online; CST, Cell Signaling Technology; SCB, Santa Cruz Biotechnology; ABM, Applied Biological Materials; TFS, ThermoFisher Scientific.

2.5 Transfection

2.5.1 Transfection transitoire de cellules HeLa

La lignée cellulaire HeLa (ATCC, CCL-2) a été procurée au laboratoire de la professeure Diana Alison Averill (UQAM, Département des Sciences Biologiques, Montréal, QC, Canada). Les cellules ont été cultivées, à 37 °C et 5 % CO₂, dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco, 11995-065) complémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (FBS; Wisent, 090150).

Les cellules ont été soumises à une transfection avec précipités de phosphate de calcium pour une période de 24 h. Pour chaque condition expérimentale, un volume total de 500 µL contenant 125000 cellules ont étéensemencés, en duplicata, dans un puits d'une plaque de 24 puits contenant une lamelle de verre de 12 mm. À 0,5 µg d'ADN plasmidique *HA-PSMC5* WT ou P312R, ou d'un plasmide contrôle, 19,4 µL d'eau

pure et 3,1 µL de chlorure de calcium ont été mélangés. Cette combinaison a été ajoutée, goutte à goutte, à 25 µL de solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) 2X supplémentée en chlorure de calcium, chlorure de magnésium et phosphate (Gibco, 14065-056). Pour des raisons pratiques, la recette a été effectuée en double. Suite à une incubation de 20 min à température pièce, 40 µL ont été ajoutés aux puits respectifs, excluant la condition non transfectée (NT). Après 24 h d'incubation à 37 °C et 5 % CO₂, les cellules ont été préparées pour une analyse par immunofluorescence (voir la section 2.8).

2.5.2 Transfection stable de cellules SH-SY5Y

La lignée cellulaire SH-SY5Y (Sigma, 94030304) a été procurée au laboratoire du professeur Saïd Kourrich (UQAM, Département des Sciences Biologiques, Montréal, QC, Canada). Les cellules ont été cultivées, à 37 °C et 5 % CO₂, dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12; Wisent, 319-075-CL) contenant 10 % de FBS.

Les cellules SH-SY5Y ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits, à une densité de 250000 cellules par puits, et incubées pendant 24 h, atteignant une confluence d'approximativement 70-80 %. Au sein d'un puits, 0,5 ou 1 µg d'ADN plasmidique *HA-PSMC5* WT ou P312R, ou d'un plasmide contrôle contenant la protéine fluorescente verte (GFP), a été dilué dans 50 µL d'Opti-MEM (Gibco, 11058021). Parallèlement, 2 µL de Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, 11668019) ont été dilués dans 50 µL d'Opti-MEM et incubés pendant 5 min. Le mélange Lipofectamine/Opti-MEM a été combiné au mélange ADN/Opti-MEM et incubé 20 min à température ambiante pour finalement être ajouté aux cellules. Après une incubation de 48 h à 37 °C et 5 % CO₂, le milieu de culture a été remplacé afin d'introduire l'agent de sélection G418 (GoldBio, G-418-5) à une concentration de 500 µg/mL.

2.6 Clonage par dilutions limites et sélection des cellules SH-SY5Y

Des cellules SH-SY5Y préalablement congelées, exprimant l'hémagglutinine (HA)-*PSMC5* WT ou P312R, ont été mises en culture dans du milieu DMEM/F12 avec 10 % de FBS et 500 µg/mL de G418, puis incubées à 37 °C et 5 % CO₂. Suite à l'obtention d'une confluence approximative de 80 %, les cellules ont été lavées avec du tampon phosphate salin 1X (PBS; 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl et 2,7 mM KCl, pH 7,4) et détachées avec une solution de trypsine 0,05 %/acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 0,53 mM. Après une centrifugation de 3 min à 121 x g à température ambiante, le culot a été resuspendu dans du milieu de culture pour procéder au comptage cellulaire. En fonction de la concentration obtenue, le volume à prélever pour obtenir 1, 2 et 4 cellules a été calculé. Pour les conditions WT et P312R, 4 plaques

de 96 puits ont été préparées respectivement avec un volume final de 150 μ L : une plaque à 4 cellules par puits, une plaque à 2 cellules par puits, ainsi que deux plaques à 1 cellule par puits. Au moyen d'observations quotidiennes des colonies avec un microscope inversé, les puits en présence de monoclonales ont été identifiés et les polyclones éliminés. Un total de 66 monoclonales a été détecté pour la condition WT et 42 pour la condition mutée.

Lorsque les monoclonales étaient suffisamment confluentes, ceux-ci ont été détachés à l'aide d'une solution de trypsine 0,05 %/EDTA 0,53 mM et transférés dans une plaque de 24 puits avec un volume final de 1 mL. Les cellules ont ensuite été transférées dans une plaque de 12 puits pour une amplification supplémentaire. Une première sélection clonale par immunobuvardage (voir la section 2.11) avec l'anticorps primaire souris anti-HA.11 a été effectuée pour discriminer les monoclonales avec une abondance positive de HA-PSMC5 WT ou P312R de ceux avec une abondance nulle.

À titre de contrôle négatif, 2 clones n'exprimant pas HA-PSMC5 ont poursuivi l'amplification cellulaire parallèlement aux clones positifs. Pour identifier les clones WT et P312R modèles, les cellules ont été amplifiées dans des pétris de 10 cm en vue d'effectuer une deuxième sélection clonale par immunobuvardage (voir la section 2.11) et immunofluorescence (voir la section 2.8). Une portion des cellules a également été mise de côté pour être cryopréservée dans l'azote liquide (voir la section 2.7).

2.7 Cryopréservation des clones stables SH-SY5Y

À une confluence d'environ 80%, les clones à congeler ont été lavés avec du PBS 1X et détachés avec une solution de trypsine 0,05 %/EDTA 0,53 mM. Suite à une centrifugation à 121 x g de 3 min à température ambiante, le culot a été resuspendu dans 1 mL de FBS pour effectuer un comptage cellulaire. Selon la densité mesurée, la suspension a été davantage diluée avec du FBS à une concentration de 4 millions de cellules par 500 μ L. Les cryotubes ont été étiquetés avec le nom du clone (puits d'origine dans la plaque de 96 puits), la dilution initiale (1, 2, 4 cellules par puits), la condition expérimentale (WT ou P312R), la lignée cellulaire (SH-SY5Y), la quantité de cellules, la date de congélation et les initiales (EC). À 500 μ L de cellules diluées, 500 μ L d'une solution de FBS contenant 20% de diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été ajoutés. Les cryotubes ont été transférés immédiatement à -80 °C et, après 24 h, dans l'azote liquide. L'annexe B présente la liste complète des clones PSMC5 WT et P312R produits à partir des cellules SH-SY5Y, ainsi que leur niveau d'abondance de HA-PSMC5.

2.8 Immunofluorescence

2.8.1 Conditions de culture des clones SH-SY5Y

Dans une plaque de 24 puits, les cellules SH-SY5Y ont été mises en culture sur des lamelles de verre de 12 mm préalablement traitées avec 0,1 mg/mL de poly-D-lysine. Chaque condition a été réalisée en duplicata, excepté pour les cellules NT où des lamelles supplémentaires ont été préparées pour les conditions contrôles de l'immunomarquage. 75000 cellules dans un volume final de 500 µL de milieu de culture ont été déposées sur les lamelles, suivie d'une incubation à 37 °C et 5% CO₂ de 72 h.

2.8.2 Marquage et acquisition

L'ensemble du marquage a été effectué à température ambiante avec une série de trois lavages entre chaque étape. Tout d'abord, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et fixées, pour une période de 15 min, avec une solution froide de PBS paraformaldéhyde (PFA) 4 %/sucrose 4 %. Pour les cellules SH-SY5Y, il est à noter que l'étape de fixation a été effectuée avec du PBS PFA 4 %/sucrose 4 % à température ambiante afin de favoriser la réticulation des protéines soumises à la paraformaldéhyde. Cette température a également été employée dans le but de minimiser les effets que pourraient avoir un choc thermique sur la fonctionnalité, la structure, ainsi que sur la disposition des composants intracellulaires. Les cellules ont été perméabilisées avec du PBS contenant 0,25 % de triton X-100 pour 15 min. Le blocage a été effectué avec 10 % de sérum de chèvre normal (NGS) dilué dans du PBS pendant 1 h. Les lamelles ont été incubées avec les anticorps primaires dilués dans du PBS comportant 3 % de NGS pour 1 h. Le marquage avec les anticorps secondaires a été effectué selon les mêmes directives que les anticorps primaires. Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dilué à 2 µg/mL dans du PBS pendant 5 min. Suite à une dernière série de lavages, les lamelles ont été montées sur des lames à l'aide de l'agent de montage à base de glycérol *ProLong Diamond Antifade* (Thermo Fisher Scientific, P36965). Les lames ont été conservées à la noirceur à 4 °C préalablement à l'acquisition. Un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 équipé d'un objectif à immersion à l'huile (U-Plan S-Apo 60x/1,35 d'ouverture numérique), d'une source lumineuse DEL *X-Cite Xylis 365* (Excelitas Technologies Corp.) et d'une caméra *Zyla 4,2 Plus sCMOS* (Andor) a été employé. La version 2.2 du logiciel *Olympus CellSens Dimension* a été utilisée pour l'acquisition des images et les intervalles du Z-stack ont été préréglés à 0,27 µm et 10 tranches. La déconvolution a été effectuée par l'algorithme *constrained iterative* de la fonction *Olympus 3D Deconvolution* du logiciel. L'analyse des images a été effectuée en intégralité sur le logiciel Fiji.

2.8.3 Protocole d'analyse bidimensionnelle (2D)

Pour produire l'image 2D, le mode d'addition (Z-project, *sum slices*) a été employé. Par l'analyse séparée des canaux fluorescents sous le format 8-bit, un seuil de détection a été déterminé pour leur signal respectif, et appliqué uniformément à l'ensemble des échantillons analysés. Suite à la conversion de l'image en format binaire, le mode *fill holes* a été employé pour combler les vides potentiellement présents au sein de la cellule en raison du seuil de détection préalablement établi. Cette étape permet d'informer au logiciel, pour la quantification du signal fluorescent, qu'elle est la zone entière occupée par la cellule à l'étude. Lorsque les cellules étaient interconnectées par des projections ou leur membrane plasmique, elles ont été délimitées avec la fonctionnalité intitulée *watershed irregular features*.

Finalement, le mode *analyze particles* a été utilisé pour identifier les différentes régions d'intérêt (ROI), ou cellules, présentes dans l'image binaire. En sélectionnant l'image 2D brute, la densité intégrée, la valeur moyenne et médiane des gris, ainsi que l'aire occupée par le signal de l'actine ont été obtenues. Dans le but d'éliminer les possibles biais obtenus par le signal de l'arrière-plan, celui-ci a été soustrait du signal fluorescent cellulaire selon la formule suivante :

$$(1) \text{ Fluorescence cellulaire totale corrigée} = \text{densité intégrée} - (\text{aire} \times \text{fluorescence moyenne arrière-plan})$$

Les mesures brutes ont été extraites de Fiji et analysées par Microsoft Excel et GraphPad Prism (version 10). Selon la normalité de la distribution des données, les analyses statistiques ont été effectuées avec l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur paramétrique et le test de Student ou l'ANOVA à un facteur non paramétrique avec Kruskal-Wallis et test de Student non paramétrique avec Mann-Whitney.

2.8.4 Protocole d'analyse tridimensionnelle (3D)

En séparant les canaux fluorescents sous le format 8-bit, un seuil de détection a été déterminé pour leur signal respectif qui a été conservé parmi tous les échantillons analysés. Par le mode 3D *Binary Close Labels* de l'extension 3D *Suite* et le mode *fill holes*, la fermeture ainsi que le remplissage 3D de l'objet sur l'image binaire ont été effectués pour délimiter la région entière occupant la cellule au sein des plans x, y et z. Comme indiqué précédemment, dans le contexte où deux cellules sont connectées, une délimitation a été effectuée selon l'extension *distance transform watershed 3D*.

Lorsque l'image binaire a efficacement discriminé les différents ROI, le mode 3D *Manager* de l'extension 3D *Suite* a été utilisé pour les analyser. Par le mode 3D *Segmentation*, les ROI présents au sein de l'image ont été identifiés puis, en sélectionnant l'image brute contenant les 10 tranches, la densité intégrée, la valeur moyenne des gris, ainsi que la surface occupée par le signal de l'actine ont été obtenues. Pour éliminer les biais potentiels provenant du signal de l'arrière-plan, celui-ci a été soustrait du signal fluorescent selon la formule suivante :

$$(1) \text{ Fluorescence cellulaire totale corrigée} = \text{densité intégrée} - (\text{surface} \times \text{fluorescence moyenne arrière-plan})$$

Il est à noter que la surface et le voxel sont au 3D ce que l'aire et le pixel sont au 2D. Les mesures brutes ont été extraites de Fiji et analysées par Microsoft Excel et GraphPad Prism (version 10) selon les mêmes directives que l'analyse 2D. Le visionnement de la reconstruction cellulaire tridimensionnelle a été réalisé avec deux extensions du logiciel Fiji, soit 3D *Project* et *Volume Viewer*.

2.9 Lyse cellulaire

À une confluence d'environ 80 %, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et détachées avec une solution de trypsine 0,05 %/EDTA 0,53 mM. Après une centrifugation de 3 min à 121 x g à température ambiante, les culots cellulaires ont été lysés dans du tampon de radio-immunoprécipitation (RIPA; 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,5 % désoxycholate de sodium, 500 nM EDTA et H₂O) froid combiné à un cocktail d'inhibiteurs de protéase sans EDTA 1X (Selleckchem, B14001). Suite à une agitation par inversion de 20 min à 15 rpm et 4 °C, les lysats ont été centrifugés (21130 x g, 15 min, 4 °C). Les surnageants ont été récupérés et conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

La concentration protéique des lysats cellulaires a été quantifiée à l'aide du kit *Pierce BCA Protein Assay* (ThermoFisher Scientific, 23227). Une courbe standard de 2000-0 µg/mL a été préparée à partir d'un extrait purifié d'albumine de sérum bovin (BSA). Tous les échantillons, ainsi que les standards, ont été déposés en duplicata, à raison de 25 µL par puits. Suite à l'ajout de 200 µL par puits du réactif à l'acide bicinchonique, la plaque a été incubée à l'obscurité à 37 °C pendant 30 min. L'absorbance a ensuite été mesurée à 562 nm.

2.10 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE

Les protéines présentes dans les lysats cellulaires ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) avec un gel de séparation contenant 0,5 % de 2,2,2-trichloroéthanol 99 % (TCE; Sigma-Aldrich, T1507). Une composition en acrylamide de 10 % a été employée pour les protéines de taille inférieure ou égale à 50 kDa et 12 % pour les protéines supérieures à 50 kDa. À moins d'avis contraire, les lysats cellulaires ont été chargés à raison de 15 µg par puits. Suite à une migration d'environ 50 min à 40 mA/gel, une photo *stain-free* du gel par le système d'imagerie ChemiDoc MP de Bio-Rad a permis d'activer la liaison covalente du TCE aux résidus tryptophanes des protéines, permettant leur visualisation à la lumière ultraviolette (UV).

2.11 Immunobuvardage

Avec le système Trans-Blot Turbo de Bio-Rad, le transfert protéique du gel à une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) à faible auto-fluorescence (Millipore, IPFL00005) avec pores de 0,45 µm a été effectué pendant 10 min à 2,5 A et 25 V. Une photo *stain-free* de la membrane a permis de confirmer le transfert protéique. Le blocage de la membrane a ensuite été effectué avec une préparation de 5 % de lait écrémé en poudre sans gras dissout dans une solution saline tamponnée au Tris avec Tween 20 (TBST; 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 140 mM NaCl, 0,3 % Tween 20) pour 1 h à température ambiante avec agitation.

Pour les étapes suivantes, 3 lavages de 3 min au TBST ont été effectués entre celles-ci. L'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire, dilué dans du TBST, a été effectuée à température ambiante pendant 1 h. Celle-ci a ensuite été incubée avec l'anticorps secondaire conjugué au HRP, dilué dans du TBST, selon les mêmes directives que l'anticorps primaire. Finalement, le substrat *Clarity Western ECL* (Bio-Rad, 1705060) a été employé pour détecter les signaux chimiluminescents présents sur la membrane. Pour détecter ces signaux, le mode d'accumulation de signal du système d'imagerie ChemiDoc MP a été employé pour déterminer le temps d'exposition approprié et le mode Chemi a été utilisé pour l'acquisition du signal.

L'analyse a été effectuée avec la version 6.1.0 du logiciel *Image Lab*. Dans le contexte d'un immunobuvardage quantitatif, 3 étapes de normalisation ont été effectuées. Afin de soustraire le bruit de fond de l'analyse, un seuil de détection a été appliqué pour chaque protéine étudiée, qui a été conservé pour tous les réplicats biologiques. Ensuite, la densité des bandes a été normalisée par rapport à la densité totale des protéines présentes sur l'image *stain-free* de la membrane. Finalement, une bande MIX,

représentant les clones modèles répartis équitablement au sein d'un même puits, a été employée systématiquement pour chaque immunoblot. L'abondance relative des protéines d'intérêts a été obtenue par rapport à la densité de la bande MIX. Les données brutes ont été extraites d'*Image Lab* et examinées par Microsoft Excel et GraphPad Prism (version 10). Par la normalité de la distribution des données, les analyses statistiques ont été effectuées avec l'ANOVA à un facteur paramétrique et le test de Student.

2.12 Analyse morphologique des clones SH-SY5Y

Un comptage cellulaire a été effectué pour déposer, sur un pétri de 10 cm, une quantité de cellules équivalente entre les différentes conditions. À une confluence approximative de 60 %, les cellules ont été analysées avec un microscope inversé Axio vert.A1 (431030-9040-000, Zeiss) équipé d'un objectif LD A-Plan 20x/0,35 Ph1 M27 (421251-9911-000, Zeiss).

2.13 Activité enzymatique du protéasome

2.13.1 Production de la protéine recombinante His-HA-PSMB5 purifiée

Des bactéries *E. coli* BL21-Gold (DE3) ont été transformées avec 76 ng du plasmide pET-28a(+)-TEV codant *His-HA-PSMB5*, et ce avec un choc de chaleur de 20 sec à 42 °C suivi de 2 min sur glace. Suite à 1 h d'incubation à 37 °C, celles-ci ont étéensemencées sur des géloses LB contenant 50 µg/mL de kanamycine. Après une incubation de 16 h à 37 °C, 3 colonies uniques ont été sélectionnées etensemencées en culture liquide dans 5 mL de milieu LB avec 50 µg/mL de kanamycine. Suite à 16 h d'incubation à 37°C avec agitation à 200 rpm, la densité optique à 600 nm a été mesurée pour confirmer une croissance bactérienne inférieure ou égale à 0,6. Pour stimuler la production de la protéine d'intérêt, une induction à l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à une concentration finale de 1 mM a été suivie d'une incubation de 2 h à 30 °C avec agitation à 200 rpm. Suite à une centrifugation de 15 min à 2823 x g à 4 °C, le culot bactérien a été resuspendu dans 1 mL de tampon de lyse (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0,5 % Triton X-100, 1 mM dithiothréitol (DTT), 1 mM fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF)). Une sonication sur glace de 2 impulsions de 20 sec, séparées d'une pause de 10 sec, a été suivie d'une centrifugation de 25 min à vitesse maximale à 4 °C. Le surnageant a ensuite été transféré sur 100 µL de résine au nickel (GenScript, L00223-10) pré-équilibrée pour procéder à une purification par *lot*. Après une incubation de 30 min avec rotation à 15 rpm à température ambiante, la résine a été centrifugée pendant 5 min à 94 x g à 4 °C pour ensuite effectuer une série de 6 lavages avec 1 mL de tampon de lyse (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0,5 % Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) et

les mêmes paramètres de centrifugation. Un total de 10 éluions avec 200 µL de tampon d'éluion (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole) et les mêmes conditions de centrifugation a été effectué pour récolter la quantité maximale de protéines His-HA-PSMB5 préalablement adsorbées sur la résine. Pour chaque colonie bactérienne employée, les différentes fractions obtenues lors de la purification ont été séparées selon la méthode SDS-PAGE (voir la section 2.10). Par l'analyse des gels, les fractions éluées 1 à 4 venant des transformants 1 et 3 ont été regroupées pour maximiser la concentration protéique finale. Une dialyse a été effectuée, avec un tampon contenant 25 mM Tris-HCl pH 8,0 et 500 mM NaCl et une cuvette en polypropylène avec un poids de coupure de 10 kDa (ThermoFisher Scientific, 88404), pour une période de 16 h à 4 °C. Un changement de tampon a été effectué 3 h suivant le début de la dialyse. Une analyse de l'échantillon protéique His-HA-PSMB5 purifié par Nanodrop, SDS-PAGE et dosage Pierce BCA a permis d'obtenir une concentration approximative de 28 µg/mL et de confirmer l'absence de contamination en ADN (ratio A260/A280 = 0,5) et en autres protéines. Des aliquotes ont été conservées à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

2.13.2 Dosage du phosphate au vert de malachite combiné à un ELISA quantitatif de la protéine HA-PSMC5

2.13.2.1 Lyse cellulaire

À une confluence d'environ 80 %, les cellules SH-SY5Y ont été lavées avec du HBSS 1X (Gibco, 14025-092), détachées avec une solution de trypsine 0,05 %/EDTA 0,53 mM et réparties dans 2 tubes distincts. Après une centrifugation de 3 min à 121 x g à température ambiante, le culot cellulaire dans le premier tube a été lysé dans 500 µL de tampon de lyse froid (40 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM NaCl, 10 % glycérol, 2 mM β-mercaptoéthanol (β-ME), 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂). À titre de contrôle négatif, le culot présent dans le second tube a été lysé avec 500 µL du tampon de lyse combiné à un cocktail d'inhibiteurs de protéase sans EDTA 1X. Suite à un mélange par inversion de 20 min à 15 rpm à 4 °C, les lysats ont été centrifugés à 21130 x g pendant 15 min à 4 °C. Les surnageants ont été immédiatement employés pour l'ELISA, l'essai de vert de malachite et le dosage BCA. En raison de la présence de β-ME dans le tampon de lyse, le dosage protéique BCA a été effectué à l'aide du kit compatible avec les agents réducteurs *BCA Protein Assay* (BioBasic, SK3051-500). Une courbe standard de 1000-0 µg/mL a été préparée à partir d'un extrait purifié de BSA. Les échantillons et les standards ont été déposés, en duplicata, à raison de 5 µL par puits. Après l'ajout de 5 µL par puits de la solution modifiant les agents réducteurs disulfure, la plaque a été incubée à l'obscurité à 37 °C pendant 30 min. Ensuite, 200 µL par puits du réactif à l'acide bichinonique ont été

ajoutés et la plaque a été incubée une seconde fois selon les mêmes conditions. L'absorbance a été mesurée à 562 nm.

2.13.2.2 ELISA

La méthode a été inspirée de l'article *The capture proteasome assay (CAPA) to evaluate subtype-specific proteasome inhibitors* (Vigneron *et al.*, 2015). Tous les échantillons ont été effectués en triplicata au sein d'une plaque transparente 96 puits de grade ELISA (Sardstedt, 82.1581.200). Afin de conserver la stabilité des protéasomes, la préparation de la plaque ELISA et l'incubation des lysats cellulaires ont été effectuées à 4 °C tandis que les étapes subséquentes ont été réalisées à température ambiante. Chaque incubation a été séparée d'une série de 3 lavages au TBST (20mM Tris-HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20), à moins d'une mention contraire. La fixation de l'anticorps souris anti-HA.11 a été effectuée avec 100 µL par puits à une concentration de 5 µg/mL dans du tampon de fixation ELISA (BioLegend, 421701), et ce jusqu'au lendemain. Le blocage de la plaque a été exécuté en ajoutant 150 µL par puits de tampon de blocage TBST contenant 2% de BSA (Bio Basic, AD0023) pendant 1 h. Dans le but de réaliser un test ELISA quantitatif, une courbe standard de 20000-0 pg/mL a été effectuée avec un échantillon purifié de protéines recombinantes His-HA-PSMB5. Les lysats cellulaires ont été préalablement dilués dans du tampon de blocage selon un rapport 1:1, puis 50 µL ont été ajoutés par puits et incubés pour 2 h. Ensuite, 100 µL de l'anticorps de détection primaire lapin anti-PSMB5, à une concentration de 0,5 µg/mL dans du tampon de blocage, ont été ajoutés par puits et la plaque a été incubée pour 2 h. Après une série de 4 lavages au TBST, l'anticorps de détection secondaire chèvre anti-lapin IgG-HRP a été incubé pendant 1 h avec 100 µL par puits, à une concentration de 0,1 µg/mL dans du tampon de blocage. Suite à 4 lavages au TBST, 100 µL par puits de substrat 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB; BioLegend, 421101) ont été utilisés pour amorcer la réaction. Après 30 min d'incubation, 100 µL de solution stop (BioLegend, 423001) ont été ajoutés par puits et l'absorbance à 450 nm a été mesurée immédiatement à l'aide du lecteur de microplaques Tecan Infinite M1000 PRO. La concentration en HA-PSMC5 des divers lysats cellulaires testés a été déterminée par l'isolation de la variable x de la courbe standard avec la valeur de densité optique obtenue (variable y). Cette concentration, en pg/mL, a permis d'estimer la quantité de HA-protéasomes responsable de l'hydrolyse de l'ATP mesurée dans l'essai de vert de malachite.

Lors de l'établissement du protocole, tous les paramètres susceptibles d'influencer la sensibilité et la spécificité de l'essai ont été testés. La fixation de l'anticorps de capture a été effectuée à des concentrations de 5 µg/mL et 10 µg/mL et selon une incubation de 1 h à température ambiante et de 16 h

à 4 °C. Le blocage au TBST a été comparé selon des concentrations de BSA de 1 %, 2 % et 3 %. L'incubation des lysats cellulaires a été testée sans dilution, à des concentrations définies de 200 et 500 µg/mL, puis avec des dilutions de 1:2, 1:4, 1:8 et 1:12 dans du tampon de blocage. Les anticorps de détection primaire anti-PSMB5 et secondaire anti-lapin IgG-HRP ont été évalués à des concentrations de 0,5, 2,5 et 5 µg/mL et 0,05, 0,1 et 0,2 µg/mL respectivement. Il est à noter que l'optimisation de la méthode a été effectuée sur un lecteur de plaques multimode VICTOR Nivo (PerkinElmer).

2.13.2.3 Dosage du phosphate au vert de malachite

La méthode décrite a été adaptée de l'article *The capture proteasome assay (CAPA) to evaluate subtype-specific proteasome inhibitors* (Vigneron *et al.*, 2015). Tous les échantillons ont été effectués en triplicata au sein d'une plaque transparente 96 puits de grade ELISA. Les étapes de fixation de l'anticorps de capture, de blocage à la BSA et d'incubation des lysats cellulaires ont été effectuées selon les mêmes directives que l'ELISA décrit précédemment. 3 lavages avec le tampon 20 mM Tris-HCl pH 7,2 ont été effectués pour éliminer toute trace de détergent Tween-20, pouvant à de faibles concentrations interférer avec le vert de malachite. Une trousse de dosage du phosphate par vert de malachite (Sigma-Aldrich, MAK307) a été utilisée pour les étapes suivantes. Dans les puits contenant les protéasomes HA-PSMC5 WT ou P312R capturés par la procédure ELISA, 80 µL d'eau ultra pure ont été ajoutés. Une courbe standard de phosphate de 40-0 µM a été préparée et 80 µL ont été déposés, en duplicata, dans les puits respectifs. La réaction a été amorcée avec une solution de vert de malachite-molybdate-ATP, à l'ordre de 20 µL par puits. La cinétique du mécanisme enzymatique a été examinée, à température ambiante, sur une période de 60 min, avec une mesure de l'absorbance à 620 nm à des intervalles de 5 à 10 min, à l'aide du lecteur de microplaques Tecan Infinite M1000 PRO.

Comme contrôle négatif de la liaison spécifique de HA-PSMC5 au fond des puits, un lysat de cellules SH-SY5Y NT a été employé. Afin de soustraire le bruit de fond, les valeurs de densité optique des clones WT et P312R ont été normalisées par les valeurs de densité optique de la condition NT. Également, à titre de contrôle négatif de l'activité d'hydrolyse de l'ATP, chaque échantillon a été comparé selon une lyse avec et sans inhibiteurs de protéase. La concentration en phosphate des divers lysats cellulaires testés a été déterminée par l'isolation de la variable x de la courbe standard de la libération de phosphate avec la valeur de densité optique obtenue (variable y), à différents temps d'incubation. Suite à la conversion de la concentration en phosphate de pM à pg/mL, la concentration en phosphate libéré (vert de malachite) a pu être normalisée par la concentration en HA-protéasomes capturés (ELISA).

Les données brutes ont été examinées par Microsoft Excel et GraphPad Prism (version 10). Selon la normalité de la distribution des données, les analyses statistiques ont été effectuées avec l'ANOVA à un facteur paramétrique et non paramétrique avec Kruskal-Wallis.

Lors de l'élaboration du protocole expérimental, une comparaison des étapes de capture des HA-protéasomes à température ambiante et à 4 °C a été effectuée pour déterminer la condition préservant davantage la stabilité et l'activité enzymatique de ces complexes multiprotéiques. Il est à noter que l'optimisation de la méthode a été effectuée sur un lecteur de plaques multimode VICTOR Nivo (PerkinElmer).

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Validation préliminaire de l'hypothèse de recherche

Avant le début des expérimentations, une prédiction bio-informatique de l'interaction entre la sous-unité PSMC5 WT et P312R du protéasome, en parallèle, et une molécule d'ATP, par le système d'intelligence artificielle AlphaFold 3, a été effectuée pour renforcer l'hypothèse de l'étude. À titre de rappel, l'hypothèse est que la variante P312R altère l'activité ATPase de PSMC5, réduisant ainsi la capacité catalytique du protéasome. Sachant que la variante P312R cause le changement d'une proline pour une arginine, les probabilités que la mutation entraîne une obstruction au niveau du site de liaison à l'ATP étaient élevées. Comme il est possible d'observer à la figure 3.1, la chaîne latérale de la proline est composée d'une pyrrolidine cyclique, donc d'un anneau de 4 atomes de carbone et 1 atome d'azote. Quant à l'arginine, celle-ci est caractérisée par une chaîne latérale linéaire à 3 atomes de carbone possédant, à une extrémité, 1 groupement guanidino. Il est donc possible de constater que la structure de l'arginine présente un degré de complexité supérieur à celle de la proline, augmentant les risques de blocage. En comparaison avec la condition WT (fig. 3.1 A et B), la présence de l'arginine en position 312 a provoqué la fermeture de la cavité permettant l'interaction avec la molécule d'ATP (fig 3.1 C et D). Ces résultats appuient l'hypothèse de recherche que la mutation P312R perturbe l'activité ATPase de la sous-unité PSMC5.

Dans le cadre du système ubiquitine-protéasome, les protéines à dégrader sont reconnues par leur étiquette de polyubiquitine au niveau de la lysine 48 (Glickman et Ciechanover, 2002; Tanaka, 2009). Dans l'éventualité où le protéasome présente une perturbation fonctionnelle, une accumulation de protéines polyubiquitinées se produit généralement au sein des cellules (Myeku *et al.*, 2011). Pour évaluer si ce phénomène se produit en présence de la mutation P312R, une transfection transitoire de PSMC5 WT et P312R chez des cellules HeLa a été réalisée. Par immunofluorescence, nous avons évalué la colocalisation intracellulaire de HA-PSMC5 WT ou P312R avec la mono- et polyubiquitine, et ce en employant le coefficient de Manders (fig. 3.2). En observant la figure 3.2 A, il est possible de constater une augmentation du chevauchement entre le signal fluorescent de HA-PSMC5 et l'ubiquitine (mono et poly) chez les cellules exprimant PSMC5 P312R, par rapport à la condition WT. Cette observation fut renforcée par l'utilisation du coefficient de Manders (fig. 3.2 B) démontrant que la mutation P312R a provoqué une augmentation significative du chevauchement entre la sous-unité HA-PSMC5 et la polyubiquitine, traduite par une valeur de colocalisation presque 2 fois plus élevée par rapport à la condition WT. Ce phénomène a aussi été

observé au niveau de la mono- et polyubiquitine (fig. 3.2 C), où la colocalisation avec la sous-unité HA-PSMC5 a augmenté de manière significative chez les cellules exprimant PSMC5 P312R. Il est à noter qu'en microscopie, le coefficient de Manders mesure l'intensité de la colocalisation entre 2 canaux fluorescents, où une valeur de 0 équivaut à une colocalisation nulle et une valeur de 1 à une colocalisation totale (Dunn *et al.*, 2011). Les résultats démontrent une accumulation de protéines ubiquitinées à proximité des protéasomes, compatible avec une altération de la fonction enzymatique du complexe, entraînant une réduction de la dégradation protéolytique.

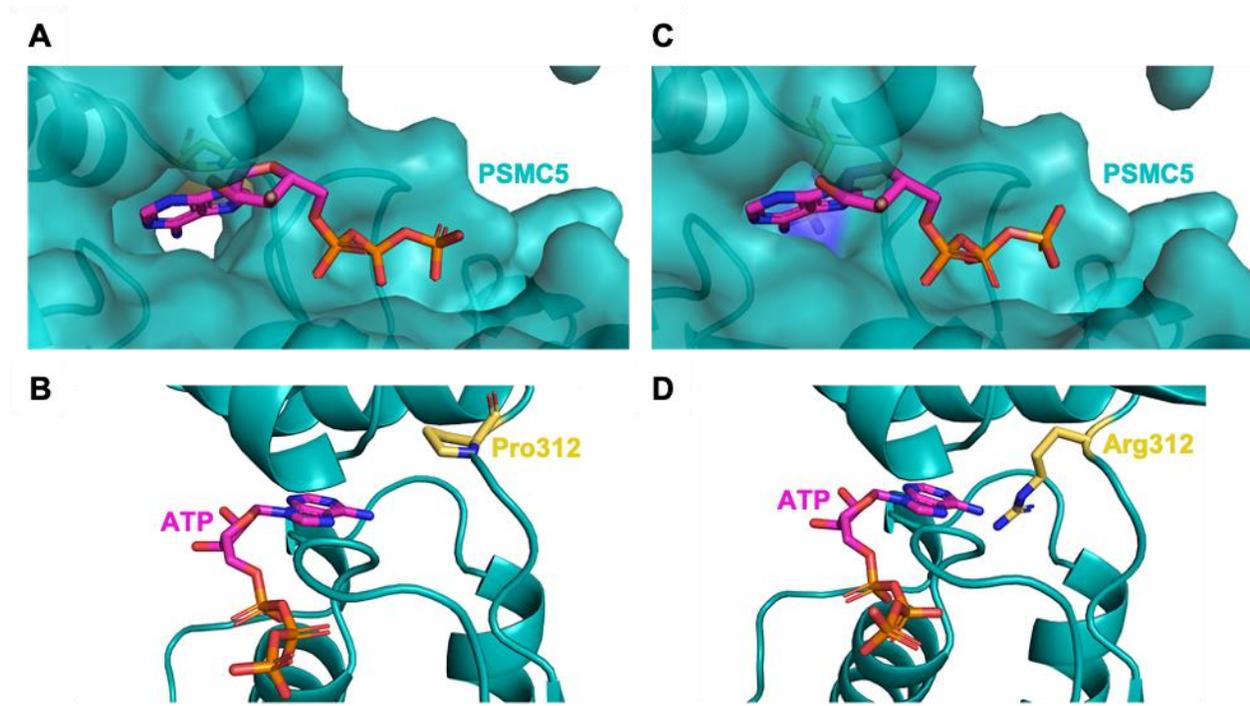


Figure 3.1 Prédiction AlphaFold de l'interaction entre la sous-unité PSMC5 WT et P312R du protéasome et une molécule d'ATP.

La protéine PSMC5 est indiquée en cyan avec le résidu à l'étude en jaune et la molécule d'ATP en rouge, orange, rose et bleu selon la chaîne. (A, C) Représentation de la protéine PSMC5 en surface et de la molécule d'ATP en bâtons. (B, D) Représentation de la protéine PSMC5 en cartoon avec le résidu d'intérêt en bâtons et de la molécule d'ATP en bâtons. Les sections présentent l'interaction entre PSMC5 WT (A, B) ou P312R (C, D) et l'ATP.

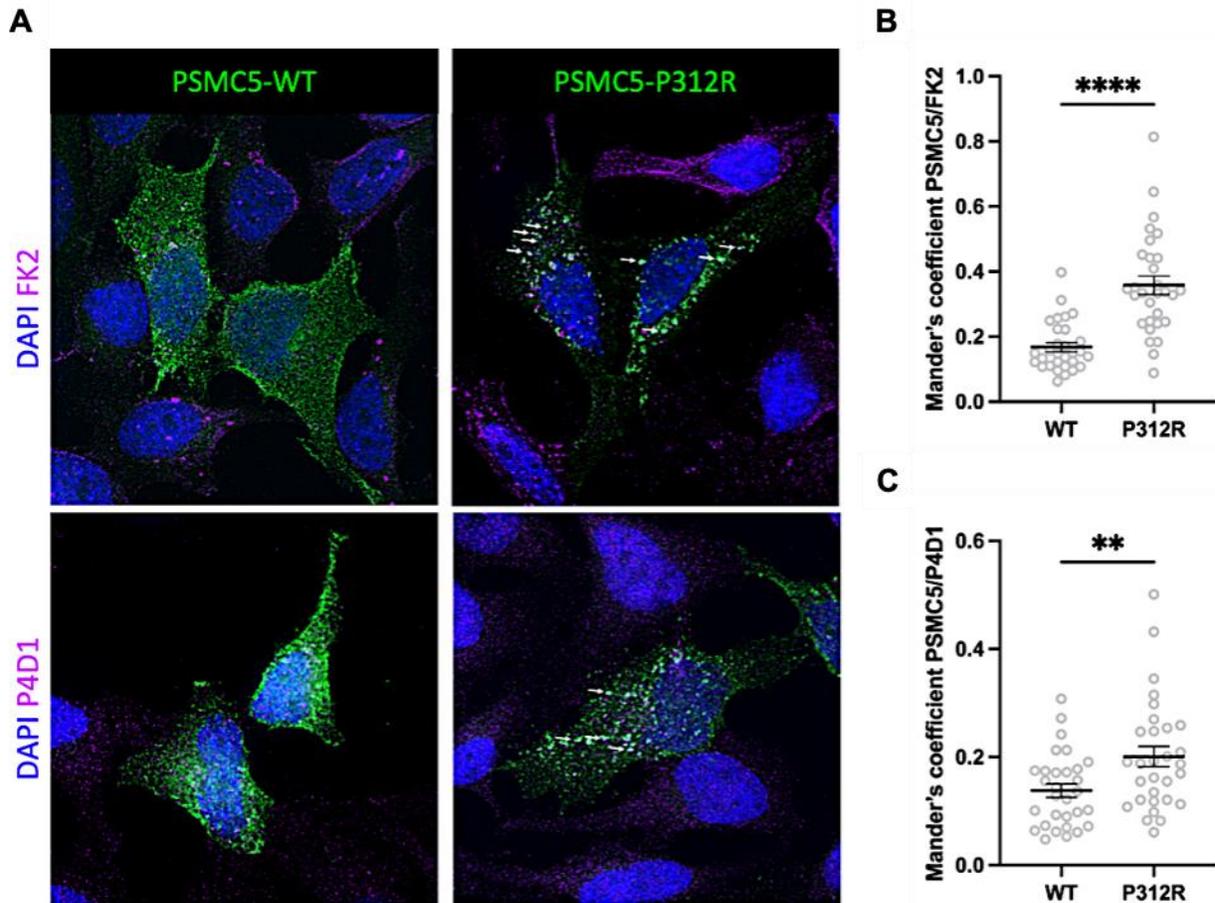


Figure 3.2 Distribution intracellulaire de HA-PSMC5 et de l'ubiquitine suite à la transfection transitoire de *PSMC5* WT et P312R chez des cellules HeLa.

(A) Analyse quantitative du chevauchement entre le signal fluorescent de HA-PSMC5 et de l'ubiquitine chez des cellules exprimant *PSMC5* WT ou P312R. L'immunofluorescence a été effectuée sur des cellules fixées et marquées contre l'étiquette HA de *PSMC5* (vert), la mono- et polyubiquitine (mauve) et l'ADN du noyau (DAPI; bleu). Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 équipé d'un objectif à immersion d'huile 60x. Les flèches blanches représentent un chevauchement entre le signal fluorescent de HA-PSMC5 et l'ubiquitine. FK2, anticorps anti-polyubiquitine; P4D1, anticorps anti-ubiquitine (mono et poly). (B) Coefficient de Manders entre le signal fluorescent de HA-PSMC5 et FK2. (C) Coefficient de Manders entre le signal fluorescent de HA-PSMC5 et P4D1. (B-C) Chaque point représente une cellule provenant de 3 expériences indépendantes où 10 cellules ont été sélectionnées aléatoirement pour l'analyse. Le test de Student non paramétrique avec Mann-Whitney a été employé. Les barres d'erreur représentent la moyenne \pm SEM. ****, $p < 0,0001$; **, $p = 0,0025$.

3.2 Mise au point du modèle cellulaire

Les essais préliminaires de prédictions bio-informatiques et d'immunofluorescence suggérant un effet négatif de la variante P312R de la sous-unité *PSMC5* sur l'activité du protéasome, il a été décidé de poursuivre l'étude en employant un modèle se rapprochant davantage des neurones du système nerveux humain. Dans un premier temps, la quantité d'ADN plasmidique à utiliser pour la transfection des cellules

a été optimisée. À cet effet, des cellules ont été transfectées à la lipofectamine 2000 avec 0,5 µg ou 1 µg d'ADN *HA-PSMC5* WT ou P312R du vecteur pcDNA3.1+/N-HA, et ce pour 48 h. Un immunoblot anti-HA a permis de comparer l'efficacité de la transfection et d'établir 2 constats : (1) la quantité croissante d'ADN plasmidique ne permet pas d'augmenter l'abondance protéique et (2) le taux de protéines HA-PSMC5 P312R demeure inférieur à celle de la condition WT, et ce indépendamment de la quantité d'ADN utilisée (fig. 3.3). Dans l'optique de produire des clones HA-PSMC5 WT et P312R, la condition à 0,5µg d'ADN a été sélectionnée pour effectuer la transfection stable des cellules SH-SY5Y.

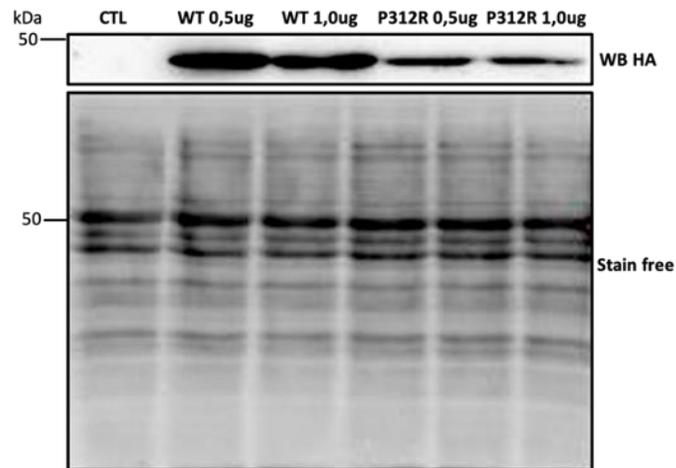


Figure 3.3 Effet de la quantité d'ADN plasmidique sur l'abondance de HA-PSMC5 WT et P312R, chez des cellules SH-SY5Y.

Immunoblot anti-HA de cellules SH-SY5Y transfectées avec 0,5 µg ou 1 µg d'ADN plasmidique *HA-PSMC5* de type WT ou P312R du vecteur pcDNA3.1+/N-HA. La condition contrôle correspond à des cellules transfectées avec 1 µg d'un vecteur contenant le gène GFP. Les protéines des lysats ont été migrées sur un gel *stain-free* et transférées sur une membrane PVDF.

Par la technique de clonage par dilutions limites, les cellules SH-SY5Y exprimant HA-PSMC5 WT et P312R ont étéensemencées à raison de 1, 2 et 4 cellules par puits, pour un total de 131 clones WT et 156 clones P312R. Après avoir éliminé les polyclones (65 WT et 114 P312R) et les monoclonales à faible croissance cellulaire (45 WT et 26 P312R), les 21 monoclonales WT et 16 monoclonales P312R restants ont été amplifiés pour réaliser un immunoblot anti-HA, permettant ainsi de distinguer les cellules avec une abondance positive et négative de HA-PSMC5 WT et P312R (fig. 3.4). Pour la condition WT, un total de 8 clones n'exprimait pas la protéine d'intérêt tandis que, pour la condition mutée, ce chiffre s'élevait à 6 (fig. 3.4). En raison de leur résistance à l'antibiotique G418, les clones WT A4 II et F7 III ont été conservés à titre de contrôle négatif pour les expérimentations suivantes. En raison d'une faible prolifération cellulaire, les clones WT B2 III et F8 II, ainsi que les clones P312R F11 III, F11 II et D8 III ont été retirés de l'étude.

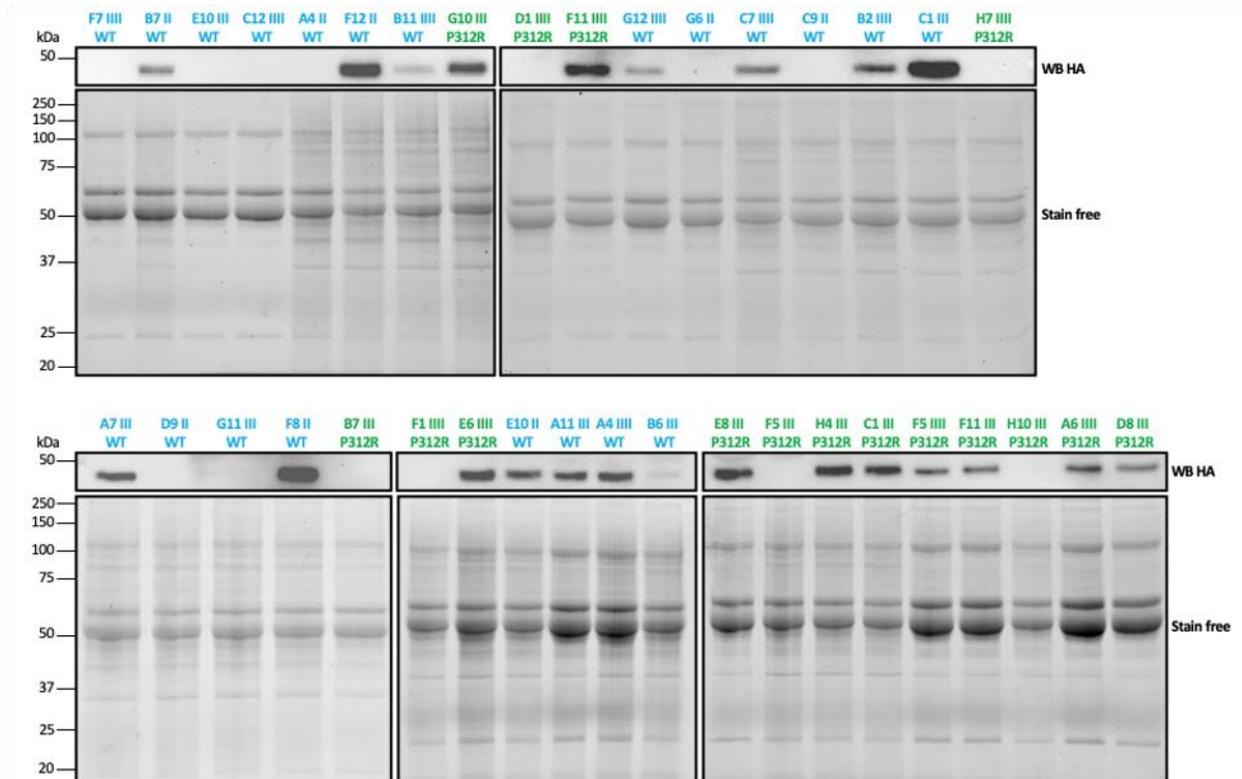


Figure 3.4 Première étape de sélection des clones PSMC5 WT et P312R, de cellules SH-SY5Y, par immunobuvardage.

Immunoblot anti-HA des clones provenant de la transfection stable de cellules SH-SY5Y avec 0,5 μg d'ADN plasmidique *HA-PSMC5* de type WT ou P312R du vecteur pcDNA3.1+/N-HA. Les protéines des lysats ont été migrées sur un gel *stain-free* et transférées sur une membrane PVDF. Normalisation entre les clones sur la base de 25 μL de lysat par puits. Les clones WT et P312R sont représentés en cyan et en vert respectivement.

Pour sélectionner les clones modèles, un immunoblot anti-HA et anti-PSMC5/Rpt6 endogène ont été effectués pour comparer qualitativement l'abondance protéique (fig. 3.5). Afin de normaliser les signaux entre les membranes, un échantillon MIX a été employé pour chaque immunoblot. Cette bande représentait le lysat de chaque clone, réparti au sein du même puits. La quantité de protéines chargée pour la condition MIX des gels WT et P312R était de 1,363 μg et 1,875 μg par clone respectivement. Parmi les clones WT, 4 avaient une forte abondance de HA-PSMC5 (F12 II, C1 III, C7 III et G12 III), 2 une abondance intermédiaire (A11 III et A4 III) et 4 une faible abondance (B7 II, E10 II, A7 III et B11 III); fig. 3.5 A). Pour PSMC5 endogène, son abondance variait: 5 à forte abondance (E10 II, F12 II, A7 III, B6 III et G12 III), 5 à abondance modérée (A11 III, C1 III, A4 III, B11 III et C7 III) et 1 à faible abondance (B7 II; fig. 3.5 B). Au sein des clones P312R, 3 d'entre eux avaient une forte abondance de HA-PSMC5 (B7 III, A6 III et F5 III), 2 une abondance intermédiaire (E8 III et G10 III) et 2 une faible abondance (C1 III et H4 III; fig. 3.5 A).

Enfin, 4 clones mutés avaient une forte abondance de PSMC5 endogène (E8 III, G10 III, E6 III, F5 III) et 4 une abondance modérée (B7 III, C1 III, H4 III et A6 III; fig. 3.5 B). Dans les figures *stain free*, une bande à intensité variable - tantôt faible ou tantôt forte - de taille moléculaire d'environ 25 kDa est parfois observée mais son identité moléculaire est indéfinie ainsi que la raison sous-jacente à sa présence dans certains échantillons par rapport à d'autres.

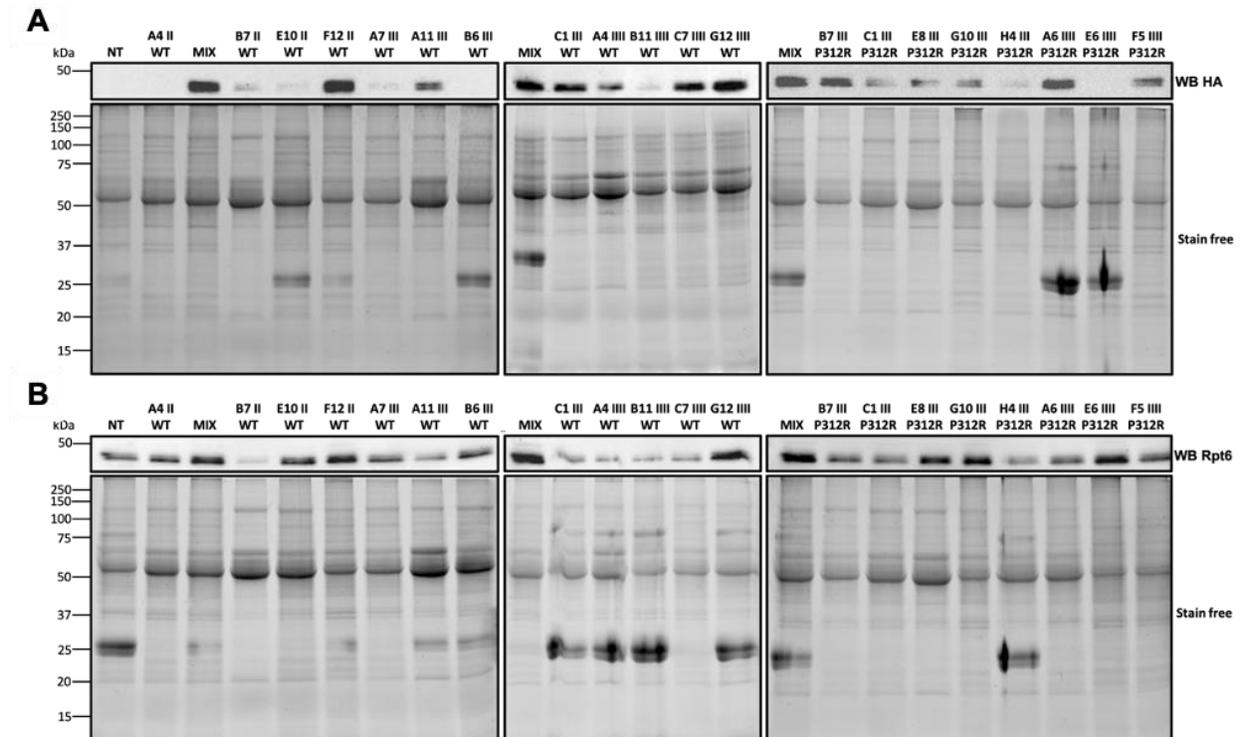


Figure 3.5 Deuxième étape de sélection des clones PSMC5 WT et P312R, de cellules SH-SY5Y, par immunobuvardage.

Immunoblot anti-HA (A) et anti-PSMC5/Rpt6 (B) des lysats. La condition NT représente un contrôle négatif de cellules non transfectées et, la condition A4 II WT, un contrôle négatif de clone n'exprimant pas le gène *PSMC5* WT, mais avec une résistance à la G418. Normalisation de 15 µg de lysat par puits. Les protéines des lysats ont été migrées sur un gel *stain-free* et transférées sur une membrane PVDF. Pour la normalisation, la bande MIX représente un mélange du lysat des clones WT ou P312R.

La comparaison qualitative des clones selon l'abondance de HA-PSMC5 a également été effectuée par immunofluorescence (fig. 3.6). Pour la condition WT, 5 clones présentaient une forte abondance (B7 II, F12 II, A11 III, C1 III et C7 III), 2 une abondance intermédiaire (E10 II et A4 III) et 4 une faible abondance (A7 III, B6 III, B11 III et G12 III; fig. 3.6 A). Parmi les clones P312R, 3 avaient une forte abondance de HA-PSMC5 (E8 III, G10 III et F5 III), 4 modérée (B7 III, C1 III, H4 III et A6 III) et 1 faible (E6 III; fig. 3.6 C). L'annexe B présente un tableau des clones générés avec leur niveau d'abondance de PSMC5 transfecté et endogène lors de la deuxième sélection. Remarquant 3 degrés d'abondance de HA-PSMC5, il a été décidé

de sélectionner 2 clones par condition, selon une abondance similaire de HA-PSMC5 par immunobuvardage et immunofluorescence, une abondance forte ou intermédiaire de PSMC5 endogène et une croissance cellulaire rapide. Donc, les clones C1 III (WT 1) et F5 IIII (P312R 1), ainsi que B11 IIII (WT 2) et C1 III (P312R 2) ont été choisis, représentant les niveaux d'abondance élevés et faibles de HA-PSMC5 respectivement.

3.3 Caractérisation des clones PSMC5 WT et P312R chez des cellules SH-SY5Y

3.3.1 Morphologie

Comme mentionné à l'introduction, la lignée cellulaire SH-SY5Y est particulière de par sa composition en cellules de type épithélial (S) et neuroblastique (N). Le type S présentant une forme aplatie et une croissance davantage sous forme de grappes, les cellules N sont dotées d'une morphologie allongée munie de multiples projections communicatrices (Shipley *et al.*, 2016). Dans ce contexte, il a été convenu de caractériser qualitativement les clones modèles sur la base de leur phénotype prédominant, et ce par microscopie inversée (fig. 3.7). Les conditions WT et P312R ont montré une prépondérance respective de cellules de type S et N, suggérant une variation du profil phénotypique suite à la transfection de *HA-PSMC5* (fig. 3.7). Également, par leurs multiples projections et une croissance cellulaire ralentie, les clones P312R, plus particulièrement le clone P312R 2, semblaient démontrer des traits typiques de cellules neuronales matures, bien qu'ils n'avaient pas été artificiellement différenciés par des substances stimulatrices. Compte tenu des différences observées entre les conditions WT et P312R, notamment au niveau de la morphologie cellulaire, les résultats suggèrent que des changements morphologiques sont induits par la mutation P312R.

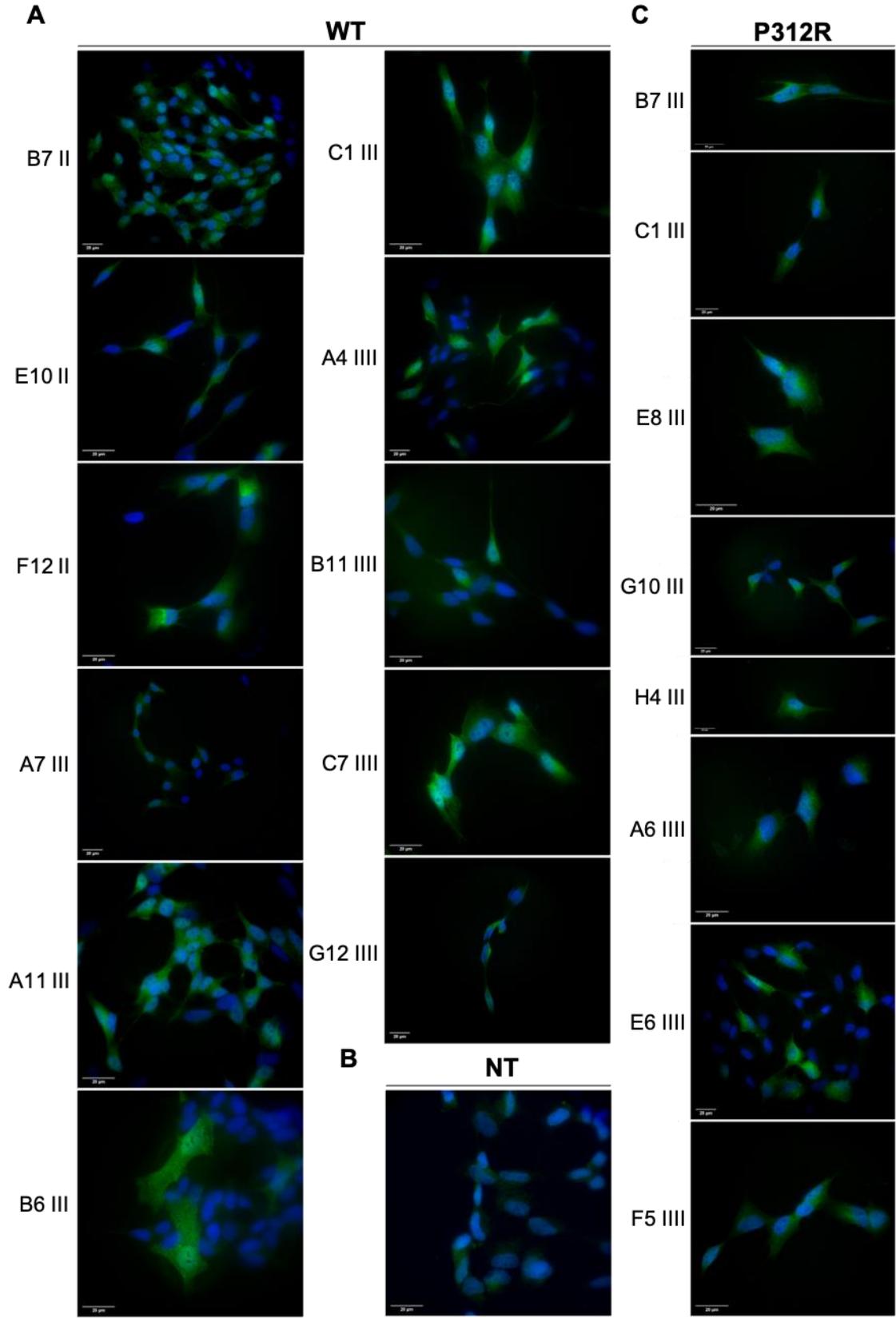


Figure 3.6 Deuxième étape de sélection des clones PSMC5 WT et P312R, de cellules SH-SY5Y, par immunofluorescence qualitative.

Abondance de HA-PSMC5 chez les 11 clones WT (A), des cellules NT (B) et les 8 clones P312R (C). L'identification des clones est basée sur leur localisation lors du clonage par dilutions limites (section 2.6). L'immunofluorescence a été effectuée sur des cellules fixées et marquées contre l'étiquette HA de PSMC5 (vert) et l'ADN du noyau (DAPI; bleu). Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 équipé des objectifs 10x, 20x et à immersion d'huile 60x. Les barres d'échelle sont réglées à 20 μm .

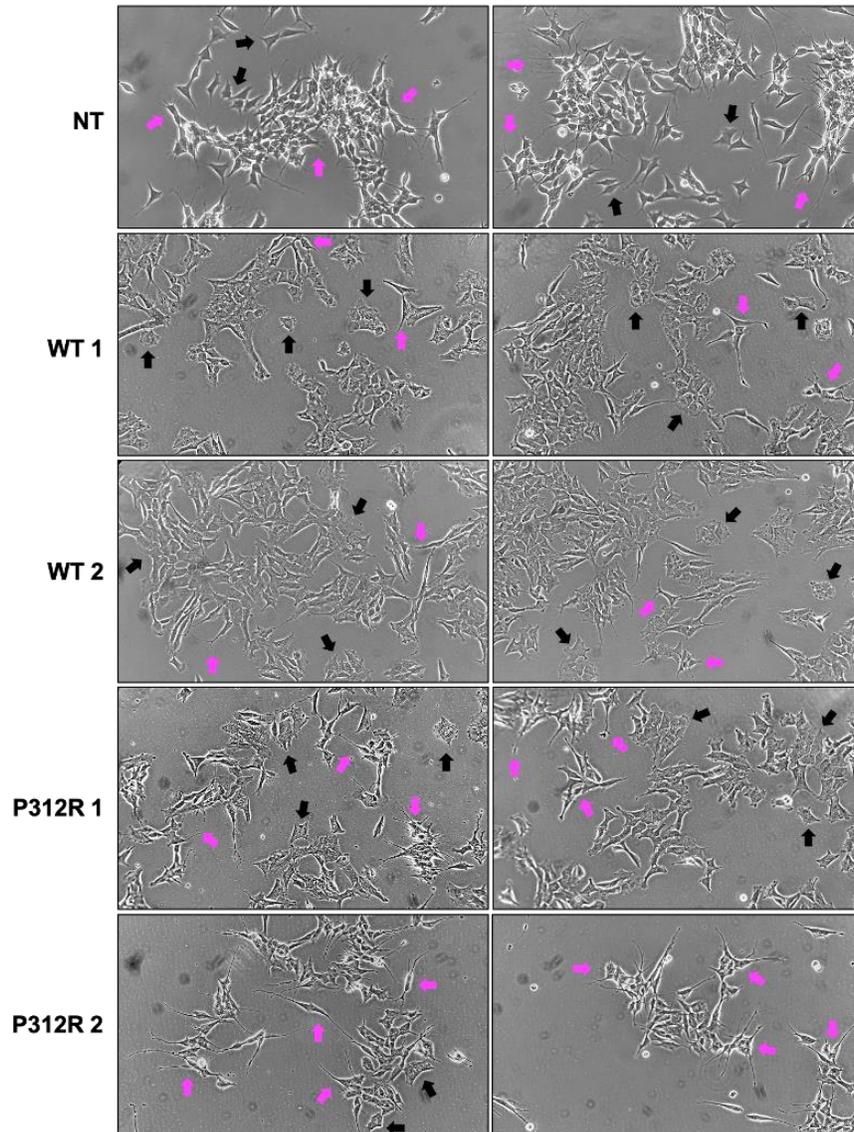


Figure 3.7 Morphologie des clones PSMC5 WT et P312R, de cellules SH-SY5Y, suite à une transfection stable de *HA-PSMC5*.

Les images des cellules non transfectées (NT) et des clones WT 1 et P312R 2 ont été prises au passage 9 tandis que celles des clones WT 2 et P312R 1 ont été obtenues au passage 10. Les images ont été prises sur un microscope inversé Axio vert.A1 équipé d'un objectif 20x. La flèche noire représente les cellules de type S et la flèche magenta les cellules de type N.

3.3.2 Abondance protéique par immunobuvardage

Afin d'approfondir davantage la caractérisation des clones modèles WT et P312R, la technique d'immunobuvardage a été employée pour comparer l'abondance protéique de HA-PSMC5, des sous-unités Rpt1, Rpt3, Rpt6, Rpn2, Rpn6 et Rpn11 de la région 19S du protéasome, ainsi que de 2 formes de l'ubiquitine (fig. 3.8). À l'exception des anticorps anti-HA.11, anti-ubiquitine et anti-K48, qui avaient été préalablement optimisés au sein du laboratoire, la dilution de travail optimale des autres anticorps a dû être déterminée. À cet effet, une titration a été effectuée avec 15 µg de lysat cellulaire SH-SY5Y NT. Pour les sous-unités du protéasome, les dilutions 1:500, 1:1000, 1:1500 et 1:2000 ont été testées. Pour la sous-unité Rpn2, le signal chimiluminescent s'était avéré faible pour toutes les dilutions testées. Sachant cela, la dilution 1:500 a été sélectionnée et utilisée avec 25 µg de lysat pour maximiser la détection. Pour l'anticorps anti-bêta actine, les dilutions 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:7000 et 1:10000 ont été testées. La dilution employée pour chaque anticorps est présentée au tableau 2.1 de la section matériel et méthodes. Une série de 10 expériences a été effectuée avec 3 réplicats biologiques indépendants (fig. 3.8). Afin de normaliser les signaux obtenus entre les réplicats, un échantillon MIX a été employé pour chaque immunoblot. La quantité de protéines chargée pour la condition MIX était de 3,75 µg par clone pour tous les gels, excepté l'analyse de la sous-unité Rpn2, où 6,25 µg par clone ont été utilisés.

Comme il a été observé aux figures 3.5 et 3.6, le clone WT 1 a exprimé HA-PSMC5 de manière significativement plus élevée que le clone WT 2, ainsi que les clones P312R (fig. 3.8 B). Bien que le clone P312R 2 ait présenté une abondance plus faible de HA-PSMC5 lors de la mise au point du modèle, l'analyse des 3 réplicats biologiques n'a pas démontré de différence significative entre les 2 clones P312R (fig. 3.8 B). Pour évaluer si la mutation P312R a induit, chez les clones modèles, des changements au niveau de l'abondance des sous-unités formant le protéasome, nous avons comparé l'abondance des sous-unités ATPases Rpt1, Rpt3, Rpt6 et non-ATPases Rpn2, Rpn6 et Rpn11 de la région 19S entre les conditions WT et P312R (fig 3.8). Le premier résultat constaté est que la présence de HA-PSMC5 P312R n'a pas affecté l'abondance protéique des sous-unités protéasomiques testées (fig. 3.8 B). Aussi, le niveau de PSMC5, tel que détecté avec un anti-Rpt6/PSMC5, était comparable entre les clones WT et P312R, mais également avec la condition NT (fig. 3.8 B). Ces résultats suggèrent une régulation différente de l'abondance endogène de la sous-unité Rpt6/PSMC5 entre les 4 clones HA-PSMC5, de manière à obtenir une abondance protéique finale similaire. Par ailleurs, des variations entre les réplicats biologiques des protéines Rpt1, Rpn2 et Rpt3 ont été observées (fig. 3.8 B). Celles-ci pourraient être d'origine biologique, notamment par la présence de différences métaboliques ou d'un facteur de stress engendrant des fluctuations dans

l'expression génique. Finalement, les clones WT et P312R ont également été comparés selon leur niveau d'abondance de l'ubiquitine libre et de la chaîne de polyubiquitine K48. Selon nos résultats, la mutation P312R de la sous-unité PSMC5 ne semble pas perturber l'activité catalytique du protéasome, puisqu'aucune différence significative quant à l'abondance de l'ubiquitine n'a été observée entre la condition WT et P312R (fig. 3.8 B).

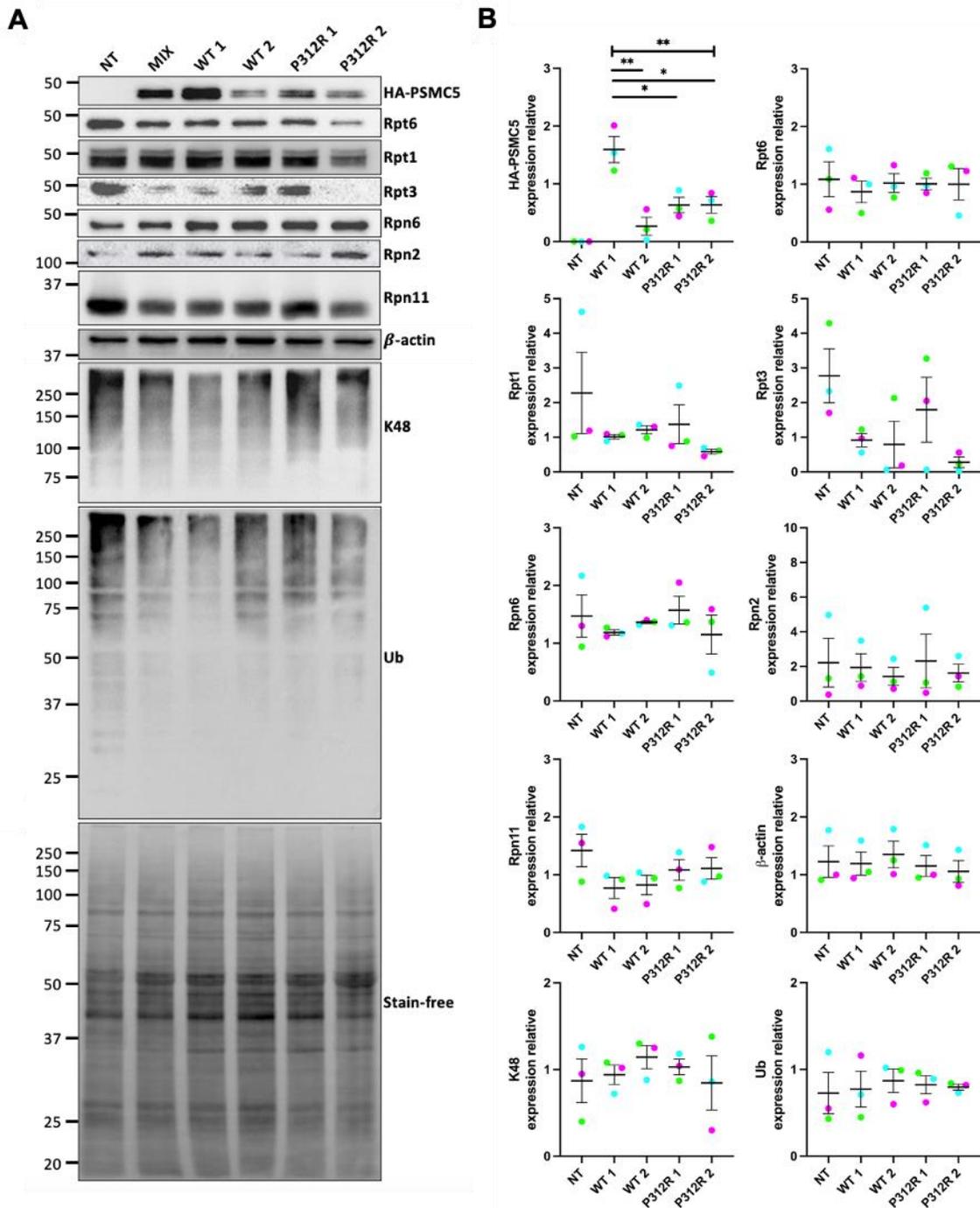


Figure 3.8 Caractérisation, par immunobuvardage quantitatif, des clones WT et P312R avec une expression stable de HA-PSMC5 chez des cellules SH-SY5Y.

(A) Expérimentation typique. (B) Expression relative de HA, Rpt6, Rpt1, Rpt3, Rpn6, Rpn2, Rpn11, bêta actine, K48 et l'ubiquitine. Les protéines des lysats ont été migrées sur un gel *stain-free* et transférées sur une membrane PVDF-LF. La densité des bandes a été normalisée selon la densité de la bande MIX par le logiciel *Image Lab*. L'ANOVA à un facteur paramétrique et le test de Student ont été employés. Les données en (B) sont présentées selon la moyenne \pm SEM de 3 réplicats biologiques (vert : réplicat 1; magenta : réplicat 2; cyan : réplicat 3). K48, chaîne de polyubiquitine liée à la lysine 48; Ub, ubiquitine; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

3.3.3 Abondance et localisation protéique par immunofluorescence

La caractérisation des clones WT et P312R par immunobuvardage a permis d'obtenir de l'information quant à l'abondance protéique de différentes protéines au sein d'un lysat contenant des millions de cellules. Bien qu'instructive, cette méthode ne permet pas d'observer la localisation intracellulaire d'une protéine d'intérêt. C'est pourquoi une analyse par immunofluorescence est justifiée afin de déterminer s'il y a une différence significative entre les clones HA-PSMC5 WT et P312R. Notamment, puisque la proportion de cellules de type S et N entre les conditions sauvage et mutée semblait varier (fig. 3.7), favorisant une morphologie allongée pour le variant P312R, il a été décidé d'analyser la forme cellulaire, et plus précisément la taille des cellules. La F-actine, un composant majeur du cytosquelette, est couramment utilisée en microscopie pour l'analyse de la morphologie cellulaire (Alizadeh *et al.*, 2018; Desroches et Harris, 2023). Dans ce contexte, la phalloïdine, une toxine issue du champignon *Amanita phalloides*, est employée de manière conventionnelle par sa capacité à se lier spécifiquement à la F-actine, empêchant la dépolymérisation des filaments et permettant ainsi leur visualisation (Desroches et Harris, 2023). L'utilisation de la phalloïdine conjuguée au colorant fluorescent CF640R a permis l'observation des filaments d'actine et, donc la quantification de l'espace totale occupée par les cellules. L'objectif de cette analyse était de déterminer si la mutation P312R affecte la taille des cellules SH-SY5Y.

À cet effet, nous avons premièrement effectué des analyses 2D et 3D pour déterminer celle qui permet d'obtenir des résultats plus représentatifs du contexte cellulaire, et ce avec une variation minimale entre les échantillons (fig. 3.9). Bien que plusieurs méthodes de projection peuvent être utilisées pour transformer le Z-stack en image aplatie, la somme des tranches (*sum slices*) a permis de conserver un maximum d'information, comparativement à la méthode *max intensity* où seulement l'intensité maximale de chaque pixel a été conservée (fig. 3.9 A). Pour la visualisation sur le plan 3D, le logiciel Fiji propose 2 processus de reconstruction cellulaire, soit la méthode *Volume Viewer* (fig. 3.9 B) et *3D Project* (fig. 3.9 C). Ces 2 algorithmes offrent une analyse qualitative distincte, avec ses avantages et ses inconvénients.

Premièrement, la méthode *Volume Viewer* a fourni une délimitation et une définition précise des espaces occupés par la protéine au sein de la cellule, et ce sous différents angles de vue. Néanmoins, cet algorithme n'a pas rendu possible l'obtention d'une image tridimensionnelle combinant les différents canaux fluorescents (fig. 3.9 B). En revanche, la méthode *3D Project* a permis la création d'une image tridimensionnelle associant les canaux fluorescents, en plus de sa visualisation sous différents angles par un mouvement de rotation (fig. 3.9 C). Cependant, la séparation des canaux n'a pas été possible avec cette méthode (fig. 3.9 C). Chaque algorithme permettant une analyse visuelle distincte, ceux-ci devraient être employés conjointement. Afin de déterminer la méthode optimale pour quantifier les signaux fluorescents, les cellules des clones WT et P312R ont été analysées en 2D et 3D, selon leur abondance de HA-PSMC5, de l'actine et du noyau (fig. 3.9 D). De plus, une comparaison entre l'aire (2D) et la surface (3D) occupées par le signal de l'actine a été effectuée (fig. 3.9 D). Le premier constat est l'absence de différence significative entre l'analyse 2D et 3D, et ce pour tous les paramètres évalués à l'exception de l'aire (fig. 3.9 D). Suite à cette observation, nous avons décidé de comparer les 2 méthodes d'analyse sur la base de la variation au sein des échantillons. Toutes conditions expérimentales confondues, le coefficient de variation de la fluorescence cellulaire était supérieur dans l'analyse 3D que 2D, et ce pour les trois canaux fluorescents. Plus précisément, la moyenne du coefficient de variation pour HA-PSMC5 est passée de 44,608 (analyse 2D) à 86,260 (analyse 3D). Pour l'actine, cette valeur est passée de 26,552 (analyse 2D) à 77,028 (analyse 3D), et pour le noyau, de 21,680 (analyse 2D) à 69,440 (analyse 3D). En employant le logiciel Fiji, l'analyse 3D semble entraîner une variance 2 fois plus élevée au sein des données (données non présentées).

Selon les résultats obtenus à la figure 3.9, il a été convenu d'utiliser le plan 2D pour l'analyse quantitative de la localisation et de l'abondance protéique de HA-PSMC5 et de l'actine des clones WT et P312R, et ce en créant l'image cellulaire aplatie avec la fonction de somme des tranches (*sum slices*; fig. 3.10). Les protéasomes étant présents dans la majorité des compartiments cellulaires, où ils effectuent des fonctions distinctes, il a été jugé pertinent d'analyser HA-PSMC5 (fig. 3.10 B-D) et l'actine (fig. 3.10 E-G) selon leur abondance totale, nucléaire et cytoplasmique. L'abondance totale de HA-PSMC5 et de l'actine étant comparable entre les conditions WT et P312R (fig. 3.10 B et E), ce fait a également été reflété au niveau de l'abondance nucléaire et cytoplasmique (fig. 3.10 C et F, D et G). De plus, l'actine a été localisée de manière significativement plus abondante au sein du cytoplasme que du noyau, ce qui suit la littérature ($p < 0,0001$; fig. 3.10 F et G) (Percipalle et Vartiainen, 2019). La sous-unité PSMC5, quant à elle, a présenté une abondance comparable entre le cytoplasme et le noyau (fig. 3.10 C et D). Sur la base du signal de la

phalloïdine, les clones WT et P312R ont également été comparés selon la taille cellulaire (fig. 3.10 H). Bien qu'une différence significative ait uniquement été observée entre les clones P312R 2 et WT 1, une tendance indiquait une taille supérieure pour la condition P312R, comparativement aux cellules NT et WT (fig. 3.10 H). Cette observation suit les résultats obtenus lors de la caractérisation morphologique des clones, où les cellules P312R présentaient une forme davantage allongée avec de multiples projections (fig. 3.7).

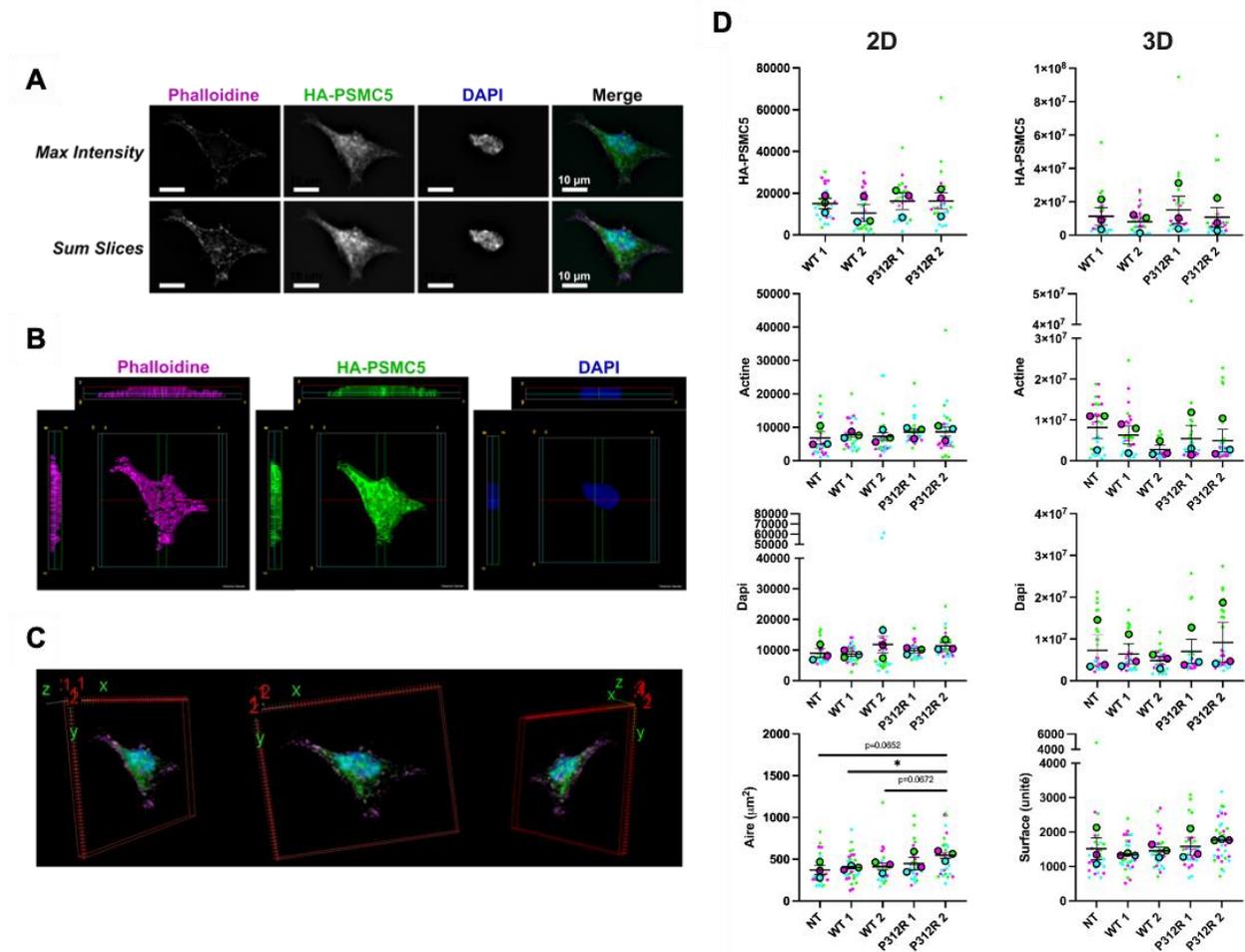


Figure 3.9 Comparaison de la méthode d'analyse quantitative bi- et tridimensionnelle des clones PSMC5 WT et P312R par le logiciel Fiji.

(A) Techniques d'analyse 2D d'un Z-stack. (B) Méthode *Volume Viewer* pour la visualisation 3D des différents canaux d'un Z-stack. (C) Méthode *3D Project* pour la visualisation 3D des canaux combinés d'un Z-stack. (D) Analyse quantitative 2D et 3D de l'abondance protéique de HA-PSMC5, de l'actine et de l'ADN du noyau. Les valeurs représentent la fluorescence cellulaire totale corrigée. L'immunofluorescence a été effectuée sur des cellules fixées et marquées contre l'étiquette HA de PSMC5 (vert), l'actine (magenta) et l'ADN du noyau (DAPI; bleu). 3 expériences indépendantes (vert : réplicat 1; magenta : réplicat 2; cyan : réplicat 3) ont été effectuées où 10 cellules ont été sélectionnées aléatoirement pour l'analyse. Un total de 10 tranches a été prélevé par cellules. Les tests statistiques ont été effectués sur la moyenne des

résultats de chacune des expériences. L'ANOVA à un facteur paramétrique et non paramétrique avec Kruskal-Wallis ont été effectuées selon la normalité de la distribution des données. Les données sont représentées selon la moyenne \pm SEM. Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 équipé d'un objectif à immersion d'huile 60x. *, $p < 0,05$.

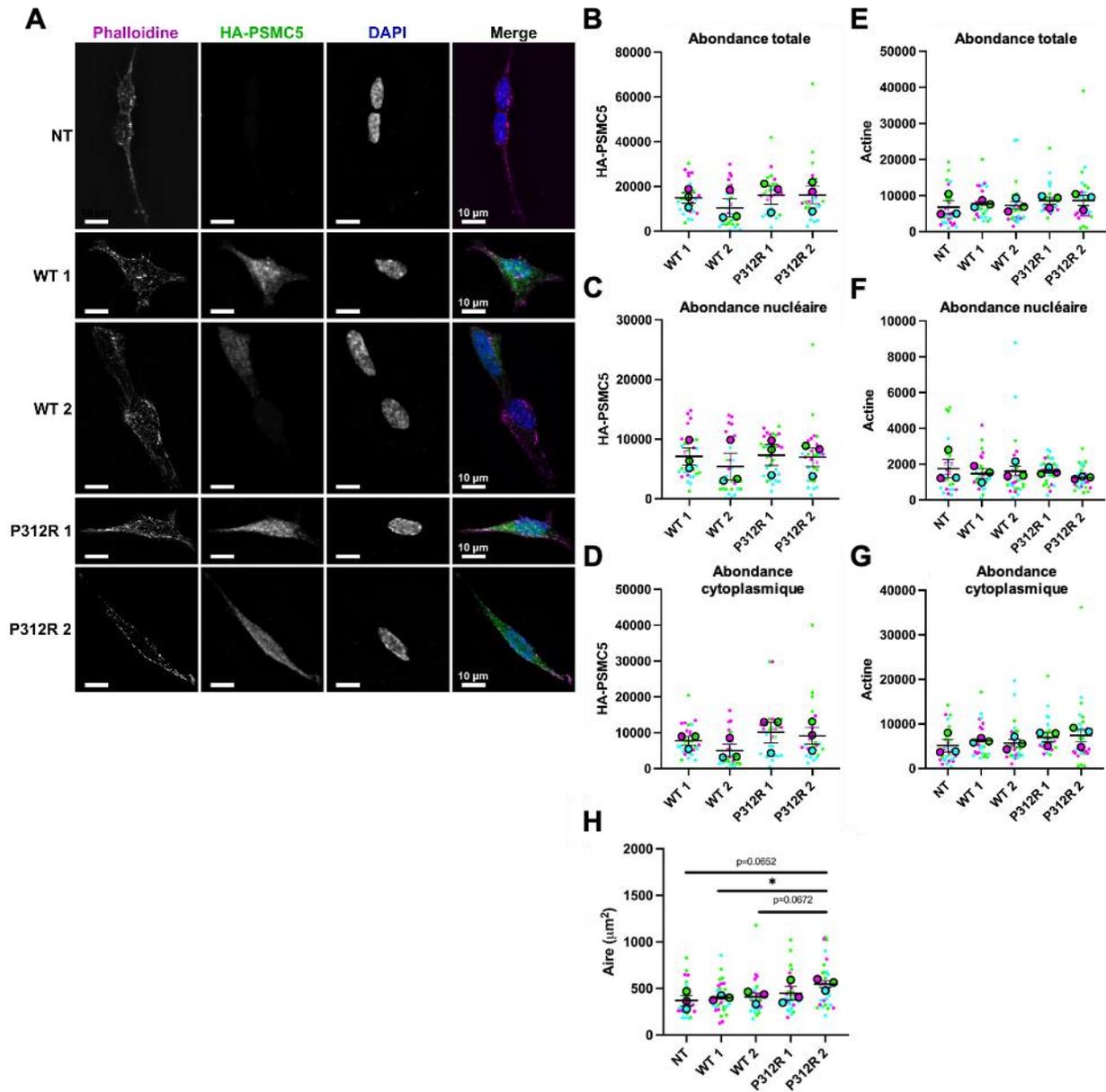


Figure 3.10 Caractérisation, par immunofluorescence quantitative, des clones WT et P312R avec une expression stable de HA-PSMC5 chez des cellules SH-SY5Y.

(A) Expérimentation typique. Analyse quantitative de l'abondance protéique de HA-PSMC5 totale (B), au niveau nucléaire (C) et cytoplasmique (D). Analyse quantitative de l'abondance protéique de l'actine totale (E), au niveau nucléaire (F) et cytoplasmique (G). Les valeurs représentent la fluorescence cellulaire totale corrigée. (H) Analyse quantitative de la taille des cellules, selon l'aire du signal de l'actine. L'immunofluorescence a été effectuée sur des cellules fixées et marquées contre l'étiquette HA de PSMC5 (vert), l'actine (magenta) et l'ADN du noyau (DAPI; bleu). 3 expériences indépendantes (vert : réplicat 1;

magenta : réplikat 2; cyan : réplikat 3) ont été effectuées où 10 cellules ont été sélectionnées aléatoirement pour l'analyse. Un total de 10 tranches a été prélevé par cellules. Les tests statistiques ont été effectués sur la moyenne des résultats de chacune des expériences. L'ANOVA à un facteur paramétrique et non paramétrique avec Kruskal-Wallis ont été effectuées selon la normalité de la distribution des données. Les données sont représentées selon la moyenne \pm SEM. Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversé Olympus IX83 équipé d'un objectif à immersion d'huile 60x. *, $p < 0,05$.

3.3.4 Activité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome par méthodes enzymatiques

Les expérimentations de caractérisation ayant permis de mieux cerner le profil des clones WT et P312R modèles, il était maintenant question d'évaluer si la variante P312R perturbe l'activité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome. À cet effet, un dosage du phosphate au vert de malachite a été choisi pour quantifier l'hydrolyse de l'ATP des protéasomes, et ce en raison de la rapidité, la sensibilité et le faible coût de la méthode.

Voulant uniquement quantifier la libération de phosphate des protéasomes étiquetés HA à la sous-unité PSMC5 WT et P312R, il était nécessaire de développer une approche simplifiée afin de purifier ces protéasomes du lysat cellulaire. La procédure se base sur le principe d'un test ELISA (Vigneron *et al.*, 2015), consistant à la fixation d'un anticorps de capture anti-HA au fond des puits d'une plaque, permettant d'isoler les protéines HA à partir d'un extrait cellulaire, et ce avant l'ajout des substrats propres au dosage au vert de malachite. Cette méthode permet la quantification colorimétrique du phosphate libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP, ainsi que la quantification colorimétrique des HA-protéasomes à l'origine de cette libération de phosphate.

Dans un premier temps, un protocole ELISA pour quantifier les HA-protéasomes présents au fond des puits a été optimisé. Le montage consistait en un anticorps anti-HA fixé à la base des puits, un blocage à la BSA, une protéine d'intérêt possédant une étiquette HA, un anticorps de détection primaire lapin anti-PSMB5, un anticorps de détection secondaire chèvre anti-lapin IgG-HRP, un substrat TMB et une solution stop. L'objectif initial étant de quantifier le signal provenant de la sous-unité PSMC5, il a été réalisé que la liaison de son étiquette HA à l'anticorps de capture pourrait bloquer son site de liaison pour un anticorps de détection anti-PSMC5, résultant en un signal nul. Pour éviter ce problème, il fallait sélectionner une autre sous-unité, spatialement éloignée de la sous-unité PSMC5, pour la reconnaissance du protéasome par l'anticorps de détection. En fonction de la disponibilité sur le marché d'anticorps spécifiques à une sous-unité protéasomique et adaptés à la technique ELISA, la sous-unité PSMB5/ β 5 de la région 20S a été

sélectionnée comme cible de l'anticorps de détection primaire. Comme le montre la figure 1.3 de l'introduction, sa position au centre de la région catalytique du protéasome, comme les autres sous-unités bêta, en faisait un candidat idéal.

Afin d'effectuer cette technique de manière quantitative, la protéine recombinante His-HA-PSMB5 a été produite, purifiée (fig. 3.11) et optimisée pour son utilisation comme courbe standard ELISA (fig. 3.16). Cette construction a été développée pour plusieurs raisons : la présence d'une étiquette His permettant une purification efficace sur résine de nickel et une étiquette HA assurant la liaison de la protéine à l'anticorps de capture fixé au fond des puits. Lors de la production de la protéine recombinante, les éluions issues de la purification sur résine de nickel (fig. 3.11 A) ont été combinées pour maximiser la concentration protéique finale. Suite à la dialyse, la protéine recombinante purifiée a été dosée sur gel avec un standard de BSA (fig. 3.11 B) et utilisée comme échantillon pour la courbe standard de l'ELISA.

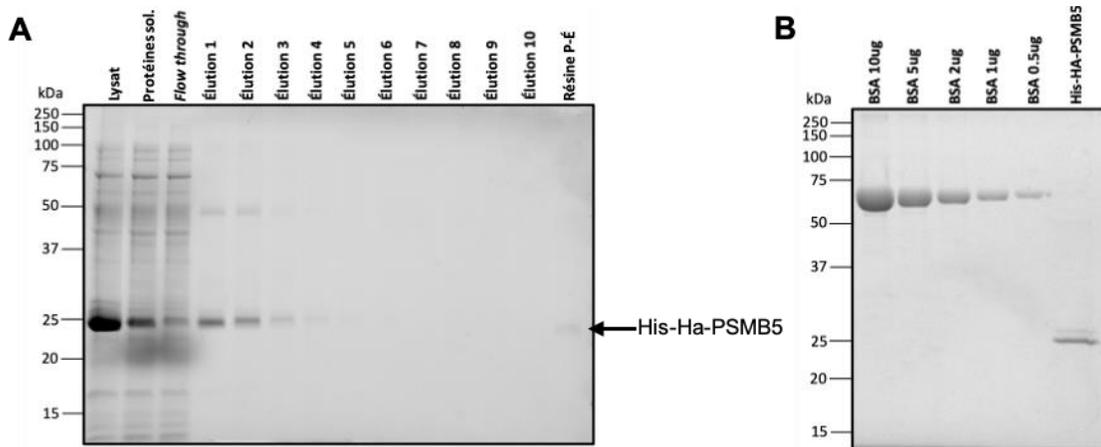


Figure 3.11 Purification de la protéine recombinante His-HA-PSMB5 produite chez *E. coli*. (A) Gel SDS-PAGE représentatif de la purification de la protéine His-HA-PSMB5 sur résine de nickel à haute affinité à partir de transformants du plasmide HA-PSMB5_pET-28a(+)-TEV chez des bactéries BL21-Gold (DE3). (B) Quantification de la concentration en protéines His-HA-PSMB5 de l'échantillon purifié. Les 4 premières éluions des transformants 1 et 3 ont été combinées et dialysées avec un tampon 25mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl. Les protéines ont été migrées sur gel *stain-free*.

La protéine His-HA-PSMB5 produite et purifiée, l'optimisation des différentes étapes du protocole ELISA a ensuite été effectuée. Tout d'abord, 2 ELISAs ont été effectués en parallèle afin de comparer le signal obtenu entre une concentration de l'anticorps de capture anti-HA de 5 µg/mL et 10 µg/mL (fig. 3.12). Au sein de chaque plaque, suite à un blocage au TBST avec 1% de BSA, nous avons évalué la concentration du lysat cellulaire à 200 µg/mL et 500 µg/mL, ainsi que les concentrations des anticorps de détection primaire anti-PSMB5 et secondaire anti-lapin IgG-HRP à 0,5, 2,5 et 5 µg/mL et 0,05, 0,1 et 0,2 µg/mL respectivement

(fig. 3.12). Une courbe standard His-HA-PSMB5 de 0 à 10 000 pg/mL a également été incluse, avec une combinaison de l'anticorps anti-PSMB5 à 2,5 µg/mL et de l'anticorps anti-lapin IgG-HRP à 0,1 µg/mL pour des raisons économiques. Il est à noter que les incubations ont été effectuées à température ambiante. Les résultats démontrent une faible variation de densité optique entre les 2 concentrations de l'anticorps de capture anti-HA (5 µg/mL et 10 µg/mL), suggérant que 5 µg/mL est suffisant pour l'atteinte d'un plateau du signal. Nous avons également observé une similarité au niveau des valeurs d'absorbance obtenues entre les concentrations du lysat cellulaire de 200 et 500 µg/mL (fig. 3.12). Par ailleurs, des variations ont été observées en réponse à la concentration des anticorps de détection. Pour une même concentration de l'anticorps de capture et du lysat cellulaire, une augmentation des valeurs de densité optique était visible avec l'augmentation de la concentration de l'anticorps de détection primaire et/ou secondaire (fig. 3.12). Plus précisément, l'absorbance semblait être davantage influencée par la concentration la plus élevée (fig. 3.12). Concernant la courbe standard de la protéine recombinante purifiée His-HA-PSMB5, la gamme de concentrations n'a pas permis d'obtenir une courbe linéaire, notamment au niveau des faibles concentrations (données non présentées).

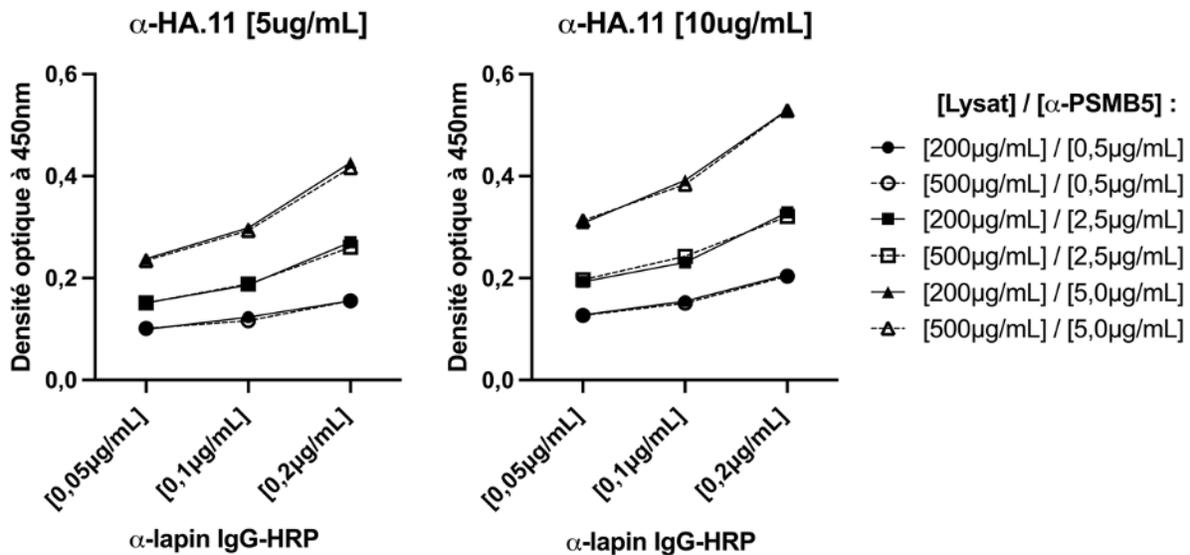


Figure 3.12 Optimisation de la concentration du lysat cellulaire et des anticorps pour l'ELISA quantitatif de HA-PSMB5.

La ligne pleine représente une concentration de lysat de 200 µg/mL et la ligne pointillée de 500 µg/mL. Les symboles rond, carré et triangle représentent une concentration de l'anticorps de détection primaire anti-PSMB5 de 0,5 µg/mL, 2,5 µg/mL et 5,0 µg/mL respectivement. Le test a été effectué en employant le lysat cellulaire du clone WT 2, et ce en duplicata. Les valeurs de densité optique ont été prises avec un lecteur de plaques multimode VICTOR Nivo.

Dans le but d'améliorer la sensibilité et la spécificité de notre essai, différentes concentrations de tampon de blocage ont été testées (fig. 3.13). Effectivement, il est connu que plus le blocage est efficace, plus le rapport signal sur bruit de fond est élevé (Rajna et Irena, 2020). Ainsi, nous avons testé le tampon de blocage TBST contenant 1%, 2% et 3% de BSA, en présence de l'anticorps de capture anti-HA à 5 µg/mL et du lysat cellulaire à 200 µg/mL (fig. 3.13). Également, afin d'évaluer le bruit de fond de la méthode, un contrôle négatif intitulé «blanc», représentant un puits sans lysat cellulaire, a été employé. Puisque la concentration du tampon de blocage influence la sensibilité envers la protéine cible, et que des concentrations élevées des anticorps de détection augmentent le risque de non-spécificité du signal, nous avons testé l'anticorps de détection primaire anti-PSMB5 à 0,5 et 2,5 µg/mL, ainsi que l'anticorps de détection secondaire anti-lapin IgG-HRP à 0,1 et 0,2 µg/mL (fig. 3.13). Un premier constat est le faible écart entre les valeurs de densité optique du blanc et du lysat cellulaire pour toutes les conditions testées, suggérant une sensibilité insuffisante de l'essai (fig. 3.13). Les résultats suggèrent également une faible spécificité puisque les contrôles négatifs, c'est-à-dire sans anticorps de détection primaire et/ou secondaire, permettaient l'obtention de valeurs d'absorbance nettement inférieures (fig. 3.13). Par ailleurs, lorsque le blocage a été effectué avec 3% de BSA, les valeurs de densité optique étaient équivalentes entre le blanc et le lysat cellulaire, ce qui suggère une réduction de la spécificité des anticorps de détection avec l'augmentation de la concentration de BSA dans les puits (fig. 3.13). Une autre observation est au niveau du blocage avec 2% de BSA où, malgré un faible écart avec le contrôle négatif, une augmentation de la concentration des anticorps de détection primaire anti-PSMB5 et secondaire anti-lapin IgG-HRP semblait entraîner une augmentation de la non-spécificité de l'essai, traduite par une augmentation des valeurs de densité optique du blanc surpassant graduellement la condition avec lysat cellulaire (fig. 3.13).

La problématique de la sensibilité de l'essai étant toujours présente malgré l'optimisation des concentrations du lysat cellulaire, des différents anticorps, ainsi que du blocage à la BSA, des interrogations ont été soulevées quant à la stabilité des HA-protéasomes lors de ces longues étapes expérimentales à température ambiante. Étant donné que la stabilité des protéasomes est cruciale pour évaluer leur activité d'hydrolyse de l'ATP, cette hypothèse a été testée en effectuant l'ELISA, ainsi que le dosage du phosphate au vert de malachite, à 4 °C (fig. 3.14).

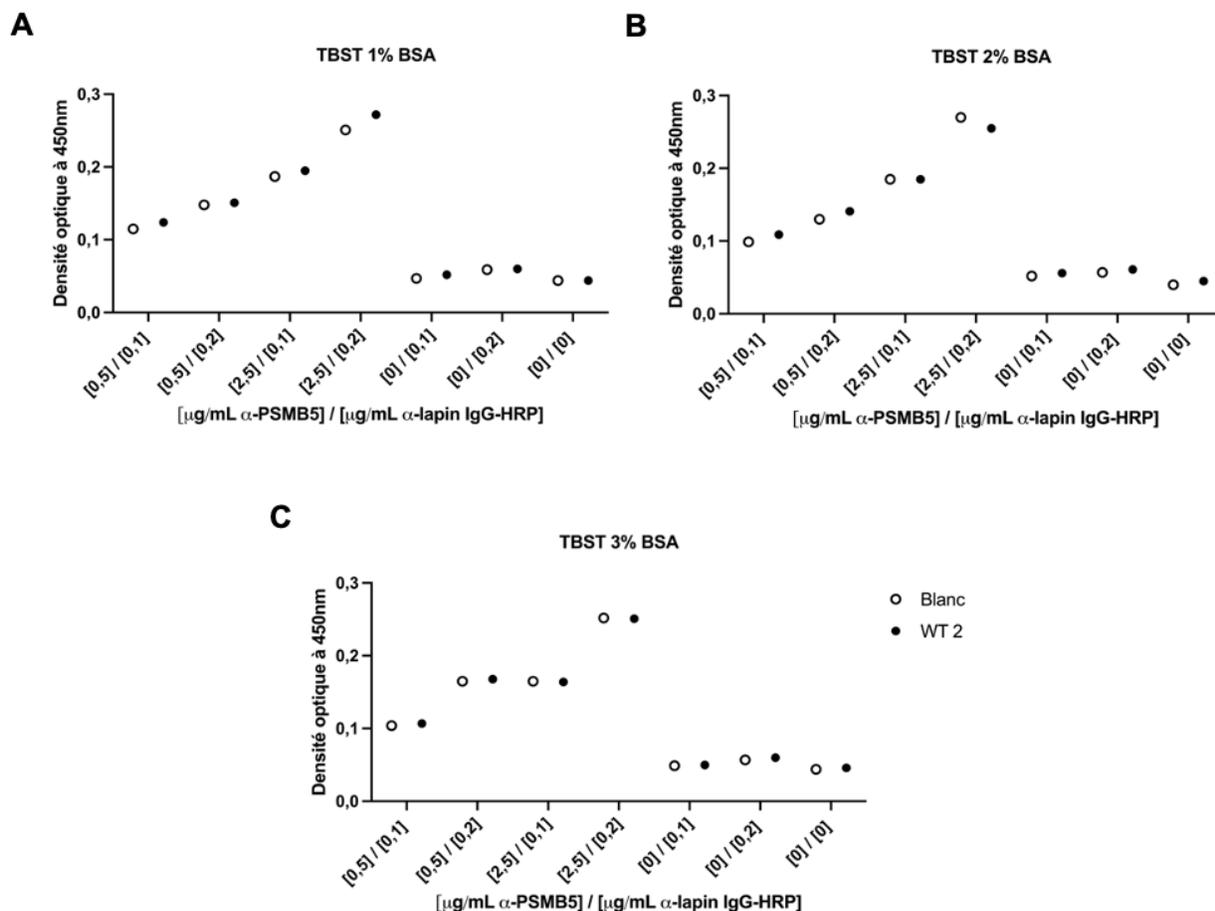


Figure 3.13 Impact de la concentration du tampon de blocage sur la sensibilité et la spécificité de l'ELISA quantitatif de HA-PSMC5, en fonction des concentrations d'anticorps de détection primaire et secondaire. Analyse de la densité optique obtenue selon différentes combinaisons de concentrations d'anticorps primaire anti-PSMB5 (0,5 $\mu\text{g/mL}$ et 2,5 $\mu\text{g/mL}$) et secondaire anti-lapin IgG-HRP (0,1 $\mu\text{g/mL}$ et 0,2 $\mu\text{g/mL}$). La comparaison a été effectuée selon la concentration du tampon de blocage TBST à (A) 1 %, (B) 2 % et (C) 3 % de BSA. Les tests ont été effectués en employant le lysat cellulaire du clone WT 2, ainsi qu'un contrôle négatif (blanc) caractérisé par l'absence de lysat. Les valeurs de densité optique ont été prises avec un lecteur de plaques multimode VICTOR Nivo.

D'après les résultats de la figure 3.13, bien que la variation entre les valeurs d'absorbance du blanc et de la condition avec le lysat cellulaire soit faible, le tampon de blocage à 2% de BSA a donné le rapport signal sur bruit de fond le plus élevé. Par ailleurs, en comparant les 3 concentrations de blocage avec toutes les combinaisons de concentration des anticorps de détection, le tampon de blocage à 2% de BSA, avec l'anticorps anti-PSMB5 à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ et l'anticorps anti-lapin IgG-HRP à 0,1 $\mu\text{g/mL}$, semblait permettre le meilleur compromis entre la variation de la densité optique du lysat cellulaire (D.O. = 0,109) et du blanc (D.O. = 0,099), et la spécificité du signal (fig. 3.13). Pour cette raison, afin de tester l'hypothèse liée à la stabilité des protéasomes à 4 °C, l'anticorps de capture anti-HA à 5 $\mu\text{g/mL}$, le tampon de blocage TBST

avec 2% de BSA, ainsi que les anticorps de détection anti-PSMB5 et anti-lapin IgG-HRP à 0,5 µg/mL et 0,1 µg/mL respectivement ont été utilisés. Simultanément, différentes dilutions de lysat cellulaire (non-dilué dans le tampon de blocage et dilué 1:2, 1:4, 1:8 et 1:12) ont été testées afin de déterminer la concentration permettant la quantification du phosphate libéré par le dosage au vert de malachite avant l'atteinte du plateau (fig. 3.14). Il est important de préciser que cette méthode vise à quantifier le phosphate libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP par les sous-unités Rpt de la région 19S du protéasome. L'hypothèse de l'étude étant que la mutation P312R réduit l'activité catalytique de PSMC5, il convient de noter qu'un clone P312R a été utilisé, et ce afin de s'assurer que les valeurs d'absorbance étaient supérieures au seuil de détection de la méthode. Également, une gamme de concentrations élargie a été employée pour tester la courbe standard de His-HA-PSMB5, allant de 0 à 20 000 pg/mL. Pour la température de travail, les plaques ont été amenées à température ambiante uniquement lors de l'ajout de la solution TMB pour l'ELISA, et de la solution de vert de malachite-molybdate-ATP, pour le dosage du phosphate. À la figure 3.14, il est possible de voir que la modification de la température de travail a permis d'obtenir des valeurs de densité optique quantifiables, liées à la concentration en phosphate libéré. Par ailleurs, seulement les lysats cellulaires non dilué et dilué 1:2 ont permis d'obtenir des concentrations en phosphate libéré supérieures à leur condition contrôle, où les protéases étaient inhibées (fig. 3.14). Pour les dilutions 1:4, 1:8 et 1:12, l'absorbance était similaire à leur contrôle négatif, suggérant une quantité de HA-protéasomes trop faible pour dépasser le seuil de détection de la méthode. Étant donné que la dilution 1:2 permettait d'obtenir des valeurs de densité optique, et donc de phosphate libéré, supérieures aux autres conditions, et que la littérature recommande une dilution du lysat cellulaire pour limiter les interférences venant du tampon de lyse, il a été décidé d'utiliser la dilution 1:2 pour les expérimentations suivantes (Stavnsbjerg *et al.*, 2022). Il est à noter que, contrairement à l'accumulation linéaire attendue du phosphate libéré, un phénomène en forme cloche a été observé. Ceci suggère possiblement une instabilité du complexe phosphate-ammonium molybdate-vert de malachite au cours de la réaction.

Lors de l'expérience présentée à la figure 3.14, quelques heures après la lecture des valeurs d'absorbance pour le dosage du phosphate au vert de malachite, le lecteur de plaques multimode VICTOR Nivo a présenté des problèmes techniques, empêchant donc de procéder à la lecture de l'ELISA quantitatif de HA-PSMC5. Après plusieurs tentatives pour rétablir son fonctionnement, le lecteur de microplaques Tecan Infinite M1000 PRO a été utilisé afin d'effectuer la lecture de la plaque ELISA. Toutefois, le délai maximal recommandé par le fabricant pour lire l'absorbance suite à l'ajout de la solution stop étant de 60 min, et puisque les valeurs de densité optique ont été prélevées après ce délai, les valeurs d'absorbance obtenues

étaient non concluantes (données non présentées). Puisque l'essai de vert de malachite était optimal lorsque la température était maintenue à 4 °C et que le lysat cellulaire était dilué à 1:2 (fig. 3.14), une validation supplémentaire a été réalisée afin de confirmer la fiabilité de l'essai complet, plus précisément au niveau des valeurs d'absorbance de l'ELISA de HA-PSMC5 (fig. 3.15, 3.16). Comme le montre la figure 3.15, bien que le clone P312R 2 ait présenté une absorbance similaire aux contrôles négatifs, l'essai a permis d'obtenir des valeurs de densité optique supérieures pour les clones HA-PSMC5, comparativement aux conditions contrôle NT et «Blanc». Par ailleurs, la condition NT contenant des protéasomes sans étiquette HA, et le contrôle «Blanc» sans lysat cellulaire, l'obtention de valeurs d'absorbance légèrement supérieures pour la condition NT était attendue.

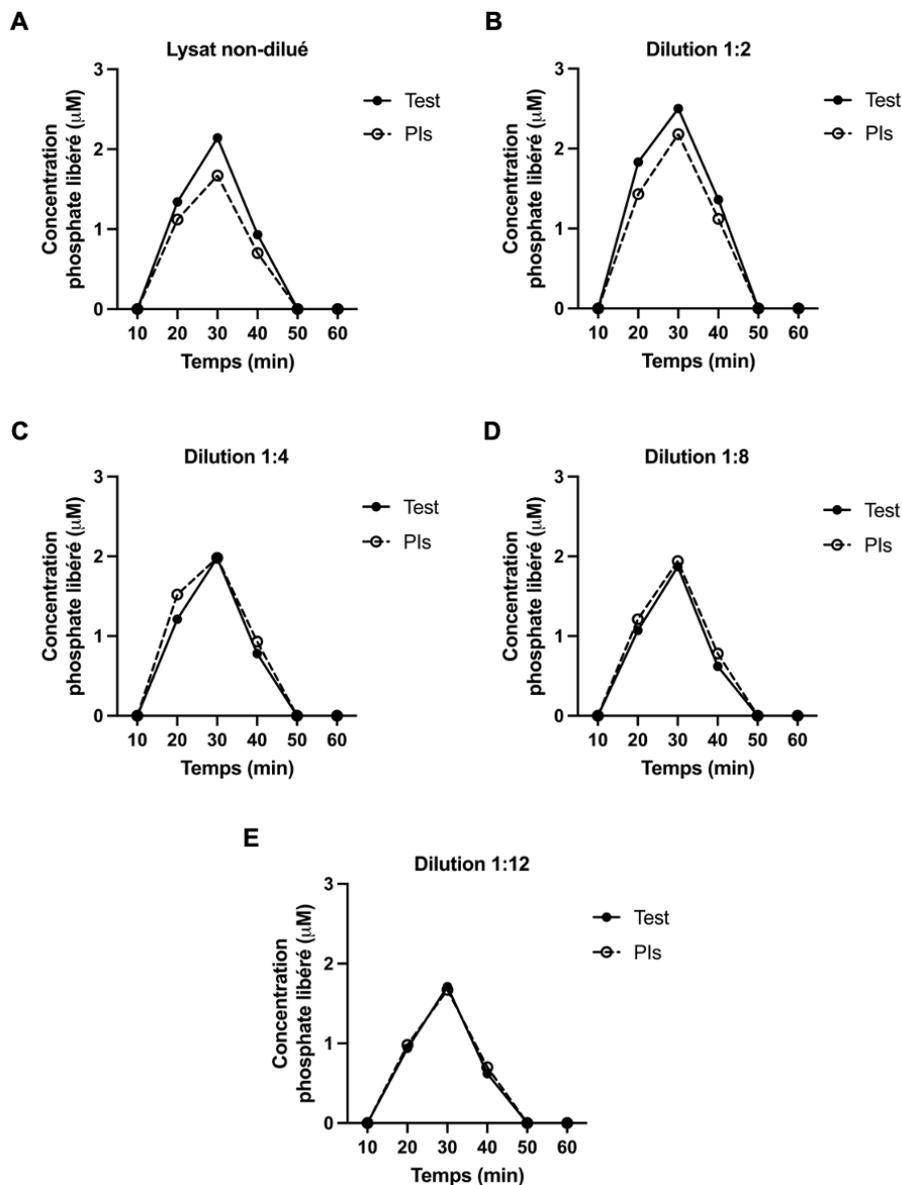


Figure 3.14 Optimisation de la dilution du lysat cellulaire pour le dosage du phosphate au vert de malachite. Analyse de la concentration en phosphate libéré en fonction du temps, selon différentes dilutions du lysat cellulaire avec le tampon de blocage (A) non-dilué, (B) 1:2, (C) 1:4, (D) 1:8 et (E) 1:12. Le test a été effectué en utilisant le lysat cellulaire du clone P312R 1, où une portion des cellules a été lysée en présence d'inhibiteurs de protéase comme contrôle de l'activité d'hydrolyse de l'ATP. La concentration en phosphate a été obtenue à partir d'une courbe standard de phosphate de 40-0 μ M. Les valeurs de densité optique ont été prises avec un lecteur de plaques multimode VICTOR Nivo. IPs, inhibiteurs de protéase.

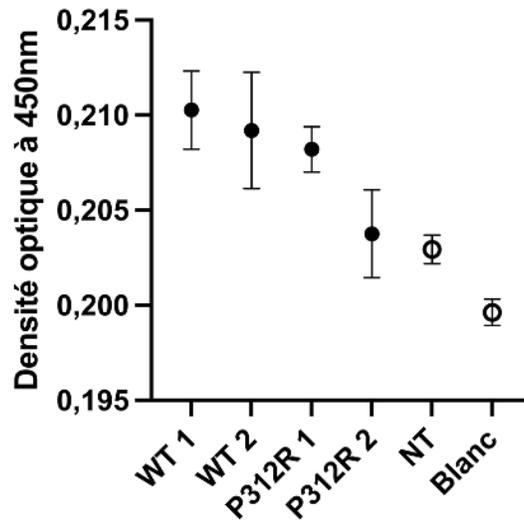


Figure 3.15 Validation du protocole ELISA pour la quantification de HA-PSMC5 chez les clones SH-SY5Y. Le test a été effectué avec le lysat cellulaire des clones HA-PSMC5 WT 1, WT 2, P312R 1 et P312R 2, en triplicata. Les contrôles négatifs «NT» et «Blanc» ont été inclus afin d'évaluer le signal en présence de protéasomes sans étiquette HA et en absence de lysat cellulaire, respectivement. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. Les valeurs de densité optique ont été prises avec un lecteur de microplaques Tecan Infinite M1000 PRO.

Concernant la courbe standard His-HA-PSMB5, contrairement aux faibles concentrations où les valeurs de densité optique variaient de manière irrégulière, la courbe standard suivait une tendance linéaire à partir de 300 μ g/mL, et ce jusqu'à la concentration maximale de 20 000 μ g/mL (fig. 3.16). Cette observation suggère que le seuil de détection de la méthode est sous 300 μ g/mL, et qu'une valeur inférieure sera considérée comme un bruit de fond. En raison de la fonctionnalité de l'essai, autant pour l'ELISA quantitatif de HA-PSMC5 (fig. 3.15, 3.16) que pour le dosage du phosphate au vert de malachite, ces résultats ont été considérés comme la première expérimentation des 3 expériences indépendantes présentées à la figure 3.17.

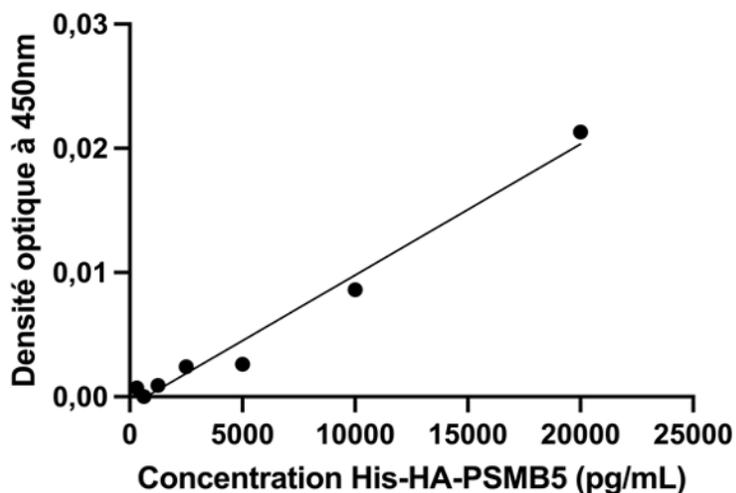


Figure 3.16 Courbe standard ELISA de la protéine recombinante purifiée His-HA-PSMB5 pour le dosage quantitatif de HA-PSMC5.

Le test a été effectué en employant l'échantillon purifié de la protéine recombinante His-HA-PSMB5, et ce en duplicata. Les valeurs de densité optique ont été prises avec un lecteur de microplaques Tecan Infinite M1000 PRO, avec une correction effectuée selon les valeurs du blanc. Les anticorps suivants ont été employés pour l'essai : anticorps de capture anti-HA, anticorps de détection primaire anti-PSMB5 et secondaire anti-lapin IgG-HRP.

Pour évaluer l'impact de la variante P312R sur la capacité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome, les clones modèles WT et P312R ont été soumis à un dosage du phosphate au vert de malachite, couplé à un ELISA quantitatif de HA-PSMC5 (fig. 3.17). Bien que le ratio phosphate libéré/protéasomes capturés du clone WT 2 soit supérieur, aucune différence significative n'a été observée entre les conditions WT et P312R (fig. 3.17). Au fil du temps, tous les clones ont présenté une tendance similaire par rapport à l'hydrolyse de l'ATP, soit une augmentation du ratio entre 10 et 30 min, où 30 min correspondait à la valeur maximale, suivie d'une diminution entre 30 à 45 min (fig. 3.17). Comme contrôle de l'essai, l'activité d'hydrolyse de l'ATP de chaque clone a été comparée à son contrôle négatif, représenté par l'inhibition des protéases lors de la lyse cellulaire (fig. 3.17). Bien qu'inférieur pour les clones WT 1, WT 2 et P312R 1, aucune différence significative entre le ratio phosphate libéré/protéasomes capturés du test et du contrôle respectif de chaque clone n'a été observée (fig. 3.17), suggérant une inhibition inefficace des protéases.

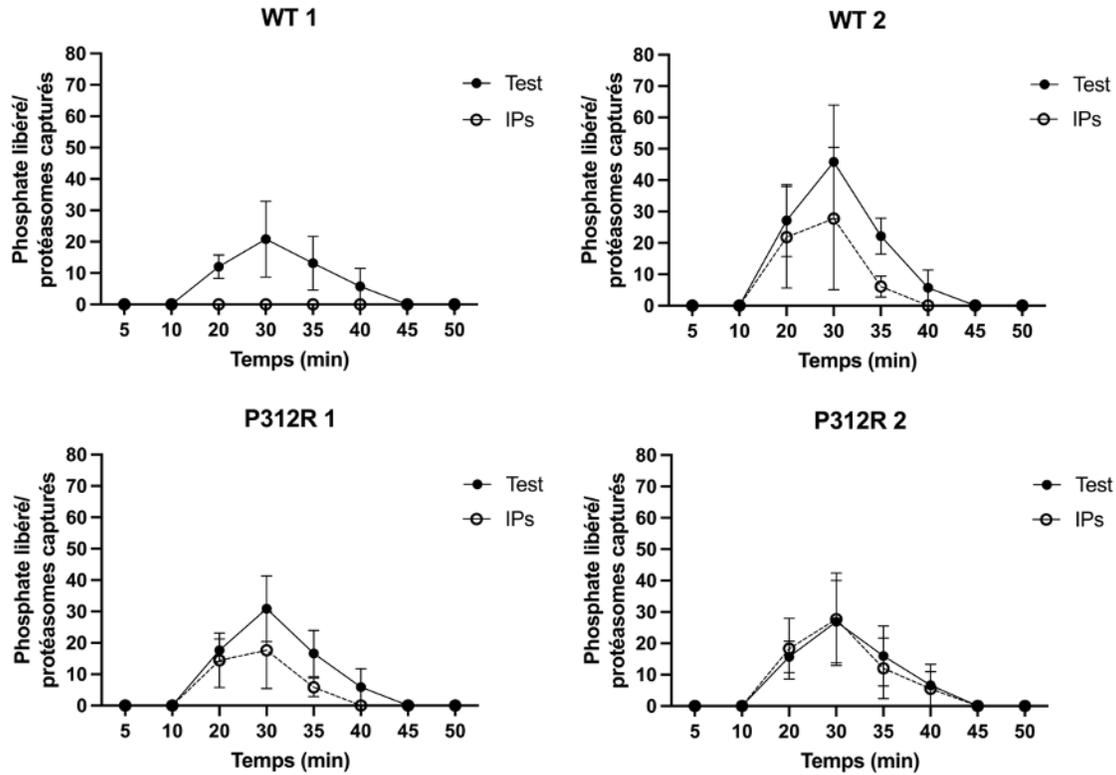


Figure 3.17 La mutation P312R de la sous-unité PSMC5 n'affecte pas l'activité ATPase du protéasome. Ratio de la concentration en phosphate libéré sur la concentration en HA-protéasomes capturés des clones WT et P312R de cellules SH-SY5Y, en fonction du temps. Chaque clone a été comparé à son contrôle lysé en présence d'inhibiteurs de protéase. 3 expériences indépendantes ont été effectuées en triplicata. En cas de présence de valeurs aberrantes, celles-ci ont été identifiées et exclues de l'analyse. L'ANOVA à un facteur paramétrique et non paramétrique avec Kruskal-Wallis ont été effectuées selon la normalité de la distribution des données. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. Les valeurs de densité optique ont été prises avec un lecteur de microplaques Tecan Infinite M1000 PRO. IPs, inhibiteurs de protéase.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Malgré les récentes avancées scientifiques, les personnes atteintes de maladies rares continuent d'être confrontées à un manque significatif d'information les concernant. En raison du nombre limité d'individus touchés, ce type de pathologie suscite généralement un manque d'intérêt au sein de la communauté scientifique, résultant en un faible taux de publications sur leur développement ou sur des traitements thérapeutiques potentiels. Suite au dépistage génétique confirmant la mutation P312R de l'isoforme 2 de la sous-unité *PSMC5* du protéasome, la famille de Cassandra a décidé de prendre en charge la recherche d'information sur la pathologie affectant leur fille. À ce jour, outre un profil de retards neurodéveloppementaux chez les enfants atteints, les implications sur la santé à long terme restent inconnues. Dans ce contexte, la mère de Cassandra, une jeune fille de 6 ans atteinte de la maladie génétique rare *PSMC5*, a contacté le Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines – Fondation Courtois (CERMO-FC) de l'Université du Québec à Montréal. Sachant cela, notre laboratoire a débuté un nouveau projet de recherche dont l'objectif est de caractériser les mécanismes cellulaires affectés par la mutation génétique P312R de la sous-unité *PSMC5* du protéasome. Dans un premier temps, il était question de développer une lignée cellulaire modèle SH-SY5Y exprimant *PSMC5* WT et P312R. Ensuite, l'impact de la variante P312R sur l'abondance et la distribution cellulaire de l'ubiquitine, ainsi que sur la capacité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome, a été analysé. L'ATPase *PSMC5* procédant, en collaboration avec ses ATPases voisines, à l'entrée des protéines déubiquitinées au sein de la chambre protéolytique, nous avons émis l'hypothèse que la variante P312R (c.935C>G, p.Pro312Arg) affecte l'activité ATPase. Ce phénomène serait traduit par une réduction du rythme de translocation des protéines au sein de la chambre catalytique du protéasome.

4.1 Validation préliminaire de l'hypothèse de recherche

Faisant partie de la catégorie des pathologies génétiques rares, la maladie *PSMC5* est le sujet d'un nombre très limité d'articles scientifiques. La majorité étant des études cliniques, la quantité de publications portant sur la science fondamentale et mécanistique de cette maladie est encore plus restreinte. Également, la mutation P320R de l'isoforme 1 de la sous-unité *PSMC5* étant mentionnée parmi les essais cliniques et les bases de données publiques, seulement une équipe se consacre à son équivalent, P312R, au sein de l'isoforme 2, bien qu'aucun papier n'ait été publié à l'heure actuelle. Bien que peu d'informations permettent de distinguer les deux isoformes, il est établi que l'épissage alternatif de l'acide

ribonucléique messager du gène *PSMC5* peut entraîner la production d'une protéine comportant 406 ou 398 acides aminés. L'isoforme 1 correspond à la forme la plus longue, avec 8 acides aminés supplémentaires en N-terminal. En l'absence de découvertes antérieures permettant de construire le projet selon un angle précis, AlphaFold 3 a été employé afin de prédire l'impact de la variante P312R sur la structure de la sous-unité PSMC5 lors de son interaction avec une molécule d'ATP. En tant qu'ATPase, l'enzyme PSMC5 catalyse l'hydrolyse de l'ATP, permettant la production d'adénosine diphosphate, de phosphate inorganique, et surtout la libération d'énergie. Pour assurer cette réaction biochimique, la protéine PSMC5 possède un site de liaison à l'ATP. Selon nos résultats, l'arginine produite par la mutation P312R de la sous-unité PSMC5 entraîne l'obstruction du site de liaison à l'ATP, affectant donc l'activité d'hydrolyse de l'ATP (figure 3.1). Ceci suit le même ordre d'idées que l'analyse structurale tridimensionnelle de l'article publié dans le journal medRxiv en 2024 (Küry *et al.*, 2024). Effectivement, ces auteurs ont démontré que 13 variants de la sous-unité *PSMC5*, y compris la mutation P320R de l'isoforme 1, étaient prédisposés à perturber l'activité du protéasome, notamment en altérant l'interaction de l'ATP à son site de liaison. Cela entraînerait une réduction de l'énergie produite par PSMC5, ralentissant ainsi la translocation protéique au sein de la région catalytique 20S (Küry *et al.*, 2024). Le variant P312R de l'isoforme 2 correspondant à la mutation P320R au sein de l'isoforme 1 de la sous-unité *PSMC5*, ces observations suggèrent que la variante P312R perturbe également l'activité d'hydrolyse de l'ATP de la sous-unité à l'étude.

Afin de renforcer la fondation du projet, nous avons également procédé à une analyse cellulaire par immunofluorescence. La fonction principale du protéasome étant la dégradation des protéines, une défaillance résultant du variant P312R serait traduite par un ralentissement, ou même une inhibition complète de la fonction enzymatique de la sous-unité PSMC5, menant ainsi à l'accumulation de protéines en attente d'être dégradées par le protéasome (Nunes et Annunziata, 2017). À cet effet, la mutation P312R a engendré une augmentation des molécules d'ubiquitine à proximité des protéasomes, traduite par une colocalisation supérieure de l'ubiquitine avec le signal de HA-PSMC5, en comparaison avec la condition WT (fig. 3.2). Ces résultats semblaient donc indiquer que le variant P312R a bel et bien un effet négatif sur la fonction du protéasome, renforçant alors l'hypothèse de recherche. Toutefois, pour s'assurer que la mutation P312R soit la seule cause des différences observées dans la colocalisation des signaux, il aurait été intéressant d'effectuer une analyse par immunobuvardage afin de comparer les niveaux protéiques de HA-PSMC5 entre les conditions WT et P312R.

La maladie génétique rare *PSMC5* causant majoritairement des retards neurodéveloppementaux, une multitude de maladies neurologiques présentent également ce phénomène d'accumulation de l'ubiquitine. Par exemple, la maladie d'Alzheimer, caractérisée par une dégénérescence neuronale entraînant une perte progressive de la mémoire à court terme, évolue par l'accumulation de l'amyloïde bêta dans le cerveau (Davidson et Pickering, 2023). Plusieurs publications ont démontré un lien entre l'accumulation de cette protéine et l'altération de l'activité enzymatique du protéasome (Gregori *et al.*, 1995; Lopez Salon *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005), résultant ainsi en l'accroissement de l'ubiquitine dans le cerveau (Ribeiro *et al.*, 2023; Tseng *et al.*, 2008). Notamment, une étude publiée en 2023 a comparé ce phénomène d'accumulation dans le lobe temporal post-mortem de 11 patients affectés par la maladie d'Alzheimer et de 10 sujets contrôles (Ribeiro *et al.*, 2023). Selon un test d'immunobuvardage, l'abondance en protéines ubiquitinées était significativement supérieure chez le groupe présentant la maladie. En conséquence, les chercheurs ont décidé d'évaluer si, au sein de tissus cérébraux humains post-mortem non porteurs de la maladie d'Alzheimer, l'activité catalytique des protéasomes était affectée par une exposition de 24 h à des oligomères d'amyloïde bêta (Ribeiro *et al.*, 2023). Par un essai de substrats fluorogéniques, une réduction significative de l'activité de type chymotrypsine et caspase a été observée chez les échantillons exposés à l'amyloïde bêta, démontrant ainsi l'impact de cette protéine sur l'activité du protéasome (Ribeiro *et al.*, 2023). D'autres pathologies neurologiques sont également caractérisées par ce phénomène d'accumulation de l'ubiquitine, telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (Davidson et Pickering, 2023). Toutefois, sachant que les protéines ubiquitinées constituent une cible de l'autophagie, il convient de ne pas négliger l'impact de ce processus dans cette accumulation, d'autant plus que l'autophagie est généralement réduite dans ce types de maladies (Guo *et al.*, 2018; Mizushima *et al.*, 2011; Palmer *et al.*, 2025).

4.2 Caractérisation des clones HA-PSMC5 WT et P312R

4.2.1 Morphologie

Une connexion semblant exister entre les maladies neurologiques et l'inhibition protéasomique, en plus de connaître les multiples fonctions essentielles du protéasome au sein des neurones, nous avons décidé d'avoir recours à la lignée cellulaire SH-SY5Y pour les expérimentations suivantes. Celle-ci est caractérisée par un mélange de cellules de type S et N (Shipley *et al.*, 2016). Comparativement à la condition WT, les clones P312R, plus particulièrement P312R 2, présentaient des caractéristiques typiques de cellules neuronales, à voir des projections cellulaires et un taux de croissance faible (fig. 3.7). Malgré la nature qualitative de l'analyse, ce phénomène suggère une adaptation cellulaire résultant en une augmentation

de la proportion de cellules de type N, comparativement au type S (fig. 3.7). Bien qu'intéressante, cette observation ne nous fournit aucune information concernant l'impact de la mutation P312R sur l'activité d'hydrolyse de l'ATP de la sous-unité *PSMC5* et/ou du protéasome. L'objectif à long terme de cette étude étant d'évaluer la capacité thérapeutique de certaines molécules à stimuler, et par conséquent restaurer, l'activité du protéasome, des résultats robustes quant à l'effet négatif de la variante P312R étaient nécessaires. Ainsi, plutôt que de poursuivre l'analyse morphologique des clones à l'aide de marqueurs de neurones matures tels que MAP2 et la bêta tubuline III, la caractérisation des clones WT et P312R selon leur abondance de HA-*PSMC5*, de diverses sous-unités protéasomiques et de l'ubiquitine (fig. 3.8), ainsi que leur localisation intracellulaire de HA-*PSMC5* et de l'actine (fig. 3.10) a été effectuée.

4.2.2 Abondance protéique par immunobuvardage

Pour la caractérisation des clones, une approche de comparaison quantitative a été employée. De manière à standardiser le signal entre les différents réplicats, la technique de normalisation par les protéines totales a été utilisée, contrairement à l'utilisation standard d'une protéine encodée par un gène de référence, comme la bêta actine et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GADPH). Ces protéines sont employées selon le principe théorique que leur expression génique endogène ne varie pas en fonction des traitements ou des conditions expérimentales (Maloy *et al.*, 2022; Ruan et Lai, 2007). Par contre, bien qu'utilisées couramment par la communauté scientifique, ces protéines ne sont pas adéquates dans tous les contextes scientifiques (Ve *et al.*, 2020). En effet, une analyse par amplification en chaîne par polymérase en temps réel, chez des cellules adipeuses humaines, a démontré qu'un traitement avec des hormones, telles que l'insuline et TNF-alpha, influence l'expression génique de plusieurs protéines de référence dont la bêta actine (Gorzelnik *et al.*, 2001; Ruan et Lai, 2007). Des études ont également exposé la modification de l'expression de la bêta actine dans des situations d'hyperglycémie, d'hypoxie et même dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (Gutala et Reddy, 2004; Ruan et Lai, 2007). Quant à elle, la technique de normalisation par les protéines totales est basée sur la division du signal chimiluminescent d'une bande d'intérêt sur la densité totale des bandes de la piste au sein de l'image *stain-free* de la membrane (Maloy *et al.*, 2022; Ve *et al.*, 2020). La force de cette méthode repose donc sur la standardisation des protéines présentes parmi les différentes pistes, sachant qu'il est impossible de déposer exactement la même quantité de protéines à chaque puits d'un gel (Maloy *et al.*, 2022). Lorsqu'il est question de la reproductibilité des résultats, les observations du groupe (Maloy *et al.*, 2022) renforçaient davantage l'utilisation de la normalisation par les protéines totales, car cette technique

permettait de réduire la variation entre les données, et ce en comparaison à la normalisation par l'actine et la bêta tubuline.

Lors de l'analyse des clones WT et P312R par immunobuvardage (fig. 3.8), nous avons tout d'abord remarqué une variation de l'abondance de HA-PSMC5 par rapport aux étapes de sélection. En effet, bien que les 2 clones WT modèles aient présenté, comme prévu, des niveaux d'abondance de HA-PSMC5 opposés, ce phénomène n'a pas été observé pour les clones P312R, où l'abondance était similaire (fig. 3.8 B). Ceci peut s'expliquer par le fait que la deuxième étape de sélection des clones par immunobuvardage (fig. 3.5) ait été évaluée uniquement sur une base qualitative, donc sans normalisation par la densité totale des protéines présentes sur l'image *stain-free* de la membrane. Bien que les clones P312R n'exhibaient pas le profil d'expression de HA-PSMC5 initialement attendu, la caractérisation complète des clones modèles par immunobuvardage ayant déjà été effectuée, et puisque les clones P312R 1 et 2 présentaient des distinctions quant à leur morphologie cellulaire (fig. 3.7), nous avons décidé de poursuivre les expérimentations avec les clones sélectionnés. En parallèle de HA-PSMC5, nous avons également évalué l'impact de la variante P312R sur l'abondance de sous-unités protéasomiques. Selon nos résultats, il semble que cette mutation n'a pas perturbé l'abondance des sous-unités Rpt6, Rpt1, Rpt3, Rpn6, Rpn2 et Rpn11 endogènes (fig. 3.8 B). Bien qu'informatifs, ces résultats ont tout de même soulevé un questionnement quant au niveau similaire de Rpt6/PSMC5 endogène entre les clones HA-PSMC5 WT et P312R et la condition NT (fig. 3.8 B). En effet, le niveau d'abondance de HA-PSMC5 variant entre les clones modèles, une tendance opposée au niveau d'abondance de PSMC5 endogène était attendue.

La fonction principale du protéasome est la dégradation protéique, où les protéines cibles sont reconnues par leur chaîne de polyubiquitine. Dans le contexte des maladies neurodégénératives, une accumulation d'ubiquitine au sein des cellules est généralement indicatrice d'une incapacité du protéasome à dégrader les protéines polyubiquitinées, et donc d'un dysfonctionnement du complexe enzymatique (Huang et Figueiredo-Pereira, 2010; Li *et al.*, 2004; Myeku *et al.*, 2011). Compte tenu de cela, un effet néfaste de la mutation P312R sur l'activité catalytique du protéasome serait traduit par une augmentation de l'abondance de l'ubiquitine et de la chaîne de la polyubiquitine K48 par immunobuvardage. Selon les résultats, la variante P312R de la sous-unité PSMC5 du protéasome n'a pas entraîné l'accumulation des diverses formes de l'ubiquitine chez les clones SH-SY5Y (fig. 3.8 B). Ceci va à l'encontre des résultats obtenus dans une étude évaluant l'impact de 23 variants de la sous-unité PSMC5 sur sa fonction neuronale dans le cadre de protéasomopathies neurodéveloppementales (Küry *et al.*, 2024). Une analyse de

l'abondance de la chaîne de polyubiquitine K48 a été effectuée chez les lymphocytes T de six individus touchés par un variant *PSMC5*, dont P320R, ainsi que de contrôles liés biologiquement et non liés (Küry *et al.*, 2024). Plus spécifiquement, un échantillon sanguin unique a été prélevé chez chaque sujet afin d'extraire les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et de les cryopréserver (Küry *et al.*, 2024). Dans le but de stimuler la prolifération des lymphocytes T, les PBMCs de chaque individu ont été mises en culture pendant 3 à 4 semaines, en présence de l'interleukine 2, de la phytohémagglutinine, ainsi que de PBMCs allogéniques irradiées. Afin de comparer l'abondance de la chaîne de polyubiquitine K48 chez les cellules T en présence de *PSMC5* WT et de ses différents variants, une lyse cellulaire a été suivie de la méthode SDS-PAGE et d'un immunobuvardage quantitatif (Küry *et al.*, 2024). Selon leurs observations, les variants de *PSMC5* ont entraîné l'accumulation significative ($p < 0,01$) de protéines en voie d'être dégradées (Küry *et al.*, 2024). Plusieurs raisons peuvent expliquer les résultats contradictoires, en lien avec l'ubiquitine, entre notre étude et l'article (Küry *et al.*, 2024). Comparativement à notre modèle expérimental, soit des clones stables HA-*PSMC5* WT et P312R de cellules SH-SY5Y, les auteurs de l'article ont travaillé directement avec les lymphocytes T de patients affectés par un variant *PSMC5* (Küry *et al.*, 2024). Ainsi, leurs résultats présentent une pertinence scientifique supérieure en raison de leur proximité avec le contexte biologique réel. Cependant, il est important de prendre ces données avec vigilance, et ce en raison de la validité des résultats. Tout d'abord, les auteurs ont mentionné que le prélèvement sanguin chez les individus n'a pas été effectué dans un intervalle de temps contrôlé, mais plutôt selon la disponibilité des sujets (Küry *et al.*, 2024). Ce manque de standardisation dans la collecte des échantillons soulève un questionnement quant à la crédibilité des résultats, notamment dans un contexte où des cellules du système immunitaire sont analysées. En effet, la prolifération et les fonctions cellulaires, ainsi que l'expression des récepteurs de chimiokines ne sont que quelques exemples de facteurs influencés par le rythme circadien chez les lymphocytes T (Ding *et al.*, 2024; Zeng *et al.*, 2024). Il est également important de noter que l'article ne mentionne aucune procédure de dépistage préalable au prélèvement sanguin afin d'exclure des sources de biais potentiels, tels que des infections virales ou bactériennes récentes et la consommation de certains médicaments. Par ailleurs, le lien entre le vieillissement et la réduction de l'activité du protéasome étant bien établi depuis plusieurs années, la différence d'âge entre les sujets et les individus contrôles est à prendre en considération (Frankowska *et al.*, 2022). Le groupe des sujets porteurs d'une variante étant composé de cinq individus de 15 ans ou moins et d'un sujet entre 16 et 20 ans, le groupe contrôle, quant à lui, comprenait trois parents et un frère biologiques, ainsi que deux individus externes dont l'âge n'était pas spécifié (Küry *et al.*, 2024). Mis à part les biais potentiels liés à l'aspect clinique de l'étude, certains paramètres expérimentaux remettent aussi en question la

reproductibilité des résultats. En effet, l'article ne fait aucune mention d'un traitement des lysats cellulaires avec des inhibiteurs de protéases (Küry *et al.*, 2024). Sans ceux-ci ajoutés au tampon, le stress généré par la lyse cellulaire peut entraîner une surstimulation des protéases, masquant donc l'effet des variants étudiés. De plus, au lieu de standardiser l'intensité de l'ubiquitine par les protéines totales, les chercheurs ont procédé à la normalisation avec les protéines de référence bêta actine et GADPH (Küry *et al.*, 2024). Bien qu'acceptée par la communauté scientifique, cette stratégie augmente le risque de générer des artéfacts, pouvant compromettre l'interprétation des résultats (Maloy *et al.*, 2022; Ve *et al.*, 2020). À ce jour, bien qu'il n'ait pas encore été révisé par les pairs, cet article multidisciplinaire possède une valeur scientifique significative, étant le premier de sa catégorie à inclure un nombre aussi élevé d'individus affectés, ainsi que de variants. De manière concordante, une étude publiée en 2024 a également mis en évidence un lien entre une altération de l'activité de PSMC5 et une augmentation de l'abondance de la chaîne de polyubiquitine K48 (Yu *et al.*, 2024). Plus précisément, dans des cellules HeLa et SH-SY5Y, les chercheurs ont inhibé l'expression du gène *PSMC5* et évalué, par immunobuvardage, l'abondance de cette chaîne d'ubiquitine (Yu *et al.*, 2024). En plus d'une augmentation de la mort cellulaire et de l'apoptose, les cellules avec *PSMC5* inhibé présentaient une accumulation significative de la chaîne de polyubiquitine K48, comparativement à la condition contrôle (Yu *et al.*, 2024). Ces observations soulignent le rôle central de l'ATPase PSMC5 dans la dégradation protéique.

4.2.3 Abondance et localisation protéique par immunofluorescence

Afin d'extraire le maximum d'information venant du Z-stack des cellules, un questionnement quant à l'utilisation du plan bidimensionnel (2D) ou tridimensionnel (3D) pour l'analyse s'est posé. En effet, un débat d'actualité dans le domaine de la microscopie à fluorescence se penche sur la capacité de l'analyse 2D à représenter concrètement les phénomènes biologiques au sein d'une cellule entière (Forsgren *et al.*, 2022; Lee et Kitaoka, 2018; Long *et al.*, 2012). Employée de manière standard, cette méthode consiste en un empilement sur la dimension Z afin d'obtenir une seule image finale plane, d'où les analyses quantitatives sont effectuées (Long *et al.*, 2012). Plusieurs méthodes de combinaison des tranches sont possibles : par l'intensité moyenne des pixels, l'intensité maximale ou minimale de chaque pixel, l'addition des valeurs de pixel sur toutes les tranches, l'écart-type des intensités des pixels et l'intensité médiane de chaque pixel. Dans le but de conserver davantage l'information provenant de l'image brute, le mode d'addition (Z-project, *sum slices*) a été employé afin de produire l'image 2D. Dans l'éventualité où les cellules étaient interconnectées par des projections ou leur membrane plasmique, l'extension *watershed irregular features* a été utilisée. Selon un principe physique, ce programme considère l'image binaire

comme une surface topographique où une source d'eau est positionnée au niveau de chaque minimum du relief. Lors de l'ajout d'eau, les reliefs présents sont inondés et des barrages, ou dans notre contexte des lignes délimitant 2 cellules uniques, sont formés (Legland *et al.*, 2016; Wu et Li, 2022). Par l'utilisation de cette extension, une source potentielle d'artéfacts a été éliminée en délimitant précisément les cellules interconnectées, permettant ainsi la quantification du signal fluorescent propre à chaque cellule.

Comparativement à l'analyse 2D, la méthode 3D permet de conserver la totalité de l'information présente au sein d'un Z-stack. Néanmoins, aucun protocole standardisé n'est actuellement établi, et les extensions et logiciels disponibles nécessitent des ajustements quant à la reconstruction 3D (Lee et Kitaoka, 2018). Par l'empilement des tranches sur le plan Z, un objet à 3 dimensions est créé ou, dans notre contexte, une cellule entière (Long *et al.*, 2012). Dans le contexte où les cellules étaient connectées, une délimitation a été effectuée selon l'extension *distance transform watershed 3D*. Le principe physique de ce programme est le même que l'analyse 2D, à l'exception d'un choix d'algorithmes pour la séparation (Legland *et al.*, 2016; Wu et Li, 2022). Ce complément se base sur l'attribution d'une valeur numérique à chaque pixel, représentée par sa distance au pixel de l'arrière-plan le plus à proximité. Ainsi, un algorithme *watershed* est appliqué à l'image transformée en distance dans le but de former des délimitations entre les régions de différentes intensités. Le logiciel Fiji proposant quatre algorithmes, ceux-ci se distinguent par leurs valeurs numériques d'attribution de distance (Legland *et al.*, 2016). L'utilisation des cellules SH-SY5Y en microscopie nécessite une approche analytique particulière, et ce en raison de leur prolifération sous forme de grappes (Shiple *et al.*, 2016). Ce phénomène de multiplication cellulaire augmentant le niveau de complexité de l'analyse 2D, cette difficulté est d'autant plus importante lorsqu'une dimension supplémentaire est impliquée. Dans le contexte de l'étude, tous les algorithmes ont été employés afin de délimiter minutieusement les cellules analysées.

Selon les résultats obtenus à la figure 3.9, une analyse du Z-stack sur le plan 2D semblait optimale. Par l'évaluation des mêmes échantillons, l'analyse 2D a permis de réduire la variation au sein des données, comparativement à l'analyse 3D, et ce autant pour le signal de HA-PSMC5, de l'actine et de l'ADN du noyau (fig. 3.9). Pour la reproductibilité des résultats d'immunofluorescence, nous avons effectué la caractérisation des clones HA-PSMC5 WT et P312R par une analyse sur le plan 2D. Par contre, certains logiciels, tels qu'Imaris par Bitplane ou Arivis Pro par ZEISS, permettent une reconstruction 3D très précise des cellules (Barry *et al.*, 2022). Cependant, ceux-ci étant très onéreux, peu d'équipes de recherche peuvent se permettre leur utilisation, d'où l'usage massif du logiciel gratuit Fiji. Celui-ci accordant au grand

public la création et l'ajout d'extensions sur le serveur, les compléments disponibles sont généralement moins précis que ceux développés par des compagnies bio-informatiques (Schindelin *et al.*, 2012).

En raison des observations obtenues lors de l'analyse morphologique des clones WT et P312R (fig. 3.7), soit le taux supérieur de cellules de type N en présence du variant P312R, il a été convenu d'évaluer l'abondance de l'actine chez les cellules. En plus d'être la protéine la plus exprimée au sein des cellules eucaryotes, l'actine est un composant essentiel du cytosquelette par sa formation d'un réseau filamentaire hautement complexe, et est donc à la source de la forme cellulaire (Alizadeh *et al.*, 2018; Ortega-Carrion *et al.*, 2016; Pollard et Cooper, 2009; Rangamani *et al.*, 2014). Plus précisément, ses filaments sont essentiels au support mécanique et tridimensionnel des cellules, et ce par leur abondance accrue au sein du cortex cellulaire (Chugh et Paluch, 2018; Salbreux *et al.*, 2012; Svitkina, 2020). En raison de cela, l'actine est fréquemment employée en microscopie afin d'évaluer des changements morphologiques au sein des cellules (Alizadeh *et al.*, 2018). Par exemple, une équipe de chercheurs a étudié, en 2021, les variations morphologiques de cellules souches embryonnaires naïves de souris entre le stade préimplantatoire homogène et le début de la différenciation cellulaire, et ce en analysant la structure tridimensionnelle de l'actine par microscopie de reconstruction optique stochastique (Barooji *et al.*, 2021). Dans le contexte de la lignée cellulaire SH-SY5Y, une étude publiée en 2013 a évalué l'efficacité de différents paramètres à induire la différenciation neuronale, soit les facteurs de croissance et les protéines de la matrice extracellulaire (Dwane *et al.*, 2013). Après avoir déterminé les conditions optimales, les caractéristiques morphologiques des cellules ont été comparées entre les différents stades de différenciation, et ce par un marquage de l'actine filamentaire à la phalloïdine par immunofluorescence (Dwane *et al.*, 2013). Tout d'abord, la différenciation a entraîné l'élargissement du corps cellulaire, après quoi l'apparition de projections similaires aux dendrites et axones a été suivie d'une réduction de la taille des cellules SH-SY5Y (Dravid *et al.*, 2021; Dwane *et al.*, 2013; Shipley *et al.*, 2016). Des articles ultérieurs ont également fait mention de cette tendance lors de la différenciation (Dravid *et al.*, 2021; Shipley *et al.*, 2016). Ceci renforce l'idée qu'une des principales caractéristiques distinguant les cellules SH-SY5Y de type S et N est la morphologie. Avec ces évidences, un marquage à la phalloïdine a été effectué afin d'évaluer la morphologie cellulaire entre les conditions WT et P312R. Par ailleurs, le réseau filamentaire de l'actine occupant toute la surface cellulaire, la taille des cellules HA-PSMC5 WT et P312R a été estimée et comparée, et ce en calculant l'aire occupée par le signal de l'actine au sein de chaque cellule (Desroches et Harris, 2023; Salbreux *et al.*, 2012; Svitkina, 2020). Bien qu'une différence significative était seulement présente entre les clones P312R 2 et WT 1, favorisant la taille du clone muté, une tendance était également

présente conférant une taille supérieure aux cellules P312R 2, comparativement au clone WT 2 ($p = 0,0672$) et la condition NT ($p = 0,0652$; fig. 3.10). Le clone P312R 1 semblait également suivre cette tendance, bien que l'effet était moins notable (fig. 3.10). Ces observations semblent suivre la même logique que l'article de Dwane *et al.* (2013) démontrant une augmentation du corps cellulaire lors des étapes précoces de différenciation. En somme, nos résultats suggèrent que la variante P312R de la sous-unité PSMC5 du protéasome induit une forme prématurée de différenciation, chez les cellules SH-SY5Y, favorisant un phénotype neuronal.

Bien que le clonage par dilutions limites ait été effectué méticuleusement, il semble que les populations clonales n'étaient pas totalement homogènes dans leur expression de HA-PSMC5. Une première indication de ce phénomène était observable lors de la deuxième sélection clonale par immunofluorescence (fig. 3.6). En effet, plusieurs clones possédaient, en plus de cellules exprimant HA-PSMC5, des cellules avec une abondance faible, voire nulle, de la protéine transfectée (fig. 3.6). Ceci était particulièrement frappant pour le clone E6 III P312R, où la proportion de cellules exprimant HA-PSMC5 ou non était environ 50%/50% (fig. 3.6). Ce phénomène était également observable lors de la caractérisation des clones WT et P312R modèles par immunofluorescence (fig. 3.10). Cette hétérogénéité présente chez les clones était probablement originaire de la technique employée. En effet, lorsqu'il était question de produire les monoclonales, plusieurs méthodes ont été envisagées, telles qu'un tri cellulaire induit par fluorescence (FACS) ou par sélection magnétique (MACS), ainsi que la technique de dilutions limites (Hu *et al.*, 2016; Zeb *et al.*, 2019). Bien que le niveau de pureté obtenu en matière d'isolation cellulaire soit supérieur à 98%, la méthode FACS a été mise de côté en raison de la grande quantité de cellules requise, et puisque nous ne voulions pas alourdir la construction plasmidique avec un marqueur fluorescent (Hu *et al.*, 2016; Zeb *et al.*, 2019). Également connue pour sa capacité à isoler efficacement des cellules spécifiques, la technique MACS, quant à elle, n'était pas envisageable en raison de la localisation intracellulaire de PSMC5, rendant donc la protéine inaccessible au processus de sélection à la surface (Hu *et al.*, 2016). Couramment employée en raison de son prix raisonnable, la technique de dilutions limites se base sur le dépôt d'une cellule unique au sein d'une plaque de 96 puits par la dilution de la suspension cellulaire (Zeb *et al.*, 2019). Bien qu'efficace, cette méthode est souvent critiquée en raison du niveau de pureté associé. Effectivement, même avec une pratique minutieuse, il est possible que 2 cellules se retrouvent, involontairement, dans un même puits et que celles-ci ne soient pas détectées lors des observations, résultant en la formation de polyclones (Ye *et al.*, 2021). Lors de l'élaboration du plan expérimental, les approches alternatives n'étant pas compatibles avec l'étude, il a été convenu de produire les monoclonales

HA-PSMC5 WT et P312R avec la technique de dilutions limites, et ce malgré les risques techniques associés. Pour renforcer la pureté des clones générés, une deuxième série de dilutions limites, voire l'utilisation de dilutions supérieures lors du clonage, aurait été préférable (Ye *et al.*, 2021). Il convient néanmoins de prendre en considération d'autres facteurs susceptibles d'expliquer l'hétérogénéité observée, tel que l'apparition spontanée de mutations chez certaines cellules.

4.3 Influence de la mutation P312R de la sous-unité PSMC5 sur l'activité d'hydrolyse de l'ATP

Les tests d'immunobuvardage et d'immunofluorescence ayant permis de caractériser suffisamment le profil des clones HA-PSMC5 WT et P312R, l'évaluation de l'impact de la variante P312R sur l'activité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome a été effectuée. La sous-unité PSMC5 étant une ATPase, un réel effet négatif de cette mutation serait traduit par une réduction de son taux d'hydrolyse de l'ATP, ou même de son inhibition complète. Par contre, la version endogène de *PSMC5* n'ayant pas été inactivée lors de la transfection, une purification des HA-protéasomes WT et P312R étaient nécessaires. Effectivement, comme observé lors de l'immunobuvardage quantitatif, les clones WT et P312R exprimaient fortement la sous-unité PSMC5 endogène (fig. 3.8 B). Ainsi, l'expérimentation sans aucune purification préalable aurait probablement résulté en des valeurs de densité optique comparables entre les conditions WT et P312R, et ce en raison des protéasomes endogènes masquant l'effet de la mutation. Afin de purifier les HA-protéasomes, nous avons d'abord considéré une immunoprécipitation de HA-PSMC5, à partir des lysats cellulaires WT et P312R, et ce avec une résine d'agarose A/G et l'anticorps monoclonal de souris anti-HA.11. Cependant, la préservation de la stabilité de la sous-unité PSMC5 étant essentielle pour évaluer son activité d'hydrolyse de l'ATP, l'étape de dissociation des complexes protéine-anticorps nous a conduits à envisager une technique alternative. En effet, dans un contexte où des conditions non dénaturantes doivent être conservées, l'élution repose généralement sur l'augmentation ou la réduction drastique du pH, ou bien sur le changement de la force ionique (Tang *et al.*, 2023). Bien que ces conditions soient moins agressives qu'un tampon dénaturant, elles peuvent tout de même perturber la stabilité protéique, altérant la conformation tridimensionnelle de la protéine, et par conséquent, sa fonction (Tang *et al.*, 2023). Le maintien de cette stabilité étant crucial pour l'évaluation de l'activité d'hydrolyse de l'ATP des protéasomes PSMC5 WT et P312R, et puisque l'utilisation d'inhibiteurs de protéases pour préserver l'intégrité protéique n'était pas possible dans le cadre expérimental, un système ELISA a été employé afin d'isoler, à la base des puits, les protéasomes d'intérêt (Vigneron *et al.*, 2015).

Pour quantifier l'activité d'hydrolyse de l'ATP des HA-protéasomes, plusieurs méthodes colorimétriques et fluorométriques ont été considérées, notamment l'essai d'hydrolyse de l'ATP couplé au nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné (NADH) et le dosage du phosphate au vert de malachite. La première méthode emploie les réactions de transformation du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate, puis du pyruvate en lactate, afin de quantifier l'absorbance générée par le NADH utilisé (Veit et Pomorski, 2023). Lors de l'hydrolyse de l'ATP, la molécule d'ADP produite sert à convertir le PEP en pyruvate. Ce même pyruvate est ensuite converti, à l'aide de l'oxydation du NADH, en lactate (Veit et Pomorski, 2023). La méthode de dosage du phosphate au vert de malachite, quant à elle, se base sur la formation d'un complexe entre le phosphate inorganique, issu de l'hydrolyse de l'ATP en ADP, l'ammonium molybdate et le vert de malachite permettant alors la quantification de la concentration de phosphate issue de cette réaction enzymatique (Veit et Pomorski, 2023). Bien que les deux méthodes soient intéressantes, la deuxième a été employée. En effet, l'essai couplé au NADH ne mesure qu'indirectement l'activité d'hydrolyse de l'ATP, et ce par plusieurs réactions enzymatiques (Veit et Pomorski, 2023). Ces nombreuses étapes supplémentaires augmentent non seulement le coût de la méthode, mais aussi le risque d'interférences dues aux réactifs nécessaires (Guo *et al.*, 2014; Radnai *et al.*, 2019).

Suite à l'optimisation de l'ELISA quantitatif de HA-PSMC5 et du dosage du phosphate au vert de malachite (fig. 3.12-3.16), l'activité d'hydrolyse de l'ATP entre les conditions WT et P312R a été comparée (fig. 3.17). Selon nos observations, la variante P312R de la sous-unité PSMC5 n'interfère pas avec l'activité hydrolytique du protéasome (fig. 3.17). Ceci était surprenant étant donné la prédiction bio-informatique par AlphaFold (fig. 3.1) ayant démontré une obstruction du site de liaison à l'ATP de la sous-unité PSMC5 en présence de la mutation P312R. Suite à l'analyse de ces résultats, l'hypothèse d'un mécanisme compensatoire impliquant les six sous-unités ATPases de la région 19S du protéasome a été formulée. En effet, une étude chez la levure a illustré que l'activité enzymatique des ATPases s'effectuerait de manière séquentielle, et ce par la réduction de l'activité d'hydrolyse du protéasome en entier suite à la mutation individuelle des sous-unités Rpt3, Rpt5 et Rpt6/PSMC5 (Peth *et al.*, 2013b). En d'autres termes, les auteurs mettaient de l'avant l'idée que l'activité de chaque ATPase dépendrait de celle des ATPases voisines (Peth *et al.*, 2013b). Cette théorie a également été corroborée par d'autres articles, dont une en 2019 analysant les changements conformationnels des protéasomes 26S humains lors de leur interaction avec le substrat, et ce par cryomicroscopie électronique (de la Peña *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2011). En plus de démontrer que l'hydrolyse de l'ATP se déroule de manière séquentielle au niveau des six ATPases, les chercheurs ont aussi observé trois modes de régulation par ces enzymes, intervenant entre la

reconnaissance du substrat polyubiquitiné et sa translocation au sein de la région catalytique 20S, et responsables des modifications conformationnelles observées (Dong *et al.*, 2019). Selon leurs résultats, la déubiquitination serait régulée par l'hydrolyse de l'ATP de deux ATPases opposées, la translocation précoce par l'activité hydrolytique de deux ATPases adjacentes, puis la translocation continue du substrat par l'hydrolyse successive de l'ATP par les six ATPases (Dong *et al.*, 2019). Dans le cadre de cette étude, l'activité d'hydrolyse de l'ATP similaire entre les conditions WT et P312R (fig. 3.17) pourrait indiquer, chez la lignée cellulaire SH-SY5Y et dans un contexte neurobiologique, un mécanisme de compensation des autres ATPases face à l'inhibition de l'activité de PSMC5 par la mutation P312R. Dans une autre perspective, malgré le clonage rigoureux, il est théoriquement possible que certains protéasomes 26S possèdent, à une extrémité, une région 19S munie d'une sous-unité PSMC5 WT et, à l'autre extrémité, une région 19S avec une sous-unité PSMC5 P312R. Cette possibilité pourrait ainsi réduire l'effet attendu sur l'hydrolyse de l'ATP par la mutation P312R.

Bien que la méthode ELISA couplée au dosage au vert de malachite, qui a été développée, ait permis de quantifier et de normaliser le phosphate inorganique libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP, les valeurs de densité optique obtenues étaient généralement faibles. Ceci a soulevé un questionnement en lien avec la sensibilité de l'essai. Bien que théoriquement fonctionnel, il est possible que le montage complexe développé n'ait pas suffisamment pris en compte la dynamique structurale du protéasome. En tant que complexe enzymatique en perpétuel mouvement, il est envisageable que les sous-unités ciblées par les anticorps n'aient pas été constamment accessibles spatialement, résultant donc en une réduction du signal optique quantifié. Par ailleurs, malgré l'exécution de la procédure à 4 °C, il se peut que la stabilité des HA-protéasomes ait été perturbée lors de l'expérimentation, affectant leur fonction enzymatique et, par conséquent, la quantification de l'activité d'hydrolyse de l'ATP. Au-delà de la sensibilité de l'essai, un questionnement est apparu suite à l'observation d'une courbe pour le ratio phosphate libéré/protéasomes capturés, comparativement à la tendance linéaire qui était attendue. Cette déviation pourrait résulter de sources d'activité ATPase additionnelles lors de la réaction, telles que l'activité enzymatique d'autres sous-unités de l'anneau Rpt ou la présence de contaminants. Des analyses supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer la cause exacte.

4.4 Avenues

Les résultats obtenus ont fourni des informations pertinentes vis-à-vis l'impact de la mutation P312R de la sous-unité PSMC5 sur le système ubiquitine-protéasome et l'activité enzymatique du protéasome.

Néanmoins, plusieurs expériences complémentaires permettraient d'approfondir davantage les connaissances sur ce variant dans le contexte de la maladie *PSMC5*. Le test ELISA couplé au dosage au vert de malachite ayant permis d'évaluer l'activité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome en présence du variant P312R, cette méthode pourrait également être appliquée afin d'analyser sa fonction catalytique. Comme mentionné dans la section résultats, la technique développée a été adaptée de l'article de Vigneron *et al.* (2015), évaluant l'impact d'inhibiteurs sur l'activité enzymatique des protéasomes standard, des immunoprotéasomes et des protéasomes intermédiaires bêta 5i et bêta 1i-5i. Dans le contexte de l'étude, il serait pertinent d'évaluer si la mutation P312R de la sous-unité *PSMC5* affecte les différentes activités catalytiques du protéasome, c'est-à-dire l'activité de type chymotrypsine, caspase et trypsine (Gomes, 2013; Peth *et al.*, 2013b; Tanaka, 2009). Pour ce faire, au sein d'une plaque à fluorescence de grade ELISA, la même technique serait effectuée pour la purification des HA-protéasomes, après quoi les fluorophores suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC et Boc-LRR-AMC seraient ajoutés pour quantifier l'activité chymotrypsine, caspase et trypsine respectivement en fonction du temps (Vigneron *et al.*, 2015). Afin de caractériser l'impact de la mutation P312R au-delà de son effet sur l'activité d'hydrolyse de l'ATP de *PSMC5*, la réalisation d'essais de translocation aurait été intéressante.

Bien que les clones HA-*PSMC5* P312R présentent des caractéristiques phénotypiques de cellules neuroblastiques, un modèle plus représentatif du système neurologique aurait été optimal, et ce étant donné l'omniprésence des retards neurodéveloppementaux chez la maladie *PSMC5*. La lignée cellulaire SH-SY5Y ayant la capacité de se différencier en neurones matures en présence de substances spécifiques, il serait intéressant d'évaluer si les clones HA-*PSMC5* WT et P312R, suite à leur différenciation en neurones, sont différemment affectés par la variante P312R en ce qui concerne le système ubiquitine-protéasome. En fonction du budget disponible, il serait d'autant plus intéressant d'utiliser un modèle expérimental murin afin d'évaluer l'impact du variant P312R de *PSMC5* sur l'activité du protéasome neuronal par la technologie CRISPR. Par contre, sachant qu'environ 25 % des gènes inactivés entraînent la mortalité chez les souris embryonnaires, il est possible qu'une simple inactivation de *PSMC5* entraîne des problèmes de viabilité (Wu *et al.*, 2019). Effectivement, des études ont mis en évidence l'implication majeure de *PSMC5/Rpt6* au sein du cerveau, notamment dans la régulation de l'expression génique et du remodelage de la chromatine (Küry *et al.*, 2024; Ohnishi *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré que cette protéine influence l'activité neuronale par son interaction avec les récepteurs GABA de type B, connus pour leur fonction inhibitrice au sein du système nerveux (Küry *et al.*, 2024; Zemoura et Benke, 2014). Par cette interaction, *PSMC5/Rpt6* modulerait l'expression de ces récepteurs à la surface des neurones (Küry *et al.*,

2024; Zemoura et Benke, 2014). Également, en oncologie, les inhibiteurs de protéasome comme le bortézomib et le carfilzomib sont couramment employés afin d'induire l'éradication des cellules cancéreuses (Nunes et Annunziata, 2017). Ce lien entre l'inhibition protéasomique et la mort cellulaire étant bien documenté dans la littérature, il est possible que l'inactivation génique de la sous-unité *PSMC5* du protéasome entraîne des effets similaires (Coban et Mutluay, 2021). Dans cette optique, il serait pertinent de considérer le système de recombinaison Cre-LoxP. Suite à l'atteinte de l'âge adulte chez les souris génétiquement modifiées, l'induction de la recombinase Cre permettrait d'activer la séquence mutée P312R de *PSMC5*, et ainsi d'évaluer son impact (Hall *et al.*, 2009). En allant plus loin, l'utilisation de cette technologie pourrait aussi être envisagée afin d'étudier l'effet du variant P312R directement au site d'intérêt, le cerveau. Ceci serait réalisable, lors de la conception des souris modèles, par l'ajout d'un promoteur spécifique au système nerveux qui régulerait l'expression de la recombinase Cre (Hall *et al.*, 2009).

Sous l'hypothèse que la différenciation neuronale des clones HA-*PSMC5* permettrait d'observer une réduction de l'activité enzymatique du protéasome en présence de la variante P312R, des essais *in vitro* pourraient être réalisés afin d'évaluer, comme approche thérapeutique, la capacité de certaines molécules à stimuler, et ainsi rétablir, les niveaux d'activité basaux du protéasome. Comme piste de molécules à considérer, des chercheurs ont identifié, en 2017, 11 petites molécules capables d'augmenter significativement l'activité du protéasome (Leestemaker *et al.*, 2017). Par le traitement des clones différenciés en culture avec ces molécules, il serait possible d'identifier celles qui permettent l'obtention de taux d'hydrolyse équivalents entre les conditions WT et P312R, et ce en utilisant le protocole de dosage du phosphate au vert de malachite couplé à l'ELISA de HA-*PSMC5*. Cet essai constituerait un point de départ vers la mise en place d'approches thérapeutiques susceptibles d'améliorer la qualité de vie des individus atteints de la maladie génétique rare *PSMC5*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, les personnes atteintes de maladies rares sont communément confrontées à un grand nombre de questionnements, et paradoxalement, à une quantité très limitée de réponses. En raison du faible nombre d'individus touchés, le financement alloué à la recherche est généralement restreint, ralentissant significativement l'approfondissement des mécanismes pathophysiologiques menant à l'élaboration de traitements. Dans le contexte de ce projet de maîtrise, la mère de Cassandra qui est atteinte de la maladie génétique rare *PSMC5* a contacté le CERMO-FC de l'Université du Québec à Montréal afin d'approfondir les connaissances relatives à la mutation de sa fille. Le professeur Marc Lussier a ainsi décidé de caractériser les mécanismes cellulaires altérés par la mutation génétique P312R de l'isoforme 2 de la sous-unité *PSMC5* du protéasome.

Sachant que l'ATPase *PSMC5* médie la translocation des protéines dans la chambre protéolytique, l'hypothèse était que la variante P312R (c.935C>G, p.Pro312Arg) altère l'activité ATPase, perturbant ainsi l'exécution de la fonction de dégradation du protéasome. Selon les résultats obtenus, la mutation P312R ne semble pas affecter la dynamique fonctionnelle du complexe enzymatique, car ni l'activité d'hydrolyse de l'ATP du protéasome, ni l'abondance des protéines ubiquitinées n'étaient changées en présence de ce variant.

La mutation P312R n'ayant été identifiée par le domaine scientifique que très récemment, ce projet de maîtrise constitue l'un des premiers travaux à évaluer son impact dans un contexte de recherche fondamentale. Pour les études futures, il serait pertinent d'utiliser un modèle expérimental plus approprié, tel que des cellules SH-SY5Y différenciées en neurones matures, ou même des neurones primaires, afin de confirmer ou bien infirmer les tendances observées au sein de ce projet. Chaque étude, quelle que soit l'ampleur de sa contribution scientifique, fait progresser le développement d'un traitement thérapeutique. Dans le cas de la maladie *PSMC5*, ceci permettrait potentiellement de stabiliser ou bien de réduire les retards neurodéveloppementaux observés chez les enfants, améliorant ainsi leur qualité de vie.

ANNEXE A

IDENTIFICATION DES VARIANTS DE L'ISOFORME 1 DE LA SOUS-UNITÉ *PSMC5* DANS LES
DIFFÉRENTES BASES DE DONNÉES PUBLIQUES

Sujet	Mutation ADNc	Mutation protéine	Decipher	MobiDetails	GnomAD
1	c.166+3del	-	-	212698	
2	c.206A>G	Q69R	-	212702	
3	c.414G>C	M138I	-	212704	
4	c.548C>T	P183L	-	212706	
5	c.587del	K196Rfs*29	-	306340	
6	c.601C>T	R201W	-	212708	
7	c.601C>T	R201W	-	212708	
8	c.605C>T	A202V	-	212710	
9	c.620C>T	T207M	-	212712	17-63830876-C-T
10	c.647G>A	G216D	-	212714	
11	c.662A>G	Q221R	-	212716	
12	c.749A>T	E250V	-	212718	
13	c.749A>G	E250G	-	212720	
14	c.754G>A	D252N	-	212722	
15	c.754G>A	D252N	-	212722	
16	c.772C>T	R258W	-	212724	17-63831128-C-T
17	c.773G>A	R258Q	-	274699	17-63831129-G-A
18	c.845G>A	G282D	-	307153	
19	c.959C>G	P320R	-	212726	
20	c.959C>G	P320R	-	212726	
21	c.959C>G	P320R	-	212726	
22	c.959C>G	P320R	-	212726	
23	c.959C>G	P320R	-	212726	
24	c.959C>G	P320R	-	212726	
25	c.959C>G	P320R	-	212726	
26	c.959C>G	P320R	-	212726	
27	c.959C>G	P320R	-	212726	
28	c.959C>G	P320R	-	212726	
29	c.959C>G	P320R	-	212726	
30	c.959C>G	P320R	306096	212726	
31	c.959C>G	P320R	307251	212726	
32	c.959C>A	P320H	-	212728	17-63831415-C-A
33	c.968_969+1del	-	-	307156	
34	c.970-2A>G	-	-	212730	
35	c.973C>T	R325W	-	212732	
36	c.973C>T	R325W	-	212732	
37	c.973C>T	R325W	-	212732	
38	c.973C>T	R325W	-	212732	
39	c.973C>T	R325W	-	212732	

40	c.973C>T	R325W	-	212732	
41	c.973C>T	R325W	-	212732	
42	c.973C>T	R325W		212732	
43	c.973C>T	R325W	261007	212732	
44	c.973C>T	R325W	305996	212732	
45	c.973C>T	R325W	454184	212732	
46	c.1103T>C	M368T	-	212734	17-63831746-T-C
47	c.1182_1183del	D394Efs*2	-	212736	
48	c.205C>T	p.Q69Ter	-	-	
49	c.479A>C	p.Q160A	304265	-	

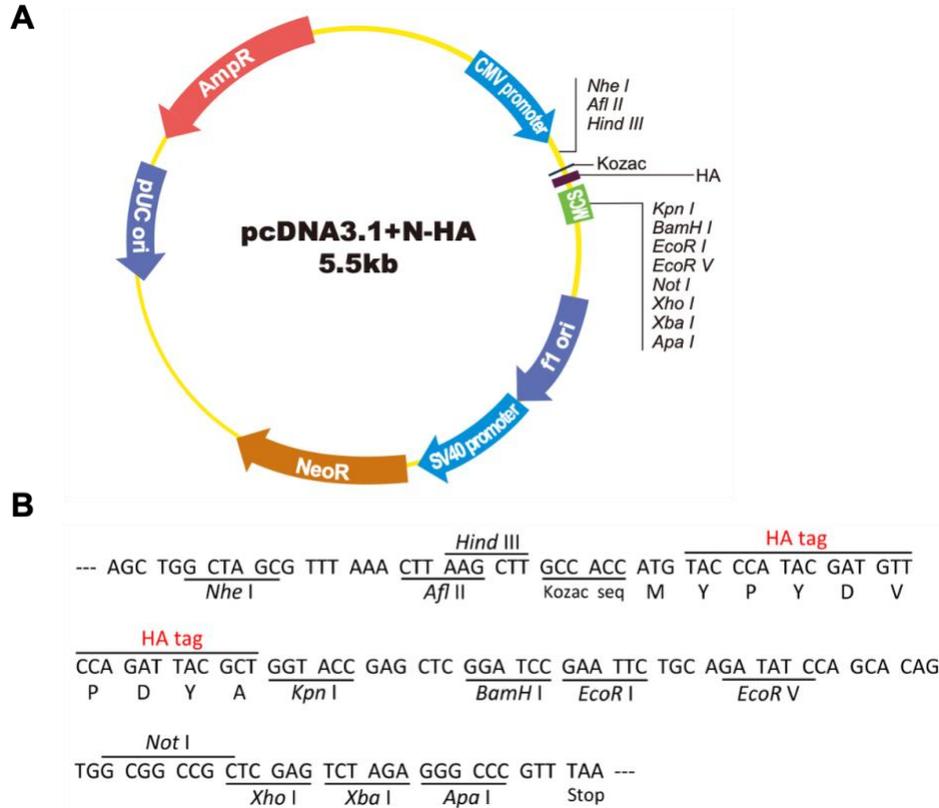
ANNEXE B

LISTE DES CLONES SH-SY5Y HA-PSMC5 WT ET P312R CONSERVÉS SUITE À LA SÉLECTION
CLONALE

Clone	Abondance de HA-PSMC5 (IB)	Abondance de HA-PSMC5 (IF)	Abondance de Rpt6 (IB)
WT			
A4 II	ND	-	Forte
B7 II	Faible	Forte	Faible
E10 II	Faible	Intermédiaire	Forte
F12 II	Forte	Forte	Forte
A7 III	Faible	Faible	Forte
A11 III	Intermédiaire	Forte	Intermédiaire
B6 III	Très faible	Faible	Forte
C1 III	Forte	Forte	Intermédiaire
A4 IIII	Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire
B11 IIII	Faible	Faible	Intermédiaire
C7 IIII	Forte	Forte	Intermédiaire
F7 IIII	Nulle	-	-
G12 IIII	Forte	Faible	Forte
P312R			
B7 III	Forte	Intermédiaire	Intermédiaire
C1 III	Faible	Intermédiaire	Intermédiaire
E8 III	Intermédiaire	Forte	Forte
G10 III	Intermédiaire	Forte	Forte
H4 III	Faible	Intermédiaire	Intermédiaire
A6 IIII	Forte	Intermédiaire	Intermédiaire
E6 IIII	Très faible	Faible	Forte
F5 IIII	Forte	Forte	Forte

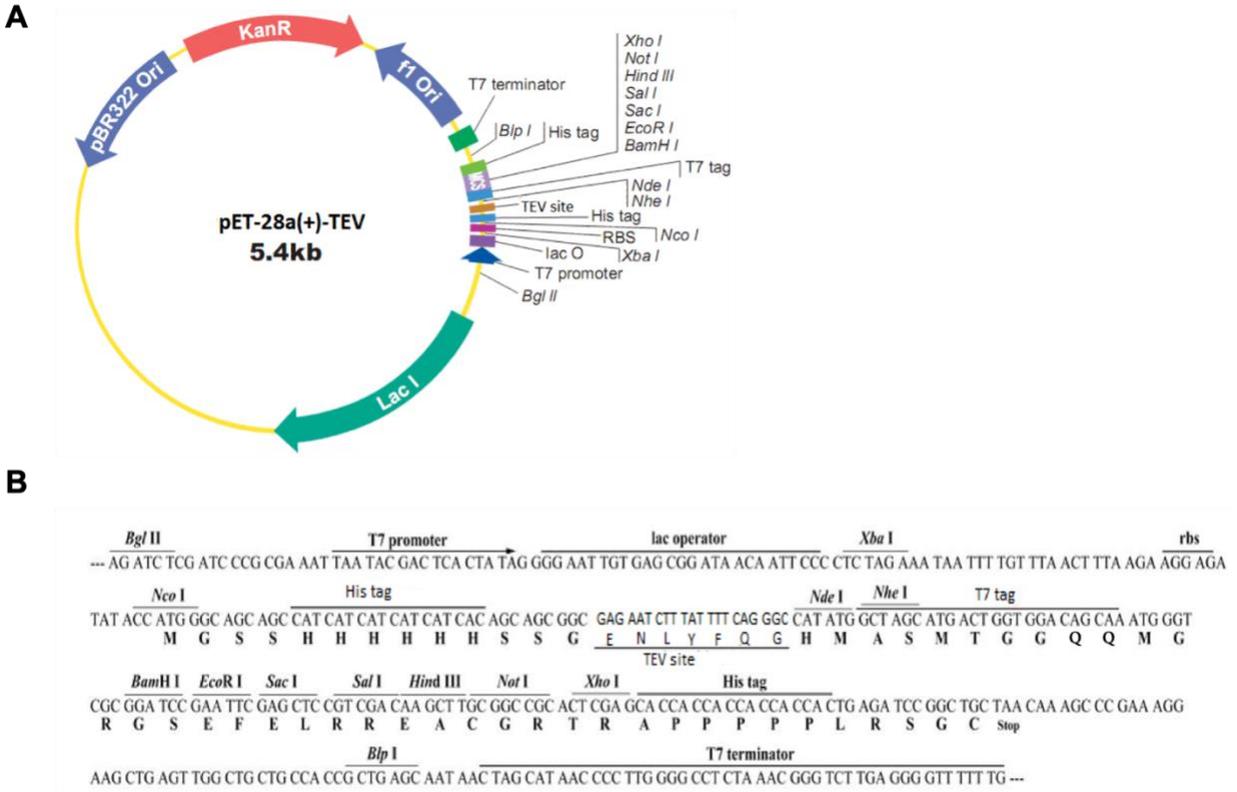
L'identifiant des clones représente leur puits d'origine dans la plaque de 96 puits et les symboles II, III et IIII, la dilution initiale de la plaque de 96 puits (section 2.6). II, dilution de 2 cellules par puits; III et IIII, dilution de 1 cellule par puits. Les niveaux d'abondance de HA-PSMC5 et Rpt6 proviennent de la deuxième sélection par immunobuvardage et immunofluorescence. Seulement un clone avec une abondance nulle de HA-PSMC5 a été inclus dans la deuxième étape de sélection. IB, immunobuvardage; IF, immunofluorescence; ND, non détectable.

APPENDICE A
VECTEUR pcDNA3.1+/N-HA



(A) Carte du plasmide. (B) Séquence nucléotidique de sites spécifiques aux enzymes de restriction. (GenScript).

APPENDICE B
VECTEUR pET-28a(+)-TEV



(A) Carte du plasmide. (B) Séquence nucléotidique de sites spécifiques aux enzymes de restriction. (GenScript)

BIBLIOGRAPHIE

- Abi Habib J, Lesenfants J, Vigneron N et Van den Eynde BJ (2022) Functional differences between proteasome subtypes. *Cells* 11: 421.
- Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, Ronneberger O, Willmore L, Ballard AJ, Bambrick J, et al. (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 630: 493-500.
- Alizadeh E, Xu W, Castle J, Foss J et Prasad A (2018) A comprehensive suite of measures to quantify cell shape and actin organization. *bioRxiv* 372755.
- Anton V, Buntbroich I, Simões T, Joaquim M, Müller L, Buettner R, Odenthal M, Hoppe T et Escobar-Henriques M (2023) E4 ubiquitin ligase promotes mitofusin turnover and mitochondrial stress response. *Molecular cell* 83: 2976-2990.e2979.
- Antoniou N, Lagopati N, Balourdas DI, Nikolaou M, Papalampros A, Vasileiou PVS, Myrianthopoulos V, Kotsinas A, Shiloh Y, Lontos M, et al. (2019) The role of E3, E4 ubiquitin ligase (UBE4B) in human pathologies. *Cancers* 12:
- Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K et Öllinger K (2013) The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *Journal of molecular cell biology* 5: 214-226.
- Artinian J, McGauran AM, De Jaeger X, Mouldous L, Frances B et Roulet P (2008) Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. *The European journal of neuroscience* 27: 3009-3019.
- Barooji YF, Hvid KG, Petitjean, II, Brickman JM, Oddershede LB et Bendix PM (2021) Changes in cell morphology and actin organization in embryonic stem cells cultured under different conditions. *Cells* 10: 2859.
- Barry DJ, Gerri C, Bell DM, D'Antuono R et Niakan KK (2022) GIANI – open-source software for automated analysis of 3D microscopy images. *Journal of cell science* 135: jcs259511.
- Basler M, Kirk CJ et Groettrup M (2013) The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current opinion in immunology* 25: 74-80.
- Baux D, Van Goethem C, Ardouin O, Guignard T, Bergougnoux A, Koenig M et Roux AF (2021) MobiDetails: online DNA variants interpretation. *European journal of human genetics* 29: 356-360.
- Bingol B et Schuman EM (2006) Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature* 441: 1144-1148.
- Birgisdottir ÅB et Johansen T (2020) Autophagy and endocytosis – interconnections and interdependencies. *Journal of cell science* 133: jcs228114.

- Blandini F, Sinforiani E, Pacchetti C, Samuele A, Bazzini E, Zangaglia R, Nappi G et Martignoni E (2006) Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Neurology* 66: 529-534.
- Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, Collins RL, Kanai M, Wang Q, Alföldi J, Watts NA, Vittal C, Gauthier LD, et al. (2024) A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes. *Nature* 625: 92-100.
- Chen X, Zhang X, Wang Y, Lei H, Su H, Zeng J, Pei Z et Huang R (2015) Inhibition of immunoproteasome reduces infarction volume and attenuates inflammatory reaction in a rat model of ischemic stroke. *Cell death & disease* 6: e1626.
- Chocron ES, Munkácsy E, Kim HS, Karpowicz P, Jiang N, Van Skike CE, DeRosa N, Banh AQ, Palavicini JP, Wityk P, et al. (2022) Genetic and pharmacologic proteasome augmentation ameliorates Alzheimer's-like pathology in mouse and fly APP overexpression models. *Science advances* 8: eabk2252.
- Chugh P et Paluch EK (2018) The actin cortex at a glance. *Journal of cell science* 131: jcs186254.
- Coban CS et Mutluay D (2021) Effects of bortezomib on mouse preimplantation embryo development in vitro. *Birth defects research* 113: 1182-1189.
- Cuinat S, Bézieau S, Deb W, Mercier S, Vignard V, Isidor B, Küry S et Ebstein F (2024a) Understanding neurodevelopmental proteasomopathies as new rare disease entities: A review of current concepts, molecular biomarkers, and perspectives. *Genes & diseases* 11: 101130.
- Cuinat S, Bézieau S, Deb W, Mercier S, Vignard V, Toutain B, Isidor B, Küry S et Ebstein F (2024b) [Neurodevelopmental proteasomopathies: new disorders caused by proteasome dysfunction]. *Medicine sciences* 40: 176-185.
- Davidson K et Pickering AM (2023) The proteasome: a key modulator of nervous system function, brain aging, and neurodegenerative disease. *Frontiers in cell and developmental biology* 11: 1124907.
- de la Peña AH, Goodall EA, Gates SN, Lander GC et Martin A (2018) Substrate-engaged 26S proteasome structures reveal mechanisms for ATP-hydrolysis-driven translocation. *Science* 362: eaav0725.
- DeMaagd G et Philip A (2015) Parkinson's disease and its management: part 1: disease entity, risk factors, pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management* 40: 504-532.
- Desroches S et Harris AR (2023) Quantifying cytoskeletal organization from optical microscopy data. *Frontiers in cell and developmental biology* 11: 1327994.
- Ding J, Chen P et Qi C (2024) Circadian rhythm regulation in the immune system. *Immunology* 171: 525-533.
- Dong C, Upadhya SC, Ding L, Smith TK et Hegde AN (2008) Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learning & memory* 15: 335-347.

- Dong Y, Zhang S, Wu Z, Li X, Wang WL, Zhu Y, Stoilova-McPhie S, Lu Y, Finley D et Mao Y (2019) Cryo-EM structures and dynamics of substrate-engaged human 26S proteasome. *Nature* 565: 49-55.
- Dravid A, Raos B, Svirskis D et O'Carroll SJ (2021) Optimised techniques for high-throughput screening of differentiated SH-SY5Y cells and application for neurite outgrowth assays. *Scientific Reports* 11: 23935.
- Dunn KW, Kamocka MM et McDonald JH (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American journal of physiology, Cell physiology* 300: C723-742.
- Dwane S, Durack E et Kiely PA (2013) Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. *BMC research notes* 6: 366.
- Ehlinger A et Walters KJ (2013) Structural insights into proteasome activation by the 19S regulatory particle. *Biochemistry* 52: 3618-3628.
- Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, Vielhaber EL, Giovanni A et Virshup DM (2005) Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Molecular and cellular biology* 25: 2795-2807.
- Fabre B, Lambour T, Garrigues L, Ducoux-Petit M, Amalric F, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O et Bousquet-Dubouch MP (2014) Label-free quantitative proteomics reveals the dynamics of proteasome complexes composition and stoichiometry in a wide range of human cell lines. *Journal of proteome research* 13: 3027-3037.
- Felsenberg J, Dombrowski V et Eisenhardt D (2012) A role of protein degradation in memory consolidation after initial learning and extinction learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Learning & memory* 19: 470-477.
- Ferreira ST, Lourenco MV, Oliveira MM et De Felice FG (2015) Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 9: 191.
- Finkbeiner S (2011) Huntington's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3: a007476.
- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM et Carter NP (2009) DECIPHER: database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensembl resources. *American journal of human genetics* 84: 524-533.
- Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T et Nägerl UV (2006) A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron* 52: 239-245.
- Forsgren E, Edlund C, Oliver M, Barnes K, Sjögren R et Jackson TR (2022) High-throughput widefield fluorescence imaging of 3D samples using deep learning for 2D projection image restoration. *PLoS one* 17: e0264241.
- Frankowska N, Lisowska K et Witkowski JM (2022) Proteolysis dysfunction in the process of aging and age-related diseases. *Frontiers in aging* 3: 927630.

- Frantzeskakis M, Takahama Y et Ohigashi I (2021) The Role of proteasomes in the thymus. *Frontiers in immunology* 12: 646209.
- Gao C, Jiang J, Tan Y et Chen S (2023) Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy* 8: 359.
- Dans pcDNA3.1+N-HA. Récupéré le de https://www.genscript.com/gsfiles/vector-map/mammalian/pcDNA3.1-N-HA.pdf?page_no=1&position_no=1&sensors=search_information
- Dans pET-28a(+)-TEV. Récupéré le de https://www.genscript.com/gsfiles/vector%2dmap/bacteria/pET%2d28a%2dTEV%2epdf?page_no=1?1673463810
- Glickman MH et Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* 82: 373-428.
- Goldbaum O, Riedel M, Stahnke T et Richter-Landsberg C (2009) The small heat shock protein HSP25 protects astrocytes against stress induced by proteasomal inhibition. *Glia* 57: 1566-1577.
- Gomes AV (2013) Genetics of proteasome diseases. *Scientifica* 2013: 637629.
- Gorzelnik K, Janke J, Engeli S et Sharma AM (2001) Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Hormone and metabolic research* 33: 625-627.
- Grabarczyk DB, Ehrmann JF, Murphy P, Kurzbauer R, Bell LE, Deszcz L, Neuhold J, Schleiffer A, Shulkina A, Versteeg GA, et al. (2024) Architecture of the UBR4 complex, a giant E4 ligase central to eukaryotic protein quality control. *bioRxiv* 2024.2012.2018.629163.
- Gregori L, Fuchs C, Figueiredo-Pereira ME, Van Nostrand WE et Goldgaber D (1995) Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *The Journal of biological chemistry* 270: 19702-19708.
- Guillaume B, Chapiro J, Stroobant V, Colau D, Van Holle B, Parvizi G, Bousquet-Dubouch MP, Théate I, Parmentier N et Van den Eynde BJ (2010) Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 18599-18604.
- Guo B, Gurel PS, Shu R, Higgs HN, Pellegrini M et Mierke DF (2014) Monitoring ATP hydrolysis and ATPase inhibitor screening using (1)H NMR. *Chemical communications* 50: 12037-12039.
- Guo F, Liu X, Cai H et Le W (2018) Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain pathology* 28: 3-13.
- Gutala RV et Reddy PH (2004) The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *Journal of neuroscience methods* 132: 101-107.
- Hall B, Limaye A et Kulkarni AB (2009) Overview: generation of gene knockout mice. *Current protocols in cell biology Chapter 19: Unit 19.12* 19.12.11-17.

- Hamilton AM, Oh WC, Vega-Ramirez H, Stein IS, Hell JW, Patrick GN et Zito K (2012) Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome. *Neuron* 74: 1023-1030.
- Hu P, Zhang W, Xin H et Deng G (2016) Single cell isolation and analysis. *Frontiers in cell and developmental biology* 4: 116.
- Hu YB, Dammer EB, Ren RJ et Wang G (2015) The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Translational neurodegeneration* 4: 18.
- Huang Q et Figueiredo-Pereira ME (2010) Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications. *Apoptosis* 15: 1292-1311.
- Jana NR, Zemskov EA, Wang G et Nukina N (2001) Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Human molecular genetics* 10: 1049-1059.
- Kabashi E, Agar JN, Strong MJ et Durham HD (2012) Impaired proteasome function in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis* 13: 367-371.
- Khilji MS, Verstappen D, Dahlby T, Burstein Prause MC, Pihl C, Bresson SE, Bryde TH, Keller Andersen PA, Klindt K, Zivkovic D, et al. (2020) The intermediate proteasome is constitutively expressed in pancreatic beta cells and upregulated by stimulatory, low concentrations of interleukin 1 beta. *PLoS one* 15: e0222432.
- Kövari E, Horvath J et Bouras C (2009) Neuropathology of lewy body disorders. *Brain research bulletin* 80: 203-210.
- Kumar Deshmukh F, Yaffe D, Olshina MA, Ben-Nissan G et Sharon M (2019) The contribution of the 20S proteasome to proteostasis. *Biomolecules* 9: 190.
- Küry S, Stanton JE, van Woerden G, Hsieh TC, Rosenfelt C, Scott-Boyer MP, Most V, Wang T, Papendorf JJ, de Konink C, et al. (2024) Unveiling the crucial neuronal role of the proteasomal ATPase subunit gene *PSMC5* in neurodevelopmental proteasomopathies. *medRxiv*
- Lee JL (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature neuroscience* 11: 1264-1266.
- Lee JY et Kitaoka M (2018) A beginner's guide to rigor and reproducibility in fluorescence imaging experiments. *Molecular biology of the cell* 29: 1519-1525.
- Leestemaker Y, de Jong A, Witting KF, Penning R, Schuurman K, Rodenko B, Zaal EA, van de Kooij B, Laufer S, Heck AJR, et al. (2017) Proteasome activation by small molecules. *Cell chemical biology* 24: 725-736.e727.
- Legland D, Arganda-Carreras I et Andrey P (2016) MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* 32: 3532-3534.

- Li Z, Arnaud L, Rockwell P et Figueiredo-Pereira ME (2004) A single amino acid substitution in a proteasome subunit triggers aggregation of ubiquitinated proteins in stressed neuronal cells. *Journal of neurochemistry* 90: 19-28.
- Long F, Zhou J et Peng H (2012) Visualization and analysis of 3D microscopic images. *PLoS computational biology* 8: e1002519.
- Lopes FM, Schroder R, da Frota ML, Jr., Zanotto-Filho A, Muller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczynski F, et al. (2010) Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research* 1337: 85-94.
- Lopez Salon M, Pasquini L, Besio Moreno M, Pasquini JM et Soto E (2003) Relationship between beta-amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells. *Experimental neurology* 180: 131-143.
- Lopez-Salon M, Alonso M, Vianna MR, Viola H, Mello e Souza T, Izquierdo I, Pasquini JM et Medina JH (2001) The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *The European journal of neuroscience* 14: 1820-1826.
- Maloy A, Alexander S, Andreas A, Nyunoya T et Chandra D (2022) Stain-Free total-protein normalization enhances the reproducibility of Western blot data. *Analytical biochemistry* 654: 114840.
- Martinez-Fonts K, Davis C, Tomita T, Elsasser S, Nager AR, Shi Y, Finley D et Matouschek A (2020) The proteasome 19S cap and its ubiquitin receptors provide a versatile recognition platform for substrates. *Nature communications* 11: 477.
- McCarthy MK et Weinberg JB (2015) The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Frontiers in microbiology* 6: 21.
- McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P et Olanow CW (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Experimental neurology* 179: 38-46.
- McNaught KS et Jenner P (2001) Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 297: 191-194.
- Medina A, Mahjoub Y, Shaver L et Pringsheim T (2022) Prevalence and incidence of Huntington's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Movement disorders* 37: 2327-2335.
- Merlo E et Romano A (2007) Long-term memory consolidation depends on proteasome activity in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 147: 46-52.
- Middeldorp J, Kamphuis W, Sluijs JA, Achoui D, Leenaars CH, Feenstra MG, van Tijn P, Fischer DF, Berkers C, Ovaas H, et al. (2009) Intermediate filament transcription in astrocytes is repressed by proteasome inhibition. *FASEB journal* 23: 2710-2726.
- Minis A, Rodriguez JA, Levin A, Liu K, Govek E-E, Hatten ME et Steller H (2019) The proteasome regulator PI31 is required for protein homeostasis, synapse maintenance, and neuronal survival in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 24639-24650.

- Mizushima N, Yoshimori T et Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology* 27: 107-132.
- Moritz KE, McCormack NM, Abera MB, Viollet C, Yauger YJ, Sukumar G, Dalgard CL et Burnett BG (2017) The role of the immunoproteasome in interferon- γ -mediated microglial activation. *Scientific reports* 7: 9365.
- Myeku N, Metcalfe MJ, Huang Q et Figueiredo-Pereira M (2011) Assessment of proteasome impairment and accumulation/aggregation of ubiquitinated proteins in neuronal cultures. *Methods in molecular biology* 793: 273-296.
- Myers N, Olender T, Savidor A, Levin Y, Reuven N et Shaul Y (2018) The disordered landscape of the 20S proteasome substrates reveals tight association with phase separated granules. *Proteomics* 18: e1800076.
- National Library of Medicine (2025a) *PSMB4 proteasome 20S subunit beta 4 [Homo sapiens (human)]*.
- National Library of Medicine (2025b) *PSMD4 proteasome 26S subunit ubiquitin receptor, non-ATPase 4 [Homo sapiens (human)]*.
- Nunes AT et Annunziata CM (2017) Proteasome inhibitors: structure and function. *Seminars in oncology* 44: 377-380.
- O'Brien RJ et Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience* 34: 185-204.
- Oddo S (2008) The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 12: 363-373.
- Oh S, Hong HS, Hwang E, Sim HJ, Lee W, Shin SJ et Mook-Jung I (2005) Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mechanisms of ageing and development* 126: 1292-1299.
- Ohnishi YH, Ohnishi YN, Nakamura T, Ohno M, Kennedy PJ, Yasuyuki O, Nishi A, Neve R, Tsuzuki T et Nestler EJ (2015) PSMC5, a 19S proteasomal ATPase, regulates cocaine action in the nucleus accumbens. *PloS one* 10: e0126710.
- Ortega-Carrion A, Feo-Lucas L et Vicente-Manzanares M (2016) Cell migration. Dans *Encyclopedia of Cell Biology*. Bradshaw RA et Stahl PD, eds. Academic Press. Waltham.
- Otey CA, Boukhelifa M et Maness P (2003) B35 neuroblastoma cells: an easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons. *Methods in cell biology* 71: 287-304.
- Palmer JE, Wilson N, Son SM, Obrocki P, Wrobel L, Rob M, Takla M, Korolchuk VI et Rubinsztein DC (2025) Autophagy, aging, and age-related neurodegeneration. *Neuron* 113: 29-48.
- Percipalle P et Vartiainen M (2019) Cytoskeletal proteins in the cell nucleus: a special nuclear actin perspective. *Molecular biology of the cell* 30: 1781-1785.

- Peth A, Kukushkin N, Bossé M et Goldberg AL (2013a) Ubiquitinated proteins activate the proteasomal ATPases by binding to Usp14 or Uch37 homologs. *The Journal of biological chemistry* 288: 7781-7790.
- Peth A, Nathan JA et Goldberg AL (2013b) The ATP costs and time required to degrade ubiquitinated proteins by the 26 S proteasome. *The Journal of biological chemistry* 288: 29215-29222.
- Phatnani H et Maniatis T (2015) Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7: a020628.
- Pollard TD et Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208-1212.
- Radnai L, Stremel RF, Sellers JR, Rumbaugh G et Miller CA (2019) A semi-high-throughput adaptation of the NADH-coupled ATPase assay for screening small molecule inhibitors. *Journal of visualized experiments*
- Rajna M et Irena Z (2020) Optimization, validation and standardization of ELISA. Dans *Norovirus*. Gyula M, ed. IntechOpen. Rijeka.
- Ramachandran KV, Fu JM, Schaffer TB, Na CH, Delannoy M et Margolis SS (2018) Activity-dependent degradation of the nascentome by the neuronal membrane proteasome. *Molecular cell* 71: 169-177.e166.
- Ramachandran KV et Margolis SS (2017) A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function. *Nature structural & molecular biology* 24: 419-430.
- Rangamani P, Xiong GY et Iyengar R (2014) Multiscale modeling of cell shape from the actin cytoskeleton. *Progress in molecular biology and translational science* 123: 143-167.
- Ribeiro FC, Cozachenko D, Heimfarth L, Fortuna JTS, de Freitas GB, de Sousa JM, Alves-Leon SV, Leite REP, Suemoto CK, Grinberg LT, et al. (2023) Synaptic proteasome is inhibited in Alzheimer's disease models and associates with memory impairment in mice. *Communications biology* 6: 1127.
- Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, Saucedo-Alquicira F, Cruz-Castañeda P et Bermudez-Rattoni F (2011) Long-term aversive taste memory requires insular and amygdala protein degradation. *Neurobiology of learning and memory* 95: 311-315.
- Roos RA (2010) Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet journal of rare diseases* 5: 40.
- Ruan W et Lai M (2007) Actin, a reliable marker of internal control? *Clinica chimica acta* 385: 1-5.
- Sahu I et Glickman MH (2021) Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome. *Biochemical Society transactions* 49: 629-644.
- Sahu I, Mali SM, Sulkshane P, Xu C, Rozenberg A, Morag R, Sahoo MP, Singh SK, Ding Z, Wang Y, et al. (2021) The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag. *Nature communications* 12: 6173.

- Salbreux G, Charras G et Paluch E (2012) Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends in cell biology* 22: 536-545.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9: 676-682.
- Seo H, Sonntag KC et Isacson O (2004) Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Annals of neurology* 56: 319-328.
- Shiple MM, Mangold CA et Szpara ML (2016) Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of visualized experiments* 53193.
- Simoes RF, Ferrao R, Silva MR, Pinho SLC, Ferreira L, Oliveira PJ et Cunha-Oliveira T (2021) Refinement of a differentiation protocol using neuroblastoma SH-SY5Y cells for use in neurotoxicology research. *Food and chemical toxicology* 149: 111967.
- Smith DM, Fraga H, Reis C, Kafri G et Goldberg AL (2011) ATP binds to proteasomal ATPases in pairs with distinct functional effects, implying an ordered reaction cycle. *Cell* 144: 526-538.
- Stavnsbjerg C, Jørgensen JS, Engel TB, Brus A, Ringgaard L, Hansen AE, Kjaer A et Andresen TL (2022) Matrix effect in tumor lysates - does it affect your cytokine ELISA and multiplex analyses? *Journal of immunological methods* 500: 113177.
- Strother L, Miles GB, Holiday AR, Cheng Y et Doherty GH (2021) Long-term culture of SH-SY5Y neuroblastoma cells in the absence of neurotrophins: a novel model of neuronal ageing. *Journal of neuroscience methods* 362: 109301.
- Svitkina TM (2020) Actin cell cortex: structure and molecular organization. *Trends in cell biology* 30: 556-565.
- Tanaka K (2009) The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences* 85: 12-36.
- Tang S, Tao J et Li Y (2023) Challenges and solutions for the downstream purification of therapeutic proteins. *Antibody therapeutics* 7: 1-12.
- Teppola H, Sarkanen JR, Jalonen TO et Linne ML (2016) Morphological differentiation towards neuronal phenotype of SH-SY5Y neuroblastoma cells by estradiol, retinoic acid and cholesterol. *Neurochemical research* 41: 731-747.
- Thomas T, Salcedo-Tacuma D et Smith DM (2023) Structure, function, and allosteric regulation of the 20S proteasome by the 11S/PA28 family of proteasome activators. *Biomolecules* 13: 1326.
- Tooze SA, Abada A et Elazar Z (2014) Endocytosis and autophagy: exploitation or cooperation? *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6: a018358.

- Tremblay RG, Sikorska M, Sandhu JK, Lanthier P, Ribecco-Lutkiewicz M et Bani-Yaghoub M (2010) Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of neuroscience methods* 186: 60-67.
- Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M et LaFerla FM (2008) Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiology of aging* 29: 1607-1618.
- Türker F, Cook EK et Margolis SS (2021) The proteasome and its role in the nervous system. *Cell chemical biology* 28: 903-917.
- Uechi H, Hamazaki J et Murata S (2014) Characterization of the testis-specific proteasome subunit alpha4s in mammals. *The Journal of biological chemistry* 289: 12365-12374.
- van Ooijen G, Dixon LE, Troein C et Millar AJ (2011) Proteasome function is required for biological timing throughout the twenty-four hour cycle. *Current biology* 21: 869-875.
- Ve H, Cabana VC, Gouspillou G et Lussier MP (2020) Quantitative immunoblotting analyses reveal that the abundance of actin, tubulin, synaptophysin and EEA1 proteins is altered in the brains of aged mice. *Neuroscience* 442: 100-113.
- Veit S et Pomorski TG (2023) Measuring in vitro ATPase activity with high sensitivity using radiolabeled ATP. *Bio-protocol* 13: e4676.
- Verkhatsky A, Rodríguez JJ et Parpura V (2013) Astroglia in neurological diseases. *Future neurology* 8: 149-158.
- Vigneron N, Abi Habib J et Van den Eynde BJ (2015) The capture proteasome assay (CAPA) to evaluate subtype-specific proteasome inhibitors. *Data in brief* 4: 146-151.
- Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A et Barg E (2020) PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions. *Cells* 9: 958.
- (2024) Dans The top 10 causes of death. Récupéré le de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death#:~:text=In%202021%2C%20Alzheimer's%20disease%20and,increase%20of%2095%25%20since%202000.>
- Wu Y et Li Q (2022) The algorithm of watershed color image segmentation based on morphological gradient. *Sensors* 22: 8202.
- Wu Y, Zhang J, Peng B, Tian D, Zhang D, Li Y, Feng X, Liu J, Li J, Zhang T, et al. (2019) Generating viable mice with heritable embryonically lethal mutations using the CRISPR-Cas9 system in two-cell embryos. *Nature communications* 10: 2883.
- Ye M, Wilhelm M, Gentshev I et Szalay A (2021) A modified limiting dilution method for monoclonal stable cell line selection using a real-time fluorescence imaging system: a practical workflow and advanced applications. *Methods and protocols* 4: 16.

- Yu ZQ, Carmichael J, Collins GA, D'Agostino MD, Lessard M, Firth HV, Harijan P, Fry AE, Dean J, Zhang J, et al. (2024) PSMC5 insufficiency and P320R mutation impair proteasome function. *Human molecular genetics* 33: 1506-1523.
- Yusuf M, Leung K, Morris KJ et Volpi EV (2013) Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. *Neurogenetics* 14: 63-70.
- Zeb Q, Wang C, Shafiq S et Liu L (2019) Chapter 6 - an overview of single-cell isolation techniques. Dans *Single-Cell Omics*. Barh D et Azevedo V, eds. Academic Press.
- Zemoura K et Benke D (2014) Proteasomal degradation of γ -aminobutyric acidB receptors is mediated by the interaction of the GABAB2 C terminus with the proteasomal ATPase Rtp6 and regulated by neuronal activity. *The Journal of biological chemistry* 289: 7738-7746.
- Zeng Y, Guo Z, Wu M, Chen F et Chen L (2024) Circadian rhythm regulates the function of immune cells and participates in the development of tumors. *Cell death discovery* 10: 199.
- Zhang ZH, Jiang TX, Chen LB, Zhou W, Liu Y, Gao F et Qiu XB (2021) Proteasome subunit alpha4s is essential for formation of spermatoproteasomes and histone degradation during meiotic DNA repair in spermatocytes. *The Journal of biological chemistry* 296: 100130.