

2019-2020

Filière recherche

Thèse

pour le

Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

**CONCEPTION PAR MODÉLISATION MOLÉCULAIRE
DE NOUVEAUX ACTIFS XANTHONIQUES,
INHIBITEURS DE LA PROTÉINE IRE1 IMPLIQUÉE
DANS LA VOIE UPR (UNFOLDED PROTEIN
RESPONSE)**

--

**THE DESIGN BY MOLECULAR MODELLING OF NEW
XANTHONIC ACTIVE AGENTS, INHIBITORS OF
THE PROTEIN IRE1 INVOLVED IN THE
UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR)
PATHWAY**

CHAMAS Mohamad

Né le 17 juillet 1993 à El-Wakef
(Liban)

Sous la direction de Dr. VIAULT Guillaume

Membres du jury

Pr. SERAPHIN Denis | Président

Dr. VIAULT Guillaume | Directeur

Dr. LE-RAY Anne-Marie | Co-Directrice

Pr. GUILLEMETTE Thomas | Membre

Soutenue à huis clos le :
10 février 2020



**FACULTÉ
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS

ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné **CHAMAS Mohamad**, déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signé par l'étudiant le **20/01/2020**

SERMENT



DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la
Faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans
Les préceptes de mon art et de leur
Témoigner ma reconnaissance en
Restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé
Publique, ma profession avec
Conscience et de respecter non
Seulement la législation en
Vigueur, mais aussi les règles de
L'honneur, de la probité et du
Désintéressement.

Ne ne jamais oublier ma responsabilité
Et mes devoirs envers le malade
Et sa dignité humaine ; en aucun
Cas, je ne consentirai à utiliser
Mes connaissances et mon état pour
Corrompre les mœurs et favoriser
Des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur
Estime si je suis fidèle à mes
Promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et
Méprisé de mes confrères si j'y
Manque



LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie : Pr Frédéric Lagarce

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
AZZOUZI Abdel Rahmène	Urologie	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BEYDON Laurent	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BOUVARD Béatrice	Rhumatologie	Médecine
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CAILLIEZ Eric	Médecine générale	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologue ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CHAPPARD Daniel	Cytologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
COUTURIER Olivier	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DE BRUX Jean-Louis	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine Générale	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
D'ESCATHA Alexis	Médecine et santé au travail	Médecine
DINOMAS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUBEE Vincent	Maladies Infectieuses et Tropicales	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
EVEILLARD Mathieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine
FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GARNIER François	Médecine générale	Médecine
GASCOIN Géraldine	Pédiatrie	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILLET David	Chimie analytique	Pharmacie
HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine



FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

HENNI Samir	Médecine Vasculaire	Médecine
HUNAUULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LEGENDRE Guillaume	Gynécologie-obstétrique	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine
LEROLLE Nicolas	Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et Santé au Travail	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et Biologie Moléculaire	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOMME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Thérapeutique	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
TRZEPIZUR Wojciech	Pneumologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	Pédiatrie	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie
VERNY Christophe	Neurologie	Médecine
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale	Médecine



FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANGOULVANT Cécile	Médecine Générale	Médecine
BAGLIN Isabelle	Chimie thérapeutique	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELLANGER William	Médecine générale	Médecine
BELONCLE François	Réanimation	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie	Pharmacie
BIERE Loïc	Cardiologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine
CLERE Nicolas	Pharmacologie / physiologie	Pharmacie
COLIN Estelle	Génétique	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FLEURY Maxime	Immunologie	Pharmacie
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
HAMEL Jean-François	Biostatistiques, informatique médicale	Médicale
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	Médecine générale	Médecine
KHIATI Salim	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie	Médecine
LACOEUILLE Franck	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
LANDREAU Anne	Botanique/ Mycologie	Pharmacie
LEBDAI Souhil	Urologie	Médecine
LEGEAY Samuel	Pharmacocinétique	Pharmacie
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Pharmacognosie	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
LUQUE PAZ Damien	Hématologie biologique	Médecine
MABILLEAU Guillaume	Histologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique	Pharmacie
MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAILHORIES Hélène	Bactériologie-virologie	Médecine
PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
PY Thibaut	Médecine Générale	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	Médecine Générale	Médecine
RINEAU Emmanuel	Anesthésiologie réanimation	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistiques	Pharmacie
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie



FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

SAVARY Camille	Pharmacologie-Toxicologie	Pharmacie
SCHMITT Françoise	Chirurgie infantile	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	Pharmacie Clinique et Education Thérapeutique	Pharmacie
TANGUY-SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion	Médecine
TESSIER-CAZENEUVE Christine	Médecine Générale	Médecine
VIAULT Guillaume	Chimie organique	Pharmacie

AUTRES ENSEIGNANTS

PRCE

BRUNOIS-DEBU Isabelle	Anglais	Pharmacie
-----------------------	---------	-----------

PRAG

AUTRET Erwan	Anglais	Médecine
BARBEROUSSE Michel	Informatique	Médecine
CHIKH Yamina	Économie-Gestion	Médecine
FISBACH Martine	Anglais	Médecine
O'SULLIVAN Kayleigh	Anglais	Médecine

PAST

CAVAILLON Pascal	Pharmacie Industrielle	Pharmacie
LAFFILHE Jean-Louis	Officine	Pharmacie
MOAL Frédéric	Pharmacie clinique	Pharmacie

ATER

KILANI Jaafar	Biotechnologie	Pharmacie
WAKIM Jamal	Biochimie et chimie biomoléculaire	Médecine

AHU

BRIS Céline	Biochimie et biologie moléculaire	Pharmacie
CHAPPE Marion	Pharmacotechnie	Pharmacie
LEBRETON Vincent	Pharmacotechnie	Pharmacie

CONTRACTUEL

FOUDI Nabil	Physiologie	Pharmacie
-------------	-------------	-----------

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord adresser mes plus chaleureux remerciements au directeur de ma thèse d'exercice, le Dr. VIAULT Guillaume et à la codirectrice Dr. LE-RAY Anne-Marie, pour leur appui scientifique, leur disponibilité permanente et leurs conseils au cours de l'élaboration de cette étude. Leurs remarques et corrections m'ont permis de progresser sereinement dans mon travail. Pour tout cela je les remercie.

Je tiens à remercier grandement les Pr. SERAPHIN Denis et Pr. GUILLEMETTE Thomas pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de faire partie du jury d'évaluation de ma thèse d'exercice.

Je remercie également DIHN Chau Phi de m'avoir formé sur les logiciels GOLD[®] et LigandScout[®] utilisés dans la partie expérimentale de cette étude. Il m'a été d'une aide précieuse.

Ensuite, je tiens à remercier le laboratoire SONAS, représenté par son directeur le Pr. RICHOMME Pascal, de m'avoir gentiment accueilli pour la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse.

Je n'oublie surtout pas de remercier mes collègues, mes proches et mes amis, qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de cette étude.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille : mes parents, mes sœurs et mon frère, pour leur soutien, leur encouragement et leur aide durant mes années d'études. Qu'ils soient aussi remerciés pour leurs sacrifices...

Sommaire

I.	INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.	Le Réticulum Endoplasmique et la synthèse protéique	1
2.	La protéine chaperonne BiP « <i>Binding Immunoglobulin Protein</i> »	4
II.	CHAPITRE I : LA VOIE UPR « <i>UNFOLDED PROTEIN RESPONSE</i> »	6
1.	Introduction : Le stress du RE et la voie UPR	6
2.	La voie UPR chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.1.	Le mécanisme d'action de la protéine Ire1p	7
2.2.	Les voies de régulation additionnelles chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
3.	La voie UPR chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
3.1.	Le mécanisme d'action des facteurs de transcription bZIP17 et bZIP28	14
3.2.	Le mécanisme d'action de la voie IRE1/bZIP60	16
3.3.	Les facteurs de transcription NAC	18
3.4.	L'autophagie chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
4.	La voie UPR chez les mammifères	22
4.1.	Le mécanisme d'action de la protéine PERK.....	23
4.2.	Le mécanisme d'action de la protéine IRE1	24
4.3.	Le mécanisme d'action de la protéine d'ATF6.....	28
4.4.	La mort cellulaire par apoptose induite par la voie UPR.....	30
4.4.1.	La voie extrinsèque.....	32
4.4.2.	La voie intrinsèque	33
4.5.	Integrated Stress Response	35
5.	Conclusion	36
III.	CHAPITRE II : L'IMPLICATION DE LA VOIE UPR DANS LES PATHOLOGIES HUMAINES	38
1.	Introduction : La voie UPR et les « maladies conformationnelles »	38
2.	La voie UPR et les maladies inflammatoires	38
2.1.	L'athérosclérose et les cardiopathies ischémiques.....	45
2.2.	L'asthme et les infections virales et fongiques	47
3.	La voie UPR et les maladies métaboliques	51
3.1.	Le Diabète	51
3.1.1.	Le Diabète Central Insipide.....	53
3.1.2.	Le Syndrome de Wolfram	54
3.1.3.	Le Syndrome de Wolcott-Rallison	54
3.2.	L'obésité et le diabète	54
4.	La voie UPR et les maladies neurodégénératives	56
4.1.	La maladie d'Alzheimer	57
4.2.	La maladie de Parkinson	60
4.3.	La sclérose latérale amyotrophique	62
4.4.	La maladie de Huntington	63
4.5.	L'épilepsie	64
5.	La voie UPR et les maladies tumorales	64
6.	Conclusion	72
IV.	CHAPITRE III : REVUE SUR LES MODULATEURS PHARMACOLOGIQUES DE LA VOIE UPR	74
1.	Introduction : Les stratégies thérapeutiques	74
2.	Les modulateurs de la voie UPR	74

2.1.	Les inhibiteurs des protéines chaperonnes	74
2.1.1.	OSU03012	74
2.1.2.	MAb159	75
2.1.3.	Tanespimycine.....	76
2.2.	Les inhibiteurs de l'ERAD	76
2.2.1.	Bortézomib	76
2.2.2.	Eeyarestatine I	77
2.3.	Les inducteurs du stress réticulaire	77
2.4.	Les inhibiteurs du stress réticulaire	81
2.5.	Les modulateurs de la protéine PERK.....	82
2.6.	Les modulateurs de la protéine ATF6	86
2.7.	Les modulateurs de la protéine IRE1	88
2.7.1.	Les ligands du domaine kinase : compétitifs de l'ATP	93
2.7.2.	Les ligands du domaine RNase	95
2.7.3.	L'interaction protéine-ligand dans le domaine RNase.....	104
2.7.4.	Le ligand de la poche interface dimère « Q site »	107
2.7.5.	Les autres modulateurs de l'axe IRE1/XBP1	107
3.	Conclusion	110
V.	CHAPITRE IV : ÉTUDE « DOCKING » IN SILICO DES XANTHONES DU MANGOUSTAN AVEC IRE1α/A	111
1.	Introduction : les xanthoïdes et la voie UPR	111
2.	Matériels & Méthodes	114
2.1.	L'alignement des séquences d'acides aminés.....	114
2.2.	Le choix des structures cristallines 3D.....	115
2.2.1.	Chez <i>Homo sapiens</i>	115
2.2.2.	Chez <i>Mus musculus</i>	117
2.2.3.	Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
2.3.	La préparation des ligands	119
2.4.	L'amarrage « Docking » des ligands sur le logiciel GOLD [®]	120
2.5.	L'étude des interactions ligand-protéine	124
3.	Résultats & Discussion.....	125
3.1.	Validation du site de liaison	125
3.2.	Les résultats de l'amarrage des xanthones avec IRE1 α /a	128
3.2.1.	Garcinone E	130
3.2.2.	α -mangostin.....	132
3.2.3.	Cudraxanthone	134
3.2.4.	Les interactions ligand-protéine.....	137
3.3.	Validation du modèle	138
3.3.1.	Le modèle semi-quantitatif	138
3.3.2.	Le modèle qualitatif	138
VI.	CONCLUSION & PERSPECTIVES	141
	BIBLIOGRAPHIE	143
	LISTE DES FIGURES	158
	LISTE DES TABLEAUX	160
	ANNEXE	161

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adenosine DiPhosphate
AINS	Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdien
ALH	Accepteur de Liaison Hydrogène
APP	Amyloid Precursor Protein
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosine TriPhosphate
AVP	Arginine-VasoPressine
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
bZIP	basic leucine ZIPper
CCL2	CC-chemokine Ligand 2
CHOP	CEBP HOmologous Protein
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNX	CalNéXine
COP	Coat Protein Complex
CRT	CalRéTiculine
DLH	Donneur de Liaison Hydrogène
DTI/II	Diabète de Type I/II
eIF2	eukaryotic translation Initiation Factor 2
EOR	ER Overload Response
ERAD	ER-Associated Degradation
ERO1	ER Oxidoreductin 1
ERSE	ER Stress Element
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
GADD	Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein
GCN	General Control Nonderepressible protein
GRP	Glucose-Regulated Protein
HAC1	Homologous to Activating transcription factor/cAMP-Response-Element-Binding 1
HERP	Homocysteine ER-induced Protein
HSP	Heat Shock Protein
IκB	Inhibiteur NF-κB
IKK	IκB Kinase
IL	InterLeukine
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme 1
ISR	Integrated Stress Response
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KAR2	KARyogamy 2
Kb	Kilo base

KDa	Kilo Dalton
LCM	Lymphome à Cellules du Manteau
LH	Liaison Hydrogène
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
MA	Maladie d'Alzheimer
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MH	Maladie de Huntington
MM	Myélome Multiple
MP	Maladie de Parkinson
NF-κB	Nuclear Factor κB
NRF2	NFE2-Related Factor 2
nt	Nucléotide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame
PAEL-R	Parkine Associated Endothelin receptor-Like Receptor
PCD	Programmed Cell Death
PDI	Protéine Disulfure Isomérase
PERK	PKR-like ER Protein Kinase
PKR	Protein Kinase RNA-activated
PPI	Peptidyl-Prolyl cis/trans-Isomérase
PS1/2	Présénilline 1/2
RCPG	Récepteur Couplé à la Protéine G
RE	Réticulum Endoplasmique
RIDD	Regulated IRE1-Dependent Decay
RIP	Regulated Intramembrane Proteolysis
ROS	Reactive Oxygen Species
SEP	Sclérose En Plaques
SERCA	Sarco/ER Ca ²⁺ -ATPase
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
S1/2P	Site 1/2 Protease
TLR	Toll-Like Receptor
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TNFα	Tumour Necrosis Factor α
TRAF2	TNF Receptor-Associated Factor 2
UMF	UPR Modulatory Factor
UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	Unfolded Protein Responsive Element
VCP	Valosin-Containing Protein
VDW	Van Der Waals
VEGF	Vascular Endothelial Growing Factor
VHC	Virus de l'Hépatite C
VHS	Virus Herpes Simplex
XBP1	X-box-binding protein 1

Espèce	Nom latin	Symbole du gène	Nom de la protéine
La souris	<i>Mus musculus</i>	<i>Abcd</i>	ABCD
L'Homme	<i>Homo sapiens</i>	<i>ABCD</i>	ABCD
La levure bourgeonnante	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ABCD</i>	Abcdp
L'arabette des dames	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ABCD</i>	ABCD

Tableau 1. La nomenclature suivie dans cette étude pour désigner les gènes et les protéines dans les différentes espèces.

I. Introduction générale

1. Le Réticulum Endoplasmique et la synthèse protéique

Le Réticulum Endoplasmique (RE) (**Figure 1.**) est un organeite dynamique qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie calcique, la signalisation, la sécrétion, ainsi que la biosynthèse des acides gras et des phospholipides destinés à l'assemblage des membranes biologiques. C'est également le principal compartiment subcellulaire impliqué dans la synthèse, le repliement et la modification post-transcriptionnelle des nouvelles protéines membranaires, ou sécrétoires, destinées à la surface des cellules ainsi qu'à d'autres organeites intracellulaires, tels que les lysosomes et l'appareil de Golgi¹⁻⁴. La lumière du RE contient 2 à 5 mM de la réserve de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire, contre 1 μM dans le cytosol². De plus, le RE représente la moitié des membranes d'une cellule et environ un tiers du protéome total y transite^{5,6}.

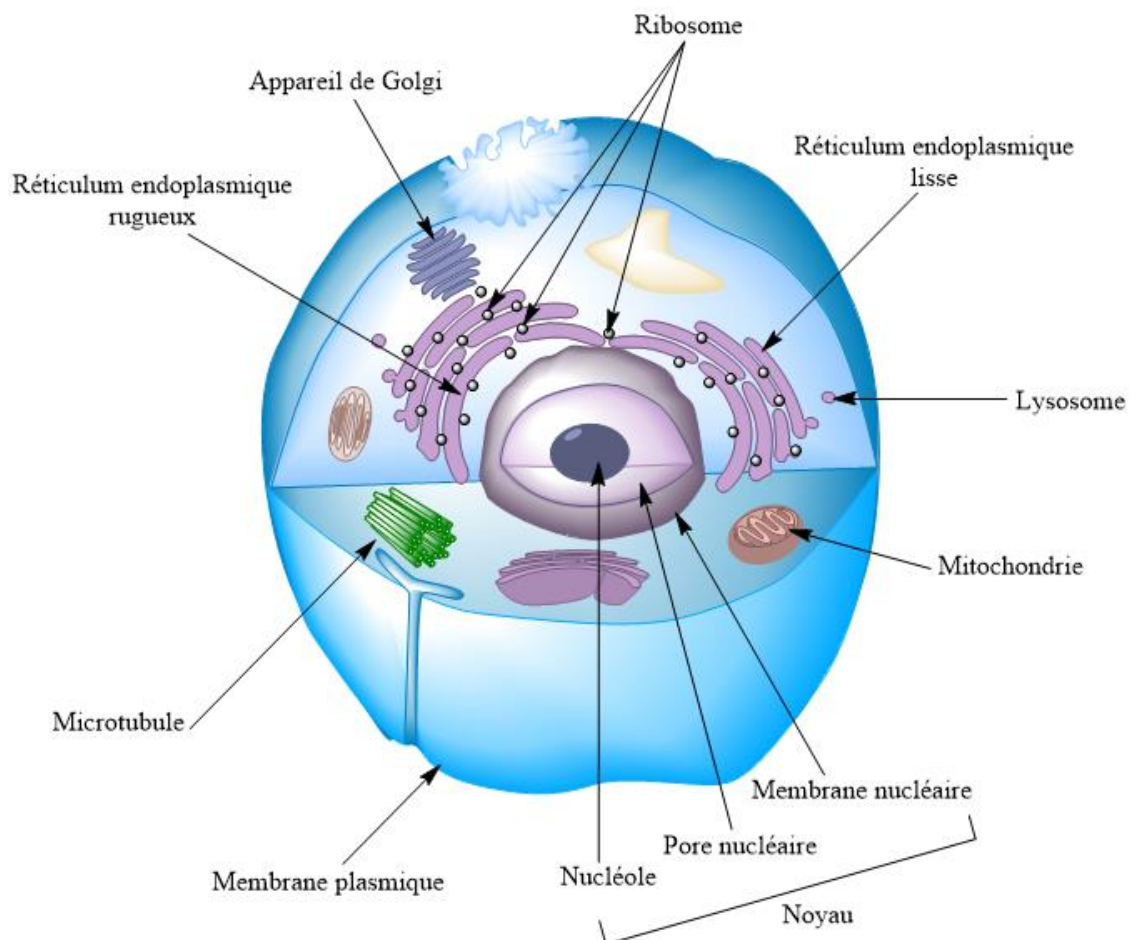


Figure 1. L'organisation des organites à l'intérieur de la cellule (ChemDraw®, PerkinElmer Informatics, version 16).

Les feuillettes et les tubules du RE sont appelés le RE rugueux et le RE lisse, respectivement. Le RE rugueux est abondant dans les cellules qui manifestent une grande capacité sécrétoire, telles que les cellules β pancréatiques sécrétant l'insuline. Le RE lisse est abondant dans les cellules musculaires, hépatiques et corticales surrénaliennes, responsables respectivement du stockage du Ca^{2+} , de la détoxification et de la production d'hormones stéroïdiennes⁷.

La biosynthèse des protéines (**Figure 2.**) est un mécanisme qui permet la traduction de l'information génétique en séquences d'acides aminés (AA). L'information est portée par l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), puis elle est transcrite en ARN messager (ARNm, Acide RiboNucléique messenger) qui, à son tour, est traduit en séquence d'AA. Cette biosynthèse démarre dans le cytosol par le biais du ribosome qui capture les ARNm et traduit leurs codons (1 codon = 3 nucléotides) en l'un des 22 AA composants les protéines. Le processus de traduction comporte 4 étapes essentielles : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage, qui sont assurées par la coordination de l'ARN de transfert (ARNt), l'ARNm et les ribosomes. La biosynthèse d'une protéine s'effectue de l'extrémité *N*-terminale vers l'extrémité *C*-terminale.

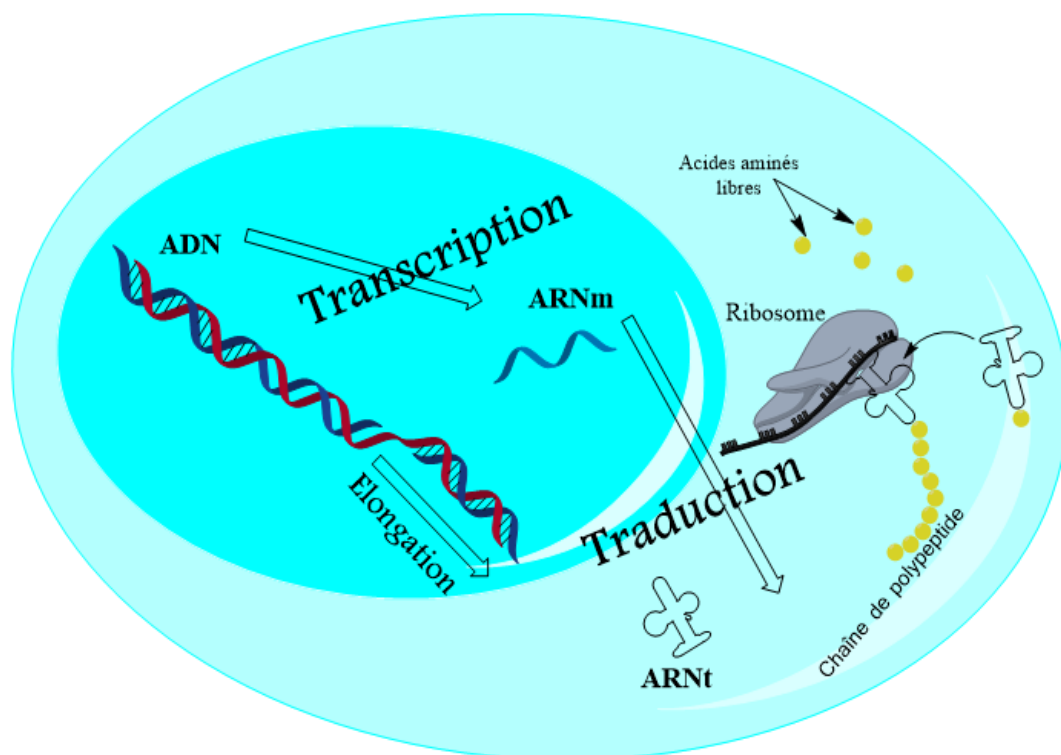


Figure 2. La biosynthèse protéique (ChemDraw®, PerkinElmer Informatics, version 16).

D'une part, toute protéine synthétisée selon « la théorie fondamentale de la biologie moléculaire » - le dogme central - émerge dans la cellule sous forme de polypeptide linéaire et doit être repliée en ses structures, tertiaire et quaternaire, spécifiques pour remplir sa fonction attribuée par le code génétique. Le repliement consiste à faire subir aux protéines des modifications post-traductionnelles, telles que le clivage, la *N*-glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et la formation de ponts disulfures..., qui auront lieu dans le RE. À ce niveau, la protéine doit acquérir des propriétés nécessaires à l'obtention de sa forme native, en adéquation avec sa fonction. C'est un mécanisme qui implique des protéines chaperonnes, localisées majoritairement dans la lumière du RE, mais également dans le cytoplasme^{1,2,8}.

D'autre part, selon le « dogme d'Anfinsen », la structure d'une protéine est principalement déterminée par sa séquence d'AA, mais ce repliement spontané est très difficile à réaliser dans le milieu intracellulaire, où les concentrations extrêmement élevées de protéines peuvent facilement conduire à un mauvais repliement, voire à une agrégation^{2,9}. En effet, les protéines immatures entrant dans le RE présentent une quantité considérable de zones hydrophobes qui s'attirent entre-elles dans le milieu aqueux du RE, donnant lieu à des agrégats. Afin d'éviter ces interactions indésirables et d'assurer le bon repliement de ces protéines, le RE est assisté par de nombreuses protéines, dites résidentes du RE, telles que les protéines chaperonnes. Une fonction « normale » du RE est donc requise pour le repliement correct et la modification post-traductionnelle des protéines^{2,5,10,11}.

Quoi qu'il adienne, en conditions physiologiques, un polypeptide en cours de repliement, appelé protéine non-repliée (dépliée), est pris en charge par des protéines chaperonnes qui se lient à ses domaines hydrophobes et maintiennent les protéines transmembranaires à l'état inactif jusqu'à ce que les protéines synthétisées soient repliées. Ces chaperonnes jouent un rôle central en favorisant un repliement normal et en évitant la formation des agrégats. En effet, plusieurs familles de chaperonnes sont impliquées dans ces processus, telles que certaines protéines de choc thermique « *Heat Shock Protein* » (HSP) de poids moléculaires différents (HSP60, 70, 90 et 100) qui facilitent le repliement des protéines en protégeant les régions non-repliées ; en plus des foldases catalysatrices des étapes du repliement et des lectines telles que la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT) impliquées dans la formation des liaisons aux glucides (*N*-glycosylation). En addition, la famille des Protéines Disulfures Isoméras (PDI) et la

famille des Peptidyl-Prolyl cis/trans-Isomérase (PPI) contribuent à la formation des ponts disulfures au sein de la structure protéique, augmentant ainsi sa stabilité^{1,2,5,9,11}. Les protéines chaperonnes utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour s'associer de manière transitoire aux polypeptides nouvellement synthétisés, supprimer les interactions inappropriées entre les zones hydrophobes et les aider à se replier conformément au dogme d'Anfinsen. Une fois que les protéines sont correctement repliées, la protéine chaperonne s'en dissocie. Puis, les protéines néosynthétisées sont envoyées vers l'appareil de Golgi où elles peuvent subir d'autres modifications telles que l'O-glycosylation, la phosphorylation et le traitement protéolytique^{8,9,11,12}. Le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi est bidirectionnel et est assuré par des vésicules spécifiques: les complexes protéiques d'enveloppe « *Coat Protein Complex II* » (COPII) qui interviennent dans le transport antérograde du RE vers Golgi, tandis que les vésicules COPI interviennent dans le transport rétrograde¹¹.

2. La protéine chaperonne BiP « *Binding Immunoglobulin Protein* »

Au milieu des années 1970, deux protéines de poids moléculaires 78 et 94 KDa, induites à la suite d'une carence en glucose dans le milieu de culture cellulaire, ont été découvertes. Elles ont été baptisées « Protéines Régulées par le Glucose » ou « *Glucose-Regulated Proteins* » (GRP78 et GRP94) en 1977¹³. Au milieu des années 1980, il s'est avéré que la protéine GRP78 était identique à la protéine de liaison à la chaîne lourde de l'immunoglobuline dans les cellules lymphocytaires pré-B découverte durant des recherches sur le cancer et appelée BiP « *Binding Immunoglobulin Protein* »^{14,15}. La protéine GRP94, quant à elle, est une protéine chaperonne qui se lie aux protéines en cours du repliement^{1,2}. La protéine BiP/GRP78 fait partie de la famille des protéines HSP70, c'est l'une des chaperonnes les mieux étudiées⁸. Elle sera désignée dans le reste de ce projet par « BiP ». La chaperonne BiP se lie aux segments hydrophobes de la chaîne polypeptidique afin d'éviter l'agrégation protéique et favorise la translocation de la chaîne polypeptidique à travers la membrane. De plus, elle est impliquée dans leur repliement et leur assemblage ultérieurs¹⁶. L'interaction de BiP avec ces polypeptides garantit que seules les protéines correctement repliées sortent du RE⁸. La chaperonne BiP contient un domaine d'ATPase N-terminal et un domaine de liaison au substrat C-terminal. Que la reconnaissance de l'état non/mal-replié des protéines se produise directement ou

indirectement *via* BiP est peu clair¹⁷⁻¹⁹ (Cf. **IV.2.7**). Dans la forme liée à l'ATP, BiP lie les substrats avec une faible affinité. La liaison au substrat stimule l'activité ATPase de la BiP pour générer la forme liée à l'ADP ayant une plus haute affinité pour le substrat (peptide) lié. L'échange d'ADP avec de l'ATP libère le substrat de BiP, qui progresse ensuite sur sa voie de repliement² (**Figure 3**).

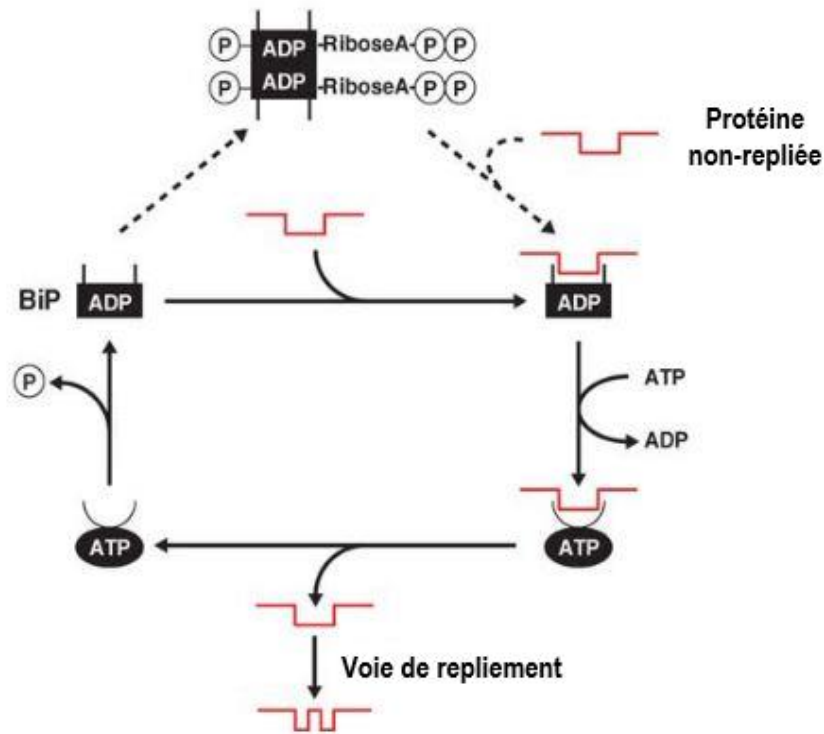


Figure 3. BiP et le cycle ADP/ATP².
Le domaine ATPase du BiP hydrolyse l'ATP et BiP retourne à l'état de haute affinité de l'ADP.

II. CHAPITRE I : La voie UPR « *Unfolded Protein Response* »

1. Introduction : Le stress du RE et la voie UPR

L'accumulation des protéines non/mal-repliées et des acides gras, l'hypoxie cellulaire, le stress oxydatif, la carence en éléments nutritifs, le déséquilibre calcique et bien d'autres *stimuli* tels que l'altération de la glycosylation, les substances chimiques toxiques, la haute température, l'infection par un agent pathogène et l'activation de l'inflammation déclenchent un stress au niveau du RE^{4,8,10,11}. Pour faire face au « stress du RE », ce dernier répond par une cascade complexe de réponses cytoprotectrices. C'est une voie de signalisation intracellulaire reliant le RE au noyau, appelée la réponse aux protéines non-repliées « *Unfolded Protein Response* » (UPR). Le prototype de la voie UPR est découvert en milieu des années 1970, par la découverte de la protéine GPR78/BiP¹³. Cette voie est le principal mécanisme de protection et de compensation pendant le stress du RE, qui conduit à une atténuation de la traduction et à une régulation positive sélective d'un certain nombre de facteurs de transcription. L'UPR est généralement associée au maintien de l'homéostasie de la voie de sécrétion dans des cellules sécrétrices, telles que les plasmocytes, les hépatocytes, les blastocytes, les glandes salivaires et les cellules β pancréatiques... L'UPR est considérée comme un mécanisme de contrôle homéostatique permettant de remodeler la voie de sécrétion en fonction des besoins de la cellule^{5,10,20}.

En effet, la voie UPR s'active afin d'éviter le surembrelement des protéines non/mal-repliées, permettant ainsi la limitation du transport de nouvelles protéines vers la lumière du RE. Également, la voie UPR permet l'amélioration des capacités de repliement et de contrôle qualité des protéines, ainsi que l'augmentation de la transcription des gènes cibles de l'UPR et de la biosynthèse des protéines chaperonnes et des foldases impliquées dans le repliement des protéines^{3,6}. La voie UPR régule l'expression de nombreux gènes codant pour les chaperonnes et les enzymes de repliement dans le RE^{4,12,21}. De plus, la voie UPR permet d'augmenter la clairance des protéines accumulées, soit par export *via* la voie de sécrétion, soit par autophagie²², ou bien par dégradation des protéines non/mal-repliées par le protéasome à travers la voie de dégradation associée au RE « *ER-Associated Degradation* » (ERAD)^{3,6,8,11} (Cf. **II.3.4**; **II.4.2**). Cette dégradation des protéines non/mal-repliées se produit dans le cytoplasme. Elles sont reconnues dans le RE, puis rétro-transloquées dans le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome.

Une série d'événements collectivement dénommés ERAD^{3,5,8,9,23}. Ainsi, la qualité des protéines dans le RE est assurée par deux mécanismes distincts de sens opposé, à savoir le repliement productif médié par les chaperonnes dans le RE et la dégradation associée au RE^{9,11}. Ces mécanismes d'adaptation sont mis en place dans le but de survivre au stress du RE, de rétablir l'homéostasie au niveau de ce compartiment et de protéger la cellule de la mort^{3,10}. Le cas échéant, si le stress ne peut être résorbé, et par conséquent l'homéostasie du RE restaurée, la signalisation de l'UPR conduit à la mort cellulaire programmée « *Programmed Cell Death* » (PCD) ou apoptose^{1,6,8,10} (Cf. **II.4.4**).

2. La voie UPR chez *Saccharomyces cerevisiae*

Issu de la recherche sur le cancer chez l'Homme, le domaine de recherche sur la voie UPR est né en 1988, mais elle a été caractérisée pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les gènes cibles de la voie UPR chez cette levure sont au nombre de 381, représentant plus de 5% de son génome²⁴. Cette voie régule l'expression de nombreux gènes codant pour des chaperonnes, ainsi que des enzymes et protéines impliquées dans divers processus cellulaires¹¹. L'activité de BiP est un marqueur classique de l'activation de la voie UPR. En effet, la chaperonne BiP est impliquée dans la régulation de l'UPR grâce à son association avec la protéine transmembranaire du RE, « *Inositol-Requiring Enzyme 1* » (Ire1p), qui requiert l'inositol pour son fonctionnement^{8,11}. L'inositol est un précurseur essentiel du phosphatidylinositol, un phospholipide structural majeur de la levure, nécessaire au bon fonctionnement du système sécrétoire²⁵.

2.1. Le mécanisme d'action de la protéine Ire1p

La protéine Ire1p a été identifiée à l'origine pour son rôle dans la prototrophie de l'inositol chez *S. cerevisiae*²⁶. C'est une protéine transmembranaire de type I composée de trois domaines fonctionnels²⁷ (**Figure 4.**). Le premier, luminal, est la poche de liaison au nucléotide liés à la protéine BiP et joue le rôle de capteur de l'état de repliement des protéines dans le RE¹¹. Les deux autres, cytosoliques: un domaine sérine/thréonine (Ser/Thr) kinase^{26,27} et un domaine endoribonucléase (abréviation RNase)²⁸. Ire1p est la seule protéine kinase transmembranaire sur environ 6000 codées par les gènes de *S. cerevisiae*⁹. C'est la composante la plus en amont de la voie de signalisation UPR^{16,29}.

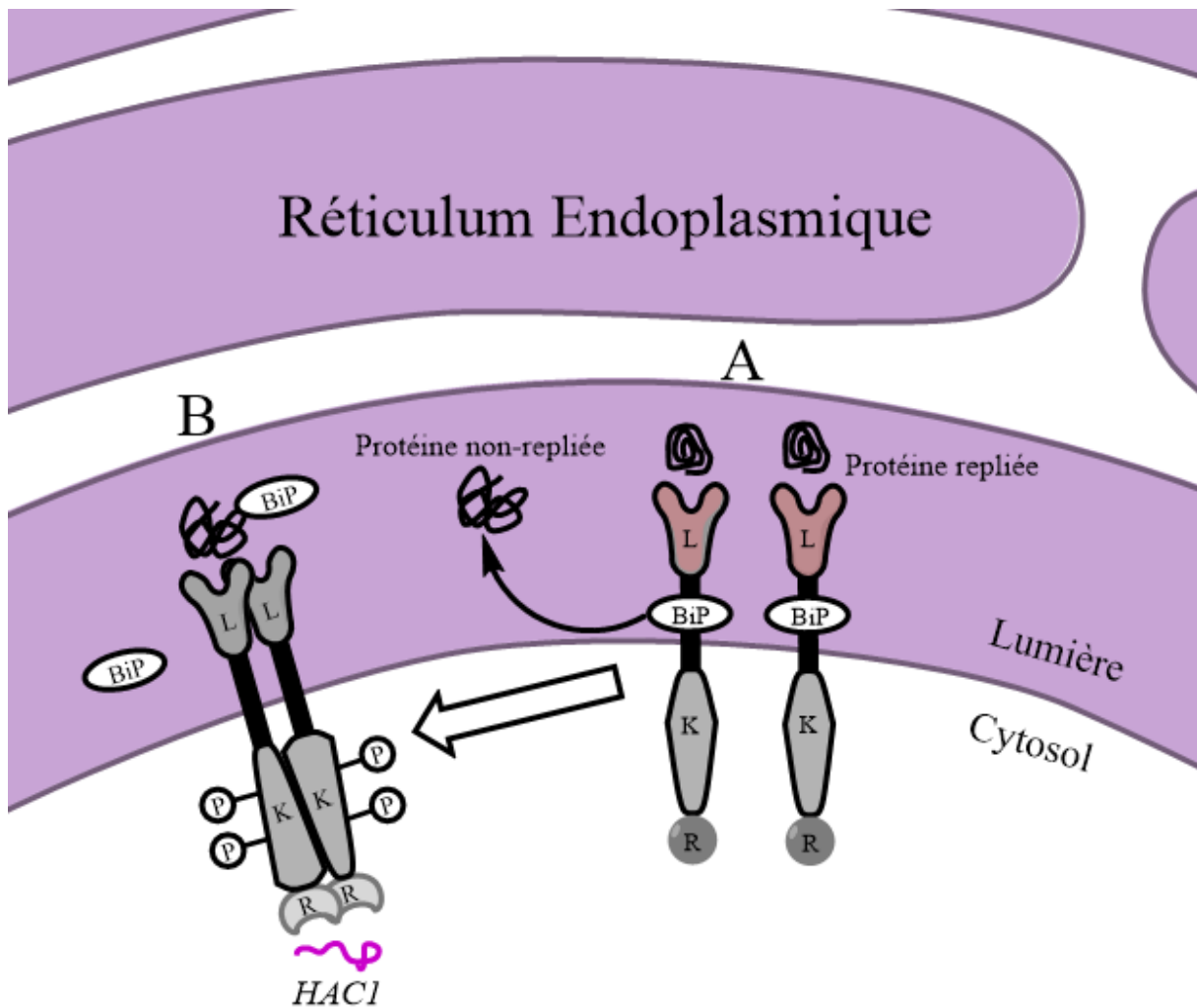


Figure 4. La protéine Ire1p au sein du RE (ChemDraw®, PerkinElmer Informatics, version 16).
 L : Domaine Luminal ; K : Domaine Kinase ; R : Domaine RNase (endoribonucléase).
 A) Les domaines Kinase et RNase sont inactifs.
 B) Les domaines Kinase et RNase sont activés.

Dans les conditions homéostatiques, Ire1p existe principalement sous forme de monomère lié par son domaine luminal à la chaperonne BiP (**Figure 4. A**). En cas de stress du RE et, au fur et à mesure que la concentration de protéines non/mal-repliées augmente, le domaine luminal d'Ire1p libère la protéine BiP^{19,29}, ce qui provoque sa dimérisation et son autotransphosphorylation sur les résidus Ser *via* son domaine Ser/Thr kinase^{3,30}. Ceci entraîne une activation de son domaine RNase^{28,31} qui va reconnaître son substrat, l'ARNm « *Homologous to Activating transcription factor/cAMP-Response-Element-Binding protein 1* » *HAC1^u (uninduced)* (non induit) de 1,4 Kb (**Figure 4. B**) et y effectuer un clivage sur deux sites d'épissage, en excisant un intron de 252 bases de manière inconventionnelle, cytoplasmique, indépendante du spliceosome nucléaire^{31,32}(**Figure 5**).

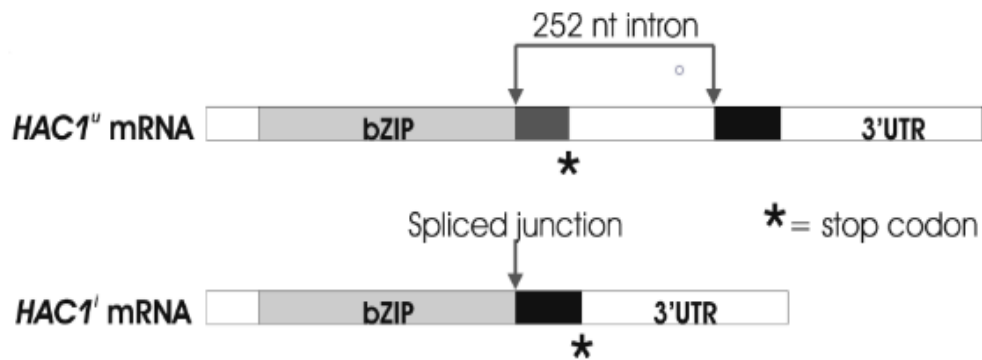


Figure 5. L'épissage d'un intron inconventionnel de l'ARNm *HAC1^u*¹¹. La boîte en gris foncé représente la partie codant pour les 10 AA C-terminaux de l'ARNm *HAC1^u*. La boîte noire représente la partie codant pour le domaine d'activation, de 18 AA.

Le clivage se produit au niveau de deux structures en tige-boucle de 7 nucléotides (nt) entre le troisième et le quatrième nt de chaque boucle ; entre les bases G et C du site 5' (SL1) et entre G et A du site 3' (SL4). Les clivages au niveau de ces sites d'épissage, SL1 et SL4, se produisent indépendamment et dans un ordre aléatoire, contrairement à l'épissage induit par le splicéosome nucléaire, dans lequel les sites d'épissage 5' et 3' sont clivés séquentiellement. Les deux exons ainsi libérés s'associent par appariement de bases et sont ligués par l'ARNt ligase Rlg1p, conduisant ainsi à la formation d'un ARNm induit *HAC1ⁱ* (*induced*) (induit) de 1,2 Kb qui va être traduit en un facteur de transcription actif Hac1p de type « *basic Leucine ZIPper* » (bZIP)^{8,9,21,28,32}. Les facteurs de transcription bZIP sont conservés au cours de l'évolution chez les eucaryotes. La taille de la famille bZIP diffère considérablement d'une espèce à l'autre : 53 chez l'Homme, 78 chez *Arabidopsis*, 92 chez le riz, 125 chez le maïs et 247 chez le colza³³. La structure symétrique des sites d'épissage et le fait que la protéine Ire1p se dimérise lors de l'activation de l'UPR reflète une situation pendant laquelle un monomère d'Ire1p interagit avec le site 5', alors que l'autre monomère interagit avec le site 3'. L'événement d'épissage fonctionne donc comme un mécanisme permettant de joindre le domaine de liaison de l'ADN à son domaine d'activation, permettant ainsi la génération post-transcriptionnelle rapide d'un activateur de transcription puissant en cas de besoin^{9,11} (**Figure 6.**).

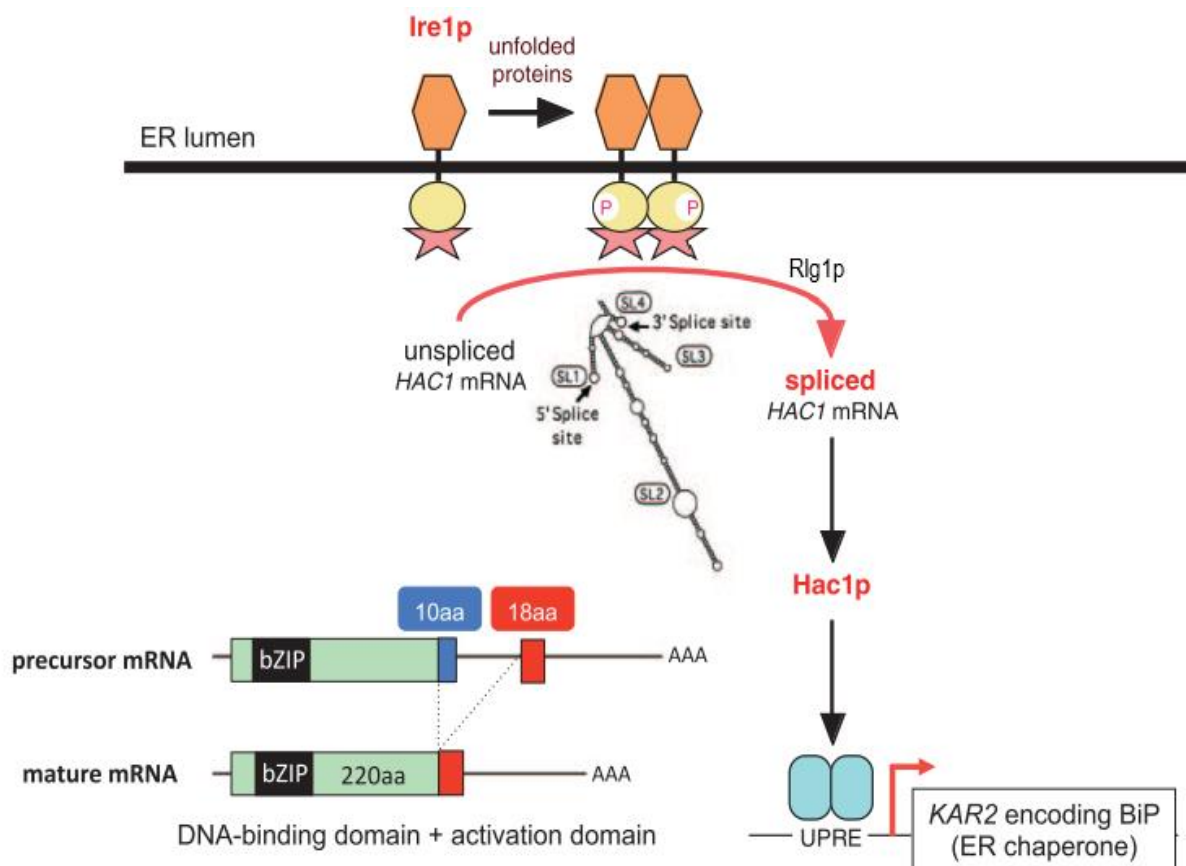


Figure 6. Le mécanisme de l'épissage inconventionnel de l'ARNm $HAC1^{u9}$.

Les deux protéines $Hac1^{i/up}$ possèdent des domaines *N*-terminaux identiques, mais se distinguent à la fois par la longueur et la séquence d'AA du domaine C-terminal. La protéine $Hac1^u$ de 230 AA est traduite de l'ARNm $HAC1^u$, tandis que la protéine $Hac1^i$ de 238 AA est traduite à partir de l'ARNm $HAC1^i$. En effet, étant donné que l'extrémité 5' de l'intron est située dans le cadre ouvert de lecture « *Open Reading Frame* » (ORF) de $HAC1^u$, lors de la traduction, l'épissage par Ire1p conduit à un décalage de l'ORF de l'ARNm $HAC1^u$ et remplace les 10 derniers codons par un exon codant pour 18 AA au niveau de l'extrémité C-terminale. Cette queue de 18 AA s'est avérée fonctionner comme un puissant domaine d'activation de la transcription (**Figure 6.**). En revanche, l'épissage n'affecte pas la partie *N*-terminale de 220 AA qui contient à la fois le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation. L'ARNm $HAC1^u$ est mal traduit en raison du blocage causé par la présence de l'intron de 252 nucléotides proche de l'extrémité 3'. En d'autres termes, l'élimination de l'intron permet la production d'un facteur de transcription hautement actif, $Hac1^i$, car le domaine de liaison à l'ADN inclus dans la région de 220 AA est joint directement au domaine d'activation de la transcription de 18 AA (sécurité intrinsèque)^{9,11,34}.

L'ARNm *HAC1^u* est identifié en tant que le seul substrat du domaine RNase d'Ire1p. L'épissage de l'ARNm *HAC1^u* est donc considéré comme l'étape clé de la régulation de la voie UPR chez *S. cerevisiae*. La protéine Hac1p traduite à la suite de cet événement chemine vers le noyau où elle active ou augmente la transcription des gènes cibles de l'UPR. En effet, le niveau d'épissage d'ARNm *HAC1^u* en *HAC1ⁱ* est un indicateur sensible de l'induction de la voie UPR³². Pour ce faire, Hac1p se lie à une séquence d'activation en amont « *Upstream Activator Sequence* » (UAS)³⁵, présente sur le promoteur des gènes cibles de la voie UPR, appelée l'élément de réponse aux protéines mal repliées : « *Unfolded Protein Responsive Element* » (UPRE); CAGCGTG^{8,16,21,32,36,37}. L'UPRE est l'élément le plus en aval de la voie de signalisation intracellulaire UPR^{16,32}. Il a été identifié à l'origine comme étant un élément de 22 paires de bases présent dans le gène « *KARyogamy 2* » (*KAR2*) codant pour la protéine BiP chez la levure²¹ et il s'est avéré être nécessaire et suffisant pour l'activation de la transcription en réponse au stress du RE^{16,36,38} (**Figure 6., Figure 7.**). Le facteur de transcription Hac1p régule donc positivement l'expression des gènes impliqués dans la fonction du système sécrétoire, y compris les chaperonnes, tel que le gène *KAR2*³⁸, ainsi que les foldases, les enzymes de glycosylation, les vésicules de transport protéique et des gènes impliqués dans la voie ERAD^{11,16,27,34,39,40}. En cas de stress du RE, la traduction n'est pas atténuée et les chaperonnes du RE ainsi que les composants ERAD sont induits par la transcription *via* la voie Ire1p/Hac1p. L'induction de ces gènes améliore la dégradation des protéines à repliement lent dans le RE et diminue ainsi la charge protéique compétitive du RE pendant le stress^{2,11,34}. De plus, l'expression du facteur de transcription Hac1p contrôlant l'UPR chez la levure³² entraîne l'expansion du RE et ainsi augmente sa capacité de contenance³.

Cependant, le gène *HAC1ⁱ* lui-même a révélé la présence d'une séquence de type UPRE. Il a été démontré que Hac1p active sa propre transcription lors d'un stress extrême et prolongé du RE, en se liant à cet élément présent dans son propre promoteur. Les cellules dépourvues de cette forme d'auto-régulation ne peuvent pas maintenir des niveaux élevés d'ARNm codant pour la protéine Hac1p et par conséquent, ne survivent pas sous un stress prolongé du RE^{11,25}. Cette auto-régulation est nécessaire pour maintenir des niveaux élevés d'ARNm *HAC1ⁱ* et ainsi protéger les cellules de la levure contre le stress prolongé du RE. Il convient de souligner que ce mécanisme d'auto-régulation ne nuit pas au mécanisme de fermeture de la voie UPR. Lorsque les protéines non-repliées sont repliées sous l'action des chaperonnes ou sont éliminées par

dégradation *via* le système ERAD, Ire1p revient à l'état monomère inactif en se réassociant avec la chaperonne BiP^{19,41}. Une fois que la réponse UPR a cessé, les protéines Hac1p préexistantes disparaissent rapidement dans les cellules en raison de leur courte demi-vie de 2 minutes. Ainsi, les cellules de levure peuvent fermer immédiatement l'UPR, même après avoir subi un stress prolongé au RE⁴¹.

Autrement, la transcription de l'ARNm *HAC1* pourrait être induite de manière indépendante d'Ire1p. C'est le résultat de la production ou de l'induction d'un activateur de transcription supplémentaire, appelé Facteur de Modulation de l'UPR « *UPR Modulatory Factor* » (UMF)²⁵. En réponse à un signal transmis par cet activateur de transcription, le promoteur dans *HAC1*ⁱ est activé, ce qui entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm de *HAC1*ⁱ qui, lors de l'épissage, produisent davantage d'Hac1p. L'induction transcriptionnelle de *HAC1*ⁱ indépendante d'Ire1p et celle induite par Ire1p, combinées, produisent des taux élevés d'Hac1p ; elles sont rassemblées sous le nom de « *Super-UPR* » (S-UPR). Le programme transcriptionnel complet du S-UPR résulte d'une collaboration entre des niveaux élevés de Hac1p et de l'UMF, la contribution relative de chacun varie entre les différents gènes cibles^{11,25,42}.

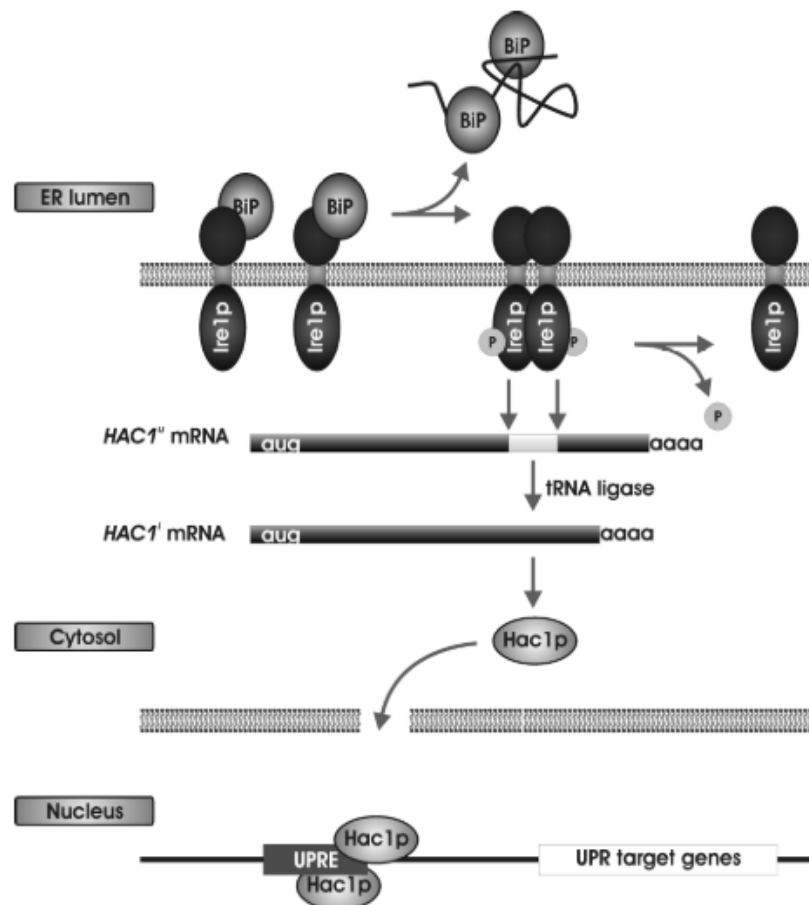


Figure 7. Le mécanisme d'action de la protéine transmembranaire Ire1p chez *S. cerevisiae*¹¹.

2.2. Les voies de régulation additionnelles chez *Saccharomyces cerevisiae*

L'activation de la transcription des gènes sensibles à l'UPR implique à la fois Hac1p et « *General Control Nonderepressible 4* » (Gcn4p), deux facteurs de transcription bZIP^{11,39,42}. Chez *S. cerevisiae*, ce mécanisme implique la phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes « *Eukaryotic translation Initiation Factor 2* » (eIF2 α) par la kinase Gcn2p, spécifiquement activée par des ARNt non chargés lors de la privation en AA³⁵. Ceci conduit à une augmentation de la traduction du facteur de transcription Gcn4p, qui à son tour augmente la transcription des gènes codants pour des enzymes nécessaires à la biosynthèse des AA, à un moment où l'expression de la plupart des autres gènes diminue^{3,42-44}. Le facteur Gcn4p intervient dans la voie UPR au niveau de la traduction par une réponse immédiate à l'accumulation de protéines non-repliées dans le RE en inhibant l'initiation de la traduction, le protégeant ainsi de toute accumulation ultérieure d'agrégats, tout en préservant les nutriments et l'énergie^{11,42}. Gcn4p est un facteur de la transcription bZIP qui a été caractérisé en tant que composant de la réponse cellulaire à la privation d'AA et à d'autres contraintes^{25,35,42}. UPRE-2 et UPRE-3 sont deux motifs similaires à l'UPRE précédemment identifié sur *KAR2* (**Figure 6.**) et sont donc appelés UPRE-1. Ce dernier est à la fois nécessaire et suffisant pour conférer une réactivité à ses propres promoteurs durant un stress du RE, de manière dépendante de la voie Ire1p/Hac1p^{11,25,42}.

3. La voie UPR chez *Arabidopsis thaliana*

Chez les plantes, les facteurs de stress abiotique notamment la chaleur, la sécheresse, la salinisation, le stress osmotique, les métaux lourds et la luminosité élevée ou bien les agents biotiques, tels que les virus et les champignons pathogènes, perturbent le repliement des protéines^{24,45}. Sachant qu'un tiers du protéome total est synthétisé dans le RE, l'accumulation des protéines non/mal-repliées entraîne un stress au niveau réticulaire^{24,29,46}. Le stress résultant est atténué en restaurant la capacité de repliement des protéines dans le RE et en réduisant la charge en nouvelles protéines. Ceci peut être réalisé en augmentant le niveau d'expression des protéines chaperonnes *via* l'activation de la voie UPR et en augmentant la dégradation par ERAD^{29,46}. Chez *Arabidopsis thaliana*, de la famille des Brassicacées, trois facteurs de transcription bZIP associés à la membrane du RE sont considérés comme les capteurs/transducteurs de la voie UPR⁴⁵.

Cette dernière chez *A. thaliana* est médiée par deux voies principales : l'épissage de l'ARNm *bZIP60* induit par la protéine IRE1 et le processus de protéolyse intramembranaire régulée (« *Regulated Intramembrane Proteolysis* » RIP) de bZIP17 et bZIP28^{4,46,47}. Le processus RIP influence des processus aussi divers que la différenciation cellulaire, le métabolisme des lipides et la voie de signalisation UPR. Ce mécanisme consiste en l'activation d'une protéine transmembranaire par un clivage dans le plan de la membrane pour libérer le fragment cytosolique qui pénètre dans le noyau afin de contrôler la transcription de certains gènes cibles⁴⁸.

3.1. Le mécanisme d'action des facteurs de transcription bZIP17 et bZIP28

Les facteurs bZIP17 et bZIP28 sont des protéines membranaires de type II contenant un domaine luminal à leur extrémité C-terminale, un domaine transmembranaire et un domaine de liaison à l'ADN bZIP à leur extrémité N-terminale cytoplasmique^{45,46} (**Figure 8.**). L'activation de bZIP28 par l'intermédiaire de RIP est la première réponse de la voie UPR chez *A. thaliana*⁴⁶.

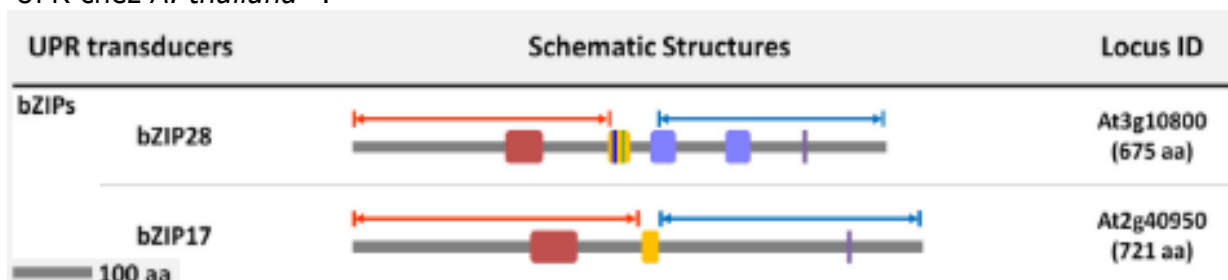


Figure 8. Les facteurs de transcription bZIP17 et bZIP28⁴⁶.

En l'absence de stress du RE, BiP se lie au domaine luminal de bZIP17/28, alors qu'il s'en dissocie en réponse au stress induit par l'accumulation des protéines dans le RE^{29,46}. Une fois libérés, bZIP17/28 subissent une activation protéolytique afin de réguler l'expression des gènes cibles de la voie UPR⁴. Le facteur bZIP28 est traduit sous forme de précurseur capable de détecter les protéines mal-repliées s'accumulant à la suite d'un stress induit par des agents qui interfèrent avec la *N*-glycosylation ou la formation des ponts disulfures. Le facteur bZIP28 induit donc l'expression de gènes distincts de ceux induits par bZIP17 dans les conditions de chaleur et de stress salin. Les facteurs bZIP17 et bZIP28 sont donc capables de distinguer ces différents types de contraintes⁴⁹.

Dans les conditions de stress, les vésicules COPII favorisent le trafic de bZIP17 et bZIP28 depuis le RE vers l'appareil de Golgi^{45,46}. Le traitement nécessite une sérine protéase de type subtilisine, la protéase de site 1 (S1P) située dans le Golgi, qui clive la protéine au niveau de son domaine luminal. Ce clivage raccourcit la taille de ce domaine, le rendant disponible en tant que substrat d'une métalloprotéase, la protéase de site 2 (S2P)^{24,48-50}. Celle-ci clive le domaine transmembranaire de bZIP17/28 pour libérer le fragment *N*-terminal contenant le domaine bZIP actif. Ce dernier est alors transféré dans le noyau où il forme un complexe transcriptionnel en se liant spécifiquement aux éléments « *ER Stress Element* » (ERSE) et UPR spécifique de la plante (P-UPRE), situés dans les régions promotrices des gènes cibles de l'UPR^{45-47,49,51}. L'élément ERSE-1 est composé de la séquence CCAAT-N10-CACG³³. L'implication de S1P dans le traitement de bZIP28 est basée sur une analogie avec le système animal, dans laquelle un facteur de transcription appelé ATF6 est lié à la membrane résidant dans le RE et est transporté vers Golgi sous stress réticulaire, puis traité séquentiellement par S1P et S2P^{45,52} (Cf. **II.4.3**). Cependant, une étude effectuée en 2017 par Iwata et ses collaborateurs⁵⁰, a montré que l'activation du facteur bZIP28 ne nécessite pas l'intervention de S1P. Des protéases inconnues clivent la partie *C*-terminale de bZIP28 à proximité immédiate du domaine transmembranaire et raccourcissent le domaine *C*-terminal, permettant à S2P de procéder au second clivage au sein du domaine transmembranaire de bZIP28, pour libérer le fragment cytoplasmique contenant le domaine bZIP. Ce dernier va être transloqué dans le noyau afin d'activer l'expression des gènes cibles de l'UPR. Il a été démontré que bZIP28, comme bZIP17, est ciblé par la protéase S2P⁵⁰. Donc, il n'est pas encore clair si le clivage générant bZIP28^{X1} et bZIP28^{X2} est médié par une seule protéase ou bien par deux protéases différentes, ni si ce clivage est effectué dans le RE ou dans le Golgi⁵⁰. Pourtant, il a été démontré que bZIP17, présentant une structure de domaine similaire à celle de bZIP28, est clivé par S1P^{49,50} (**Figure 9**).

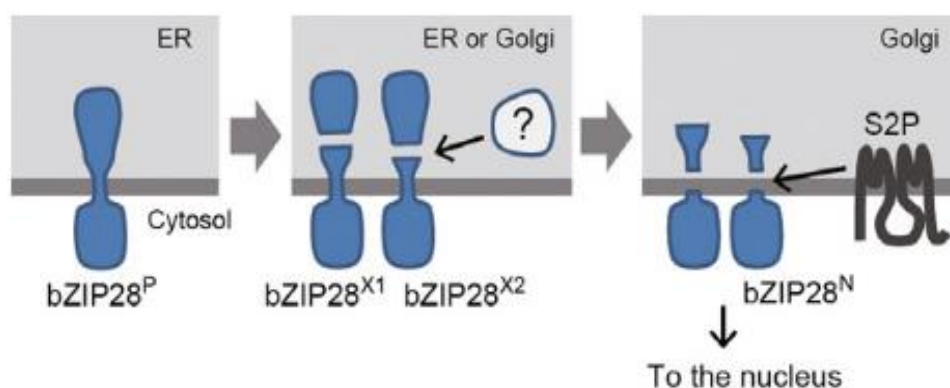


Figure 9. Le modèle proposé pour l'activation protéolytique de bZIP28⁵⁰.

3.2. Le mécanisme d'action de la voie IRE1/bZIP60

La branche principale de la voie UPR est médiée par la protéine IRE1. Dans les cellules d'*Arabidopsis*, deux isoformes d'IRE1, AtIRE1-2/IRE1a et AtIRE1-1/IRE1b^{22,29,53}, sont classés en tant que protéines transmembranaires de type I contenant les trois mêmes domaines rencontrés dans Ire1p chez la levure⁴⁶. Les protéines IRE1a et IRE1b comportent donc un domaine C-terminal luminal de détection de stress du RE, un domaine Ser/Thr kinase et un domaine endoribonucléase N-terminal cytosolique^{24,29}. En revanche, chaque protéine IRE1 est codée par un gène unique, le gène codant pour IRE1a étant situé sur le chromosome 2, tandis que le gène codant pour IRE1b se trouve sur le chromosome 5⁵³. Les deux protéines partagent une identité de 41% d'AA⁴⁶ et possèdent des profils d'expression presque non chevauchants^{24,29}.

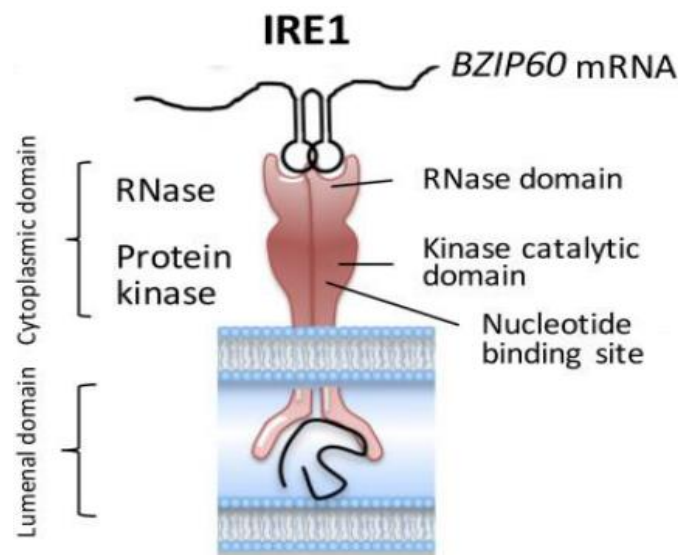


Figure 10. L'interaction de la protéine IRE1 avec les protéines luminales et l'ARNm *bZIP60*²².

Fonctionnant de la même manière que chez les levures, dans les conditions de stress du RE, chacun des deux isoformes d'IRE1 se dimérise^{29,45,46}. La dimérisation conduit à une autotransphosphorylation, provoquée par l'activité kinase intrinsèque de la protéine, pendant laquelle un monomère phosphoryle l'autre^{24,29}. L'autotransphosphorylation ouvre un site luminal de liaison aux nucléotides qui, lorsqu'il est occupé, produit un changement de conformation dans le domaine cytosolique de manière à positionner les domaines de la ribonucléase dans une configuration de dimère dos-à-dos²⁴ (**Figure 10.**). Ceci active la fonction RNase d'IRE1a et b provoquant un épissage inhabituel de l'ARNm *bZIP60*^{22,24,46}, sur deux sites présents dans sa structure. Il en résulte la libération d'un intron de 23 nt et les fragments épissés de l'ARNm *bZIP60* sont ligaturés par l'ARNt ligase RLG1 dans le cytoplasme pour former *bZIP60*^s^{24,28,50} (**Figure 11.**).

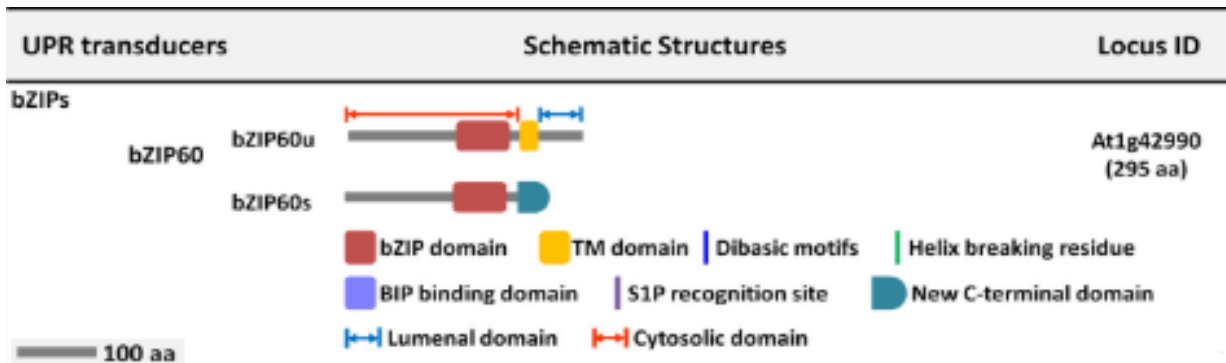


Figure 11. Le facteur de transcription bZIP60⁴⁶.

L'ARNm *bZIP60^u* non-épissé code pour une protéine potentiellement associée à la membrane, tandis que l'épissage par IRE1a ou b entraîne la perte du domaine transmembranaire et l'acquisition d'un signal de ciblage nucléaire. La forme épissée *bZIP60^s* est traduite sous la forme active bZIP60^s transférée vers le noyau pour se lier à la région promotrice des gènes UPR sur les éléments P-UPRE et ERSE dans le but d'activer les réponses transcriptionnelles des gènes cibles de l'UPR^{4,22,37,45-47}. En conséquence, l'induction de l'expression de ces gènes permet une tolérance au stress réticulaire⁴⁶. L'activation du promoteur de *BiP* par bZIP60 dépend des éléments P-UPRE dans *BiP1* et *BiP2* et ERSE dans *BiP3*³⁷(**Figure 12.**).

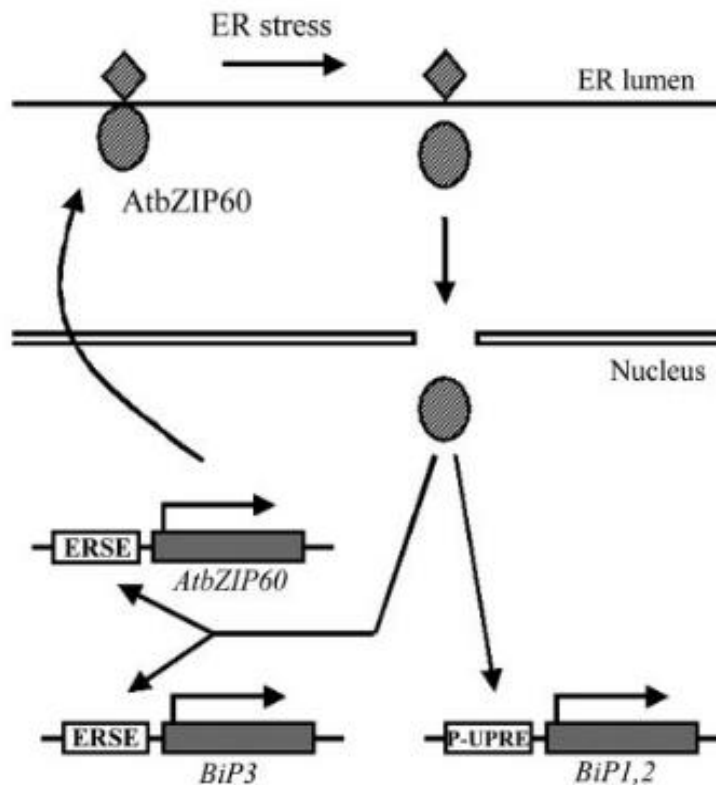


Figure 12. L'activation du promoteur de *BiP* par le facteur bZIP60³⁷.

Le facteur bZIP60 est le régulateur principal de l'expression du gène *BiP3*, mais n'apporte qu'une contribution mineure à la régulation de *BiP1* et *BiP2*⁴⁷. De plus, afin de maintenir l'homéostasie du RE, bZIP60 contribue à la régulation des chaperonnes moléculaires, y compris la protéine BiP bien évidemment, ainsi que les lectines CNX et CRT et les enzymes de repliement telles que la PDI^{29,37,46}. Les facteurs de transcription bZIP60 et bZIP28 remplissent des fonctions de régulation complémentaires et se chevauchent partiellement dans la réponse au stress du RE chez *Arabidopsis thaliana*⁴⁷ (**Figure 13.**).

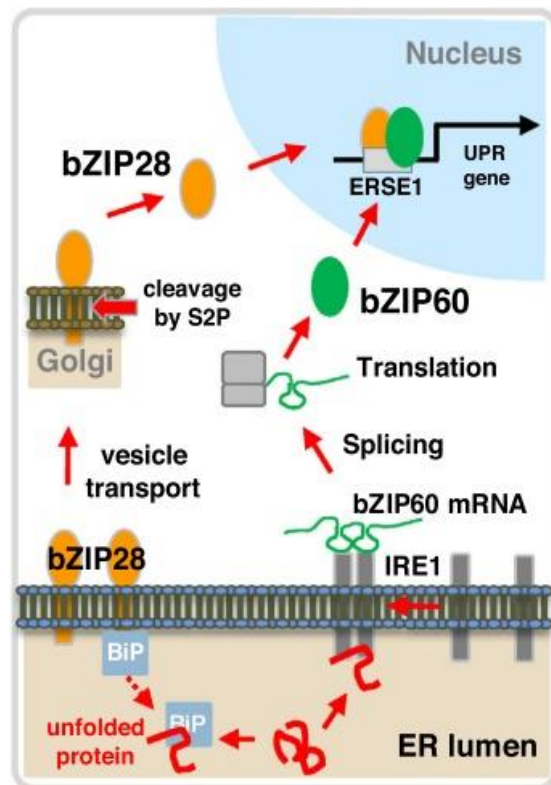


Figure 13. Le mécanisme d'action des facteurs de transcription bZIP28 et bZIP60³³.

3.3. Les facteurs de transcription NAC

Des études récentes ont montré l'implication dans la voie UPR des facteurs de transcription nommés collectivement NAC : « *No Apical Meristem* » (NAM), « *Arabidopsis Transcription Activation Factor* » (ATAF), « *CUp-shaped Cotyledon* » (CUC) ». Ce sont des facteurs spécifiques de la plante dans la régulation de la voie UPR. NAC est l'une des plus grandes familles de facteurs de transcription chez *Arabidopsis*. Environ 117 gènes NAC ont été identifiés, à partir desquels sont traduites 13 protéines transmembranaires de type II⁴⁵. Les NAC membranaires subissent une activation protéolytique, similaire à celle de bZIP17/28, en réponse à différents *stimuli* tels que le froid, la sécheresse, la salinisation, le stress osmotique ou des *stimuli* hormonaux, notamment par l'acide abscissique, l'acide gibbérellique et la cytokinine⁴⁶ (**Figure 14.**).

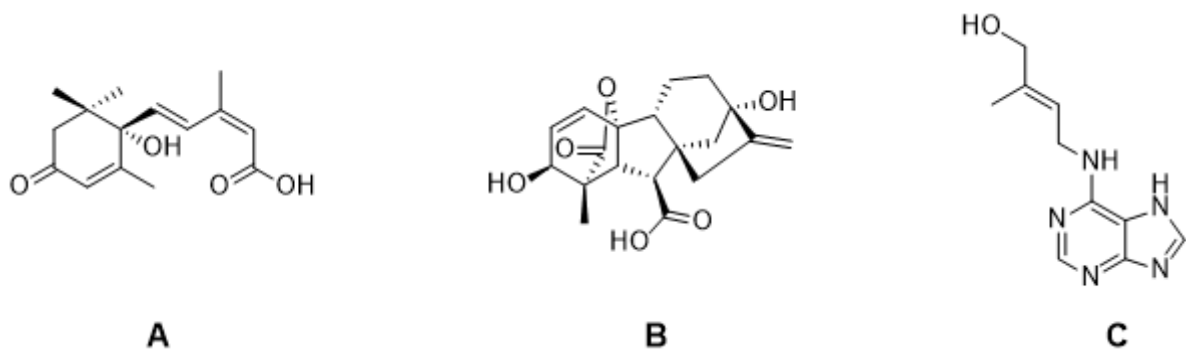


Figure 14. A) Acide abscissique ; B) Acide gibbérellique ; C) Cytokinine.

L'activation de ces facteurs de transcription spécifiques au stress, induit l'expression des gènes cibles de l'UPR et est donc essentielle pour une réponse rapide au stress du RE et pour le développement d'*A. thaliana*. Par exemple, l'expression de *NAC062* et *NAC103* est induite par bZIP60 via la liaison directe à UPRE-III présent dans leurs régions

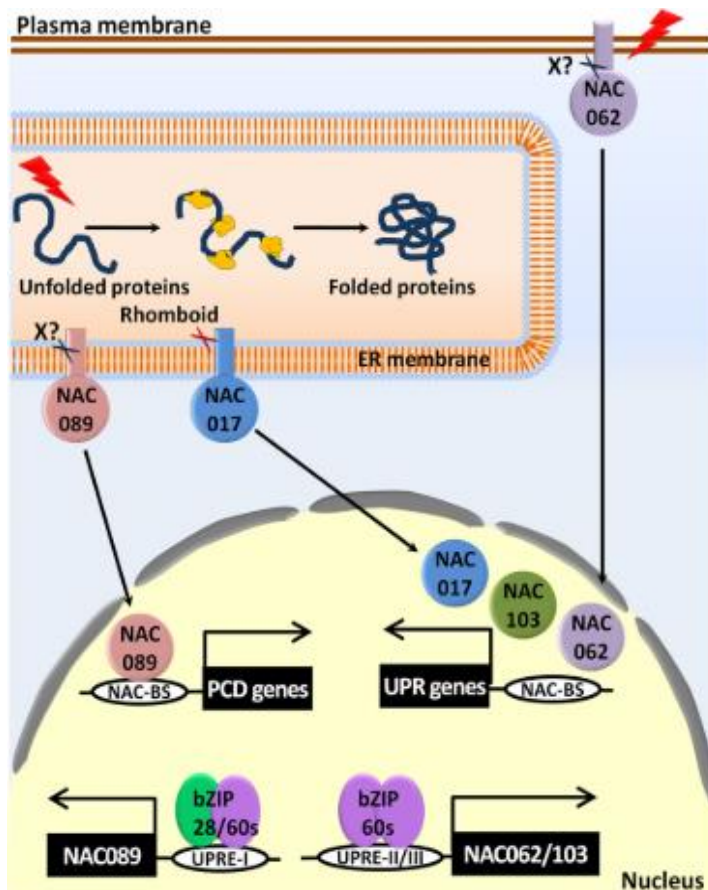


Figure 15. Le mécanisme d'activation des facteurs de transcription NAC⁴⁶.

promotrices. Tous les transducteurs UPR possèdent un domaine transmembranaire au niveau du RE, à l'exception de *NAC103*, une protéine nucléaire dépourvue de domaine transmembranaire et *NAC062* localisée au niveau de la membrane cytoplasmique⁴⁶ (**Figure 15.**). La surexpression du facteur *NAC089* actif, délocalisé du RE vers le noyau sans domaine transmembranaire, induit l'expression des gènes impliqués dans le processus de la mort cellulaire programmée (PCD), tandis que l'inactivation

de son gène codant confère une tolérance au stress du RE. Les facteurs bZIP28 et bZIP60 participent tous deux à l'induction de *NAC089* dans les conditions de stress. Les facteurs de transcription NAC sont équivalents à des transducteurs secondaires de l'UPR chez les plantes et sont impliqués dans diverses voies de développement et d'interactions phytohormonales. Leur interaction avec BiP n'est pas encore rapportée⁴⁶.

3.4. L'autophagie chez *Arabidopsis thaliana*

En milieu agricole, les contraintes environnementales constituent une menace majeure pour la productivité et la croissance optimale des plantes. Or, plusieurs contraintes sont souvent rencontrées simultanément, les plantes activent donc une série de mécanismes protecteurs et adaptatifs pour répondre à ces stress, notamment des adaptations transcriptionnelles, métaboliques et cellulaires qui limitent souvent la croissance tout en augmentant la tolérance au stress et à terme, la survie²². En effet, la voie UPR soutient la croissance des racines et joue un rôle essentiel dans le développement des graines et des parties reproductrices mâles de la plante et dans la réponse aux agents pathogènes non seulement dans les conditions de stress mais dans les conditions normales également^{37,46,47} (**Figure 16.**).

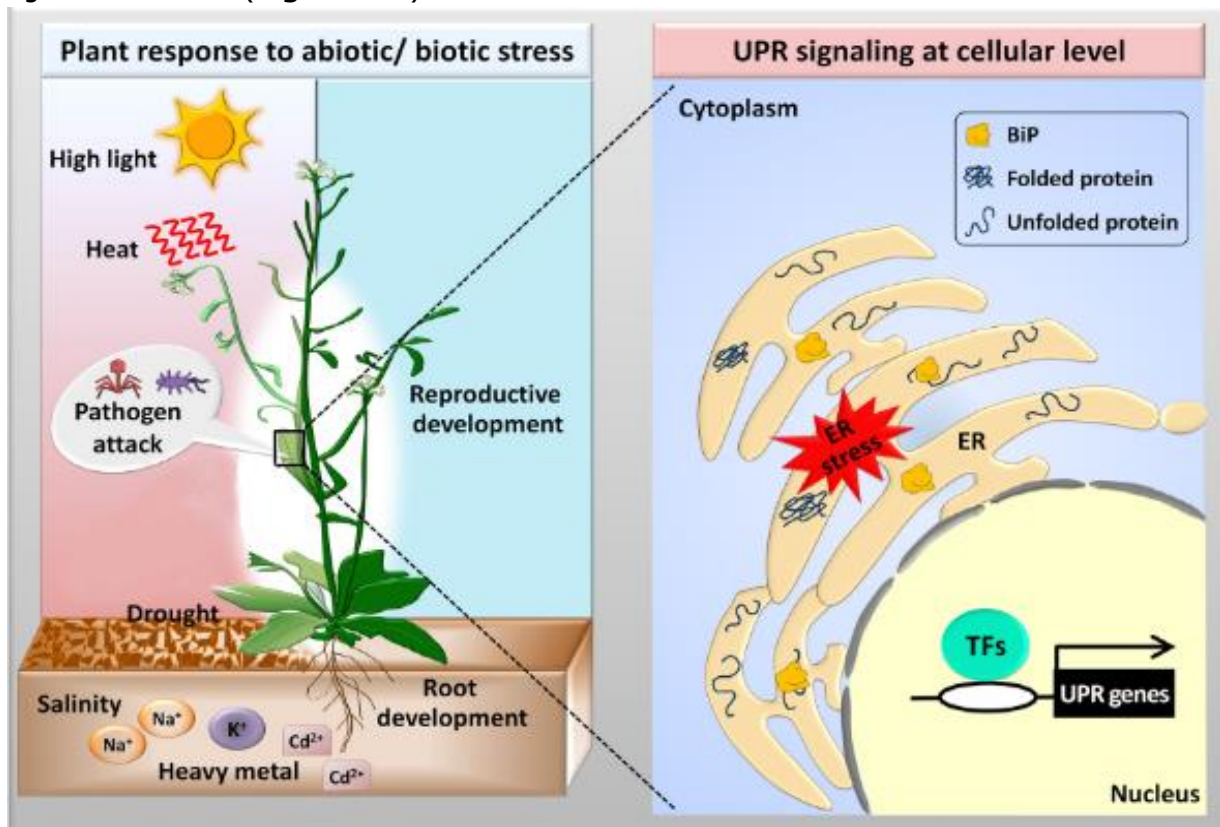


Figure 16. La réponse végétale au stress environnemental⁴⁶.

Parallèlement, l'un des mécanismes adoptés par la plante est l'activation d'une voie de dégradation par autophagie, pendant laquelle des matériaux cellulaires sont transférés à l'intérieur de la vacuole centrale et dégradés par les enzymes lytiques vacuolaires. L'autophagie est active à un niveau basal dans les conditions de croissance normale, mais est fortement régulée à la hausse par une grande variété de stress biotiques et abiotiques inducteurs classiques du stress du RE¹⁰. Effectivement, dans les conditions de stress, l'activation de l'autophagie nécessite l'accumulation de protéines mal-repliées dans le RE.

C'est un mécanisme permettant la destruction des agrégats de protéines non-repliées qui ne peuvent être dégradées par d'autres voies de protéolyse^{3,22}. Ce processus est médié par une voie dépendante d'IRE1b. La liaison aux nucléotides et l'activité RNase d'IRE1b sont nécessaires pour l'autophagie induite par le stress du RE chez *A. thaliana*²² (Figure 17.).

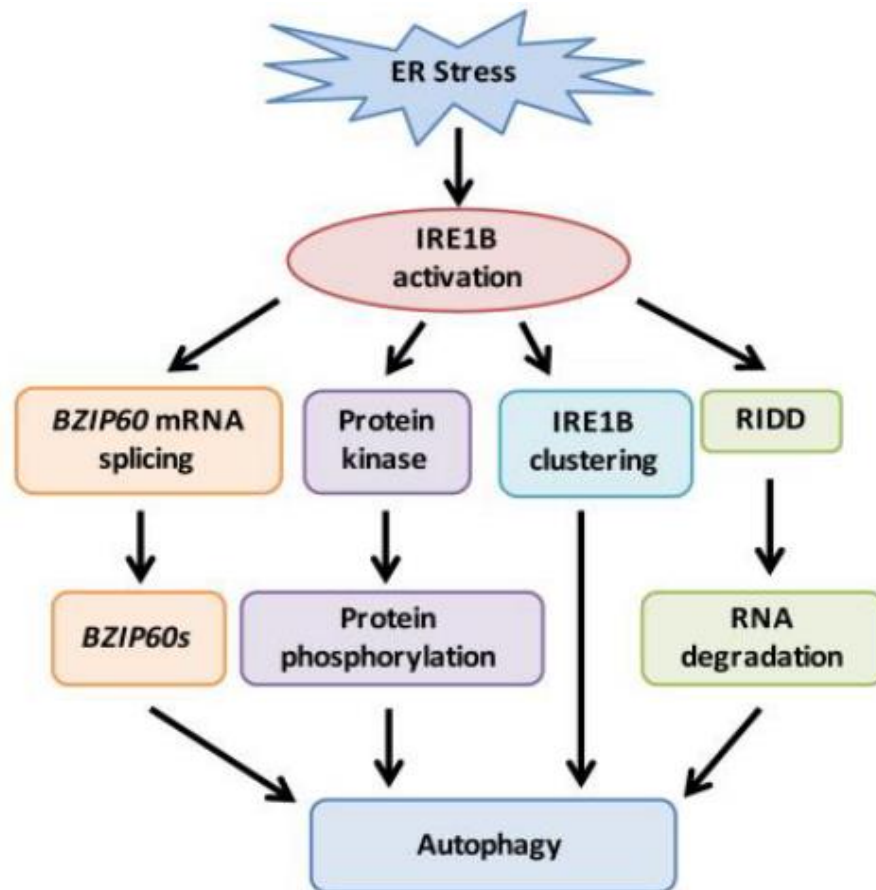


Figure 17. L'autophagie chez *A. thaliana*²².

Chez les plantes, l'autophagie est initiée par le recrutement de la protéine « *autophagy-related Protein 5* » (ATG5) vers le RE entraînant l'expansion de la membrane pour former un intermédiaire à double membrane, nommé phagophore, qui génère une vésicule à double membrane, l'autophagosome, qui sera libéré du RE par la suite. La membrane externe de l'autophagosome se fusionne ensuite avec la membrane de la vacuole appelée tonoplaste, libérant sa cargaison dans la vacuole pour la dégradation et le recyclage²². Durant l'autophagie induite par la voie UPR, les organites peuvent être dégradés indépendamment de leur taille et de l'état de repliement de leurs protéines constituantes. Les membranes du RE sont sélectivement séquestrées et emballées en autophagosomes³. Les autophagosomes accumulés dans les cellules où la voie UPR est induite ne sont pas facilement fusionnés avec la vacuole avant que le stress ne soit aboli, indiquant que la séquestration du RE endommagé est plus importante que

sa dégradation ultime. L'autophagie est responsable de la mort cellulaire non-apoptotique, d'autres indiquent que l'autophagie est protectrice contre la mort cellulaire^{10,22}. En plus, sous conditions de stress du RE, IRE1b participe à la désintégration régulée des ARNm codant pour les protéines sécrétaires *via* son activité RNase. Ce mécanisme est désigné par « *Regulated IRE1-Dependent Decay* » (RIDD). Pendant ce mécanisme les ARNm sont dégradés par autophagie, néanmoins, la perturbation d'IRE1a n'a aucun effet détectable sur ce processus^{22,46}. Le mécanisme de dégradation RIDD sert à ralentir la traduction en cas de stress chez la plante²².

4. La voie UPR chez les mammifères

Chez les mammifères, la voie UPR se met en place par l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : « *PKR-like ER Protein Kinase* » (PERK), « *Activating Transcription Factor 6* » (ATF6) et IRE1⁴. Elle a pour but d'augmenter les capacités de repliement, de maturation, voire de dégradation des protéines mal-repliées dans le RE⁵. Ces trois branches de la voie UPR communiquent largement pourtant, la différence entre leurs mécanismes d'action permet à la cellule de les activer d'une façon dépendante du temps^{3,34} (**Figure 18.**).

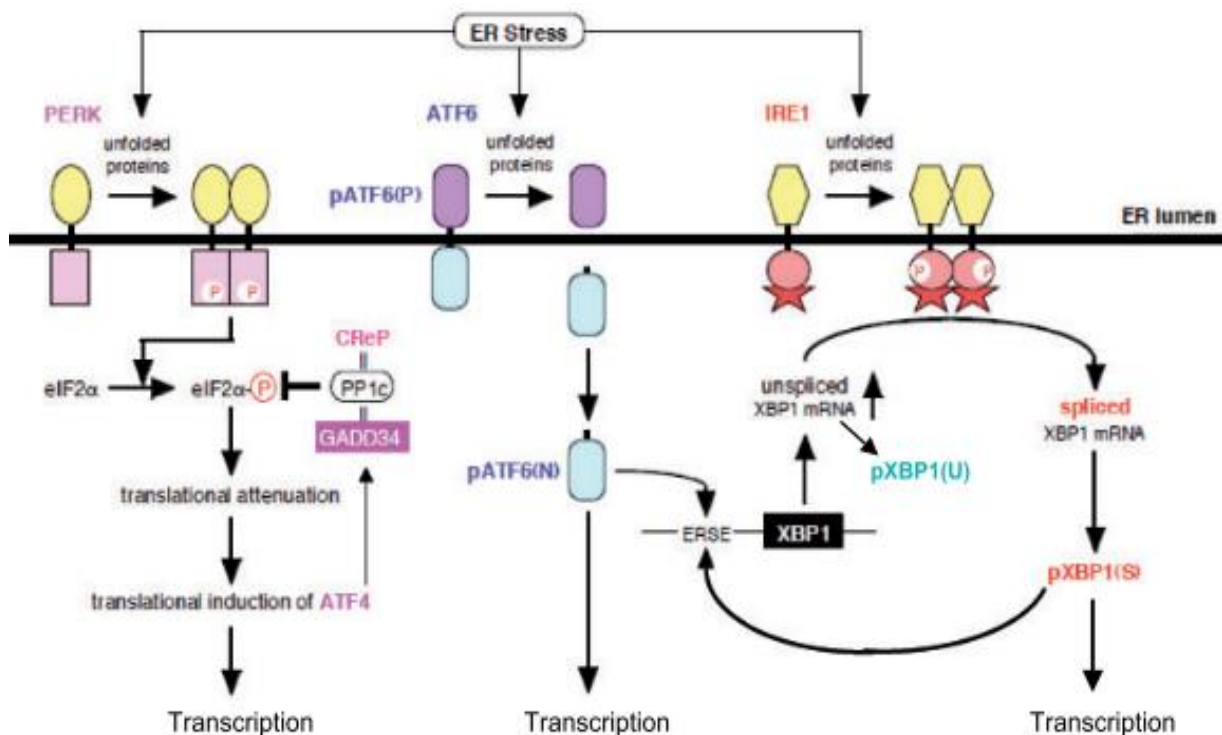


Figure 18. La voie UPR chez les mammifères³⁴.

4.1. Le mécanisme d'action de la protéine PERK

Contrairement à la levure qui poursuit la biosynthèse protéique même dans les conditions de stress du RE, les cellules chez les mammifères sont capables de réduire la charge protéique sur le RE *via* la voie PERK en induisant la transcription des gènes codant des protéines chaperonnes du RE pour augmenter la capacité de repliement, en plus de la restriction de la synthèse protéique^{8,19-21,29,45}. Parallèlement, la voie UPR permet l'induction de la transcription des composants de l'ERAD pour améliorer la capacité de dégradation^{19,34}. La réponse la plus immédiate de la voie UPR chez les mammifères est l'inhibition de la traduction des ARNm médiée par la voie PERK, ce qui ralentit momentanément la protéosynthèse afin d'éviter un afflux supplémentaire de néo-protéines dans le RE^{5,11,54}. La protéine PERK est une Ser/Thr kinase transmembranaire de type I surexprimée dans les cellules pancréatiques. Elle est nommée ainsi vu la similarité de son domaine kinase avec celui de la « *Protein Kinase RNA-activated* » (PKR) activée par oligomérisation et responsable de la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 α ^{19,21,54,55}. À l'état homéostatique, le domaine luminal de la protéine PERK est associé à la protéine chaperonne BiP qui inhibe son oligomérisation en la maintenant dans son état monomérique inactif¹⁹. Cependant, les domaines requis pour l'oligomérisation et pour la liaison de BiP sont distincts². En réponse à l'accumulation des protéines non/mal-repliées dans la lumière du RE, le complexe BiP-PERK se dissocie, induisant l'oligomérisation et l'autotransphosphorylation de la protéine PERK sur les résidus Ser et Thr de son domaine kinase cytoplasmique, résultant en son activation^{5,8,19,21,55}.

Une fois activée, la protéine PERK phosphoryle la sous-unité α du facteur de traduction eIF2 (eIF2 α) au niveau du résidu Ser51^{25,54}. En conséquence, le taux du facteur eIF2 α actif diminue, ce qui conduit à l'inhibition générale de la traduction et donc à la réduction globale de la charge des protéines néo-synthétisées^{1,54,55}, en plus de favoriser la survie cellulaire⁸. Paradoxalement, PERK induit la traduction de l'ARNm codant pour le facteur de transcription « *Activating Transcription Factor 4* » (ATF4), de type bZIP, qui active la transcription de multiples gènes impliqués dans la voie UPR³ et contribue également à la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des AA, la résistance au stress oxydatif et l'apoptose^{3,11,21,34,42-44,56} (**Figure 19.**). L'ATF4 est l'orthologue (homologue fonctionnel) mammalien de Gcn4p chez *S. cerevisiae*⁵, le facteur de transcription collaborant avec Hac1p^{25,42,44}. Selon R. Kaufman, PERK combine les propriétés fonctionnelles de Gcn2p et Ire1p chez la levure¹.

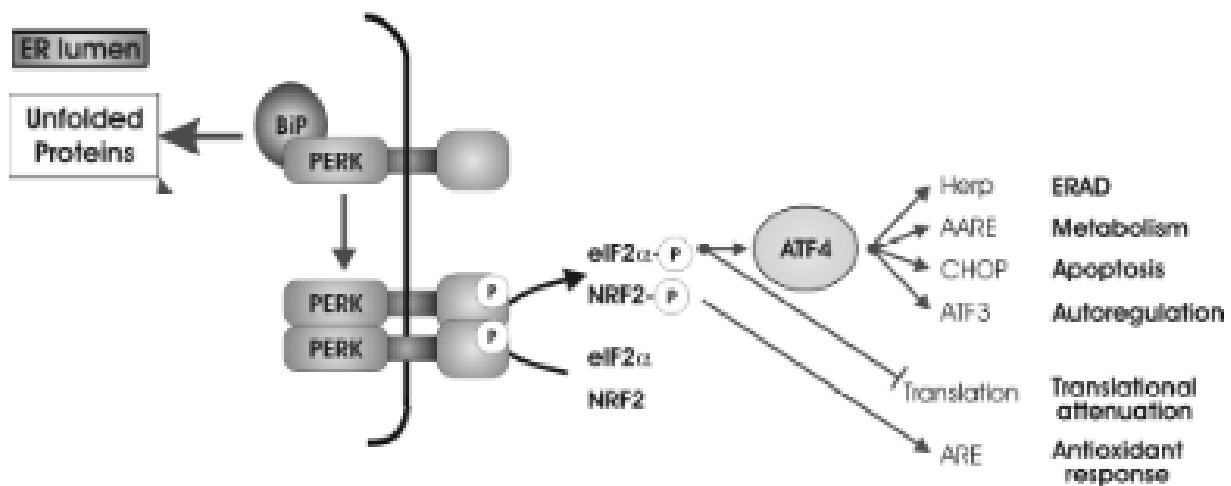


Figure 19. La voie de la protéine PERK¹¹.

Parallèlement, la protéine ATF4 s'accumule sous l'effet du stress et active le facteur de transcription « *CEBP HOMologous Protein* » (CHOP), qui se lie et active le promoteur de gènes cibles jouant un rôle dans la voie apoptotique (Cf. **II.4.4**) et la régénération tissulaire^{3,5,57} (**Figure 19**). Simultanément, la transcription de la protéine « *Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34* » (GADD34) est induite³, ce qui entraîne le recrutement de la Protéine Phosphatase Ser/Thr de type 1c (PP1c)^{57,58}, qui déphosphoryle eIF2α menant au blocage de l'induction de la traduction par ATF4. Ainsi, les niveaux de traduction atténués par PERK reviennent à la normale automatiquement avec le temps⁵⁶, c'est un système de rétrocontrôle. En outre, à des niveaux élevés, la phosphorylation d'eIF2α peut également activer le facteur nucléaire κB (NFκB) impliqué dans l'inflammation³ (Cf. **III.2**). De plus, la phosphorylation d'eIF2α est suffisante pour induire l'apoptose. Les effets pro-apoptotiques de la phosphorylation d'eIF2α médiée par PKR contrastent avec la réponse anti-apoptotique lors de l'activation de la kinase PERK⁵⁹. L'inhibition de la traduction des protéines par PERK est le premier processus déclenché par le stress du RE⁶⁰. Si les protéines non-repliées continuent de s'accumuler ou ne sont pas complètement repliées, la phase de contrôle de la traduction est déplacée vers une phase de contrôle de la transcription médiée par ATF6 et IRE1³⁴.

4.2. Le mécanisme d'action de la protéine IRE1

La protéine IRE1 est hautement conservée parmi les espèces, son rôle est présent entre les levures, les plantes et les mammifères^{29,31,61}. Il existe deux gènes codant pour IRE1 chez les mammifères : *ern1/ern2* et *ERN1/ERN2* sont les *loci* murins et humains, codant pour IRE1a/b et IRE1α/β, respectivement^{1,29}. La protéine IRE1α/a est largement exprimée, tandis que l'expression d'IRE1β/b est limitée au tractus gastro-

intestinal^{8,21,24,29,31,62}. Lors de l'accumulation des protéines non/mal-repliées dans la lumière du RE, la charge protéique sur ce dernier change l'équilibre en consacrant plus de chaperonnes BiP qui vont aller se lier aux zones hydrophobes de ces protéines^{2,21}. Ceci entraîne sa dissociation du domaine luminal d'IRE1 engendrant ainsi l'homodimérisation de la protéine IRE1 et l'induction de son activité Ser/Thr kinase, ce qui conduit à son autotransphosphorylation^{21,31,61}. En conséquence, son domaine RNase est activé et procède à l'épissage de son substrat l'ARNm « *X-box-binding protein 1* » (*XBP1*) codant pour la protéine XBP1, un facteur de transcription bZIP de 54 KDa^{20,63,64}. La protéine XBP1 est l'orthologue mammalien de la protéine Hac1p chez la levure, mais leurs séquences d'AA ne partagent pas de similarité significative^{34,64} (**Figure 20.**).

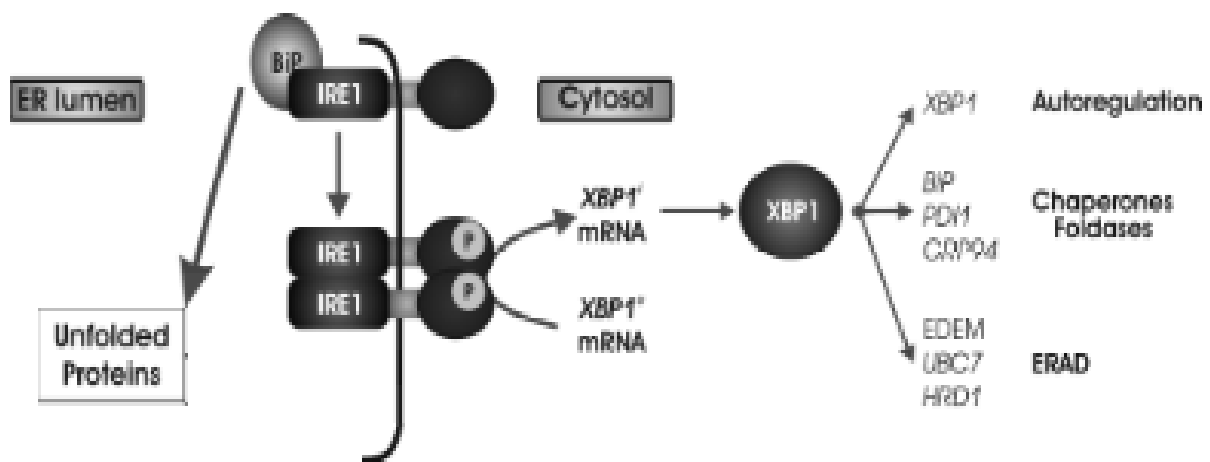


Figure 20. La voie de la protéine IRE1¹¹.

Il existe deux formes d'ARNm *XBP1* codant pour la protéine XBP1 : la forme épissée *XBP1^S* (*Spliced*) et la forme non-épissée *XBP1^U* (*Unspliced*). Cette dernière contient un intron inconventionnel de 26 nt dont l'excision crée un décalage dans le cadre de lecture ORF et, en conséquence, permet de joindre le domaine de liaison à l'ADN bZIP et le domaine d'activation afin de produire l'ARNm *XBP1^S* qui sera traduit par la suite en un facteur de transcription très actif, *XBP1^S* de 376 AA^{34,63}. Les formes, précurseur et épissée, de *XBP1* sont traduites. En effet, contrairement à *S. cerevisiae*, l'intron *XBP1* ne contient que 26 nt, codant pour 10 AA, ce qui est trop court pour former une telle structure inhibitrice de la traduction par la forme non-épissée comme chez la levure⁶³. La protéine *XBP1^U* traduite possède alors une séquence de 261 AA, dont une extrémité C-terminale de 105 AA. Or, *XBP1^S* est plus stable et fonctionne comme un puissant activateur de l'UPR, grâce à son nouveau domaine d'activation de la transcription, de 212 AA, présent à son extrémité C-terminale. L'extrémité N-terminale de 164 AA, contenant le domaine bZIP, est structuralement identique dans les deux protéines traduites^{3,11,24,56,64} (**Figure 21.**).

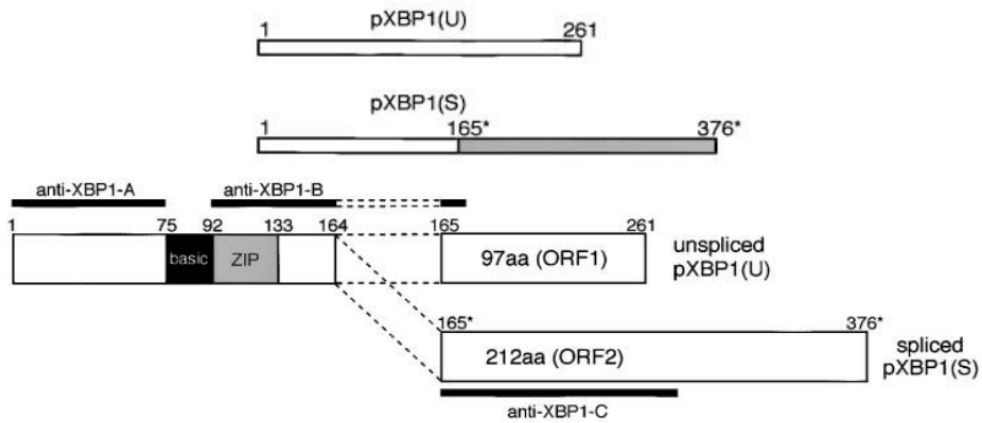


Figure 21. L'épissage inconventionnel de XBP1⁶³.

La protéine XBP1^U est synthétisée en continu à un faible niveau, même en l'absence d'épissage, mais elle est instable et est incapable d'activer la transcription en raison de sa faible activité inductrice de la transcription et de sa dégradation rapide par le protéasome^{41,64}. Elle peut s'associer à XBP1^S et le complexe en résultant, XBP1^U-XBP1^S, est séquestré à partir du noyau et dégradé par le protéasome en raison de la présence du domaine de dégradation (DEG) dans l'extrémité C-terminale de XBP1^U^{64,65}. La dégradation protéasomale implique des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de l'ubiquitine^{23,56,64} (**Figure 22.**). La dégradation rapide de XBP1^U est nécessaire pour empêcher l'activation incontrôlée de l'UPR⁶⁴. Cela indique que XBP1^U fonctionne comme régulateur négatif de l'expression de la protéine XBP1^S⁵⁶. Grâce à ce mécanisme, la cellule peut arrêter la transcription des gènes cibles de XBP1^S immédiatement après l'inactivation d'IRE1 lorsque le stress réticulaire est résolu^{56,65}.

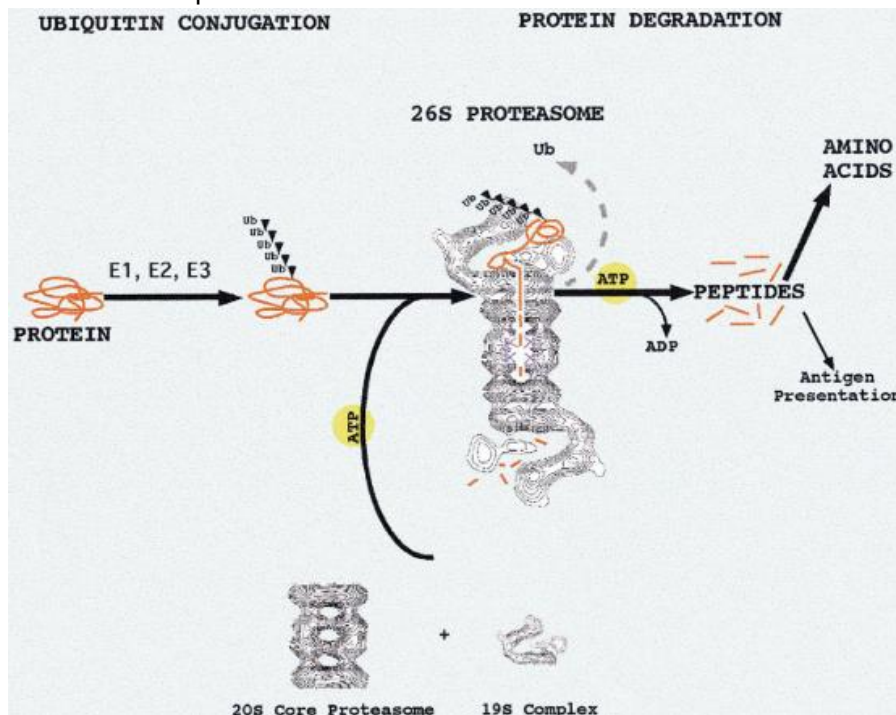


Figure 22. La voie Ubiquitine-Protéasome⁷⁵.

Les protéines non/mal-repliées sont détectées, extraites du RE et dégradées par le système protéasome 26S⁷⁹.

La contribution de XBP1^U à l'activation globale des cibles UPR est différente selon les types de cellules⁶⁴. L'induction transcriptionnelle des gènes codant les chaperonnes est médiée par l'élément ERSE présent dans leurs régions promotrices. XBP1^S se lie sur les séquences ERSE et améliore leur expression. ERSE-I a une structure tripartite avec la séquence consensus CCAAT-N9-CCACG. Le facteur XBP1 a été isolé sous forme de protéine bZIP qui se lie au CCACG^{9,41}. Cette séquence est présente dans les promoteurs des gènes codant les chaperonnes BiP et GRP94 et permet aussi d'augmenter l'expression de la CRT²⁰. ERSE-II de séquence consensus ATTGG-N-CCACG, ressemble à l'ERSE-I et a été identifié dans la région promotrice du gène *HERP* (Protéine du RE induite par l'Homocystéine) qui code une protéine membranaire du RE. La transcription de ce gène est fortement induite pendant le stress du RE et active l'expression des gènes codant des enzymes impliquées dans la voie ERAD, en reconnaissant les protéines glycosylées mal conformées^{5,11,37}. Conformément à cette notion, le promoteur de *XBP1* porte un ERSE fonctionnel, permettant à XBP1 d'activer sa propre transcription. XBP1 produite à un niveau élevé à partir d'ARNm induit et épissé possède une activité de transcription supérieure et peut échapper à la dégradation induite par le protéasome, conduisant à l'induction transcriptionnelle de ses gènes cibles. L'autorégulation est une autre caractéristique des substrats de l'épissage qui est conservée de la levure à l'homme en plus du remplacement C-terminal. En raison de cette autorégulation, les cellules de levure et de mammifère peuvent continuer à synthétiser les facteurs de transcription Hac1p et XBP1 spécifiques à l'UPR^{41,60}.

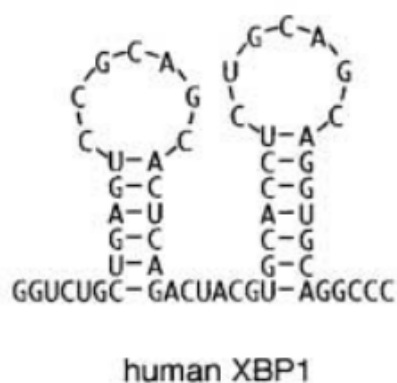


Figure 23. La structure en tige-boucle de *XBP1*⁶³.

Chez les mammifères, l'activation de l'autophagie sous stress du RE nécessite l'activité kinase d'IRE1 qui active la voie « *Mitogen-Activated Protéine Kinase 8/c-Jun N-terminal Kinase 1* » (MAPK8/JNK1)-MAPK9-MAPK10 absente chez les plantes²². Chez la levure, l'inhibition de la traduction pendant le stress du RE est médiée par l'activité du facteur de transcription Gcn4p, tandis que, chez les mammifères la protéine PERK s'en charge

(Cf. **II.4.1**). La phosphorylation d'eIF2 α par PERK et le processus de dégradation des ARNm associés au RE, RIDD, servent à réduire l'afflux des protéines naissantes dans le RE⁶⁶. La dégradation des ARNm chez les mammifères est médiée par IRE1 α qui reconnaît la séquence CUGCAG accompagnée d'une structure en tige-boucle^{46,67} (**Figure 23.**). L'activité RNase d'IRE1 est impliquée dans ce mécanisme qui dégrade de manière sélective les ARNm associés au RE codant des protéines sécrétaires ou membranaires. Les ARNm codant pour les protéines chaperonnes évitent la RIDD par un mécanisme inconnu. Cependant, certains gènes cibles de RIDD chez les mammifères n'ont pas cette séquence consensus. RIDD est considéré comme un mécanisme constitutivement actif qui se développe avec l'intensité et/ou la durée du stress du RE, ce qui conduit finalement à la mort cellulaire⁶⁰. La signalisation de la voie IRE1 joue un rôle essentiel dans l'activation post-transcriptionnelle de XBP1. En outre, les niveaux d'ARNm *XBP1* sont augmentés par la signalisation PERK²⁰ et par ATF6^{21,63}.

4.3. Le mécanisme d'action de la protéine d'ATF6

La troisième branche de la voie UPR chez les mammifères est celle du facteur de transcription ATF6. C'est un capteur du stress réticulaire, activé et contrôlé par protéolyse intramembranaire régulée (RIP)^{8,48,52}. Il existe deux gènes mammaliens, *ATF6 α* et *ATF6 β* , codant pour les protéines ATF6 α , de 90 KDa et ATF6 β , de 110 KDa, respectivement. Les deux formes sont synthétisées de manière ubiquitaire dans les différents types de tissus. Ce sont des protéines transmembranaires de type II avec un domaine bZIP du côté cytosolique et semblent être régulées par le même mécanisme^{21,52,56,63,68}.

À l'état homéostatique, ATF6 α et β sont des protéines précurseurs retenues dans le RE par l'association avec la protéine BiP. Lors de l'activation de la voie UPR, elles sont traitées pour générer des fragments de protéines cytosoliques de 50 à 60 KDa, à partir d'ATF6 α et β , respectivement ; qui migrent du RE vers l'appareil de Golgi *via* les vésicules COPII^{8,34,52}. Le fragment déplacé est coupé au niveau de son domaine luminal par la sérine protéase S1P. Sa partie effectrice, contenant les régions d'activation de la transcription et de la liaison à l'ADN, située à l'extrémité *N*-terminale faisant face au cytosol, est clivée à son tour par la métalloprotéase S2P au sein de la bicouche phospholipidique pour libérer la partie de liaison à l'ADN^{21,63}. Cette réaction protéolytique libère le domaine *N*-terminal contenant le domaine bZIP qui est transloqué vers le noyau, où il active la transcription et déclenche l'expression des gènes cibles de l'UPR contenant

les éléments ERSE au niveau de leurs promoteurs⁴, tels que les gènes codant des protéines majeures du RE comme les chaperonnes BiP et GRP94 et la protéine PDI catalyseur de la formation des ponts disulfures, ainsi que d'autres protéines impliquées dans la dégradation par la machinerie ERAD. L'activation d'ATF6 permet ainsi d'accroître les capacités de repliement des protéines dans le RE^{3,5,8,11,45,52,56} (**Figure 24.**).

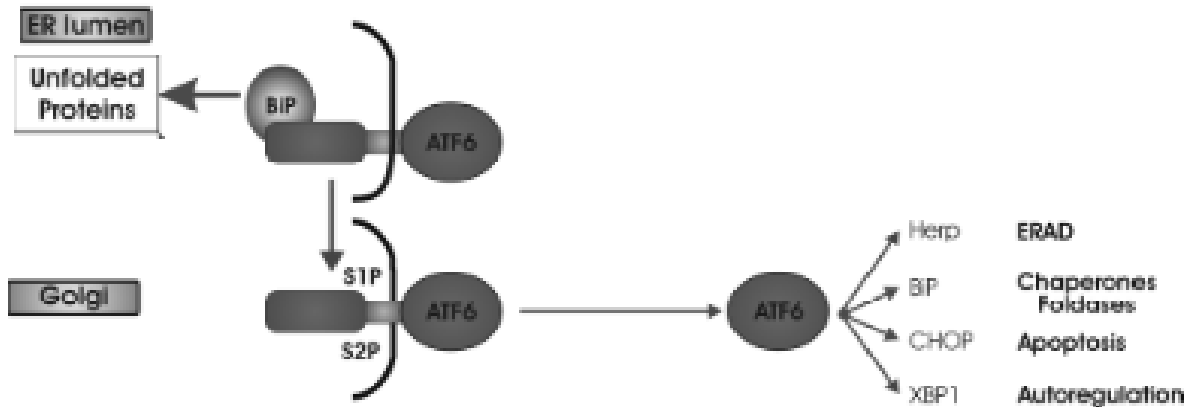


Figure 24. La voie de la protéine ATF6¹¹.

En réponse au stress du RE, la forme active d'ATF6 est produite dans le temps avant celle de XBP1, car elle est dérivée d'une protéine précurseur préexistante, alors que XBP1 doit être traduite *de novo* à partir d'ARNm induit par la transcription et ensuite traité par épissage^{37,52,63}. Au cours des premières phases de la réponse au stress, ATF6 α est activée et, à son tour, peut activer la transcription du gène XBP1 d'une manière dépendante d'ERSE^{24,63}, étant donné que XBP1 contient ERSE dans son promoteur³⁷. La protéine ATF6 α , et non l'ATF6 β , est la seule responsable de l'induction transcriptionnelle des principales chaperonnes du RE³⁴. De plus, l'hétérodimérisation des domaines bZIP d'ATF6 α/β et celui de XBP1^U permet l'induction des principaux composants de l'ERAD et la dégradation du facteur ATF6 qui sera séquestré à partir du noyau et dégradé dans le cytoplasme par le protéasome vu la présence du domaine de dégradation DEG dans l'extrémité C-terminale de XBP1^U et d'ATF6 α/β ^{34,56}. Grâce à ce mécanisme nouvellement acquis, les cellules des mammifères sont en mesure de couper rapidement la transcription des gènes cibles de XBP1^S et ATF6 α/β lorsque le stress réticulaire est résolu. Cet arrêt rapide est important vu que la surexpression des chaperonnes en l'absence de stress du RE est toxique pour les cellules et diminue le taux de la croissance cellulaire³⁴. La régulation simultanée d'ATF6 et XBP1^S par XBP1^U permet à la cellule de couper rapidement et efficacement la transcription des gènes d'ERAD lorsque le stress du RE est résolu, de sorte que les protéines nouvellement synthétisées en l'absence du stress

auraient moins de risque d'être dégradées par erreur⁵⁶. D'autre part, l'absence d'interaction entre XBP1^U et ATF4 permet à la cellule d'éviter une dégradation non souhaitée de l'ATF4 induite en réponse à un stress par XBP1^U synthétisée de manière constitutive. Ce processus illustre les multiples niveaux de régulation trouvés dans l'UPR³⁴. L'ATF6 clivé et l'isoforme XBP1^S fonctionnent principalement dans des voies parallèles pour induire la transcription des gènes codant des chaperonnes et des enzymes qui favorisent le repliement, la maturation, la sécrétion et la dégradation des protéines associées au RE⁶⁹ (**Figure 25**).

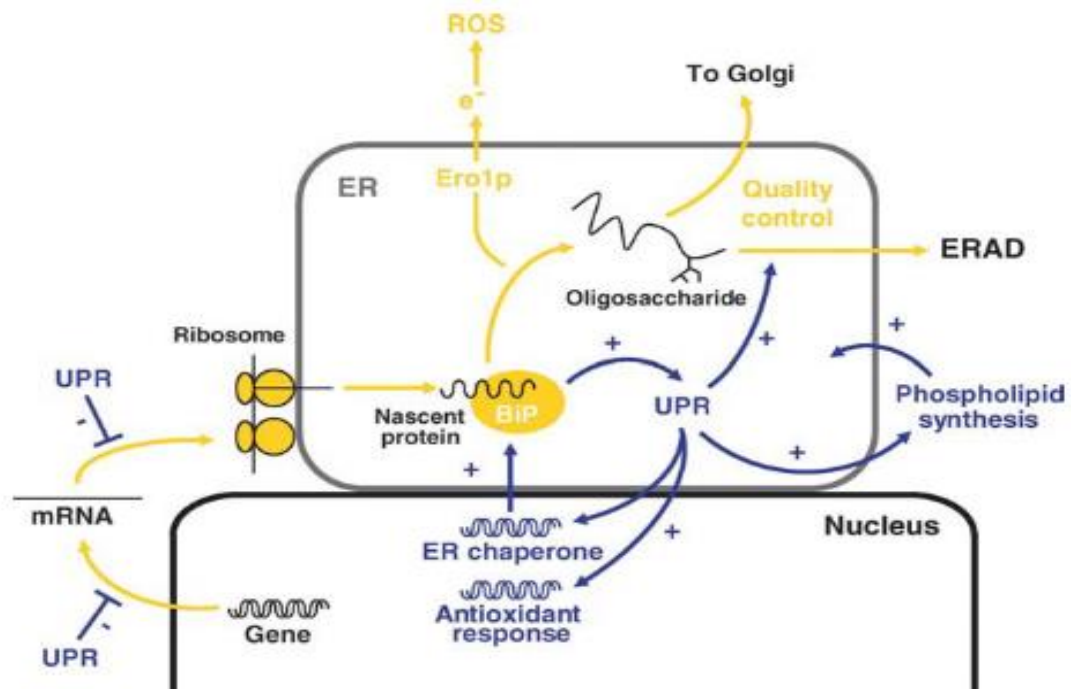


Figure 25. Le transport protéique et l'activité de la voie UPR dans le RE². Le transport protéique est en jaune et l'activité de la voie UPR en mauve.

4.4. La mort cellulaire par apoptose induite par la voie UPR

La santé de l'organisme dépend de la précision des signaux envoyés et reçus par les cellules constituantes. Les protéines sécrétoires ou membranaires transmettent une grande partie de ces informations. Sur la base de ces signaux, les cellules prennent des décisions vitales: quand et où se diviser, migrer ou changer de forme, se différencier ou mourir⁷⁰. L'UPR est initialement une réponse d'autoprotection visant à restaurer la fonction normale du RE et à maintenir l'homéostasie et la survie cellulaire⁷¹. Si par les processus et mécanismes de la voie UPR décrits ci-dessus le stress n'est pas résorbé, le processus de la mort cellulaire programmée, apoptose, est activé, afin de protéger l'organisme en éliminant les cellules stressées produisant des protéines mal-repliées ou dysfonctionnelles⁶⁹⁻⁷².

Plusieurs types de mort cellulaire, y compris l'apoptose, la nécrose/nécroptose et la mort cellulaire autophagique, peuvent être induits à la suite d'un stress réticulaire⁶⁷. L'apoptose est une forme de mort cellulaire qui implique l'action d'un certain nombre de voies de signalisation intracellulaires, notamment des membres de la famille des caspases⁸, une famille de protéases spécifiques de l'aspartate qui sont activées par plusieurs voies⁷³. Les modulateurs de la mort cellulaire induite par le stress du RE comprennent des gènes membres de la famille Bcl-2 (*BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX*, *BAK* et *BIK*), le facteur CHOP/GADD153, la « *Valosin-Containing Protein* » (*VCP*) et « *Apoptosis Linked Gene 2* » (*ALG-2*)⁸. Les membres de la famille Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques² sont associés au RE et opèrent pour réguler l'homéostasie du Ca²⁺ et la mort cellulaire par apoptose⁸ (**Figure 26.**).

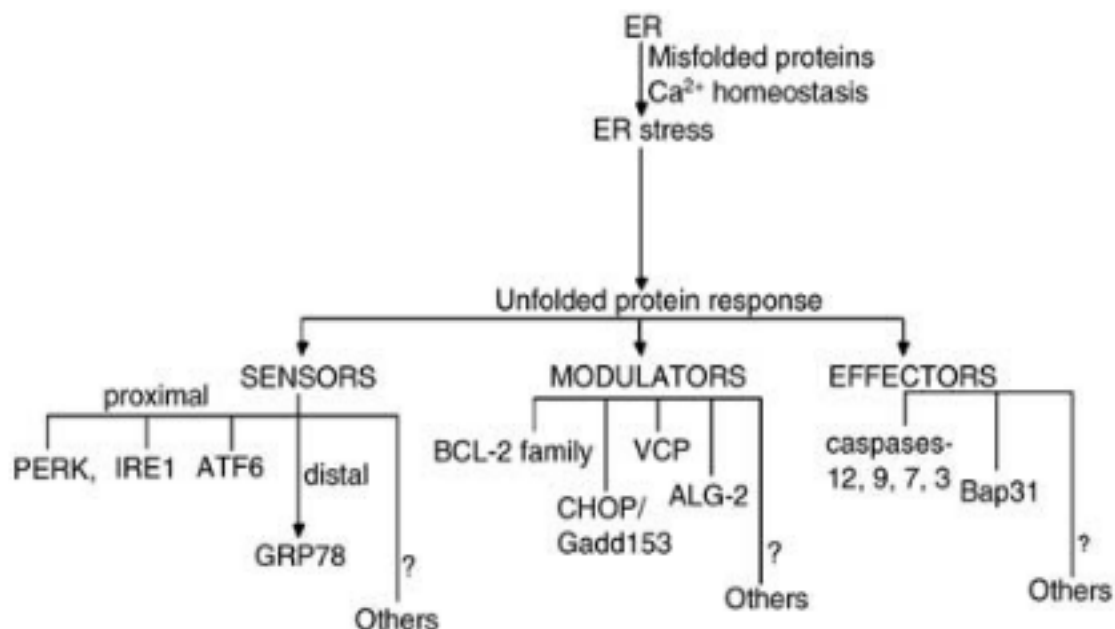


Figure 26. Les composants moléculaires de l'UPR conduisant à la signalisation de la mort cellulaire ou de la survie cellulaire⁸.

Ils sont classés en capteurs, modulateurs ou effecteurs. L'équilibre entre les différents modulateurs détermine la survie cellulaire induite par le stress du RE par rapport à la mort.

Un des premiers gènes identifiés comme modulateurs de la mort cellulaire est *BCL-2*⁸. Les molécules pro-apoptotiques connues incluent la caspase-4, p28, BAP31 et CHOP⁷³, les protéines multi-domaines (*BAX*, *BAK*) et les protéines uniquement BH3 « *BH3-only proteins* » : *BAD*, *BID*, *BIM* et *BIK*⁸. Tandis que les molécules anti-apoptotiques incluent les protéines chaperonnes du RE, telles que BiP, ainsi que la CRT, les PDI⁷³ et les protéines *BCL-2* et *BCL-XL*⁸. L'équilibre entre les différents membres de la famille Bcl-2 détermine un «rhéostat apoptotique» ou un «apostat» modulant la survie cellulaire en fonction de la survie des cellules dépendantes des mitochondries⁸. La mort cellulaire

programmée est un phénomène dans lequel CHOP joue un rôle important^{61,69}. CHOP est un facteur de transcription en aval de la voie PERK et de la voie ATF6, induit pendant le stress du RE et ensuite activé par la protéine kinase p38^{8,69}. L'induction de CHOP, désigné aussi GADD153, par le stress du RE favorise l'apoptose¹ et induit l'expression de nombreux facteurs pro-apoptotiques (notamment DR5, TRB3, BIM et GADD34), qui favorisent la traduction et la synthèse protéiques dans les cellules stressées^{60,69,74}.

Les deux voies apoptotiques principales sont : la voie du récepteur de la mort (extrinsèque) déclenchée par les caspases-8 et -10, répondant aux *stimuli* extracellulaires ; et la voie de la mitochondrie (intrinsèque) initiée par la caspase-9, répondant aux agressions intracellulaires telles que l'altération de l'ADN^{2,8}.

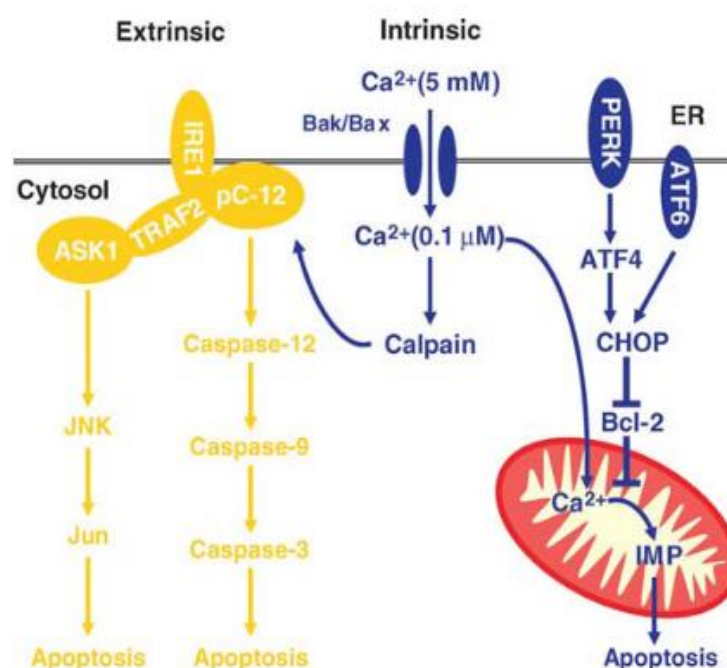


Figure 27. Les voies d'activation de l'apoptose^{2,8}.

4.4.1. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque, initiée par les caspases-8 et -10, est déclenchée par l'engagement direct des récepteurs de mort à la surface des cellules⁷³. Cette voie implique la protéine CHOP qui, en inhibant l'expression de la protéine BCL-2, favorise l'apoptose de la cellule. La protéine IRE1 forme un complexe hétérotrimérique avec « *TNF Receptor-Associated Factor 2* » (TRAF2) et « *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1* » (ASK1), active la « *c-Jun N-terminal Kinase 1/2* » (JNK1/2) et par conséquent, la mort cellulaire^{5,20} (**Figure 27.**). Les domaines endoribonucléase et Ser/Thr kinase d'IRE1 jouent un rôle prépondérant dans le processus apoptotique⁷¹. En réponse au stress du RE, le domaine kinase remplit des fonctions pro-apoptotiques. Il se lie à la molécule adaptatrice TRAF2 et active la

kinase ASK1, qui à son tour provoque la phosphorylation et l'activation de la JNK⁷⁴. Cette dernière augmente la phosphorylation des principales protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL, réduisant ainsi leur activité anti-apoptotique. Les deux isoformes JNK1 et JNK2 jouent un rôle essentiel dans l'apoptose induite par des lésions de l'ADN⁷⁵. Ses interactions avec les protéines conduisent à l'activation de la procaspase-12 qui induit une cascade d'activation de la voie des caspases conduisant à l'apoptose^{5,71}. La fonction RNase d'IRE1 peut également jouer un rôle dans la régulation de la survie cellulaire en réponse au stress du RE^{60,74}. La capacité d'IRE1 d'activer la transcription du gène *CHOP* et le fait que le facteur CHOP soit nécessaire à l'activation d'un ensemble de gènes induits par l'UPR implique que, dans les cellules mammaliennes, IRE1 contrôle une réponse au stress assez diverse et arborescente⁶¹.

4.4.2. La voie intrinsèque

L'expression du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP augmente la phosphorylation de JNK1/2 et le clivage de BAP31, induit par la caspase-8, en BAP20 imbriquée dans la membrane, permettant aux signaux apoptotiques de se propager du RE vers les mitochondries^{2,73}. Ce clivage stimule la fission mitochondriale dépendante du Ca²⁺, augmentant ainsi la libération du cytochrome C dans le cytoplasme^{8,73,76}. Cette cascade de caspases déclenchée par le stress dans le RE, initiée par la caspase-4 (caspase-12 murine) et impliquant les caspases-8 et 3, joue un rôle important dans l'apoptose spontanée des cellules⁷³ (**Figure 28.**). La surexpression des protéines pro-apoptotiques BAX ou BAK forme un pore ionique dans la membrane mitochondriale externe, ce qui entraîne un efflux de Ca²⁺ du RE vers les mitochondries². En conséquence, elles forment des canaux conducteurs de protéines dans leur membrane externe, provoquant la libération de protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome C ; ce dernier se lie ensuite à la caspase-9 initiatrice, ce qui engendre une cascade protéolytique. Le Ca²⁺ libéré active une protéase dépendante du Ca²⁺, la m-calpaïne qui à son tour clive et active la procaspase-12. Ensuite, la procaspase-12 induit une cascade d'activation des caspases conduisant à l'apoptose⁵ (**Figure 27.**). Cette cascade entraîne le clivage de protéines cellulaires spécifiques ainsi que de l'ADN et entraîne la disparition de la cellule⁸.

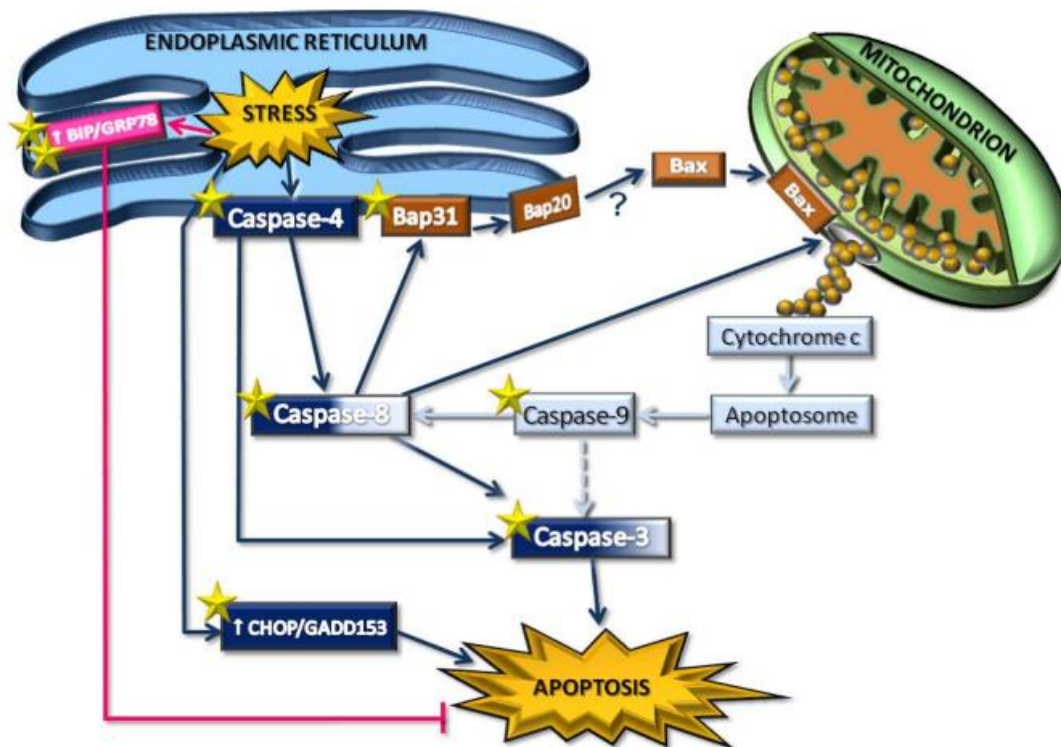


Figure 28. La voie intrinsèque de l'apoptose⁷³.

La voie mitochondriale intrinsèque est initiée par la caspase-9 et est contrôlée par les membres de la famille Bcl-2. La caspase-9 est activée lorsque le cytochrome C est libéré dans le cytoplasme. La translocation de BAX aux mitochondries est concomitante avec la libération du cytochrome C dans le cytosol à partir de l'espace intermembranaire mitochondriale et le traitement de la caspase-9^{8,73}. Les caspases-9 et -12 servent de médiateurs pour une nouvelle voie d'apoptose intrinsèque indépendante du cytochrome C et de la mitochondrie. Les caspases-8 et -9 activent les caspases du bourreau (exécutrices), y compris la caspase-3. Une fois actives, les caspases du bourreau coupent un certain nombre de protéines cellulaires, notamment des protéines nucléaires, des protéines structurelles, des molécules de signalisation, des protéines du cytosquelette et d'autres protéines impliquées dans des maladies neurodégénératives. La protéolyse de ces protéines perturbe l'homéostasie cellulaire et met fin aux signaux de survie, entre autres effets⁸.

Les activités IRE1 et ATF6 sont atténuées par le stress persistant dans le RE. L'atténuation de la signalisation IRE1 par un stress prolongé apparaît comme une étape clé dans la prise de décision de vie ou de mort après l'induction de l'UPR⁷⁰. Une baisse de la production des chaperonnes est observée dans les cellules humaines soumises à un stress non résolu du RE. En cas d'échec des sorties de protection, la signalisation pro-apoptotique non contrôlée guide la cellule vers sa disparition et la sensibilise également

à toute autre insulte préjudiciable susceptible de se produire, telle que l'hypoxie ou la privation de nutriments⁷⁴. Contrairement à IRE1 et ATF6, l'activation de la branche PERK est largement maintenue avec un stress persistant⁷⁰. Les fonctions de la branche PERK, y compris l'inhibition de la traduction et la régulation de la transcription pro-apoptotique, sont maintenues⁷⁰. ATF4 régule à la hausse la transcription des gènes codant la protéine CHOP qui active l'apoptose médiée par le RE⁷⁴. Le stress réticulaire active toutes les voies de signalisation de l'UPR, produisant ainsi simultanément des sorties antagonistes. Les différentes périodes d'action de chaque branche de la voie UPR influent sur le destin de la cellule en réponse au stress du RE^{67,70} (**Figure 29.**).

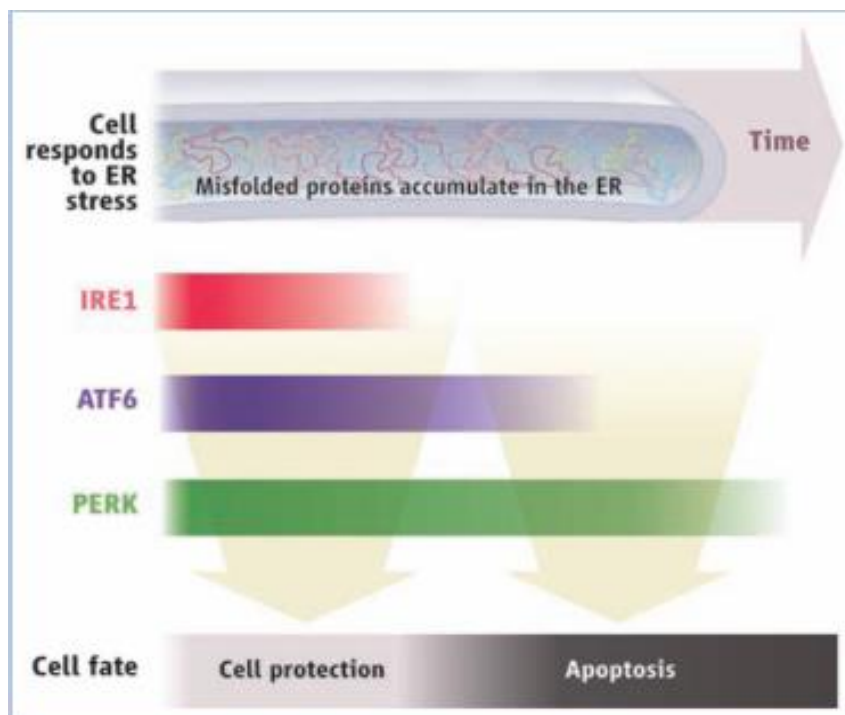


Figure 29. L'influence de la durée du stress réticulaire sur le destin de la cellule⁷⁰.

4.5. Integrated Stress Response

La réponse intégrée au stress « *Integrated Stress Response* » (ISR) est une voie alternative à l'activation de l'UPR. Le facteur eIF2 α peut être phosphorylé indépendamment des branches de l'UPR par trois kinases supplémentaires : la protéine GCN2, la kinase inhibitrice régulée par l'hème (HRI) et la protéine kinase PKR. Pendant cette réponse, la protéine GCN2 phosphoryle eIF2 α pour conserver le métabolisme des AA et incite l'ATF4 à favoriser la récupération après la privation en nutriments^{77,78}.

5. Conclusion

La voie UPR fonctionne comme un réseau de régulation, présentant des opportunités de diaphonie avec d'autres voies de signalisation. La voie UPR est impliquée dans la régulation systémique du métabolisme protéique, lipidique et glucidique. De plus, cette voie interagit avec multiples cascades de signalisation impliquées dans la mort cellulaire programmée, l'inflammation, la prolifération, la croissance, ... L'interaction de la voie UPR avec ces processus complexes montre l'importance de son implication dans diverses conditions physiologiques et pathologiques. Les acteurs centraux et la connectivité des circuits impliqués semblent être conservés parmi les eucaryotes. Chez les mammifères, les signaux induisant l'UPR sont transduits *via* trois capteurs UPR localisés au niveau de la membrane du RE : IRE1, PERK et ATF6 (**Figure 30.**). Parmi ceux-ci, la voie médiée par IRE1 est la plus conservée chez les eucaryotes. Au cours du stress du RE, suite à une oligomérisation et une autotransphosphorylation, IRE1 actif procède au clivage de l'ARNm d'un facteur de transcription de la leucine basique (bZIP), à savoir *HAC1* chez la levure, *XBP1* chez les mammifères et *bZIP60* chez les plantes^{51,66}. Les protéines résultantes activent les gènes cibles de l'UPR afin de résoudre le stress réticulaire, rétablir l'homéostasie et maintenir la survie cellulaire. Le cas échéant, la mort cellulaire apoptotique est déclenchée.

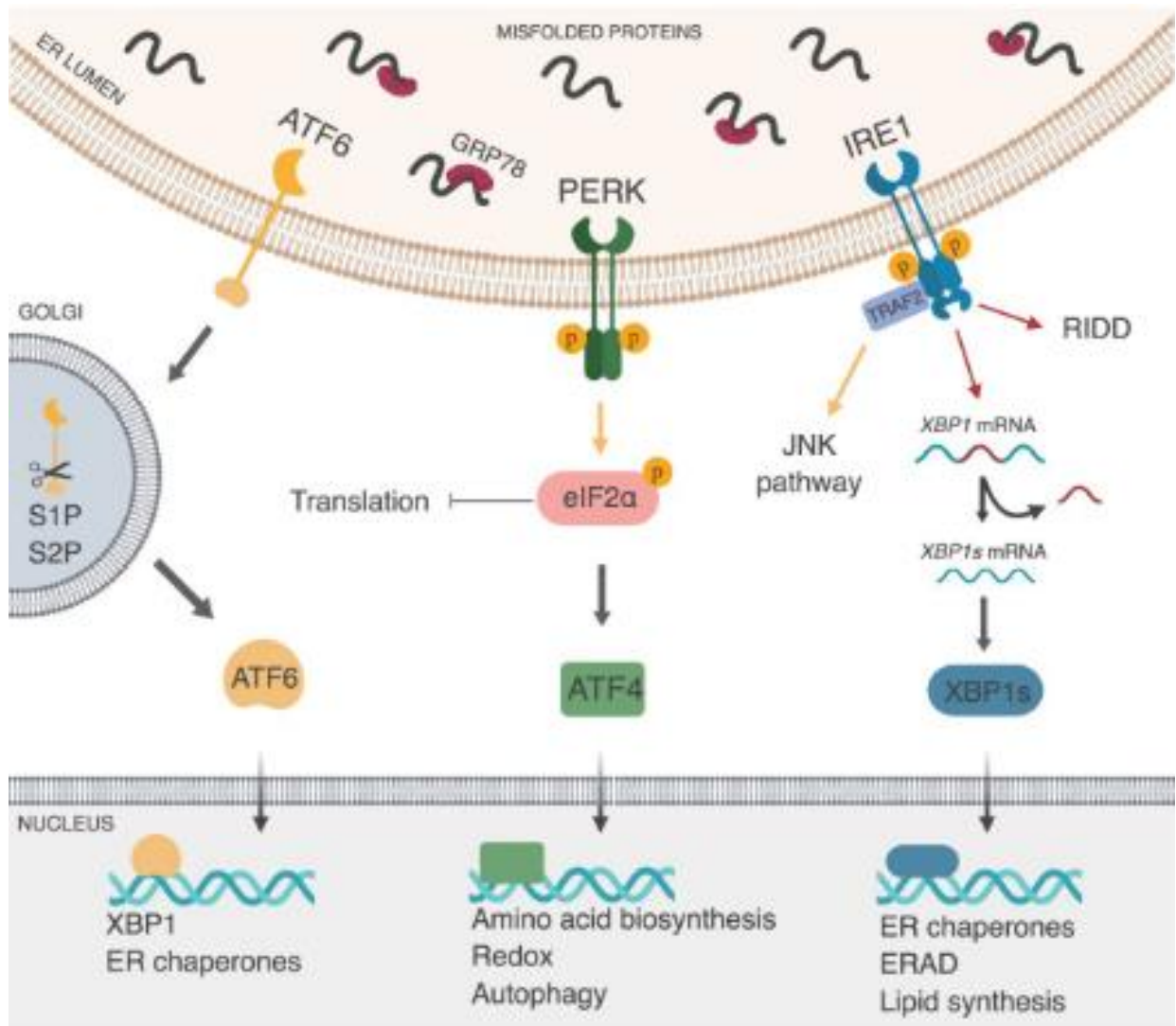


Figure 30. Récapitulatif de l'activité des trois branches de la voie UPR chez l'homme¹¹³.

III. CHAPITRE II : L'implication de la voie UPR dans les pathologies humaines

1. Introduction : La voie UPR et les « maladies conformationnelles »

Les composantes de l'UPR régulent de nombreux processus et ne doivent pas être considérés comme trois cascades de signalisation isolées, mais comme un réseau fournissant une diapason puissante avec l'autophagie, l'apoptose et l'inflammation. D'où, l'implication de la voie UPR dans multiples pathologies métaboliques, comme le diabète^{2,6}, l'obésité⁷⁹, la fibrose kystique ou mucoviscidose⁷⁵, le cancer^{1,6}, les maladies inflammatoires^{4,76} telles que l'athérosclérose^{66,76}, l'asthme⁷⁶, la maladie hépatique alcoolique^{23,76}, la stéatose hépatique non-alcoolique^{67,76}, l'emphysème (Stade ultime, irréversible et destructif de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive BPCO), dans des maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer⁸⁰, de Parkinson^{23,81}, de Huntington²³, de Charcot-Marie-Tooth⁶⁶, la sclérose latérale amyotrophique⁷⁶ et dans certaines infections virales⁴.

L'accumulation des protéines incompetentes au repliement, résistantes à la dégradation protéasomique dans le RE, peut complètement perturber ce dernier et par conséquent, constitue une menace permanente pour la fonction et la viabilité des cellules^{2,75}. Les conformations aberrantes des protéines sont une cause majeure de nombreuses maladies humaines. Elles sont donc nommées « maladies conformationnelles », originellement appelées maladies de stockage du RE parce que la plupart de ces maladies sont associées à la rétention des protéines non-repliées dans ce dernier^{2,11,23}. Ces maladies sont dues à des dysfonctionnements de la voie de dégradation par le protéasome qui conduiraient à une activation de la réponse UPR et à plus long terme à la mort cellulaire⁵.

2. La voie UPR et les maladies inflammatoires

L'inflammation est une réponse physiologique essentielle et nécessaire pour faire face aux infections de l'organisme par le non-soi, tels que les virus et les bactéries, ainsi que pour la réparation des tissus endommagés à la suite des blessures. La réaction inflammatoire peut cependant persister d'une manière disproportionnée et se

transformer en inflammation chronique, contribuant ainsi à de multiples pathologies aiguës comme chroniques, telles que le diabète, l'arthrite rhumatoïde, le cancer, l'asthme, l'allergie et la dermatite⁸². Le processus inflammatoire exige l'interaction entre, d'un côté, les cellules immunitaires spécialisées, telles que les lymphocytes et non spécialisées, telles que les macrophages et, d'un autre côté, des médiateurs pro-inflammatoires, des immunomodulateurs et régulateurs (voies de signalisation). Ceci permet la détermination de la réponse cellulaire (différenciation, recrutement, activation, adhésion, migration, chimiotactisme, diapédèse) et systémique (œdème, douleur, chaleur, rougeur...). Les docosanoïdes (C22), les éicosanoïdes (C20) et les octadécanoïdes (C18) sont des lipides oxygénés produits à partir des acides gras polyinsaturés qui jouent un rôle important dans l'initiation, la progression et la résolution de l'inflammation tout en interagissant avec multiples voies de signalisation et en régulant divers aspects de la réponse immunitaire. Par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires et de ceux couplés à la protéine G (RCPG), les éicosanoïdes régulent de multiples processus homéostatiques et inflammatoires⁸³⁻⁸⁵.

En 2008, de nouvelles observations suggèrent que la réponse UPR peut elle-même initier l'inflammation. Il existe des preuves épidémiologiques, cliniques et expérimentales selon lesquelles le stress cellulaire et une inflammation excessive sont liés de manière causale à diverses conditions pathologiques, telles que l'obésité, l'arthrite, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type I et de type II et l'athérosclérose⁶⁹. Sous conditions de stress du RE, ce dernier envoie un signal pour activer le facteur de transcription NF- κ B, afin d'induire l'expression de la réponse immunitaire et des gènes pro-inflammatoires, tels que les interférons et les cytokines. Cette voie de signalisation est appelée réponse de surcharge du RE « *ER Overload Response* » (EOR)^{1,8}. Elle est beaucoup moins étudiée que l'UPR, mais son action peut s'appliquer dans les maladies aiguës comme chroniques. Comparée à l'UPR, l'EOR semble être plus reliée à des perturbations de mouvements calciques. En libérant des réserves de Ca²⁺ de la lumière du RE dans le cytosol, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mène à l'activation de NF- κ B, qui est un facteur de transcription spécifique de la séquence qui est un point clé de la prolifération cellulaire, de l'inflammation et donc de la survie cellulaire (**Figure 31.**)⁷¹.

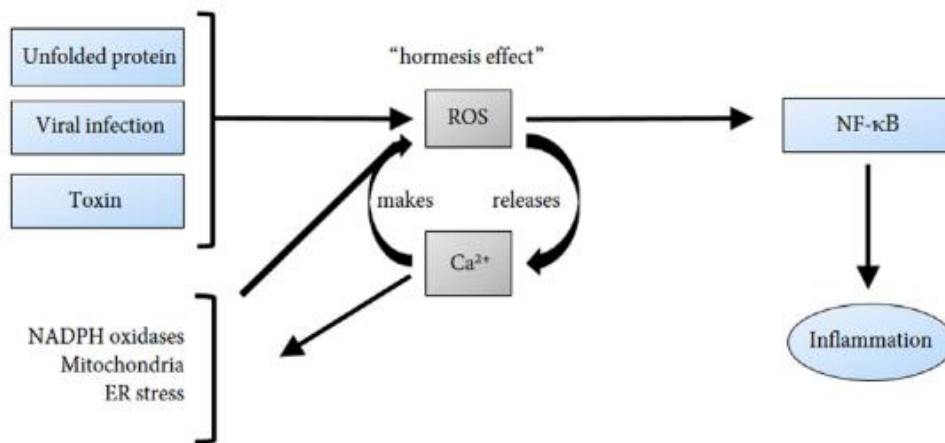


Figure 31. La voie EOR en réponse aux perturbations homéostatiques⁷¹.

Bien que la démarcation entre UPR et EOR ne soit pas claire, l'un doit céder le pas à l'autre afin d'éviter les redondances dans la logique mécaniste. L'UPR mène à un état de défense, tandis que l'EOR conduit à un état d'attaque. L'EOR est spécialisée dans l'activation des voies conduisant à l'inflammation et à la prolifération cellulaire, *via* NF- κ B afin de favoriser la survie cellulaire, ce qui contraste radicalement avec l'UPR (**Figure 32.**). Les protéines chaperonnes GRP perturbent l'homéostasie du Ca^{2+} et conduisent à l'activation de la voie EOR⁷¹. Les mitochondries sont étroitement associées au RE par le biais de leurs membranes, dont le rôle est important pour de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation de la signalisation calcique, le transport des lipides, le métabolisme énergétique et la survie cellulaire⁷⁶.

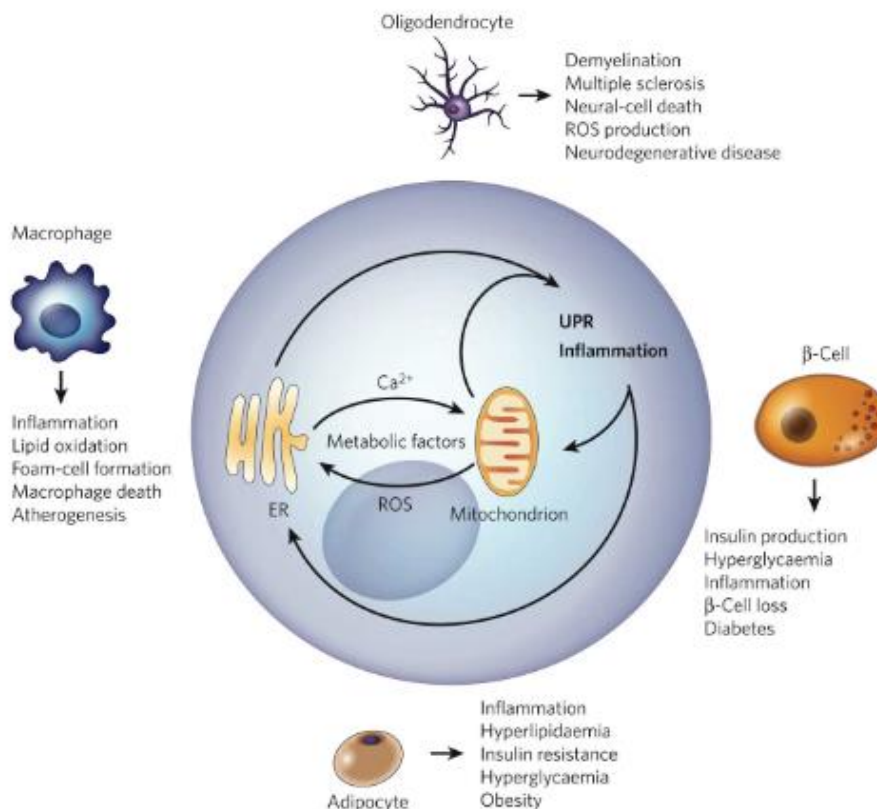


Figure 32. La boucle « stress réticulaire-inflammation » dans les cellules spécialisées²⁰.

Les ROS sont de petites molécules très réactives du fait de la présence d'électrons non appariés. Les ROS sont d'importants médiateurs de l'inflammation et un lien est établi entre le stress du RE et la génération et l'accumulation de ROS intracellulaires, un état communément appelé stress oxydatif. Le repliement des protéines dans les conformations correctes dans le RE est un processus consommateur d'énergie et des conditions d'oxydation sont nécessaires pour la formation de liaisons disulfures intramoléculaires et intermoléculaires⁶⁹. Pendant la formation de la liaison disulfure, les ROS sont produites à l'intérieur du RE et pourraient contribuer de manière significative au stress oxydatif⁷⁶. Le RE fournit un environnement oxydant pour faciliter la formation de liaisons disulfures et ce processus contribue jusqu'à environ 25% de la production totale des ROS⁶⁷. Plusieurs agents externes tels que les polluants atmosphériques, les radiations, les métaux lourds, les médicaments et les pesticides peuvent induire une production des ROS intracellulaires. Lorsque leur production dépasse la capacité antioxydante, le stress oxydatif affecte négativement la synthèse des protéines et l'homéostasie du RE^{67,71}. Les ROS, y compris les radicaux libres, sont générés par les mécanismes de repliement par oxydation régis *via* la voie UPR dans le RE et dans les mitochondries. L'interconnexion entre le RE et les ROS est assurée par des voies de signalisation impliquant le glutathion (GSH)/disulfure de glutathion, la NADPH oxydase 4, la NADPH-P450 réductase, le Ca^{2+} , l'« *ER Oxidoreductin 1* » (ERO1) et la PDI⁶⁷.

En effet, le transport des électrons pendant la formation de la liaison disulfure est piloté par un relais protéique impliquant deux enzymes résidentes dans le RE : PDI et ERO1⁶⁹. Cette dernière fonctionne en association avec la « *Flavin Adenine Dinucleotide* » (FAD), qui est synthétisée dans le cytosol mais qui peut facilement pénétrer dans la lumière du RE. ERO1 est une oxydoréductase qui transmet les liaisons disulfures à l'isomérase PDI⁷⁶. PDI accepte les électrons des substrats de repliement des protéines, oxydant ainsi les groupes thiol (SH) sur les résidus Cys de la protéine et aboutissant à la formation de liaisons disulfures. ERO1 utilise une réaction dépendante de FAD pour transférer des électrons de PDI vers l'oxygène moléculaire (O_2), ce qui entraîne la production des ROS sous forme de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Par conséquent, une augmentation de la charge de repliement des protéines dans le RE peut entraîner une accumulation des ROS, ce qui pourrait déclencher une réponse inflammatoire. L'activité d'ERO1 étant modulée par la quantité de FAD présente dans le RE, la formation de liaisons disulfures est liée au statut nutritionnel et/ou métabolique de la cellule. Le glutathion

réduit (GSH) peut contribuer à la réduction de la liaison disulfure, qui survient lors d'une surcharge en protéines à replier ou une accumulation de protéines mal-repliées et conduit à la production de glutathion oxydé (GSSG)⁶⁹ (**Figure 33.**). De plus, l'activation de la protéine CHOP pro-apoptotique augmente également la production des ROS en régulant positivement la sous-unité α d'ERO1 (ERO1 α)⁷⁶.

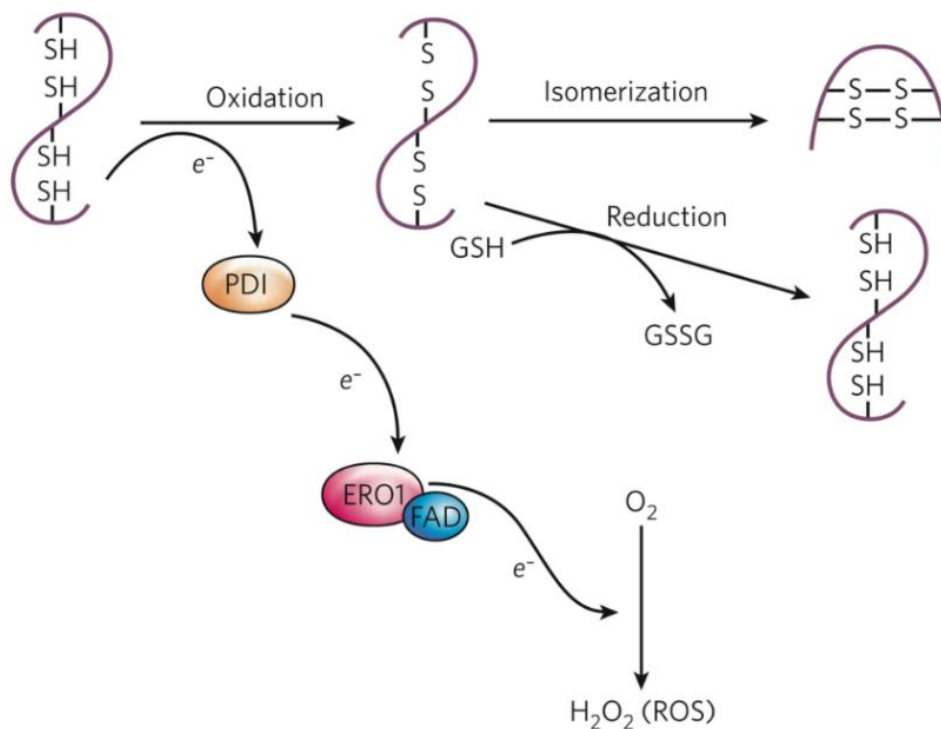


Figure 33. Le repliement oxydatif des protéines⁶⁹.

Il est important de noter que les cellules ont développé des mécanismes pour limiter l'accumulation des ROS. La voie PERK peut activer un programme antioxydant en traduisant préférentiellement l'ARNm codant le facteur de transcription ATF4 et en phosphorylant le facteur de transcription « *Nuclear Factor Erythroid-derived 2 (NFE2)-Related Factor 2* » (NRF2), contenant un domaine bZIP également. Après la phosphorylation induite par PERK, le facteur NRF2 est transféré vers le noyau où il active la transcription d'un ensemble de gènes codants pour des enzymes antioxydantes et détoxifiantes, notamment la NAD(P)H-quinone oxydoréductase, l'hème oxygénase 1 et la glutathion S-transférase. De plus, les facteurs de transcription NRF2 et ATF4 induisent chacun la transcription de gènes dont les produits maintiennent le niveau cellulaire de glutathion, le principal tampon rédox de la cellule^{69,76} (**Figure 34.**).

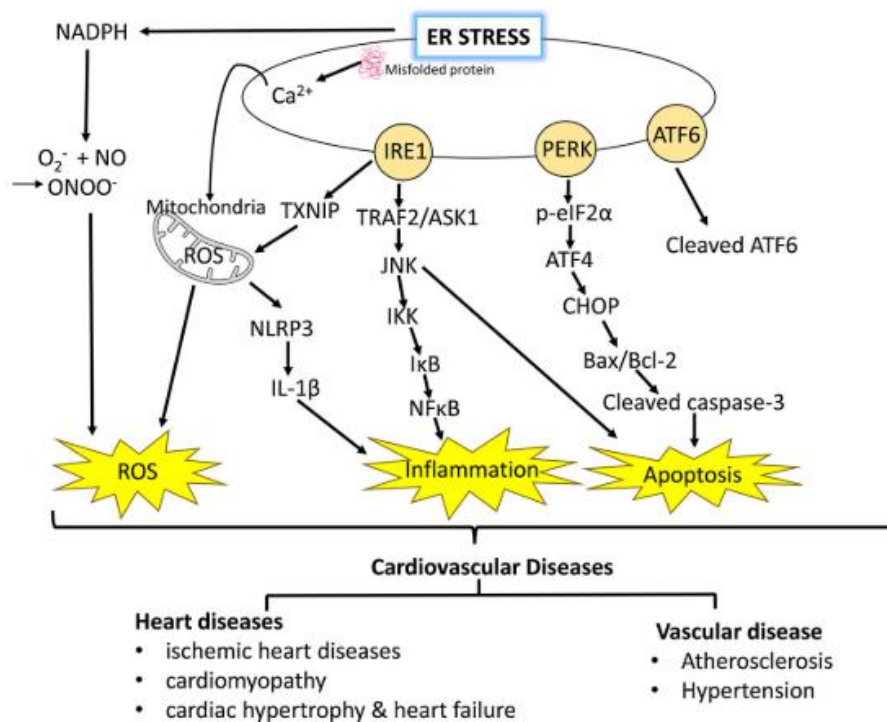


Figure 34. Les mécanismes des maladies cardiovasculaires induites par le stress ER¹³⁷.

La voie UPR a été identifiée en tant que régulateur principal dans plusieurs maladies inflammatoires⁷⁶. En effet, en réponse au stress du RE, l'UPR peut promouvoir directement l'activation de NF-κB par le biais d'une atténuation de la traduction induite par PERK. Le facteur NF-κB est un régulateur clé de la transcription qui joue un rôle central dans l'apparition de l'inflammation. En l'absence de *stimuli* inflammatoires, NF-κB reste inactif par la liaison à un membre de la famille des inhibiteurs de la NF-κB (IκB). Étant donné que les IκB ont une demi-vie plus courte que celle de NF-κB, l'atténuation de la traduction induite par PERK modifie le rapport d'IκB à NF-κB, libérant ainsi NF-κB et permettant sa translocation vers le noyau. Donc, l'activation de NF-κB est initiée par la phosphorylation induite par le signal d'IκB, qui est ensuite dégradée. La dégradation de IκB expose un signal de localisation nucléaire dans NF-κB, permettant à NF-κB de se déplacer dans le noyau, où il induit la transcription de nombreux gènes inflammatoires^{69,76} (**Figure 35.**).

D'ailleurs, le domaine cytoplasmique d'IRE1α, phosphorylée en réponse au stress du RE, peut recruter le facteur TRAF2. L'autophosphorylation d'IRE1α induit un changement de la conformation de son domaine cytosolique, qui peut ensuite se lier à la protéine adaptatrice TRAF2. Le complexe IRE1α-TRAF2 peut recruter la kinase « *IκB kinase* » (IKK) et la protéine kinase JNK, conduisant ainsi à leur activation. La JNK activée phosphoryle la protéine AP1. IKK activée phosphoryle IκB, conduisant à sa dégradation

et ainsi à l'activation de NF- κ B et à sa translocation nucléaire. Les protéines NF- κ B et AP1 activées migrent vers le noyau, où elles induisent la transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire^{69,76,78} (**Figure 34., Figure 35.**).

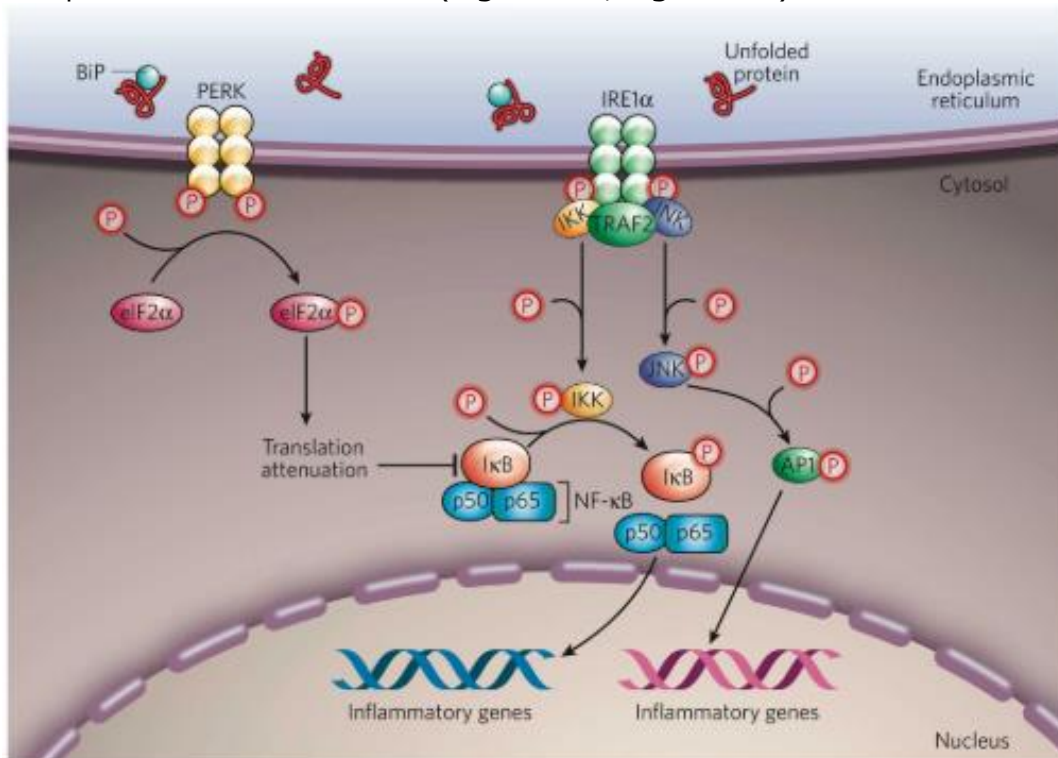


Figure 35. Le modèle proposé par Zhang K. et Kaufmann R. pour l'activation médiée par l'UPR de la JNK et du facteur NF- κ B⁶⁹.

Parmi d'autres, la protéine I κ B α (et ses membres de famille apparentés, I κ B β et I κ B ϵ) peut être considérée comme l'un des régulateurs négatifs les plus puissants et universels de NF- κ B. Les cytokines telles que l'interleukine IL-1 ou le facteur de nécrose tumorale TNF α , déclenchent la destruction active et rapide d'I κ B α par la voie de dégradation protéasomique. Cela permet aux sous-unités de NF- κ B de se transloquer dans le noyau et d'induire la transcription de nombreux gènes cibles, y compris le gène *NFKBIA* qui code pour I κ B α . L'I κ B α nouvellement synthétisée séquestre le facteur NF- κ B, le retenant dans le cytoplasme. Cette boucle de rétroaction négative majeure arrête l'activation de la transcription de NF- κ B dans plusieurs types de cellules⁷⁸. De plus, le facteur XBP1^S peut directement induire l'activation de la transcription des gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et le TNF α . Il a été démontré que le stress chronique du RE active, *via* IRE1 α , une protéine qui interagit avec la thiorédoxine pour activer l'inflammasome NLRP3 et favoriser l'apoptose. IRE1 α induit la libération de profils moléculaires associés au danger mitochondrial par la signalisation NLRP3/caspase-2/BID, qui active l'inflammasome. L'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite la production des ROS et de l'efflux de K⁺⁷⁶ (**Figure 34.**).

L'IRE1 β , quant à elle, a été identifiée comme une protéine essentielle qui atténue les perturbations de la fonction du RE pendant la progression de la maladie. Les récepteurs *Toll-like 2* (TLR2) et TLR4 induisent l'activation d'IRE1 α et l'épissage de XBP1, nécessaires à la production optimale de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages^{60,79,86}. Des conditions de stress survenant lors d'un cancer, d'une inflammation ou d'une infection, activent des réponses adaptatives contrôlées par la voie UPR et le facteur NF- κ B. Les voies UPR et NF- κ B convergent dans le noyau à travers dix principaux facteurs de transcription, à savoir ATF4, ATF3, CHOP, XBP1, ATF6 α et les cinq sous-unités de NF- κ B. Cette diapason offre de nombreuses possibilités d'ajuster les réponses au stress cellulaire et pourrait également être exploitée à des fins thérapeutiques à l'avenir⁷⁸. Effectivement, lors de la privation en AA, ATF3 et ATF4 se lient aux éléments de réponse aux AA (AARE) du promoteur ATF3 et à de nombreux gènes métaboliques, tels que l'asparagine synthétase (AsnS), le transporteur d'AA neutres 2 couplé au sodium (SNAT2) et le γ -glutamyl-cyclotransférase (CHAC1), mais aussi au promoteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)⁷⁸. L'ATF4 agit directement comme facteur de transcription pour IL-6⁷⁶. ATF4 et CHOP régulent près de 58 gènes qui ont un rôle documenté dans la régulation de la voie de signalisation de NF- κ B, y compris trois I κ B (α , ε et ζ)⁷⁸. La branche ATF6 α de l'UPR active également NF- κ B *via* la phosphorylation de la Ser/Thr kinase AKT et par l'I κ B⁷⁶.

2.1. L'athérosclérose et les cardiopathies ischémiques

L'athérosclérose, cause principale des maladies cardiovasculaires, est une maladie inflammatoire caractérisée par une activité immunologique intense, une accumulation de lipides, une mort cellulaire et une fibrose ; dans laquelle les mécanismes immunitaires interagissent avec les facteurs de risque métaboliques, entraînant l'apparition de lésions dans le système vasculaire artériel^{69,87} (**Figure 36.**).

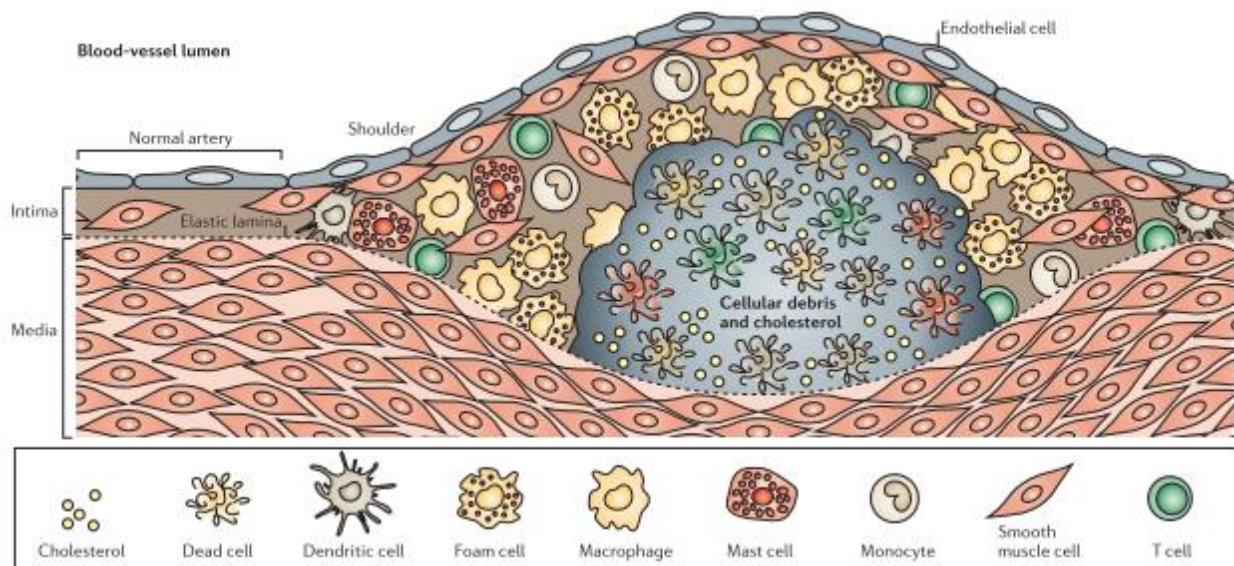


Figure 36. La composition cellulaire des plaques d'athérome⁸⁷.

Au fil du temps, ces lésions, appelées plaques d'athérome, mûrissent et acquièrent de nouvelles caractéristiques. Les événements cliniques les plus graves suivent la rupture d'une plaque qui expose le matériel thrombotique à la lumière artérielle et provoque une occlusion thrombotique soudaine de l'artère sur le site de la perturbation⁸⁷ (**Figure 37.**).

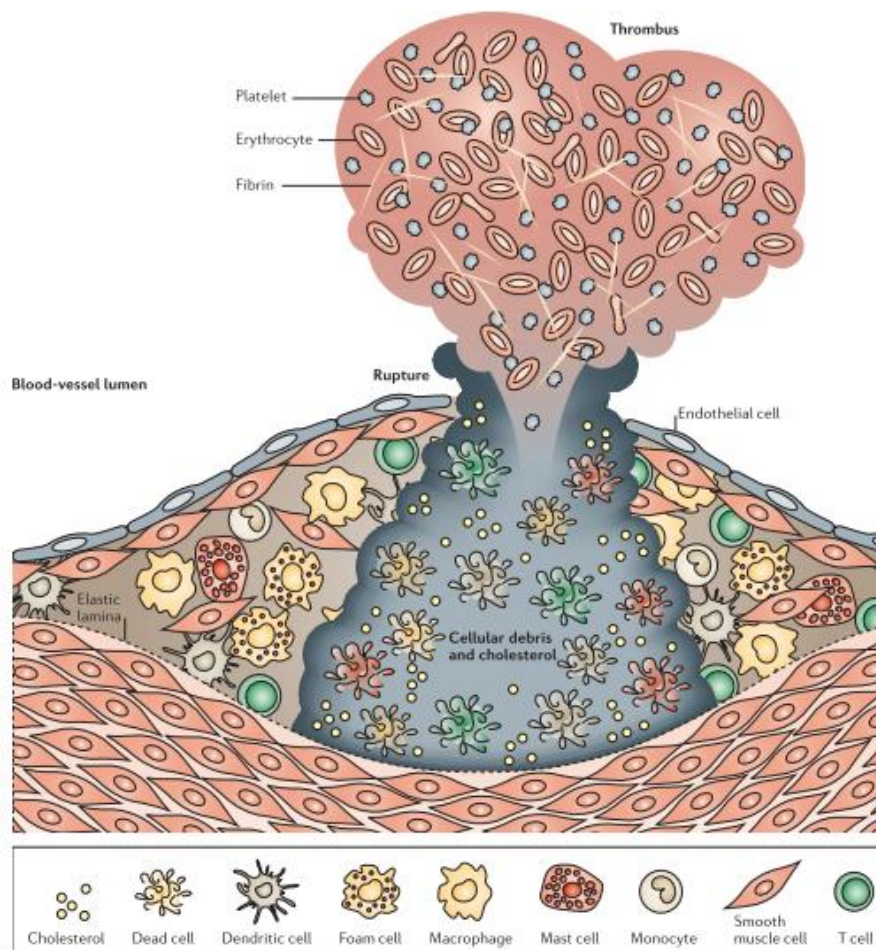


Figure 37. L'activation, la rupture de la plaque et la thrombose⁸⁷.

Dans le cœur, l'athérosclérose peut entraîner un infarctus du myocarde et une insuffisance cardiaque, alors que dans les artères qui perfusent le cerveau, elle peut provoquer un AVC ischémique et des attaques ischémiques transitoires. Si l'athérosclérose affecte d'autres branches artérielles, elle peut entraîner une insuffisance rénale, une hypertension, des anévrismes de l'aorte abdominale et une ischémie critique des membres inférieurs⁸⁷. Des études *in vitro* ont montré que les facteurs de transcription ATF4 et XBP1 étaient nécessaires à la production de la cytokine IL-6 et des chimiokines IL-8 [ou « *CXC-chemokine Ligand 8* » (CXCL8)], « *CC-chemokine Ligand 2* » (CCL2) et CXCL3 par les cellules endothéliales de l'aorte humaine à l'état basal et lors de l'accumulation de lipides oxydés⁶⁹. Par ailleurs, la cardiopathie ischémique est la principale cause d'invalidité et de décès liée aux maladies cardiovasculaires dans le monde, ce qui pèse lourdement sur le système de santé et l'économie. La cardiopathie ischémique est un état de stress grave qui provoque de nombreuses altérations pathologiques et déclenche la mort des cellules cardiaques. Des preuves accumulées suggèrent un rôle critique de la voie UPR dans l'étiologie de la cardiopathie ischémique chez les humains et les modèles de rongeurs par divers événements pathologiques, tels que la surproduction des ROS, l'inflammation et le déséquilibre métabolique. Si le stress est sévère et persistant, l'UPR déclenche des voies inflammatoires et apoptotiques, pour éliminer les cellules touchées qui contribuent au développement et à la progression de la cardiopathie ischémique. Alors que les effets pro-survie de l'UPR peuvent dominer au début de la phase d'ischémie, l'activation persistante de l'UPR pourrait avoir des conséquences néfastes, voir fatales⁸⁸.

2.2. L'asthme et les infections virales et fongiques

L'asthme est considéré comme l'une des cinq maladies respiratoires principales dans le monde. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique hétérogène des voies respiratoires qui touche près de 334 millions de personnes dans le monde et qui entraîne un fardeau socioéconomique important à l'échelle mondiale. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que près de 250 000 personnes meurent d'asthme chaque année dans le monde. C'est une maladie dont les manifestations cliniques résultent d'une obstruction, d'une hypersensibilité et d'une inflammation des voies respiratoires. Elle est associée à des symptômes récurrents tels que la respiration sifflante, la dyspnée, l'oppression thoracique et la toux. Les voies respiratoires asthmatiques sont caractérisées

par une infiltration accrue d'éosinophiles, de neutrophiles, de macrophages, de mastocytes activés et de cellules T auxiliaires (*helper*) de type 2 (Th2). L'asthme se caractérise par une réponse immunitaire Th2 chez une grande proportion de patients. Les cytokines, telles que les interleukines IL-4, 5, 9 et 13, sont connues pour favoriser l'inflammation à éosinophiles et la production d'immunoglobuline E (IgE) par les mastocytes. Les IgE entraînent la production de médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, qui déclenche le bronchospasme et la sécrétion de mucus par les cellules du gobelet (cellule caliciforme). L'inhibition de l'IRE1 pourrait constituer une option thérapeutique potentielle pour réduire ces deux caractéristiques importantes de l'asthme, à savoir la réponse inflammatoire accrue et l'hypersécrétion de mucus⁷⁶.

Une aggravation de l'état asthmatique peut être provoquée par des *stimuli* tels que le stress oxydatif, les infections pathogènes et l'exposition aux allergènes. Tout cela peut induire un stress au niveau du RE et activer l'UPR, entraînant l'activation de différentes réponses inflammatoires et une dérégulation des fonctions immunitaires innées dans les voies respiratoires. En effet, l'accumulation de protéines mal/non-repliées dans le RE pourrait aggraver l'état asthmatique. Le stress oxydatif est accru dans les voies respiratoires asthmatiques. Les ROS endogènes et exogènes tels que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le radical hypohalite (halogène oxydé) et le H₂O₂, ainsi que les espèces réactives de l'azote (RNS), telles que le monoxyde d'azote (NO), le peroxyde d'azote (HNO₃⁻) et le nitrite (NO₂⁻), jouent un rôle majeur dans l'inflammation des voies respiratoires. Par ailleurs, l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques est associée à la chronicité et à la sévérité de l'asthme. Dans l'épithélium bronchique asthmatique, une augmentation de l'UPR peut entraîner une inflammation et une activation accrues de NF-κB induite par ATF6 et IRE1, tandis que PERK activée conduit à une ubiquitination et à une dégradation d'*IFNAR1*, un gène codant pour la sous-unité 1 du récepteur d'interféron α/β, réduisant ainsi les réponses antivirales. Cela pourrait amener le microenvironnement épithélial à être plus susceptible aux infections virales et fongiques. De plus, les allergènes induisent le stress du RE dans l'épithélium des voies respiratoires. Ce stress réticulaire est évident dans l'inflammation allergique des poumons ainsi que dans l'asthme fongique⁷⁶. Effectivement, des espèces fongiques aéroportées telles que *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* peuvent provoquer une aggravation de l'asthme. Plus de 6,5 millions de personnes dans le monde souffrent d'asthme sévère associé à une sensibilisation fongique. Jusqu'à 50% des asthmatiques adultes

fréquentant des soins secondaires ont une sensibilisation fongique et 4,8 millions d'adultes sont atteints d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique⁷⁶. Par exemple, *Aspergillus fumigatus* est un champignon filamenteux vivant dans le sol qui est devenu l'agent pathogène prédominant de la population immunodéprimée. L'infection est contractée par l'inhalation des spores suffisamment petites pour atteindre les voies respiratoires distales. *A. fumigatus* s'appuie sur l'activation de la voie UPR pour sa croissance chez l'hôte⁸⁹. *Cryptococcus neoformans*, un agent pathogène fongique opportuniste responsable de la méningo-encéphalite met en jeu le pronostic vital chez les sujets immunodéprimés. La voie UPR chez *Cryptococcus* régule le stress du RE, la résistance aux médicaments antifongiques et la virulence de manière dépendante d'IRE1. Une Cryptococcose non traitée traverse la barrière hémato-encéphalique et provoque une méningo-encéphalite mortelle. *Cryptococcus* comprend deux espèces pathogènes majeures, *C. neoformans* et *C. gattii*, inhalées par les voies respiratoires, entraînant une infection pulmonaire. *C. neoformans* est le clade le plus couramment isolé au monde⁴. La voie IRE1 est également impliquée dans la réplication et la virulence de *Salmonella enterica typhimurium*⁹⁰ et de *Candida albicans* chez les patients immunodéprimés³⁹.

L'activation d'IRE1 α et l'autophagie par des virus tels que les rhinovirus (RV) sont susceptibles de favoriser leur virulence et leur réplication dans l'épithélium bronchique asthmatique⁷⁶. Une variété de virus induit le stress du RE et la voie UPR impliquée dans la réplication virale^{2,74}. Pour faciliter leur réplication, les virus empruntent de nombreux processus au sein de leurs cellules hôtes. Les virus enveloppés font souvent appel au RE pour la maturation de leurs glycoprotéines et leur transport vers la membrane plasmique⁷². Par exemple, Le cytomégalovirus humain (CMV) et le virus de l'hépatite C (VHC) induisent tous deux un stress au niveau du RE en induisant épissage de l'ARNm *XBP1*^{72,74}. La protéine US11 du CMV active l'UPR pour augmenter la dégradation des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte⁷⁴. L'induction de NF- κ B par l'UPR se produit dans des situations physiopathologiques telles qu'une infection par des virus, comme le VHC ou le coronavirus humain 229E⁷⁸. La voie UPR est activée lors de l'infection par le VHC ou par celui de l'herpès simplex (VHS). Ces virus, en se répliquant dans le RE et en entraînant une synthèse accrue de protéines par la cellule hôte, déclenchent la réponse UPR. D'une part, le VHC stimule la voie ATF6 mais inhibe celle d'IRE1. Ainsi, les protéines chaperonnes peuvent aider les protéines virales à s'assembler sans être marquées pour

la dégradation. D'autre part, le VHS code pour une protéine homologue à la protéine GADD34⁵. Les deux virus induisent le clivage de l'ATF6. L'induction des bras IRE1 α et/ou ATF6 de l'UPR peut aider à maintenir l'homéostasie du RE en augmentant la capacité de repliement des protéines, facilitant ainsi la maturation des glycoprotéines virales et la survie des cellules hôtes. En revanche, la plupart des virus bloquent l'activation de la voie PERK et la phosphorylation en aval d'eIF2 α , évitant ainsi l'inhibition de la traduction et l'induction ultérieure de l'apoptose *via* CHOP⁷². Le virus de l'hépatite B (VHB) a même un promoteur qui est régulé positivement par le stress du RE. Ainsi, il est probable que certains virus ont mis au point des mécanismes leur permettant d'échapper aux conséquences négatives du stress et d'utiliser simultanément certains sous-ensembles de facteurs induits par l'UPR à leur avantage⁷⁴.

Les α virus, tel que le chikungunya (CHIKV), sont exceptionnels car ils permettent la phosphorylation d'eIF2 α au cours d'une infection productive⁷². L'expression des facteurs de transcription fonctionnels et des gènes cibles de l'UPR est efficacement inhibée par CHIKV. L'infection par un α virus induit plusieurs composantes clés de l'UPR. PERK est activé tôt lors des infections par CHIKV. Bien qu'eIF2 α soit phosphorylé et qu'une partie du *pool* d'ARNm *XBP1* soit épissée, la voie UPR est complètement inhibée dans les cellules infectées par le CHIKV²¹. L'activation/inhibition des branches de l'UPR est différente selon le virus. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) induit l'expression de l'ATF4. Puisqu'ATF4 est impliqué dans une réponse sensible au facteur temps pour la survie ou la mort cellulaire, il peut déclencher la réplication du VIH pendant la phase de survie de l'UPR et a été suggéré comme jouant un rôle dans le passage de la latence virale à une réplication active. En termes de traduction, la protéine Tat entre en compétition avec eIF2 α pour la phosphorylation et inhibe l'activation de la kinase PKR, conduisant à la réactivation des processus de traduction. VIH-1 induit IRE1, JNK et AP1, entraînant une apoptose cellulaire pouvant contribuer à la progression du VIH vers le sida. Pendant ce temps, l'IL-2 induit l'épissage de *XBP1* dans les cellules T CD8⁺, ce qui est essentiel pour leur différenciation en cellules T cytotoxiques. Alors que de nombreux virus ont évolué pour détourner cette défense, le VIH continue à se répliquer et à traduire les protéines dans les lymphocytes. Cela finit par épuiser la cellule, entraînant sa destruction. La destruction continue des lymphocytes T CD4⁺ appauvrit les lymphocytes T en CMH de classe II, ce qui épuise en conséquence les précurseurs des lymphocytes T auxiliaires (Th), essentiels pour l'immunité à médiation cellulaire⁷¹.

Le virus ZIKA (ZIKV), quant à lui, déclenche le stress réticulaire et la voie UPR dans le cortex cérébral de fœtus humains infectés. La balance de la neurogenèse est régulée de manière dynamique au cours du développement par la voie UPR physiologique dont la perturbation conduit à la microcéphalie en réduisant le débit neuronal et en renforçant la susceptibilité de la descendance neuronale à l'apoptose dépendante de l'UPR via l'activation de CHOP *in vivo*. Le stress induit et la dérégulation de l'UPR contribuent à l'inhibition directe de la voie PERK dans les cerveaux infectés par le ZIKV ce qui empêche l'apoptose induite par l'UPR, prévenant ainsi la microcéphalie. En outre, l'inhibition d'IRE1 α prévient la microcéphalie et réduit la réplication du ZIKV, mais inhibe également l'ATF4, cible directe de la voie PERK. La dérégulation de l'ATF4 est un facteur prédominant de la microcéphalie induite par ZIKV. Alors, le ciblage de la voie UPR par des inhibiteurs constitue une approche thérapeutique potentielle visant à réduire la neuropathogenèse associée au ZIKV dans le cortex cérébral en développement⁹¹.

La nécessité de développement de nouveaux médicaments antifongiques dirigés vers de nouvelles cibles thérapeutiques est devenue urgente en raison de l'incidence croissante d'infections invasives, d'effets secondaires de médicaments toxiques et de l'émergence de souches pharmacorésistantes. La voie UPR fongique, bactérienne, virale et parasitaire joue un rôle essentiel dans la résistance aux médicaments. Nombreux virus et champignons utilisent la voie UPR pour développer leur mécanisme de pathogénicité contre les molécules de défense de l'hôte. L'apparition de résistance souligne l'importance de la voie UPR, comme étant une cible prometteuse pour le contrôle de diverses conditions pathologiques⁶⁷. De plus, l'inhibition de l'UPR est associée à une virulence atténuée et à une augmentation spectaculaire (dramatique) de la sensibilité aux antifongiques⁸⁹. Pour cela la stratégie de recherche qui vise à découvrir de nouvelles molécules capables de moduler le stress du RE, constitue une bonne alternative à l'égard des maladies fongiques chez l'humain comme chez les plantes⁶⁷.

3. La voie UPR et les maladies métaboliques

3.1. Le Diabète

Selon les estimations de la Fédération Internationale du Diabète (FID), il y a dans le monde 425 millions de personnes atteintes de diabète et 727 milliards de dollars, soit 12% des dépenses de santé mondiale sont consacrées au diabète⁹². L'OMS prévoit qu'en 2030 le diabète serait la 7^{ème} cause de décès dans le monde^{93,94}. En France, en 2009, on

estimait à plus de 3,5 millions le nombre de personnes atteintes de diabète. En 2015, ce nombre est porté à 3,7 millions soit 5,4% de la population. Selon la Fédération Française des Diabétiques (FFD), 26% des diabétiques ont plus de 75 ans. Sachant qu'en 2025, les personnes âgées représenteront le quart de la population française⁹⁵, ce nombre risque de ne cesser d'augmenter.

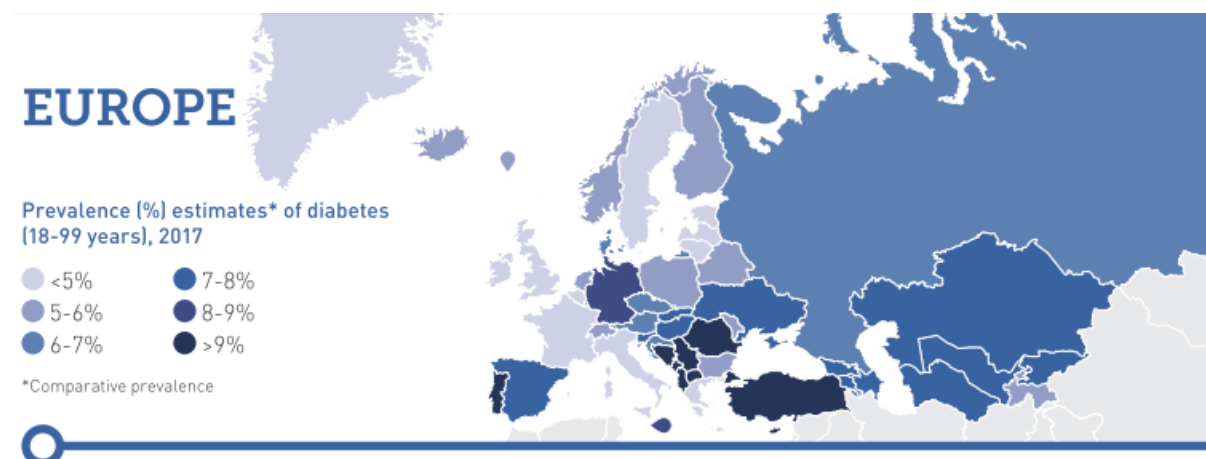


Figure 38. Estimation de la prévalence (%) du diabète (20-79 ans) en Europe en 2017¹⁹⁰.

Les principales causes du diabète sont⁹⁵ :

- les prédispositions génétiques et les antécédents,
- le surpoids et l'obésité,
- la mauvaise alimentation,
- le manque d'activité physique et la sédentarité.

Les disparités du diabète sont liées à⁹⁵:

- l'âge,
- le sexe (H>F),
- les conditions sociales : plus de 80% des décès dans les pays à revenu faible ou intermédiaire,
- les disparités géographiques : en France Métropolitaine, la région de l'Ouest a les taux de prévalence les plus faibles : Bretagne (3,33%), Pays-de-la-Loire (4,08%).

Le diabète est une maladie métabolique chronique divisée en deux types : le Diabète de Type I (DTI) ou Diabète Insulinodépendant (DID) et le Diabète de Type II (DTII). Les diabétiques diagnostiqués avec un DTII présentent près de 90% des diabétiques, contre environ 10% avec un DTI⁹⁵. Le DTI est une maladie auto-immune entraînant la destruction des cellules β du pancréas et une insuffisance ultérieure de production d'insuline. Les cellules β du pancréas ne répondent plus à la demande en insuline pour maintenir l'homéostasie du métabolisme du glucose, ce qui provoque une hyperglycémie. D'autre part, le DTII est un mélange complexe de conditions métaboliques conduisant à une résistance à l'insuline et à une éventuelle sécrétion altérée d'insuline^{60,74}. Au niveau

des îlots de Langerhans représentant environ 2% du pancréas en masse, environ 60% sont des cellules β sécrétrices d'insuline. Lorsque le glucose s'associe aux cellules β après un repas complet, l'insuline ne sera produite et sécrétée qu'après la génération de ROS et la stimulation des récepteurs de la Ryanodine, suivies de la libération de Ca^{2+} luminal et de l'augmentation subséquente des réserves de Ca^{2+} intracellulaire. Cette réponse constitue la réponse à la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose « *Glucose-Stimulated Insulin Secretion* » (GSIS), qui conduit à la libération d'insuline dans les tissus concernés tels que le tissu musculaire qui a un besoin continu en énergie. Par conséquent, toute perturbation dans le transport de Ca^{2+} empêchera la sécrétion d'insuline et une hyperglycémie persistante entraînera une inflammation et une destruction des cellules β ⁷⁴.

Le stress du RE et la voie UPR sont impliqués dans le DTI à médiation immunitaire^{60,74,79}. En raison de facteurs génétiques qui sont généralement à l'origine du DTI, des aberrations de la traduction ou des modifications post-traductionnelles des protéines, entraînant leur déploiement, peuvent alors déclencher la voie UPR^{60,71}. Le stress du RE et l'activation de la voie UPR sont également impliqués dans le dysfonctionnement et l'apoptose des cellules β présentes dans certaines formes héréditaires de diabète, ainsi que dans l'épuisement tardif des cellules β et dans la résistance à l'insuline au cours du DTII^{5,79,96}. En outre, le stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondrial jouent un rôle important dans le DTII. Les voies NF- κ B dépendante de PERK et JNK dépendante d'IRE1 peuvent être activées dans des conditions de stress oxydatif, ce qui peut être important pour la capacité des ROS à induire la résistance à l'insuline^{79,86}.

3.1.1. Le Diabète Central Insipide

Le Diabète Central Insipide (DCI) est un trouble dans lequel le patient excrète un volume important d'urine hypotonique et diluée en raison d'une altération de la sécrétion de l'Arginine-Vasopressine (AVP) anti-diurétique produite dans l'hypothalamus et stockée dans la glande pituitaire postérieure. L'AVP est la principale hormone impliquée dans la régulation de l'homéostasie de l'eau et dans l'osmolalité. Cette hormone se lie aux récepteurs V2 présents sur l'épithélium des canaux collecteurs rénaux et améliore la réabsorption de l'eau. La voie ATF6 joue un rôle important dans la régulation de la synthèse et la sécrétion de l'AVP. L'AVP-NPII, un précurseur de l'AVP, est clivée en AVP

lors du transport vers l'hypophyse postérieure. La protéine AVP-NPII a une structure complexe comprenant sept liaisons disulfures et, par conséquent, des mutations géniques codant pour la NPII modifient principalement la structure de la protéine AVP-NPII et provoquent un stress par la protéine AVP-NPII mutante localisée dans le RE et, *in fine*, entraînent une altération de la sécrétion de l'AVP⁶⁰. Dans ce cas, les tissus périphériques insulino-résistants forcent les cellules β pancréatiques à augmenter la production de la proinsuline, ce qui entraîne une augmentation de la proinsuline mal-repliée dans le RE, provoquant un stress du RE. Plusieurs affections pathologiques, telles que la résistance à l'insuline et les mutations du gène codant de l'insuline, augmentent le stress du RE dans les cellules β du pancréas, ce qui conduit à une hyperglycémie, dépendante de l'AVP⁶⁰.

3.1.2. Le Syndrome de Wolfram

Le « *Wolfram Syndrome* » (WS) est une maladie génétique rare caractérisée par un diabète sucré juvénile associé à une altération de la sécrétion d'insuline, un diabète insipide, une perte auditive, une atrophie du nerf optique et une neurodégénérescence. La majorité des patients présentent des mutations autosomiques récessives du gène *WFS1* codant la wolframine localisée sur la membrane du RE et qui joue un rôle dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire⁵. Bien que ce trouble témoigne généralement d'une transmission récessive, certains porteurs de mutations hétérozygotes *WFS1* ont un risque accru de perte auditive neurosensorielle à basse fréquence en plus d'un risque accru de dépression et de suicide. Au niveau du RE, la wolframine (*WFS1*) se lie directement à l'ATF6 et améliore la dégradation de ce dernier par le système ubiquitine-protéasome conduisant à l'apoptose des cellules β ⁶⁰ pancréatiques.

3.1.3. Le Syndrome de Wolcott-Rallison

La signalisation PERK joue un rôle central dans l'homéostasie du glucose. Chez l'homme, des mutations du gène *EIF2AK3*, qui code PERK, sont à l'origine du syndrome de Wolcott-Rallison, caractérisé par un diabète néonatal ou infantile permanent dû à une altération de la sécrétion d'insuline^{5,21,60,74,79}.

3.2. L'obésité et le diabète

En 2016, on enregistrait plus d'1,9 milliard d'adultes en surpoids et plus de 650 millions d'obèses. Chaque année, 2,8 millions de personnes au moins meurent des

conséquences du surpoids ou de l'obésité. Le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risque majeurs pour un certain nombre de maladies chroniques, parmi lesquelles le diabète, les maladies cardio-vasculaires et le cancer. À l'échelle mondiale, 44% du diabète, 23% des cardiopathies ischémiques et 7 à 41% de certains cancers peuvent être imputés au surpoids et à l'obésité⁹⁷. L'obésité est un trouble du métabolisme lipidique dû à la sédentarité et au régime riche en calories. La perturbation lipidique fait référence à une accumulation excessive de lipides dans les tissus, notamment le foie, le pancréas et les tissus adipeux⁹⁸. La perturbation de l'homéostasie du RE par l'altération des phospholipides membranaires active la voie UPR et provoque des changements dramatiques de la transcription et de la traduction dans la cellule⁹⁸. En effet, l'obésité induit un stress chronique du RE dans le tissu adipeux, qui est déclenché par la libération d'acides gras non-estérifiés. Le stress du RE dans le tissu adipeux induit une inflammation *via* la voie PERK/eIF2 α , ce qui entraîne une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6⁶⁰ (Cf. **III.2**). La découverte, il y a un peu plus de dix ans, du fait que le facteur TNF- α est surexprimé dans le tissu adipeux de souris obèses a permis d'établir le premier lien clair entre l'obésité, le diabète et l'inflammation chronique⁷⁹.

L'adiponectine est un sensibilisateur à l'insuline doté de propriétés anti-inflammatoires et anti-résistance à l'insuline. L'altération de l'expression de l'adiponectine contribue donc au développement de la résistance à l'insuline. L'environnement hypoxique dans les adipocytes provoque un stress du RE, qui réduit la transcription de l'adiponectine *via* l'inhibition de CHOP. En outre, l'expression de l'adiponectine est régulée négativement par l'ATF3 induite par le stress du RE présent dans les maladies métaboliques chroniques. La leptine est une hormone dérivée des adipocytes qui supprime l'appétit principalement par son action sur un sous-ensemble de neurones hypothalamiques. Le stress du RE joue un rôle important dans le développement de la résistance à la leptine. L'expression de la leptine est également régulée négativement par le stress du RE. Le facteur CHOP activé par le stress du RE régule négativement la protéine C/EBP α , qui est nécessaire à la transcription de la leptine^{60,67}. Le stress oxydatif est une caractéristique de l'obésité et un facteur important dans le développement de la résistance à l'insuline dans l'obésité^{79,96}, qu'il soit dû à des facteurs de mode de vie ou à une déficience génétique, entraînent des conditions de stress qui augmentent la demande pour le RE^{69,79,98} et modulent spécifiquement l'autophagie *via* l'axe IRE1/XBP1 (**Figure 39**)⁹⁸.

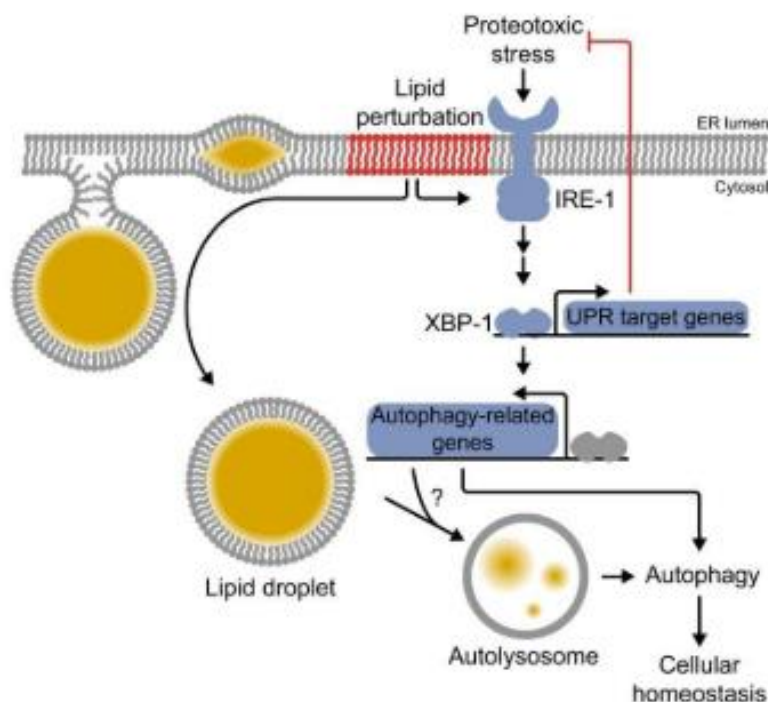


Figure 39. La régulation de l'autophagie via l'axe IRE1/XBP1⁹⁸.

Le stress du RE accentue l'état pathologique associé aux altérations du métabolisme lipidique et glucidique, ce qui suggère que le ciblage de la voie UPR pourrait servir de stratégie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques associées à l'accumulation des lipides et des glucides⁶⁷.

4. La voie UPR et les maladies neurodégénératives

Les inclusions intracellulaires de protéines dénaturées et les agrégats de protéines sont caractéristiques de nombreuses maladies neurologiques, notamment la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP) et plusieurs autres maladies héréditaires par expansion de polyglutamine, telles que la maladie de Huntington (MH), les ataxies spinocérébelleuses^{5,8,75}, la sclérose en plaques (SEP)⁶⁹, les maladies à protéines prions^{5,75} et l'épilepsie^{99,100}. Les neurones en particulier sont très sensibles aux effets toxiques des protéines mal-repliées. L'accumulation des protéines mal-repliées entraîne des modifications de la structure des organites, y compris le RE⁸. Dans toutes ces maladies neurodégénératives, la pathologie et le décès éventuel de populations neuronales spécifiques sont dus à l'accumulation de polypeptides anormaux distincts. Ces différents types d'inclusion résultent de mécanismes communs et provoquent des réponses similaires de la part de l'hôte. Par exemple, toutes ces inclusions contiennent des composants de la voie de dégradation de l'ubiquitine-protéasome, ainsi que des chaperonnes moléculaires, qui représentent les deux systèmes

principaux protégeant les cellules eucaryotes contre l'accumulation de polypeptides non/mal-repliés⁷⁵. Environ 1 à 10% des cas de ces maladies neurodégénératives (MH, MA, MP et SLA) sont héréditaires, souvent en tant que caractères autosomiques dominants⁸⁰.

4.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est l'affection neurodégénérative la plus fréquente. En 2020, la France comptera environ 1 275 000 personnes atteintes¹⁰¹. Cette maladie se caractérise principalement par l'agrégation de protéines anormales (β -amyloïde, tau) mesurées dans le liquide céphalorachidien (LC) ou quantifiées par méthode d'imagerie nucléaire telle que la tomographie par émission de positrons (TEP)¹⁰². La MA est une maladie neurodégénérative qui apparaît lentement et qui est caractérisée par le dépôt d'agrégats de protéines ordonnés dans le cerveau. Ces dépôts de protéines amyloïdes dans le cerveau commencent plusieurs années avant l'apparition des symptômes. Les signes caractéristiques de chorée et de démence progressives sont dus à une perte neuronale sévère, initialement dans le néostriatum et plus tard dans le cortex cérébral⁸⁰. La MA est la cause la plus courante de démence et serait à l'origine de 60-70% des cas¹⁰³. Le risque de développer cette maladie augmente fortement avec l'âge et, à mesure que l'espérance de vie augmente, l'effet de la maladie augmente également⁸⁰. Diagnostiquer et initier le traitement avant l'apparition des symptômes est essentiel pour gérer la maladie car, à l'apparition des symptômes, il est souvent trop tard pour que les traitements actuels induisent un effet significatif. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour la MA est donc cruciale. Les plaques séniles, les enchevêtrements neurofibrillaires, la perte neuronale et le déficit en acétylcholine définissent la MA. Les caractéristiques neuropathologiques des enchevêtrements neurofibrillaires et des plaques séniles ont été décrites par le psychiatre allemand Aloïs Alzheimer en 1907⁸⁰. Les enchevêtrements neurofibrillaires sont des agrégations de la protéine microtubulaire cytosquelettique tau hyperphosphorylée^{71,80,81}. Les plaques séniles (neuritiques), quant à elles, résultent de l'accumulation de plusieurs protéines et d'une réaction inflammatoire autour des dépôts de protéines β -amyloïdes ($A\beta$)^{8,80}. Les plaques sont donc des structures complexes, constituées notamment de la protéine β -amyloïde, la protéine tau, l'ubiquitine, l' α_1 -antichymotrypsine, l'apolipoprotéine E, les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) et l' α_2 -macroglobuline⁸ (**Figure 40.**).

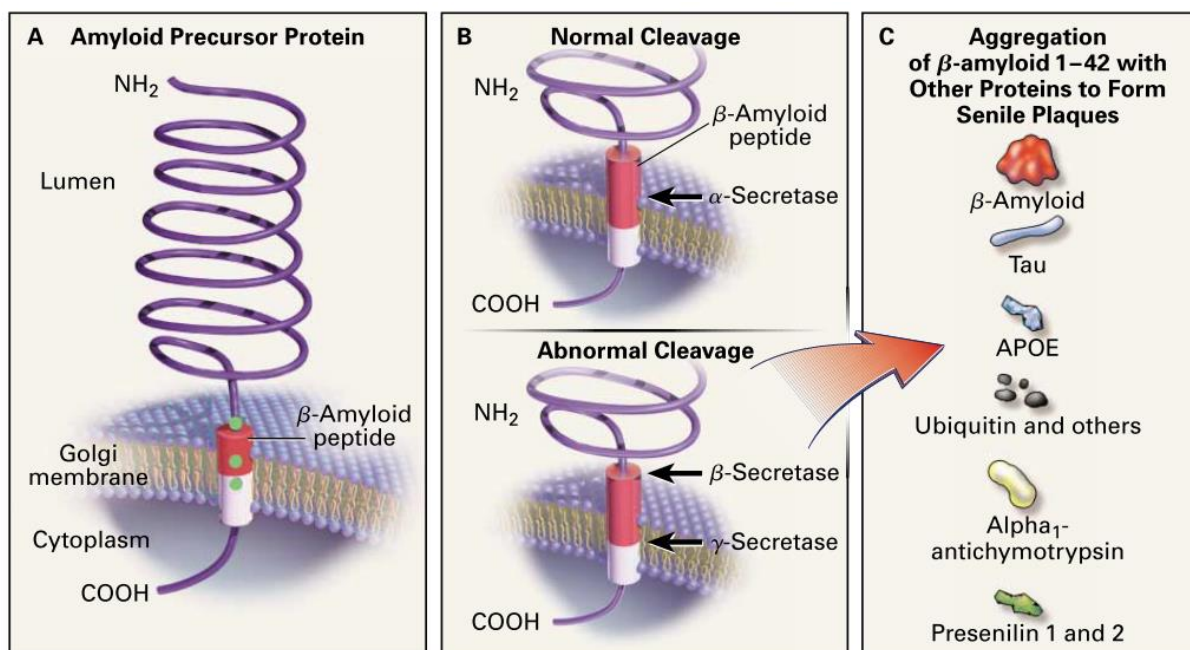


Figure 40. A) La protéine APP, **B)** clivage normal et anormal de la protéine et **C)** les conséquences d'un clivage anormal⁸⁰.

La protéine β -amyloïde provient du clivage anormal d'une glycoprotéine membranaire appelée « *Amyloid Precursor Protein* » (APP)^{1,5,48,81}. Ce clivage est assuré par les sous-unités catalytiques PS1 et PS2 du complexe enzymatique de la γ -sécrétase. Des mutations dans les gènes codant PS1, PS2 et APP sont responsables des formes familiales juvéniles de la MA^{1,5}. PS1 et PS2 sont impliquées dans la protéolyse de β -APP dans le RE pour générer deux produits : A β 40 et A β 42^{1,74}. Le premier s'accumule dans le trans-Golgi, tandis que le dernier s'accumule dans le RE¹. Différentes mutations génétiques des *PS1* et *PS2* associées aux formes familiales de la MA sont liées à une diminution de l'activation des différentes branches de la voie UPR *in vitro*, altérant l'induction des chaperonnes comme BiP et sensibilisant les cellules au stress réticulaire et à l'apoptose^{104,105}.

Hoozemans et ses collaborateurs ont démontré en 2005, grâce à des études post mortem sur des tissus cérébraux primitifs de la MA, un stress du RE sous la forme d'une expression accrue de la protéine chaperonne BiP et une réactivité immunohistochimique pour des marqueurs spécifiques de l'activité de la voie UPR (PERK)¹⁰⁶. Cependant, étant donné que les protéines agrégées (enchevêtrements et plaques) dans la MA ne sont pas retrouvées dans le RE, ces découvertes soulèvent la question de la source du stress du RE qui active la signalisation de l'UPR dans cette maladie⁷⁴. La voie UPR semble jouer un rôle dans l'amyloïdogenèse. En régulant positivement l'expression de l'APP, l'expression de CHOP est améliorée induisant l'agrégation des β -amyloïdes qui conduisent à la mort des neurones ; marques pathologiques de la démence dans le cadre de la MA⁷¹. En outre,

le stress réticulaire et l'activation de l'UPR peuvent également survenir dans la MA liée à une fonction défectueuse de la préséniline^{74,105}. La protéine PS1 est localisée dans les endomembranes et est impliquée dans le processus protéolytique de la protéine IRE1 dans les cellules des mammifères^{48,105}. Il a été démontré que PS1 se lie directement sur IRE1 au niveau de la membrane réticulaire⁵. IRE1 étant essentielle pour la transcription des chaperonnes, la mutation sur *PS1* inhibant la phosphorylation de l'IRE1 peut expliquer en partie l'accumulation des A β mal-repliés^{71,107}. À la fois, un épissage élevé de XBP1 et une phosphorylation d'IRE1 α ont été détectés dans les tissus pathologiques de patients atteints de la MA⁸⁶. Une accumulation de XBP1^S est retrouvée dans le cortex frontal des cerveaux de patients atteints, combinée à une augmentation de certaines de ses cibles transcriptionnelles comme la chaperonne PDI. En conditions de stress, le facteur XBP1^S joue un rôle neuroprotecteur dans le cadre de la MA et différentes maladies conformationnelles. La surexpression *in vitro* de XBP1^S protège de l'exposition aux peptides β -amyloïdes 1-42 oligomériques dans différents modèles cellulaires, mais son rôle dans l'UPR propre à la MA reste à définir¹⁰⁴.

Parallèlement, L'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires est régulée à la hausse dans les stades avancés de la MA, suggérant l'activation de la réponse inflammatoire « *ER Overload Response* » (EOR)¹ (Cf. **III.2**). En effet, la présence continue d'agrégats d'A β entraîne l'activation de l'UPR et la libération de Ca²⁺ luminal pour activer l'EOR et d'autres voies apparentées de survie cellulaire qui activent également la « *Glycogen Synthase Kinase 3- β* » (GSK3- β), une tau kinase majeure responsable de la phosphorylation de la protéine tau et impliquée dans son agrégation ; la voie PERK étant directement impliquée. De ce fait, une augmentation des dépôts d'agrégats entraînerait non seulement des signaux favorables à la mort des cellules neuronales, mais également une hyperphosphorylation de la protéine tau provoquant l'effondrement des microtubules associés, ce qui conduirait à une augmentation du nombre de protéines non/mal-repliées et, éventuellement, à une augmentation du stress du RE et de l'apoptose^{71,74,106} (**Figure 41.**).

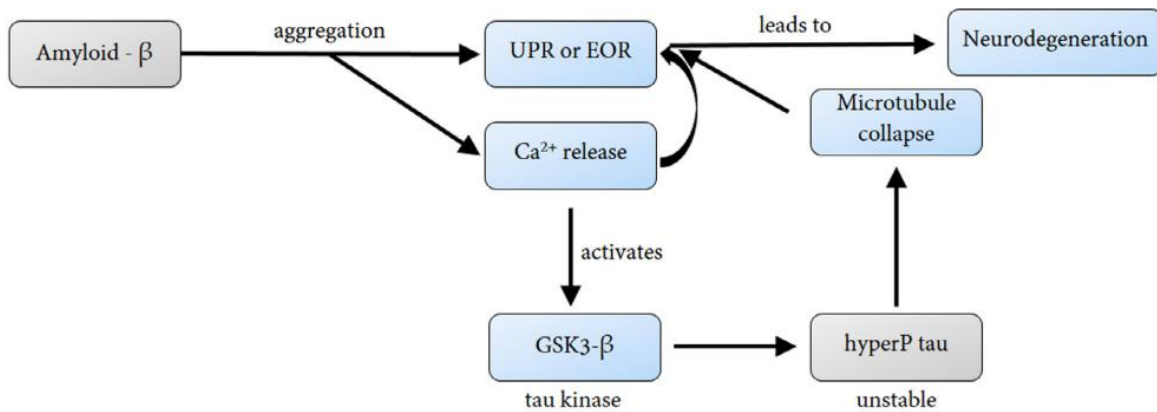


Figure 41. La voie UPR participe activement à la pathogénèse et à la physiopathologie de la MA⁷¹.

En outre, l'UPR activée qui conduit à la phosphorylation d'eIF2 α (PERK) pour atténuer la synthèse des protéines, augmente les transcrits d'ARNm qui code la « β -site APP Cleaving Enzyme 1 » (BACE1), une β -sécrétase qui conduit à la production de plus d'A β . Pendant ce temps, l'appauvrissement continu en Ca²⁺ mène à l'EOR, qui active ensuite le NF- κ B conduisant à la production de cytokines et au recrutement subséquent de cellules microgliales. Ceci explique en partie pourquoi l'inflammation est une partie critique de la physiopathologie et de la progression de la MA⁷¹.

4.2. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est le deuxième trouble neurodégénératif le plus fréquent après la MA⁸⁰. En France, plus de 200 000 personnes sont touchées par cette maladie¹⁰⁸. Les symptômes caractéristiques de rigidité, de bradykinésie et de tremblement au repos sont associés à la perte de cellules dans la *substantia nigra* et à l'épuisement de la dopamine dans le striatum. Les grandes inclusions intracytoplasmiques appelées corps de Lewy sont la marque pathologique de la maladie, se produisant principalement dans les neurones de la *substantia nigra* contenant la mélanine⁸⁰. Ces neurones forment un réseau, la voie nigrostriée impliquée dans le contrôle des mouvements. Cette maladie se caractérise par la mort massive de neurones dopaminergiques. Outre la synthèse de dopamine, ces neurones expriment notamment « *Retinaldehyde Dehydrogenase 1* » RALDH1, une aldéhyde déshydrogénase qui leur donne la capacité de synthétiser des molécules bioactives comme l'acide rétinoïque, dérivé de la vitamine A, ou de dégrader les aldéhydes neurotoxiques⁸⁰. Il existe un important chevauchement clinique entre la MA et la MP. La démence se développe chez environ 20 à 30% des patients atteints de la MP et le cerveau de ces patients contient souvent des corps de Lewy, des plaques séniles et des enchevêtrements

neurofibrillaires^{8,80}. Chez les patients atteints de la MP tant héréditaire que sporadique, les corps de Lewy contiennent des sous-unités d' α -synucléine, d'ubiquitine et des protéines protéasomales. Si le mécanisme est connu, les causes de cette maladie sont toujours inconnues. Dans 10% des cas, la maladie a une origine génétique. Deux protéines impliquées dans certaines formes familiales de la MP, « *PTEN-induced putative kinase 1* » (PINK1) et Parkine, travaillent ensemble pour préserver la qualité de la mitochondrie, centrale énergétique de la cellule. Elles régulent notamment la destruction des mitochondries endommagées par un processus appelé mitophagie. Par ailleurs, des mutations dans le gène codant l'ubiquitine hydrolase carboxyterminale semblent également provoquer la MP familiale. Ces mutations sont supposées conduire à des aberrations dans la voie protéolytique et à l'agrégation de protéines sous forme de corps de Lewy⁸⁰. Néanmoins, la kinase « *Leucine-Rich Repeat Kinase 2* » (LRRK2), une protéine altérée dans une forme familiale de la MP, réfute la mitophagie et les fonctions de PINK1 et Parkine. C'est une kinase impliquée dans la perte de neurones dopaminergiques et de protéines α -synucléine, dont les agrégats constituent les corps de Lewy⁷¹.

D'autre part, il a été démontré qu'une certaine protéine appelée « *Parkine Associated Endothelin receptor-Like Receptor* » (PAEL-R)⁸, un RCPG, se déploie spontanément lorsqu'elle est activée. PAEL-R est un substrat de la Parkine, qui est ensuite ubiquitinée et destinée à la dégradation protéasomale. Par conséquent, des mutations dans le gène codant la Parkine peuvent entraîner une accumulation de PAEL-R, ce qui peut déclencher la voie UPR. En fait, la mort des cellules neuronales induite par PAEL-R est observée dans le parkinsonisme juvénile autosomique récessif⁷¹. De plus, l' α -synucléine interagit directement avec l'ATF6 naissante, empêchant efficacement son association aux vésicules COPII qui transfèrent généralement des protéines au Golgi. En conséquence, une interférence avec la protéine « *Rat brain 1* » (Rab1), une GTPase, pourrait conduire à une accumulation de protéines non-repliées dans le RE et une inhibition de l'ATF6 arrêterait généralement l'ERAD, incitant la cellule à signaler l'apoptose⁷¹. D'ailleurs, des mutations de gènes associés à des fonctions liées à ERAD et/ou aux fonctions mitochondriales peuvent être à l'origine de la MP chez l'Homme⁶⁹. Il a été démontré que des mitochondries défectueuses pouvaient déclencher l'UPR. Les aberrations dans les organites qui interagissent avec le RE peuvent également déclencher la voie UPR, ce qui indique que le RE est au cœur de la pathologie biocellulaire de la MP (**Figure 42.**)⁷¹.

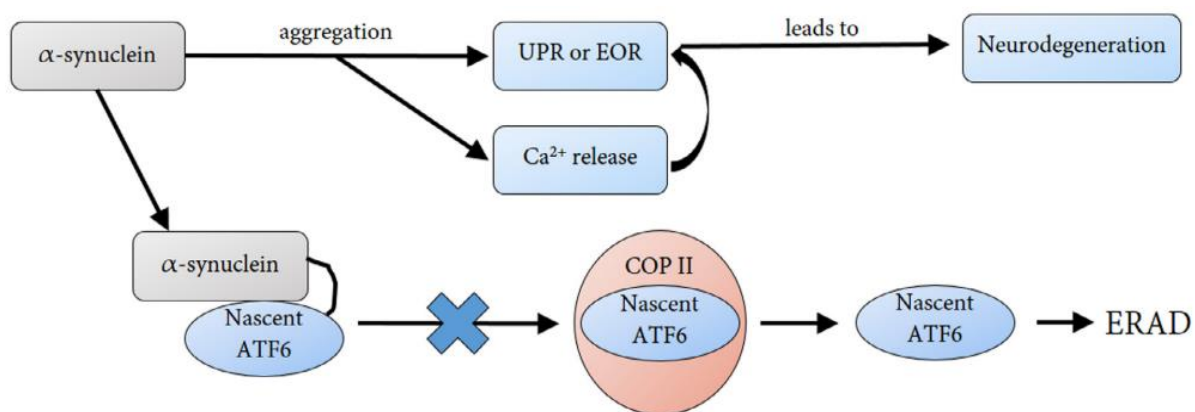


Figure 42. La voie UPR participe activement à la pathogenèse et à la physiopathologie de la MP⁷¹.

La MP implique deux types de cellules : les neurones et les myocytes. La surcharge de la libération de Ca^{2+} luminal dans les myocytes conduit à ce que l'on appelle une dyskinésie induite par la L-DOPA « *L-DOPA-Induced Dyskinesia* » (LID). L'appauvrissement des réserves luminales de Ca^{2+} pour favoriser la contraction musculaire déclenche le stress du RE. L'activation de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ déclenche l'EOR, ce qui explique en partie pourquoi les patients atteints de la maladie de Parkinson qui souffrent de LID ou de dystonies associées souffrent également d'inflammation et d'atrophie musculaires⁷¹.

Enfin, parvenir à bloquer la mort de ces neurones serait une avancée majeure dans la lutte contre cette maladie⁸⁰. D'autant plus que les médicaments conçus pour l'atténuer, tels que des agonistes de la dopamine ou des médicaments dopaminergiques (L-DOPA, par exemple), causent souvent plus de dommages à long terme⁷¹. Il a été démontré que suite à l'inhibition de XBP1, les neurones dopaminergiques se montraient plus résistants à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), une neurotoxine et que l'inhibition de CHOP protège les neurones dopaminergiques de l'effet des toxines dans un modèle où, la MP est associée au stress du RE^{3,71}.

4.3. La sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est le trouble neuromoteur le plus courant. Il débute généralement au cours de la cinquième et la sixième décennie de la vie. Appelée aussi la maladie de Charcot, la SLA est décrite pour la première fois par le neurologue français Jean-Martin Charcot en 1869. Chez un patient typique, elle se caractérise par une dégénérescence sélective des motoneurones, grandes cellules nerveuses reliant le cerveau à la moelle épinière et la moelle épinière aux muscles. La perte des motoneurones entraîne une atrophie progressive des muscles squelettiques. Bien que

ceux qui contrôlent les mouvements des yeux et la fonction des intestins et de la vessie soient épargnés. Avec une prévalence d'environ 5 pour 100 000 personnes, cette maladie est généralement sporadique, mais chez 1 à 10% des patients, elle est familiale, héritée comme un trait autosomique dominant. Les formes héritées et sporadiques sont indiscernables cliniquement^{80,81}. La SLA est une maladie implacable qui se manifeste par un déclin progressif de la fonction musculaire entraînant éventuellement une paralysie, des déficits de la parole et, finalement, un décès par insuffisance respiratoire chez la majorité des patients dans les 2 à 5 années suivant le début des signes cliniques¹⁰⁹. Dans les deux formes, le pronostic est grave, la mort survenant dans trois à cinq ans chez 95% des patients⁸⁰. On trouve des inclusions cellulaires et des axones moteurs gonflés, ainsi que des accumulations neurofilamenteuses anormales et des agrégats de protéines toxiques dans les neurones moteurs en dégénérescence^{80,109}. La mort neuronale motrice dans la SLA est complexe et implique multiples cascades d'événements, notamment la formation d'agrégats de protéines, les dommages oxydatifs, les anomalies mitochondriales, la modification de l'homéostasie du Ca^{2+} , l'activation de la cascade des caspases et les modifications du taux de BCL-2¹⁰⁹. Ceci montre l'implication de la voie UPR et son interaction avec la voie apoptotique dans le cadre de la SLA.

4.4. La maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) est une maladie par expansion de polyglutamine. Les inclusions intranucléaires de huntingtine et d'ubiquitine dans les neurones du striatum et du cortex cérébral mais pas dans le tronc cérébral, le thalamus ou la moelle épinière, correspondent étroitement aux sites de perte des cellules neuronales du striatum dans la maladie. Les erreurs de réplication de l'ADN entraînant une augmentation du nombre de répétitions de trinuécléotides sont associées à des profils sélectifs de neurodégénérescence⁸⁰. Les trinuécléotides (CAG) à répétition, sont marqués dans la MH, la maladie de Kennedy, l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne et six formes d'ataxie spinocérébelleuse⁸¹. De plus, il a été démontré que l'inhibition de XBP1 favorise l'autophagie par induction de l'expression du gène « *Forkhead box O1* » (*FOXO1*) codant pour un facteur de transcription clé régulant l'autophagie dans les neurones et stimule la dégradation de la protéine Huntingtine mutante retardant ainsi la progression de la maladie. En revanche, XBP1 est nécessaire pour la récupération locomotrice après une lésion de la moelle épinière⁸⁶.

4.5. L'épilepsie

En général, le rôle du RE dans les maladies neurodégénératives est de plus en plus reconnu. Cependant, peu de choses sont connues sur le rôle du stress réticulaire dans l'épilepsie. Une étude récente menée par Liu et ses associés a montré que l'expression des chaperonnes BiP et GRP94 est régulée à la hausse après des crises dans le néocortex temporal de patients épileptiques. Ils ont également documenté la présence de stress réticulaire par l'activation de la voie IRE1 α /TRAF2/JNK, indiquant ainsi que dans les cas où une lésion cérébrale se produit à la suite de crises d'épilepsie, le stress du RE et en particulier la voie de signalisation IRE1 α peuvent jouer un rôle important dans l'apoptose des cellules neuronales. D'autres preuves liant le stress du RE à l'épilepsie comprennent des perturbations de l'homéostasie calcique, une expression accrue des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) et la régulation à la hausse de XBP1^{99,100}.

Les branches de la voie UPR sont impliquées dans multiples maladies neurodégénératives. Ceci met l'accent sur l'importance de cibler les différentes fonctions de la voie UPR dans le cadre de ces pathologies. En effet, l'inhibition de la voie IRE1 semble être bénéfique dans la lutte contre la progression de certaines de ces pathologies. Néanmoins, il faudra prendre en compte son interaction avec les différentes voies de signalisations telles que l'apoptose, l'autophagie et l'inflammation et les effets indésirables qui peuvent être engendrés à la suite de cette inhibition.

5. La voie UPR et les maladies tumorales

Les signes distinctifs du cancer, tels que l'instabilité génétique et les mutations, peuvent entraîner une induction constitutive du stress réticulaire et l'activation de la voie UPR, induisant ainsi la croissance, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules cancéreuses^{67,86,110}. En effet, les cellules cancéreuses nécessitent des niveaux de production de protéines très élevés, ce qui impacte sur les systèmes de récupération du RE^{78,111,112}. La modification de l'expression des protéines et l'activation de la voie UPR sont observées dans divers types de cancer, notamment du poumon, du sein, du côlon, de l'estomac, du pancréas, du foie, de la prostate, du rein, de la peau, de l'utérus, de l'ovaire, ainsi que la leucémie, le myélome et le glioblastome^{7,86,113}.

En outre, en raison de la prolifération incontrôlée, les cellules cancéreuses vivent souvent dans des conditions pauvres en oxygène et en nutriments. En effet, les tumeurs

dépassent rapidement leur apport sanguin disponible, ce qui entraîne une disponibilité hétérogène en oxygène dans toute la tumeur, certaines régions n'ayant que peu ou pas d'oxygène, provoquant ainsi un stress microenvironnemental local aboutissant à une hypoxie, à la famine et à l'acidose, qui causent le stress du RE et perturbent éventuellement la synthèse des protéines et des lipides^{7,67,78,111-113}. Le niveau des ROS augmente dans les cellules en hypoxie, ce qui augmente le stress du RE et l'activité de l'UPR. Non seulement les cellules cancéreuses doivent s'adapter aux conditions hypoxiques, mais encore elles doivent faire face à une réduction de l'apport en nutriments jusqu'à ce qu'une vascularisation tumorale suffisante se forme^{67,78,113}. Les tumeurs peuvent surmonter les limitations et les contraintes résultant d'un environnement hypoxique et oligotrophe en partie en stimulant la vascularisation par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *via* un processus appelé « angiogenèse ». L'angiogenèse survient lors de la germination, de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales. Elle est régulée par la sécrétion de facteurs solubles, notamment le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)¹¹³.

La tumeur progresse sur plusieurs étapes, à commencer par la transformation, suivie de la division cellulaire sans restriction, de l'angiogenèse, de l'invasion et enfin la propagation métastatique. La voie UPR est impliquée à chaque étape, d'une manière significative¹¹³. Les composants de la voie UPR peuvent jouer plusieurs rôles et, par conséquent, leurs effets peuvent être difficiles à prévoir et à contrôler. La voie UPR est souvent activée dans les cellules cancéreuses, ce qui suggère que cette réponse est cytoprotectrice et importante pour la survie des cellules. Elle peut favoriser la tumorigenèse et la résistance à divers stress, tels que le stress oxydatif et thérapeutique^{77,111}. Bien que l'activation de la voie UPR aide les cellules cancéreuses à répondre aux demandes de repliement protéique durant l'étape de la transformation, cette voie doit être soigneusement contrôlée pour éviter le déclenchement de la voie apoptotique^{112,113}. En effet, lorsque le stress du RE est trop sévère ou prolongé, l'UPR persistante peut engager et activer des voies de la mort cellulaire programmée⁷⁷. Les cellules cancéreuses contournent donc ce commutateur apoptotique et exploitent la voie UPR pour promouvoir la prolifération et l'invasion métastatique. Ceci consiste à supprimer les composantes de la voie de la mort cellulaire ou à stimuler des mécanismes cytoprotecteurs tels que l'autophagie¹¹³. En plus d'aider à la signalisation pro-survie dans

la tumorigénèse, le stress hypoxique active également les trois branches de l'UPR, qui lancent des cascades en aval pour augmenter l'insensibilité des cellules tumorales à la signalisation pro-apoptotique et donc contribuer à leur survie dans des conditions hypoxiques^{7,113}. Il a été démontré que l'hypoxie active IRE1 α en tant que voie de survie dans les cellules cancéreuses. La surexpression de XBP1 et de la chaperonne BiP a également été démontrée dans divers types de cancer^{74,77}. De plus, la surexpression du facteur XBP1 est liée aux stades cliniques progressifs et au degré de malignité tumorale⁶⁷. De même, la voie IRE1 est principalement pro-angiogénique^{110,113} et le facteur de transcription XBP1^S régule l'angiogénèse indépendamment du facteur de croissance VEGF dans l'adénocarcinome du pancréas, par exemple⁷⁷. Le ciblage thérapeutique de la protéine IRE1 ou XBP1 semble être une stratégie médicamenteuse intéressante dans le cadre des maladies cancéreuses.

L'équilibre entre les signaux, IRE1/XBP1 pro-angiogénique et IRE1/RIDD anti-angiogénique, pourrait influencer sur la progression de l'angiogénèse *via* un processus encore mal connu¹¹³. Le domaine kinase d'IRE1 n'a pas de fonction pro-survie signalée, mais peut déclencher la mort cellulaire en activant la JNK qui active des membres de la famille Bcl-2 pro-apoptotiques tels que BID et BAD. L'activité RIDD d'IRE1 implique le clivage sélectif d'espèces d'ARN cytoplasmiques et peut favoriser la survie en réduisant le nombre de nouveaux peptides entrant dans le RE. Cependant, RIDD peut aussi favoriser la mort cellulaire en coupant des miARN spécifiques¹¹⁰. La famille Bcl-2 est impliquée dans les translocations chromosomiques et l'augmentation des taux de transcription dans les affections malignes telles que le lymphome non-hodgkiniens et le cancer des poumons⁷¹. BCL-2 et BCL-XL anti-apoptotiques sont induites pendant le stress du RE pour favoriser la survie. Entre-temps, celles qui favorisent l'apoptose sont BAK et BAX, où BAK peut agir comme un déclencheur suffisant de la mort cellulaire lorsque la cellule ne peut plus faire face au stress. Dans un environnement hypoglycémique, les tumeurs augmentent la glycolyse en anaérobie pour produire beaucoup de lactate, ce qui diminue le pH de la cellule conduisant alors à une acidose. En conséquence, la cellule active la famille d'oncogènes Bcl-2, *via* la voie UPR, pour assurer sa survie. Ceci met l'accent sur le rôle de l'UPR dans la survie tumorale. Dans certains cas de cancer du côlon, la production de CHOP est perdue, entraînant la survie de la tumeur. Pendant ce temps,

des mutations dans *IRE1* sont associées à des tumeurs malignes du poumon et du sein (**Figure 43.**)⁷¹.

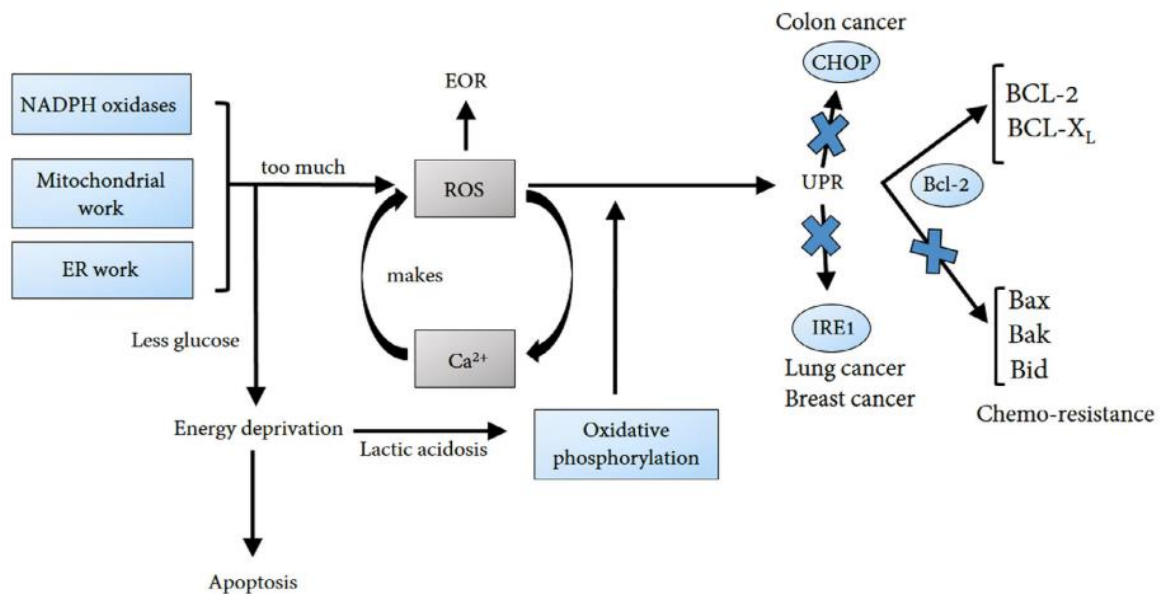


Figure 43. La réponse au stress du RE et la tumorigenèse⁷¹.

Les cellules tumorales doivent également atténuer la réponse immunitaire antitumorale pour assurer une croissance continue. En effet, les cellules cancéreuses peuvent échapper à la surveillance immunitaire en produisant des facteurs immunosuppresseurs qui diminuent la réponse immunitaire antitumorale et réduisent les cellules immunitaires infiltrantes¹¹³. En profitant de la voie UPR, les tumeurs peuvent supprimer ou éviter le nettoyage immunitaire. Dans les conditions physiologiques, l'axe IRE1 α /XBP1 joue un rôle important dans la présentation croisée des antigènes par les cellules dendritiques CD8⁺. En revanche, la surexpression de XBP1 a été rapportée dans les cellules dendritiques associées à une tumeur dans des cancers agressifs. Cette surexpression a des effets négatifs sur la fonction des cellules dendritiques dans le microenvironnement tumoral. Elle induit l'accumulation des triglycérides (TG) dans les cellules dendritiques, ce qui diminue l'expression du CMH-I, entravant ainsi l'activation des cellules T CD8⁺⁷. De nouvelles études sont nécessaires pour comprendre précisément la contribution de la voie IRE1 au maintien de la survie cellulaire pendant l'hypoxie¹¹³. En plus de la voie IRE1, la voie PERK est également impliquée dans la survie cellulaire dans des conditions hypoxiques et dans la production de facteurs pro-angiogéniques¹¹³. L'activation de PERK a été rapportée dans une grande variété de tumeurs primaires humaines, y compris le mélanome, le glioblastome et les cancers du sein et du col de l'utérus⁷⁴. En effet, PERK inhibe la synthèse des régulateurs du cycle cellulaire, tels que la cycline D1, entraînant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1⁷ (**Figure 44.**).

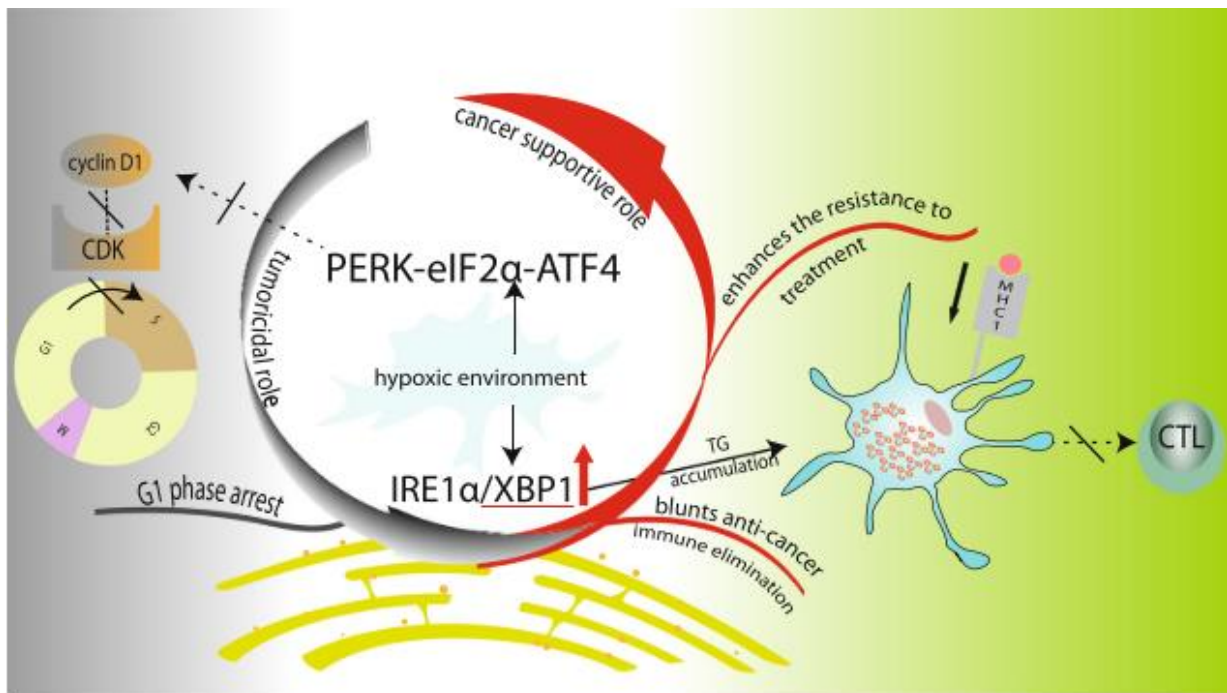


Figure 44. Le double rôle de l'UPR dans le cancer¹¹³.

D'une part, la voie PERK joue un rôle dans la survie des cellules tumorales en réponse à l'hypoxie et la production des ROS. La voie de signalisation PERK s'est révélée essentielle pour l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie. La phosphorylation du facteur de transcription NRF2 dépendante de PERK favorise la dissociation de la protéine « *Kelch-like ECH-Associated Protein 1* » (KEAP1) permettant ainsi sa translocation nucléaire¹¹³. NRF2 est un régulateur principal des enzymes antioxydantes associées à la chimiorésistance⁷⁷. D'autre part, en plus de contribuer à la survie des cellules en luttant contre le stress oxydatif, il a également été démontré que la voie PERK maintient la viabilité des cellules en déclenchant l'autophagie. En effet, L'autophagie élevée joue un rôle cytoprotecteur en éliminant les protéines mal/non-repliées, réduisant ainsi le stress protéotoxique. L'activation de voie PERK aide, *via* une expression accrue d'ATF4 et de CHOP, à compenser les conséquences négatives de l'augmentation de la production des ROS par l'augmentation des réponses antioxydantes. Cela profite à la cellule en éliminant les protéines endommagées et en fournissant une source de nutriments recyclés pour soutenir la prolifération et la survie¹¹³. De plus, la voie PERK permet une restauration partielle de la synthèse des protéines et la traduction simultanée des gènes cibles de l'UPR. Ce commutateur permet aux cellules de faire face au stress chronique d'éviter la mort cellulaire¹¹⁰, contribuant à la progression métastatique des cellules cancéreuses⁶⁷.

Les voies IRE1 et PERK sont impliquées dans l'invasion et la propagation des métastases *via* un processus appelé la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)¹¹³.

En effet, avant de pouvoir pénétrer dans la circulation vasculaire, les cellules tumorales doivent acquérir un phénotype migrateur invasif. Originellement, la TEM est un processus cellulaire essentiel au cours du développement embryonnaire, jouant un rôle important dans la formation du mésoderme et la migration des cellules de la crête neurale. Cependant, dans le cancer, l'activation anormale de la TEM entraîne la perte du contact entre les cellules tumorales, conférant ainsi un phénotype migrateur invasif favorisant les métastases^{67,113}. Si une cellule tumorale disséminée parvient à atteindre un organe cible, sa croissance peut être activement restreinte jusqu'à ce que des conditions favorables apparaissent, par le biais d'un processus appelé « dormance tumorale ». Les cellules cancéreuses peuvent rester dans cet état de repos pendant des mois, voire des années. Une augmentation de l'expression des marqueurs de l'UPR (BiP, CHOP, GPR94, IRE1 β ...) a été rapportée dans des cellules tumorales dormantes^{7,113}.

Les patients subissant une chimiothérapie répondent initialement au traitement, comme peut le montrer la régression de la tumeur. Cependant, beaucoup développent une résistance à la chimiothérapie (chimiorésistance) en raison d'une petite population de cellules cancéreuses qui s'adaptent intrinsèquement pour faire face à ce stress supplémentaire¹¹³. Le stress du RE lié aux mutations peut également induire une sénescence qui contribue à la chimiorésistance⁶⁷. De plus, la surexpression de BiP est associée à un mauvais pronostic et à la chimiorésistance. Cette surexpression a été observée dans les carcinomes hépatocellulaires et prostatiques, les gliomes, le cancer buccal, le cancer du sein et de l'estomac⁷⁷. Les trois branches de la voie UPR sont impliquées dans la réponse adaptative exploitée par les cellules cancéreuses pour assurer leur survie après l'exposition à des agents chimiothérapeutiques^{110,113}. La surexpression des formes nucléaires actives d'ATF6 α et ATF6 β suffit pour réguler positivement la transcription de BiP, CHOP et XBP1. Le facteur de transcription ATF6 α est essentiel pour l'adaptation des cellules dormantes à la chimiothérapie et au stress nutritionnel⁷⁷. ATF6 favorise principalement la survie cellulaire et l'expression des chaperonnes localisées dans le RE pour favoriser le repliement des protéines et rétablir l'homéostasie¹¹⁰. L'expression d'ATF6 α s'est révélée être positivement associée à une survie accrue d'un cancer différencié de la thyroïde. De plus, les patients atteints d'un cancer du côlon présentent une expression accrue d'ATF6 dans leurs tumeurs primaires et une propension plus élevée à la rechute⁷⁷. Bien que la voie de signalisation ATF6 favorise principalement la survie, elle a également été indirectement liée à la régulation négative de la famille

Bcl-2¹¹⁰. De même, il a été démontré qu'IRE1 est importante dans la chimiorésistance^{77,110}. Une des raisons pour lesquelles certaines tumeurs résistent à la chimiothérapie est une surexpression des oncogènes anti-apoptotiques BCL-2 et, de manière similaire, toute mutation des gènes pro-apoptotiques *BAX* ou *BAK* entraînerait une perte de signaux de la mort permettant aux cellules cancéreuses de résister au traitement et de poursuivre leur prolifération⁷¹. Dans les cellules cancéreuses, les branches de la voie UPR sont souvent altérées et conduisent généralement vers une adaptation à un environnement hostile, en ciblant spécifiquement les molécules UPR de pro-survie. L'inhibition pharmacologique des composantes de l'UPR pourrait être exploitée pour réduire le caractère envahissant de la tumeur et les métastases^{7,67,110}. En induisant l'apoptose, certaines molécules peuvent contraster le développement de la tumeur et la croissance tumorale, définissant ainsi de nouveaux types de traitement anticancéreux^{6,73}.

En premier lieu, l'inhibition de l'expression de BiP sensibilise les cellules cancéreuses à la chimiothérapie et augmente la chimiosensibilité des gliomes malins⁷. Des inhibiteurs de BiP ont été développés et prouvés pour réduire la croissance des tumeurs du sein *in vivo*, à la fois seuls et en association avec des médicaments approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*), auxquels l'UPR confère une résistance¹¹⁰ (Cf. **IV.2.1**). En deuxième lieu, le double rôle d'IRE1 dans le cancer pourrait potentiellement être exploité de manière thérapeutique. L'inhibition d'IRE1 entraîne une apoptose accrue et inhibe la croissance tumorale ainsi que l'angiogenèse^{67,77}. En effet, l'inactivation d'IRE1 dans les cellules cancéreuses du côlon entraîne l'activation de PERK et bloque la traduction des protéines en raison de la phosphorylation d'eIF2 α , réduisant ainsi l'expression de la cycline D1, ce qui inhibe la prolifération cellulaire par conséquent¹¹³. L'inactivation de la voie IRE1 augmente la toxicité dans le cadre d'une thérapie combinatoire d'anticancéreux⁷. Finalement, le double rôle de PERK dans le cancer pose un défi au développement thérapeutique⁷⁷. Quand les fonctions de PERK sont compromises, cela sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose en inhibant la croissance des tumeurs. En effet, l'inhibition de la voie PERK inhibe l'autophagie, sensibilisant ainsi les cellules à l'hypoxie^{74,113}. Néanmoins, la perte de la voie de signalisation PERK augmente la résistance à la mort cellulaire dans des conditions pathologiques liées au stress provoqué par les ROS⁷⁷.

En raison de la double fonction du stress réticulaire dans la détermination du devenir des cellules cancéreuses et le maintien de l'homéostasie physiologique, il convient de faire preuve de prudence lors de toute interférence avec la voie UPR, en raison du risque d'effets secondaires non-ciblés. De plus, la durée d'exposition au médicament doit être prise en compte en raison des effets pro-apoptotiques dynamiques et dépendant du temps de l'UPR⁷ (**Figure 45.**). La mortalité liée au cancer est la deuxième cause de décès dans le monde. Le Centre international de recherche sur le cancer a signalé que 14,1 millions de nouveaux cas de cancer et 8,2 millions de décès étaient survenus dans le monde en 2012, et prévoit 21,7 millions cas et 13 millions de décès en 2030¹⁴. D'où la concentration des études de la voie UPR sur son implication dans les maladies tumorales et la nécessité d'une stratégie thérapeutique contre le cancer qui cible cette cascade de signalisation.

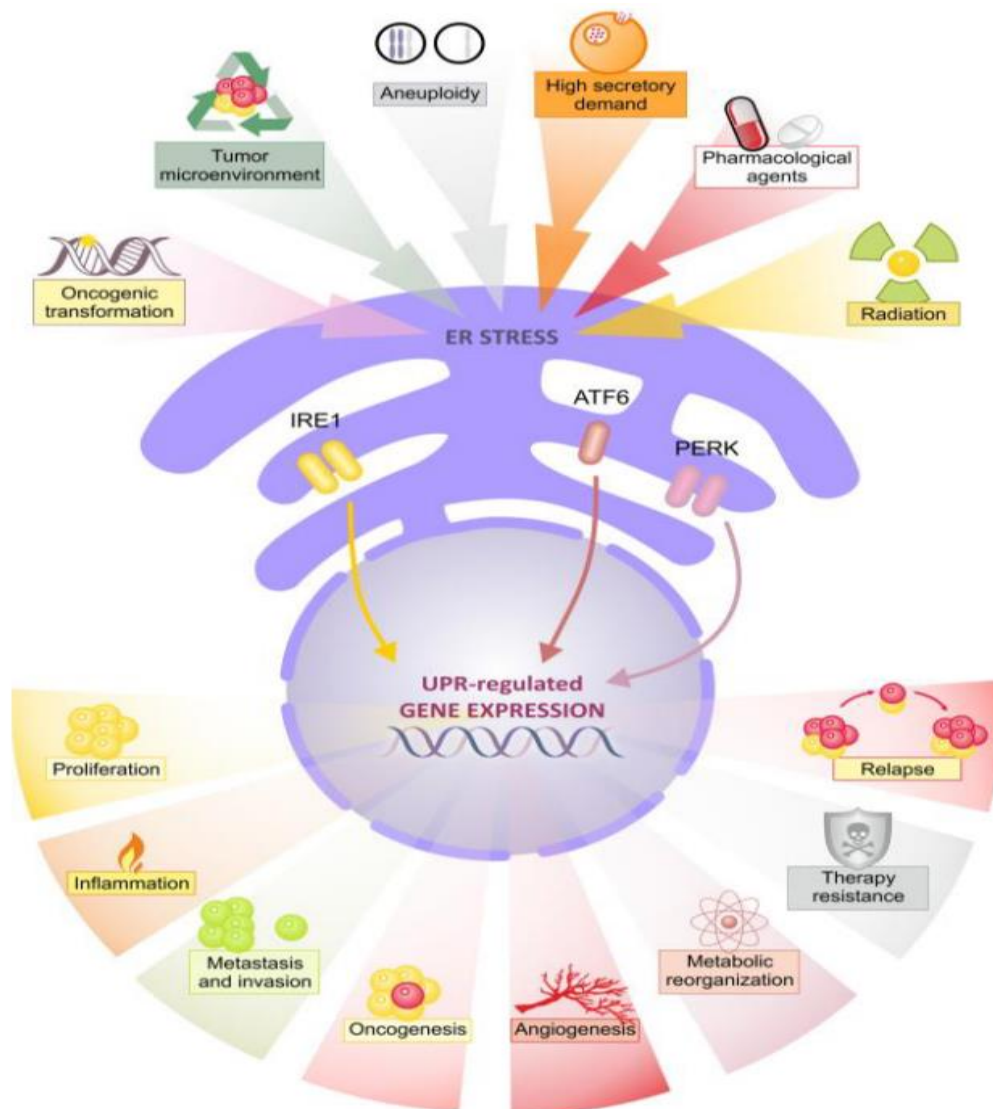


Figure 45. Les facteurs de stress associés aux tumeurs induisent le stress réticulaire et la voie UPR¹⁰.

6. Conclusion

Le stress du RE accentue l'état pathologique associé aux altérations du métabolisme cellulaire, ce qui suggère que le ciblage de la voie UPR pourrait servir de stratégie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques liées à l'accumulation des protéines, des lipides et des glucides. Les trois branches de la voie UPR sont impliquées dans diverses pathologies humaines. Ceci met l'accent sur l'importance de cibler les différentes fonctions de l'UPR dans le cadre de ces pathologies (**Figure 46.**).

Les premières communications scientifiques disponibles décrivent des effets thérapeutiques manifestes, démontrant qu'une « manipulation » de la réponse au stress du RE *via* un ciblage de l'UPR pourrait s'avérer pertinente dans certaines pathologies. Il est donc logique de développer des stratégies thérapeutiques ciblant l'UPR qui visent à découvrir de nouvelles molécules capables de moduler le stress du RE (Activer/inhiber les différentes voies de signalisation), constituant une bonne alternative à l'égard de nombreuses pathologies majeures chez l'homme⁶.

En effet, l'inhibition de la voie IRE1 semble être bénéfique dans la lutte contre la progression de certaines pathologies. Néanmoins, il faudra prendre en compte son interaction avec différentes voies de signalisations telles que l'apoptose, l'autophagie et l'inflammation et les effets indésirables qui peuvent être engendrés à la suite de cette inhibition.

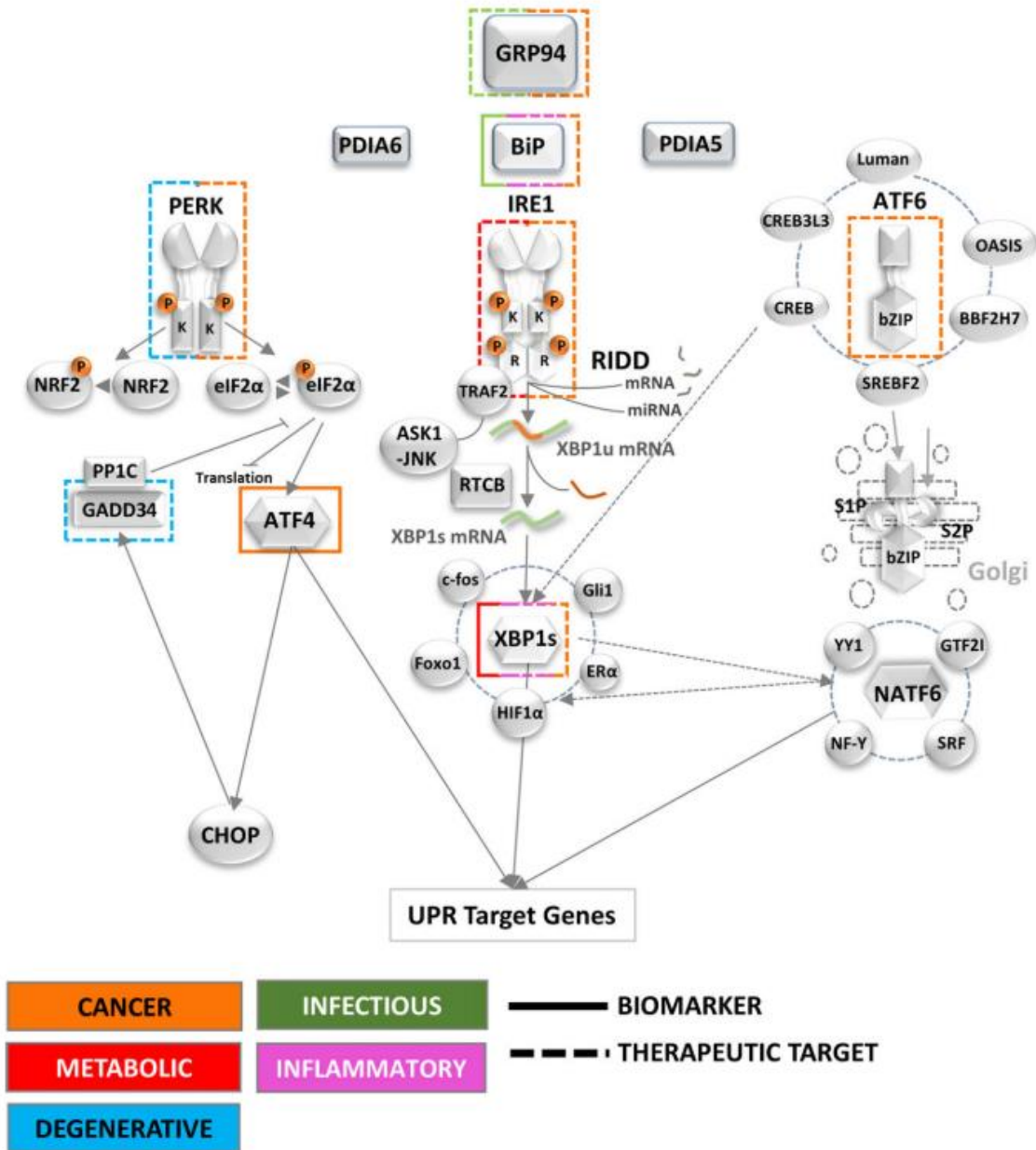


Figure 46. Les biomarqueurs UPR des maladies et les cibles thérapeutiques⁶⁷.

IV. CHAPITRE III : Revue sur les modulateurs pharmacologiques de la voie UPR

1. Introduction : Les stratégies thérapeutiques

Selon le contexte pathologique, la stratégie thérapeutique peut avoir plusieurs objectifs : l'atténuation de la réponse adaptatrice UPR, l'inactivation des composantes pro-apoptotiques de l'UPR ou, au contraire, l'amélioration de la réponse UPR pour une meilleure adaptation au stress⁶. Une des stratégies thérapeutiques visant la suppression du cancer consiste à faciliter l'accumulation de protéines non-repliées en inhibant les branches de l'UPR impliquées dans la réponse de survie, conduisant finalement à l'apoptose¹¹⁴. L'utilisation des voies pro-apoptotiques de l'UPR a des effets tumoricides dans divers types de cancer⁷. L'induction de la mort cellulaire dans la néoplasie est un événement critique définissant le taux de croissance de la tumeur, sa régression et sa réponse au traitement. L'apoptose dépendante des caspases est un résultat courant de nombreux traitements anticancéreux¹⁰⁰. Il existe de nombreux composés disponibles ciblant la voie UPR, bien qu'aucun ne soit approuvé pour une utilisation chez les patients¹¹⁰. La plupart des molécules pharmacologiques disponibles ciblant l'UPR ont été testées dans des modèles de cancer⁶, raison pour laquelle le présent chapitre portera surtout sur les effets anti-tumorigènes des modulateurs pharmacologiques de la voie UPR.

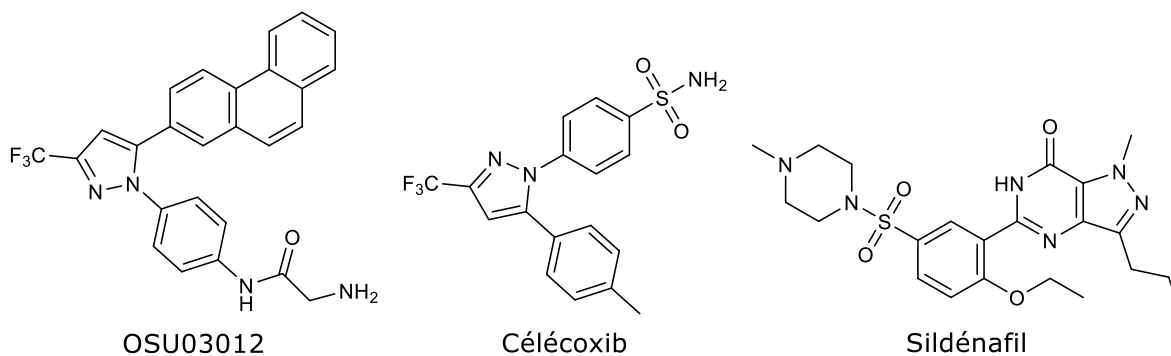
2. Les modulateurs de la voie UPR

2.1. Les inhibiteurs des protéines chaperonnes

2.1.1. OSU03012

Le composé **OSU03012** est un inhibiteur des protéines chaperonnes GRP94 et BiP. Il présente des effets antitumoraux remarquables lorsqu'il est associé au **sildénafil**. OSU03012 est un dérivé du **célécoxib**, un AINS. Le sildénafil est largement utilisé dans l'amélioration de la dysfonction érectile et l'hypertension artérielle pulmonaire. L'inhibition de la cascade IRE1/XBP1 de l'UPR augmente les effets létaux dans les cellules cancéreuses de gliomes et de médulloblastomes. De plus, le sildénafil et le composé OSU03012 activent d'une manière synergique la voie de signalisation PERK, ce qui augmente les taux de phosphorylation d'eIF2 α , entraînant une expression réduite de GADD34, entravant ainsi la récupération de la synthèse protéique sous stress réticulaire.

L'effet synergique dépend de l'activation de la signalisation IRE1/JNK et de l'inhibition de l'expression de GPR94 et de BiP⁷.



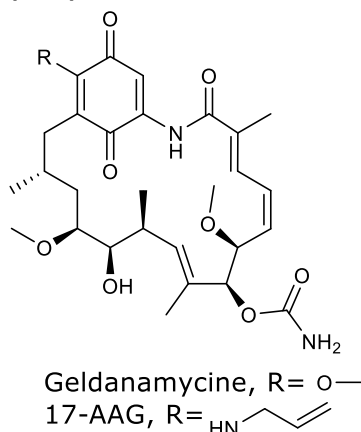
Le premier essai clinique sur BiP par voie intraveineuse a démontré qu'elle est sans danger pour les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et que certains patients présentent des améliorations cliniques et biologiques après une seule perfusion. L'administration de la protéine BiP peut induire une rémission pouvant aller jusqu'à 3 mois chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde⁶⁷. Des études précliniques ont établi un lien entre l'expression du GRP94 et la progression du cancer dans les cas du myélome multiple (MM), de carcinome hépatocellulaire, de cancer du sein et celui du côlon. Cette protéine a été identifiée comme un puissant modulateur du système immunitaire pouvant être utilisée en immunothérapie anticancéreuse^{67,111}.

2.1.2. MAb159

C'est un anticorps monoclonal ciblant la protéine BiP, qui a montré une activité antitumorale et une efficacité accrue de la radiothérapie dans le cancer du poumon non à petites cellules et le glioblastome multiforme dans des modèles de xénogreffes chez le murin. Il a également été démontré qu'un traitement systémique à court terme avec des anticorps monoclonaux anti-BiP augmente l'apoptose chez les souris atteintes d'un adénocarcinome de l'endomètre^{7,67}. Le **MAb159** a été rapporté pour son inhibition de la croissance tumorale dans divers modèles murins de cancer tel que le cancer du côlon, du poumon, le cancer du sein métastatique, le mélanome, le cancer de la prostate et la leucémie^{7,67,110}.

2.1.3. Tanespimycine

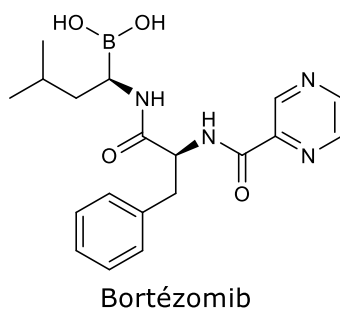
La **tanespimycine** est le 17-(allylamino)-17-déméthoxygeldanamycine (**17-AAG**), dérivé moins toxique de l'antibiotique **geldanamycine**, un inhibiteur de la famille des HSP90. Il inhibe la fonction de la protéine chaperonne GPR94, provoquant ainsi l'apoptose. Cette molécule inhibe fortement la croissance des cellules tumorales dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC)^{6,115}.



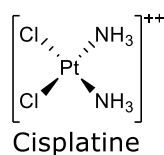
2.2. Les inhibiteurs de l'ERAD

2.2.1. Bortézomib

Le **bortézomib**, approuvé en 2003 par la FDA pour traiter le myélome multiple (MM) réfractaire, est un inhibiteur du protéasome 26S, la majeure partie de la machinerie ERAD qui élimine les protéines non/mal-repliées du cytosol. Le traitement par le bortézomib entraîne l'activation de la branche PERK de l'UPR et augmente l'expression d'ATF4 et de CHOP, induisant ainsi l'apoptose causée par le stress du RE dans les cellules de MM et de lymphome à cellules du manteau (LCM), non hodgkinien, incurable, dérivé de cellules B matures dans la zone du manteau des ganglions lymphatiques^{7,67,100,115-118}. Cependant, des preuves suggèrent que l'inactivation de XBP1 pourrait contribuer à la résistance au bortézomib^{7,86,100,117,119-122}. Le bortézomib pourrait donc être classé en tant qu'inducteur du stress réticulaire (Cf. **IV.2.3**).

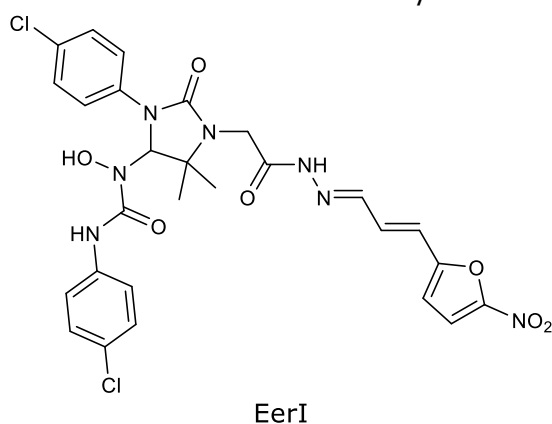


En effet, le bortézomib induit un stress réticulaire accru dans les cellules cancéreuses du pancréas. Il agit également en synergie avec le **cisplatine**, provoquant l'apoptose des cellules cancéreuses du pancréas, induite *via* une surexpression de CHOP et de BiP¹²¹.



2.2.2. Eeyarestatine I

L'**Eeyarestatine I (EerI)**, un inhibiteur de l'ERAD, possède une activité antitumorale puissante similaire à celle du bortézomib et peut agir en synergie avec le bortézomib pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses de myélome malin^{77,100,115,118}.

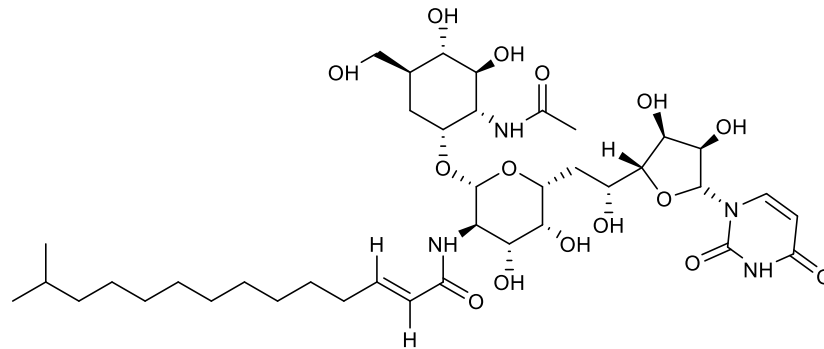


EerI cible le complexe p97 (une ATPase cytosolique impliquée dans le transport des protéines poly-ubiquitinées) afin d'inhiber la déubiquitination des substrats d'ERAD associés à p97, ce qui est nécessaire au processus de dégradation^{77,115,118}. L'EerI active les facteurs de transcription ATF3 et ATF4. Cet exemple d'inhibiteur d'ERAD peut représenter une nouvelle classe de médicaments anticancéreux qui cible simultanément l'UPR et la signalisation épigénétique afin de limiter la progression des cellules cancéreuses⁷⁷.

2.3. Les inducteurs du stress réticulaire

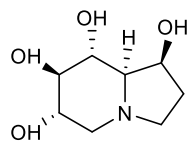
Les produits chimiques typiques qui induisent le stress du RE et la voie UPR comprennent plusieurs familles de molécules. Les agents inducteurs du stress réticulaire peuvent être utilisés directement comme agents chimiothérapeutiques, seuls ou en combinaison avec d'autres anticancéreux. Ils provoquent la mort cellulaire en induisant des sorties cytotoxiques des voies de signalisation de l'UPR⁷⁴. Cependant, ces inducteurs chimiques pourraient activer l'autophagie cytoprotectrice¹⁰.

La **tunicamycine**, un antibiotique produit par la bactérie *Streptomyces lysosuperificus*, est un inhibiteur de la *N*-glycosylation, ce qui entraîne une accumulation de protéines non-repliées dans le RE, induit le stress du RE et active la voie UPR^{10,11,67,71}. La tunicamycine sensibilise les cellules cancéreuses au ligand induisant l'apoptose liée à TRAF2 *via* le facteur de transcription CHOP dans des cellules de prostate et de carcinome humains¹⁰⁰.

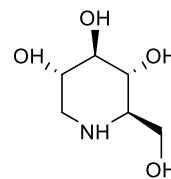


Tunicamycine A

La **castanospermine** et la **1-désoxynojirimycine**, quant à elles, induisent la voie UPR *via* l'inhibition des glucosidases I et II impliquées dans la *N*-glycosylation des protéines⁷¹.

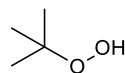


Castanospermine

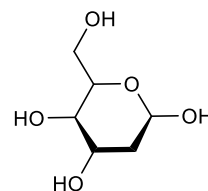


1-Désoxynojirimycine

L'**hydropéroxyde de tert-butyle** est un produit oxydatif qui induit le stress du RE *via* l'augmentation de l'oxydation au niveau du RE. En plus, le **2-désoxy-D-glucose**, un inhibiteur du métabolisme de glucose, inhibe la *N*-glycosylation qui induit le stress réticulaire et l'autophagie par voie de conséquence¹.

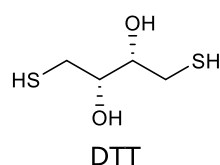


Hydropéroxyde de *t*-butyle

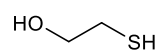


2-désoxyglucose

De plus, les agents réducteurs, tels que le **β -mercaptoéthanol** ou le **1,4-dithiothréitol (DTT)**, perturbent l'environnement oxydant du RE en réduisant les ponts disulfures, interférant ainsi avec le repliement des protéines dans le RE^{11,73}.

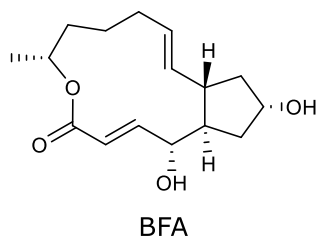


DTT



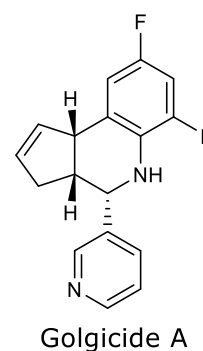
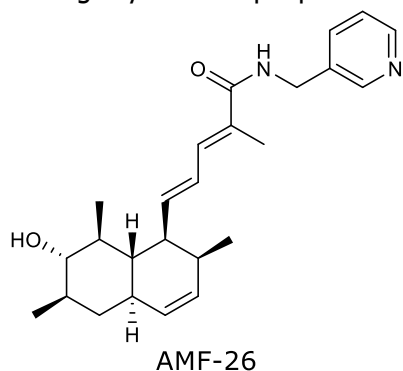
β -mercaptoéthanol

La **bréfeldine A (BFA)**, un macrolide fongique à 16 membres isolé de *Penicillium brefeldianum*, altère le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi, provoquant ainsi une inhibition rapide et réversible de la sécrétion protéique^{10,67,73,74,100}.

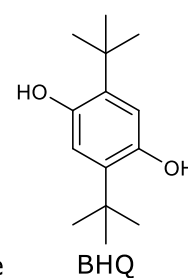
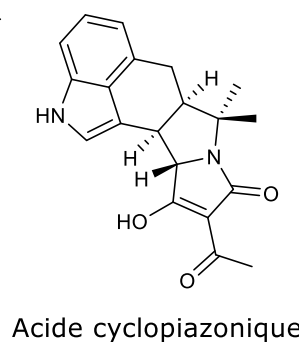
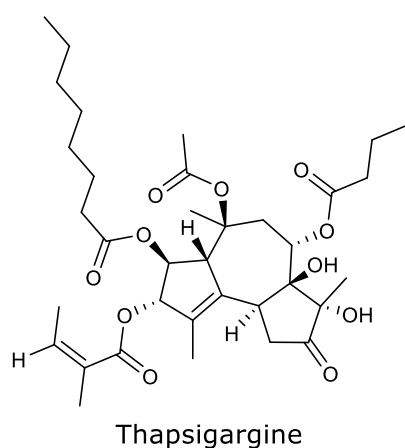
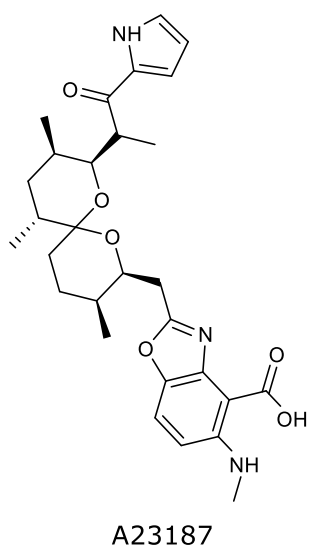


La BFA déclenche l'apoptose dans le MM, la leucémie, le cancer du côlon, de la prostate et dans les cellules de sarcome adénoïde et kystique. En fait, elle exerce son activité antitumorale dans les xénogreffes du mélanome de souris athymiques¹⁰⁰. Pour autant, en raison de la cytotoxicité élevée et de la faible biodisponibilité, la BFA n'a pas passé le stade préclinique de son développement.

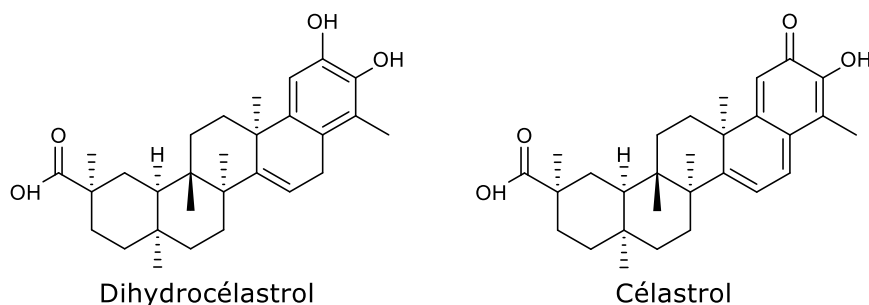
Récemment, l'**AMF-26** et le **golgicide A** ont été décrits comme nouveaux inhibiteurs du système de Golgi ayant des propriétés antitumorales ou bactéricides¹²³.



D'autres produits chimiques typiques induisent le stress du RE. Il s'agit de la **calcimycine (A23187)**, la **thapsigargine**, l'**acide cyclopiazonique** et la **2,5-di-tert-butylhydroquinone (BHQ)**, qui perturbent l'homéostasie calcique en ciblant le récepteur « *Sarco/ER Ca²⁺-ATPase* » (SERCA). Ils entraînent une réduction de la concentration en Ca²⁺ et altèrent la capacité de repliement des protéines^{10,11,67,71,100}.

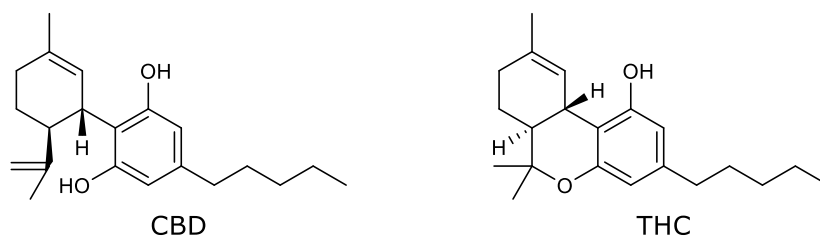


Les triterpénoïdes **dihydrocélastrol** et **célastrol** sont des inducteurs puissants de la voie UPR. Ils inhibent la prolifération des cellules cancéreuses et augmentent les transcriptions liées à l'apoptose dans un criblage primaire. Ceci a été confirmé sur un panel de cellules du carcinome épidermoïde oral (OSCC)¹²⁴.



Tous ces inducteurs sus-cités induisent la voie UPR et plus précisément la phosphorylation d'eIF2 α , sauf la castanospermine qui active la voie UPR sans agir sur la phosphorylation d'eIF2 α . De plus, ils induisent tous la réponse EOR, sauf le DTT et la castanospermine¹.

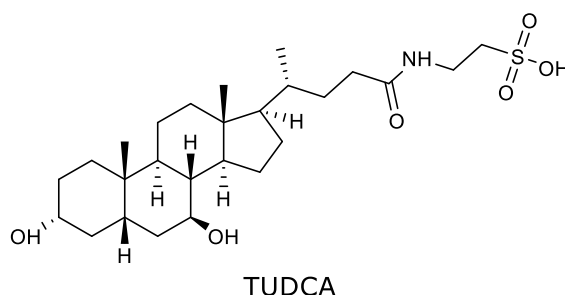
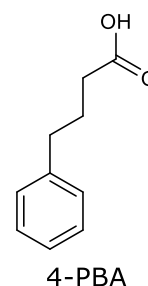
Parallèlement, les cannabinoïdes sont des terpénoïdes très réputés pour leurs propriétés antitumorales générales contre une grande variété de cancers. Les cannabinoïdes qui se sont révélés prometteurs sont le **δ -9-tétrahydrocannabinol (THC)** et le **cannabidiol (CBD)**. Des propriétés antitumorales ont été documentées dans les gliomes, les mélanomes, les lymphomes et les carcinomes⁹⁹. Le CBD induit le stress au niveau du RE dans une variété de cancers, y compris les gliomes, le carcinome du foie, le cancer du pancréas et le MM. En fait, le CBD active le domaine RNase d'IRE1 et induit l'épissage de l'ARNm *XBP1*. Il induit l'accumulation de JNK phosphorylée à la suite de la déphosphorylation de l'ASK1, déclenchant ainsi la cascade de signalisation apoptotique. De plus, le CBD augmente l'expression de la protéine pro-apoptotique CHOP *via* la phosphorylation de PERK⁹⁹. De même, le THC active le stress du RE et l'autophagie dans les glioblastomes multiformes. Il inhibe la prolifération cellulaire, altère l'angiogenèse et induit ensuite la cascade de signalisation apoptotique *via* l'activation de la voie de signalisation PERK^{99,115}.



2.4. Les inhibiteurs du stress réticulaire

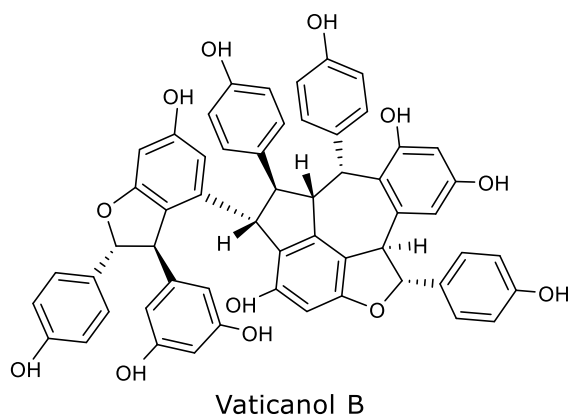
La FDA a approuvé l'**acide tauroursodésoxycholique (TUDCA)** et l'**acide 4-phénylbutyrique (4-PBA)** pour le traitement de la cirrhose biliaire primitive et des troubles du cycle de l'urée, respectivement. Il a été démontré que TUDCA et 4-PBA réduisent de manière significative la phosphorylation de PERK et de l'IRE1 α et atténuent en conséquence le stress réticulaire *in vitro* et *in vivo*^{5,76,125}.

En effet, le composé 4-PBA inhibe le stress réticulaire, l'activité de NF- κ B et la production des cytokines⁷⁶. Curieusement, il réduit l'accumulation des protéines mal-repliées dans le RE *via* la modulation des régulateurs de la protéase, par un mécanisme encore inconnu⁶⁷. Il est utilisé comme un éliminateur d'ammoniac chez les patients présentant des troubles du cycle de l'urée. Plusieurs études ont démontré que la 4-PBA atténue la toxicité cellulaire induite par le stress dans le RE⁶⁰. Le traitement oral par 4-PBA atténue la résistance à l'insuline induite par les lipides et le dysfonctionnement des cellules β provoqué par le stress réticulaire chez l'Homme⁷⁶. De plus, l'inhibition de la voie PERK réduit la formation des tumeurs *in vivo*^{76,113,125,126}.

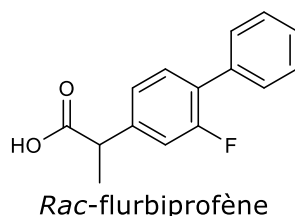


Quant à l'acide tauroursodésoxycholique (TUDCA), c'est un acide biliaire endogène approuvé par la FDA pour le traitement de la cirrhose biliaire primitive et qui est également capable d'atténuer le stress du RE dans les cellules β des îlots de Langerhans. TUDCA est le conjugué de la taurine et de l'acide ursodésoxycholique (UDCA)⁶⁷. Des essais cliniques à petite échelle démontrent que le traitement par TUDCA pourrait avoir un effet positif sur l'amélioration de la sensibilité hépatique et musculaire à l'insuline en modulant le stress dans le RE. TUDCA inhibe la signalisation induite par H₂O₂ de PERK et IRE1, ce qui réduit la production des ROS et l'apoptose dans des modèles murins d'ischémie⁷⁶.

En outre, le **vaticanol B**, un tétramère de resvératrol (Cf. **2.7.5.d**), inhibe à la fois la voie UPR et la réponse inflammatoire en réduisant la charge de repliement des protéines et en maintenant l'intégrité de la membrane du RE, empêchant ainsi l'apoptose induite par le stress⁶⁹.

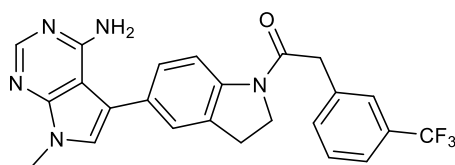


Le **flurbiprofène**, un anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS), traite efficacement la douleur, l'inflammation et la fièvre. Les AINS sont des médicaments capables d'inhiber les COX (Cf. **III.2**). Le flurbiprofène est classé en tant qu'acide 2-arylpropionique parmi les AINS. Il est largement prescrit pour l'arthrite, les rhumatismes, l'arthrose et est utilisé pour traiter l'inflammation et la douleur associées à ces maladies¹²⁷. Le flurbiprofène a montré une forte activité chaperonne, qui réduit l'agrégation des protéines, atténue la résistance et augmente la sensibilité à la leptine (Cf. **III.3.2**) induite par le stress du RE. De plus, il a montré une baisse de l'obésité chez la souris. Parallèlement, le flurbiprofène est connu pour inhiber la progression de la maladie d'Alzheimer¹²⁷. La mort cellulaire activée par le stress réticulaire, induite chimiquement par la tunicamycine ou la BFA, est inhibée de manière significative par le flurbiprofène. Ce dernier a également amélioré significativement la viabilité des cellules. De plus, le flurbiprofène inhibe significativement les trois branches de la voie UPR¹²⁷.



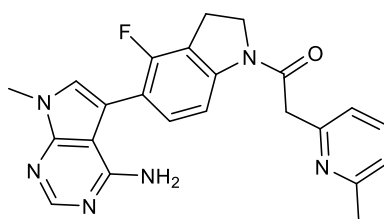
2.5. Les modulateurs de la protéine PERK

Il existe trois inhibiteurs de l'activité kinase de PERK, compétitifs de l'ATP : **GSK2606414**, **GSK2656157** et **AMG PERK 44**¹¹⁰. Ces inhibiteurs puissants de PERK peuvent être administrés par voie orale, réduisant ainsi la croissance tumorale dans des modèles de xélogreffe de souris⁶⁷.



GSK2606414

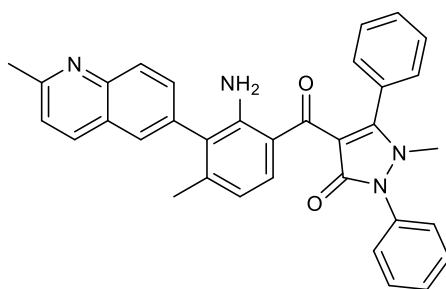
Il a été démontré que GSK2606414 réduit les métastases des cellules de cancer du sein *in vivo*. GSK2606414 sensibilise *in vitro* les cellules du cancer du sein au **paclitaxel** et à la **doxorubicine** et réduit la croissance tumorale xénogreffe de cellules du cancer du sein triple négatif (TNBC) en présence de la doxorubicine¹¹⁰. GSK2606414 est un inhibiteur de PERK, de première génération, mimétique et compétitif de l'ATP. C'est la première petite molécule *per os* à prévenir la neurodégénérescence *in vivo* chez les souris atteintes de prions en inhibant l'autophosphorylation de PERK, réduisant ainsi les niveaux de PERK et eIF2 α et rétablissant les taux de synthèse protéique⁶⁷. Cet inhibiteur est hautement sélectif et inhibe la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe chez la souris⁷⁸.



GSK2656157

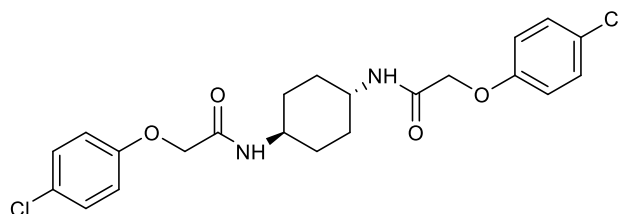
GSK2656157, un inhibiteur de deuxième génération, est une version optimisée de GSK2606414, 1000 fois plus active sur PERK^{67,78}. De même que GSK2606414, GSK265617 a supprimé une gamme de tumeurs de xénogreffe humain chez le murin et inhibé l'autophosphorylation de PERK, la phosphorylation d'eIF2 α , l'expression de l'ATF4 et l'induction des gènes cibles de l'UPR dans des lignées cellulaires et des tumeurs. Cependant, il est cytotoxique pour les tissus pancréatiques exocrines/endocrines chez les témoins sains⁷⁸.

GSK2606414 et GSK2656157 inhibent également la sérine/thréonine-protéine kinase 1 (RIPK1), un régulateur de la mort cellulaire et de l'inflammation dans la voie du TNF α , contrairement à l'AMG PERK 44^{67,110}. En effet, AMG PERK 44 est plus de 160 fois plus sélectif pour PERK comparé à 387 kinases testées. Il inhibe l'autophosphorylation de la protéine PERK¹¹⁰.



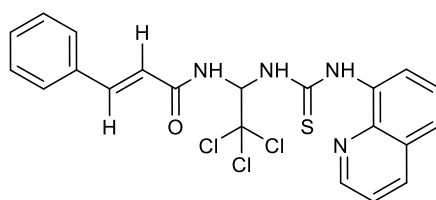
AMG PERK 44

Pour surmonter la toxicité au niveau des cellules β , de petites molécules modulant la voie eIF2 α sans inhiber directement PERK ont été examinées. « **Integrated Stress Response Inhibitor** » (**ISRIB**) est la première petite molécule décrite en tant que ligand activateur du facteur d'échange de nucléotide guanine eIF2 β . Cette molécule inhibe la voie de signalisation en aval d'eIF2 α et diminue l'expression d'ATF4 en conséquence. Contrairement aux inhibiteurs de la GSK, ISRIB n'a montré aucune toxicité pancréatique⁶⁷.



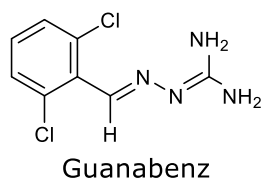
ISRIB

Le **salubrinal**, le **guanabenz** et le **séphine 1 (IFB-088)** inhibent la déphosphorylation d'eIF2 α , protègent les cellules de l'apoptose et inhibent la traduction des protéines par la voie PERK^{60,67}. Le salubrinal, un inhibiteur de la phosphatase PP1, supprime sélectivement la déphosphorylation d'eIF2 α en inactivant indirectement les complexes eIF2 α -PP1-GADD34 et PP1-CReP (CReP est un régulateur constitutif de la phosphorylation d'eIF2 α). Ceci augmente le taux de la phosphorylation d'eIF2 α , réduit le taux de traduction et active en aval la signalisation d'ATF4^{5,6,69,78}. Par ailleurs, le salubrinal inhibe significativement la réplication du VHS et augmente la survie neuronale dans le cadre de la MP, la SLA et l'excitotoxicité^{128,129}.

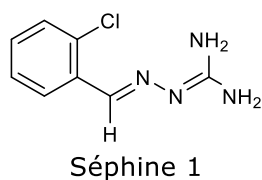


Salubrinal

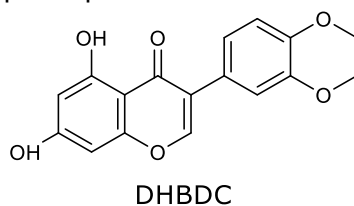
À l'appui de cela, le même effet a été observé avec le guanabenz, un autre inhibiteur de PP1 qui se lie directement à GADD34 et empêche l'assemblage du complexe GADD34-PP1^{6,78,130}.



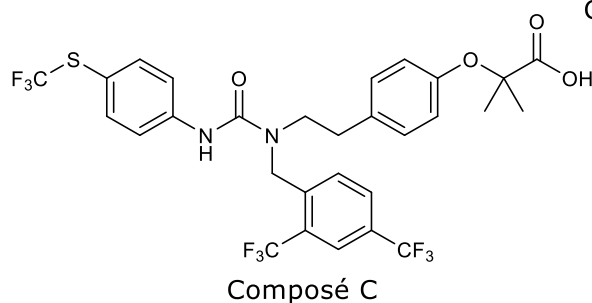
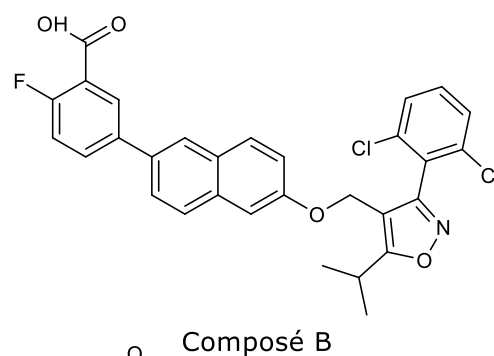
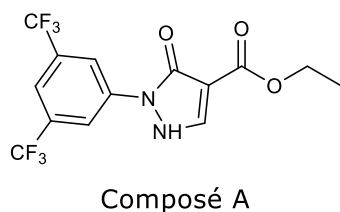
Par ailleurs, le séphine 1, dérivé du guanabenz, inhibe sélectivement une sous-unité régulatrice de la PP1 *in vivo* et permet d'éviter les défauts moteurs, morphologiques et moléculaires chez les modèles murins de la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1B et de SLA¹³⁰. Récemment, le séphine 1 a reçu en mai 2018 l'autorisation par la FDA de démarrer les essais de phase I dans le cadre de la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A¹³¹.



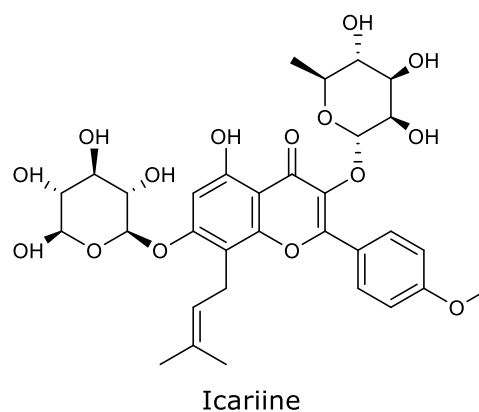
Ces petites molécules pourraient trouver un usage thérapeutique dans des maladies aussi diverses que la neurodégénérescence, le cancer et les infections virales¹²⁸. Les stratégies thérapeutiques qui consistent en la suppression de la voie PERK ou, au contraire, augmentent l'expression du gène *CHOP*, sont très attractives dans le cadre du traitement des maladies cancéreuses¹¹⁴. En revanche, plusieurs activateurs de la voie PERK sont rapportés par la littérature. Le **DHBDC** (CAS 101068-35-3) est un activateur spécifique de PERK et PKR, rapporté par Bai et ses collaborateurs^{110,132}.



Par ailleurs, les **composés A, B et C** décrits par Wensheng Xie et ses collaborateurs ont montré une activation de PERK, ainsi qu'une activation de NRF2^{110,133}.



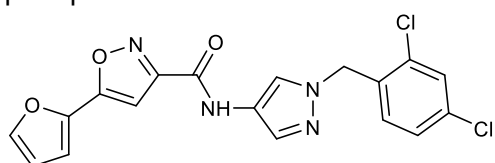
La phytothérapie traditionnelle chinoise (TCHM) utilise des produits naturels extraits d'herbes, d'animaux et de minéraux. Plusieurs monomères extraits de produits naturels de la TCHM sont utilisés pour leurs effets antinéoplasiques. L'**icariine**, un flavonoïde glycosylé dérivé des plantes du genre *Epimedium*, est un composé antitumoral potentiel. Le traitement par l'icariine entraîne la mort des cellules cancéreuses, accompagnée d'une augmentation de l'expression de BiP, PERK, eIF2 α , ATF4 et CHOP^{7,134}.



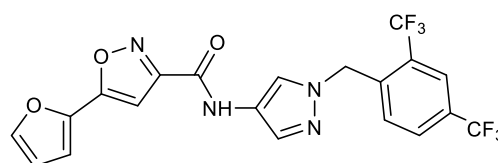
2.6. Les modulateurs de la protéine ATF6

L'identification de petites molécules qui modulent l'ATF6 s'est révélée difficile en raison de l'absence de sites de liaison pharmaco-potentiels et de l'indisponibilité de la structure cristalline de la protéine. Récemment, les **céapines**, des petites molécules de la famille des pyrazoles amides ont été identifiées en tant qu'inhibitrices sélectives de l'ATF6 α . Les céapines n'affectent pas les bras IRE1 et PERK de l'UPR. Les analogues de la céapine, nommés inhibiteurs de classe 1, piègent l'ATF6 α dans le RE et empêchent ainsi sa translocation vers l'appareil de Golgi en cas de stress du RE. Les inhibiteurs appartenant à la classe 2 des céapines inhibent la transcription des gènes cibles de l'ATF6 α , en agissant en aval de la translocation vers le Golgi, la protéolyse et la translocation nucléaire. Les céapines sensibilisent les cellules au stress réticulaire sans toucher les

cellules non-stressées et ont donc le potentiel d'être développées dans le cadre d'une stratégie thérapeutique visant à induire la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses. La **céapine-A1** est le premier hit de la famille et la **céapine-A7** est un analogue dix fois plus puissant^{60,67,130}.

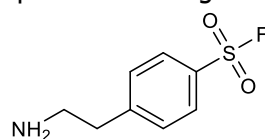


Céapine-A1



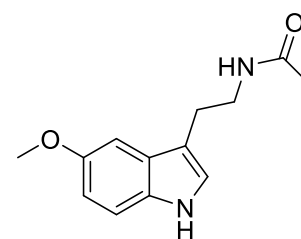
Céapine-A7

De plus, le **fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyl (AEBSF)**, un inhibiteur de la sérine protéase, empêche le clivage d'ATF6 induit par le stress du RE^{67,110}.



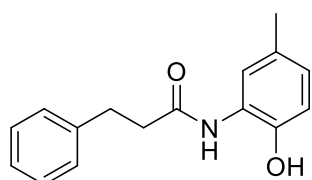
AEBSF

Une étude récente a identifié la **mélatonine** en tant qu'inhibiteur sélectif de l'ATF6, conduisant à une apoptose accrue des cellules cancéreuses du foie en diminuant l'expression de la COX-2^{67,135}. L'inhibition de la voie de signalisation ATF6 pourrait être une stratégie de traitement des maladies cancéreuses¹¹⁴.

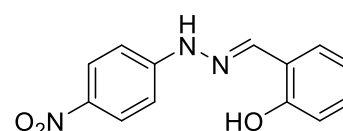


Mélatonine

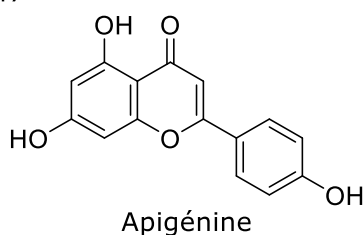
En revanche, des activateurs de la voie ATF6 sont rapportés par la littérature. Tels que les **composés 147** et **263**^{67,110,136}, l'**apigénine** et la **baicaléine**, deux flavonoïdes d'origine naturelle^{67,110,137}. Ce sont de petites molécules généralement non toxiques qui activent préférentiellement la branche ATF6. L'activation limitée des bras IRE1 et PERK offerte par ces molécules, minimise l'activation de l'apoptose induite en aval de ces deux voies de signalisation. Les composés 147 et 263 ont le potentiel d'améliorer globalement les maladies dégénératives associées à l'agrégation de protéines sécrétaires¹³⁶.



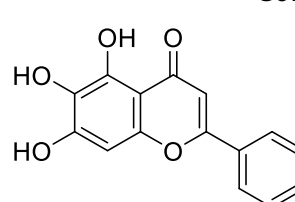
Composé 147



Composé 263



Apigénine



Baicaléine

2.7. Les modulateurs de la protéine IRE1

La protéine IRE1 contient au moins trois sites connus pouvant être engagés par de petites molécules inhibitrices : la poche de liaison aux nucléotides dans le domaine kinase, la poche d'interface dimère et le site actif de la RNase¹¹⁷. Les isoformes α et β d'IRE1 sont identiques à 100% dans la composition des résidus de poche de liaison dans le domaine RNase¹³⁸. La fonction principale du domaine luminal d'IRE1 est de reconnaître les protéines non/mal-repliées dans le RE et de traduire ce signal à travers la membrane vers le cytosol. Que la reconnaissance des protéines mal repliées se produise directement par le domaine luminal ou indirectement *via* BiP est peu clair. Mais, Il existe deux modèles établis, l'association directe^{17,18} et la compétition avec BiP^{18,19}. Le modèle d'association directe postule que les protéines malrepliées se lient directement au domaine luminal d'IRE1 entraînant son oligomérisation et l'activation de l'UPR(**Figure 47.**)¹⁸.

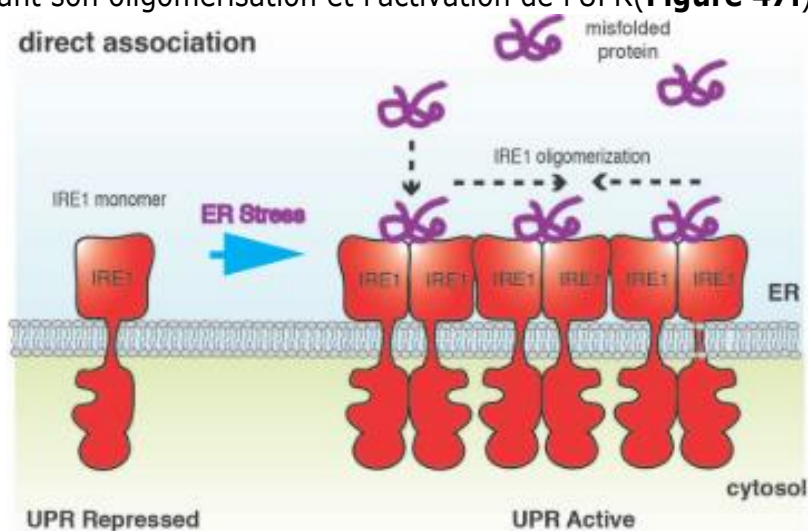


Figure 47. Le modèle d'association directe¹⁸.

Dans le modèle de compétition, le domaine luminal d'IRE1 se lie au domaine de liaison au substrat (SBD) de BiP, dans une interaction de type chaperonne-substrat. Il s'agit du même site que là où les protéines malrepliées se lient à BiP, conduisant à une compétition pour ce site de liaison. L'interaction de BiP avec IRE1 est médiée par ERdj4, qui inhibe finalement la signalisation UPR en facilitant la formation du monomère IRE1. Ainsi, BiP agit comme un répresseur de la signalisation UPR, mais n'est pas un capteur direct de stress réticulaire (**Figure 48.**)¹⁸.

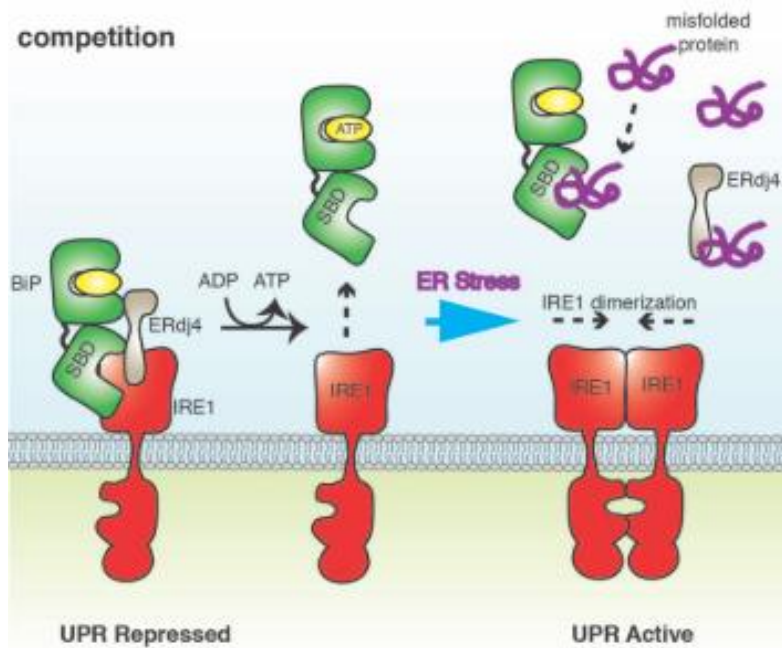


Figure 48. Le modèle de compétition avec BiP¹⁸.

Plus récemment, un modèle alternatif « allostérique » de BiP a été proposé. Dans ce modèle, la liaison des protéines malrepliées et du domaine luminal d'IRE1 à BiP se produit sur différents sites, éliminant ainsi l'exigence de concurrence. La liaison aux protéines malrepliées induit un changement conformationnel qui libère BiP d'IRE1. Ce modèle implique BiP comme un capteur direct du stress réticulaire^{18,60} (**Figure 49.**).

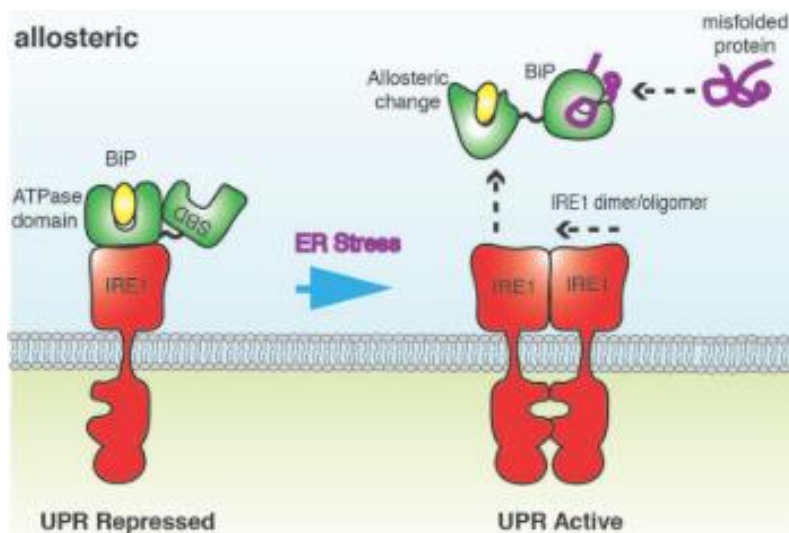


Figure 49. Le modèle allostérique¹⁸.

Après la détection des protéines non-repliées, le signal est propagé à travers la membrane du RE *via* une modification de la conformation d'IRE1, générant une activation du domaine cytosolique. Il existe de nombreux rapports concernant l'état du domaine luminal et de sa transition lors de l'activation induite par le stress du RE, y compris les transitions monomère-dimère^{19,30,139} et la formation d'oligomère^{17,18}. La partie cytosolique d'IRE1 α présente un arrangement de dimère avec chaque monomère orienté

de telle sorte que leurs sites actifs de kinase se mettent en face-à-face, d'une manière qui permet son autotransphosphorylation. Cette conformation précède et se distingue de l'arrangement dos-à-dos représentant la forme active de la RNase qui procède à l'épissage de son substrat, l'ARNm *XBP1*^{18,117,140-143}. Dans cette conformation, les sites actifs du domaine kinase sont tournés vers l'extérieur d'une manière qui empêcherait la phosphorylation^{141,144} (**Figure 50.**).

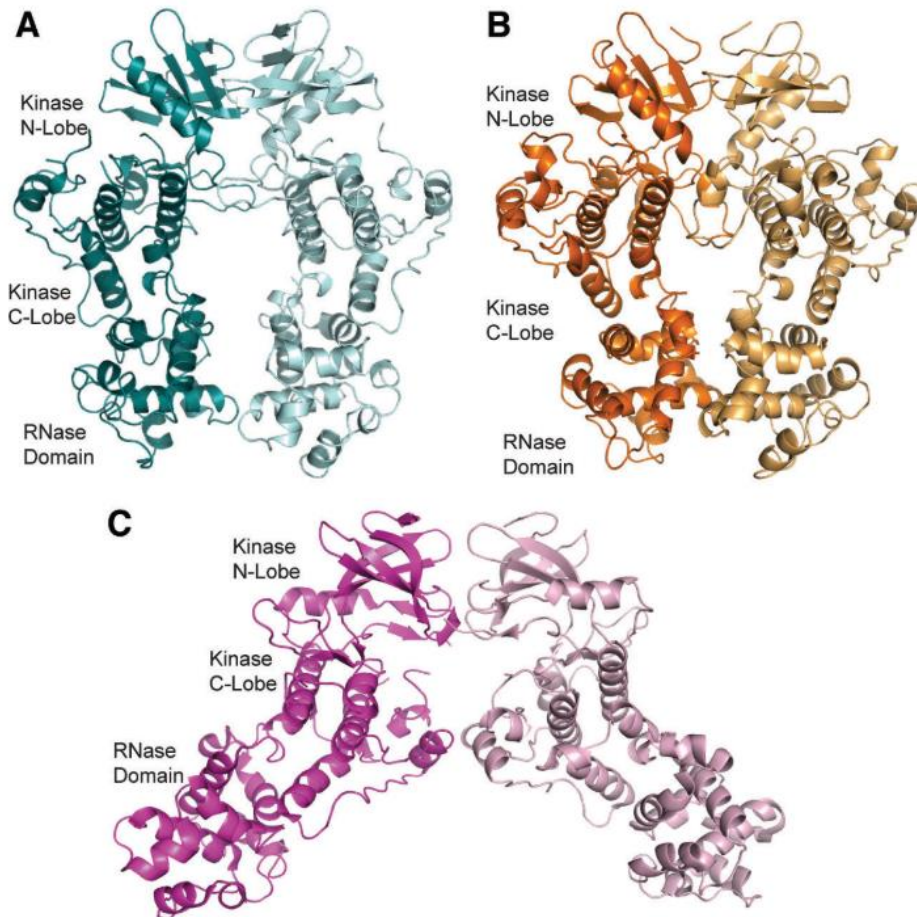


Figure 50. Les différentes conformations d'IRE1¹⁴³.

A) La protéine apo-IRE1 α en conformation dos-à-dos, chez l'Homme (PDB ID 4Z7G)¹⁴³.

B) La protéine Ire1p phosphorylée active dans une orientation dos-à-dos, chez la levure (PDB ID 3FBV)¹⁴⁴.

C) La protéine IRE1 α en conformation face-à-face à la suite de la liaison de l'ADP, chez l'homme (PDB ID 3P23)¹⁴¹.

En plus d'effectuer un changement dans sa fonction kinase, la dimérisation et l'autophosphorylation d'Ire1p conduisent à l'activation de son domaine endoribonucléase¹⁴⁵. Fait intéressant, la fonction endoribonucléase d'Ire1p est également fortement potentialisée *in vitro* par la liaison de nucléotides (ADP ou ATP et ses analogues non hydrolysables, l'ADP ayant le plus grand effet)^{139,145}. Le domaine cytosolique d'Ire1p chez la levure forme un grand arrangement hélicoïdal utilisant le dimère dos-à-dos comme bloc de construction (PDB ID 3FBV, **Figure 51.**), en complexe avec l'inhibiteur de la kinase APY29 (Cf. **IV.2.7.1**) qui agit comme un puissant activateur de la RNase

donnant naissance à un complexe oligomère RNase "actif"^{18,141,144,146}. Ainsi, il est probable que la formation d'oligomères linéaires d'ordre supérieur soit importante pour l'activation d'Ire1p¹⁷. L'oligomérisation du domaine luminal d'Ire1p semble favoriser la dimérisation et l'activation des domaines kinase et RNase. Il semble que l'autotransphosphorylation et la liaison de l'ADP contribuent à l'activation du domaine RNase¹⁴⁴. Le domaine kinase d'Ire1p des levures et IRE1 des mammifères est nécessaire à la dimérisation et à l'activation du domaine RNase¹⁴⁷. L'oligomérisation du domaine de la kinase IRE1 α contrôle l'activité catalytique du domaine RNase adjacent⁷⁸.

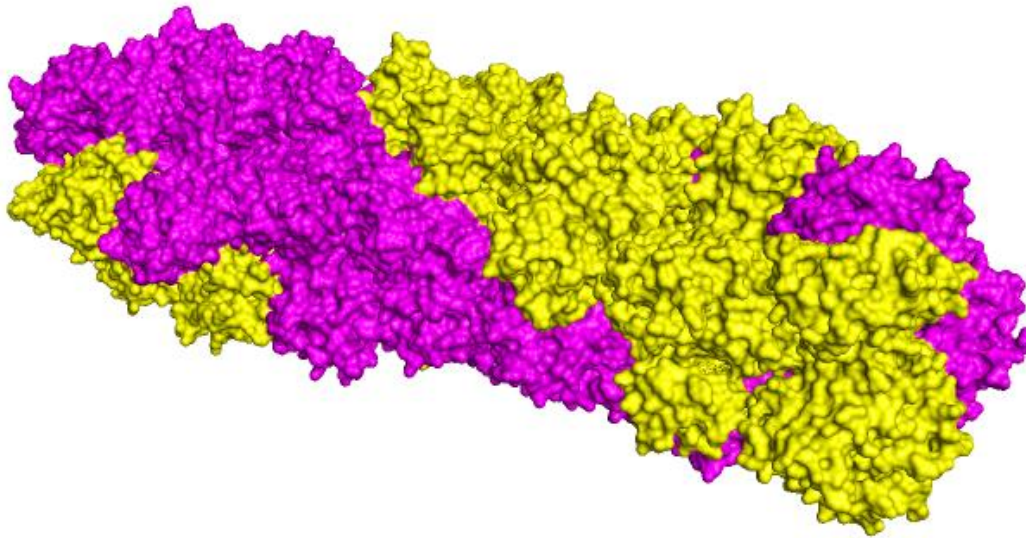


Figure 51. La surface de la structure de l'oligomère 3FBV.
Les deux monomères sont représentés avec deux couleurs différentes à l'aide du logiciel PyMol (The PyMol Molecular Graphics System, Version 2.0.6, Schrödinger, LLC.)

Il est plausible que ces dispositions soient interconvertibles, l'état initial étant l'orientation face-à-face permettant l'autophosphorylation. Cela correspond à l'exigence de phosphorylation au niveau de la boucle d'activation pour stimuler l'activité RNase, qui transite ensuite vers l'arrangement dos-à-dos, et par conséquent des structures oligomériques plus grandes¹⁴³ (**Figure 52.**). Bien que la façon dont cela fonctionne reste à résoudre, d'autant plus que les réarrangements du domaine cytosolique dépendraient du domaine luminal, et jusqu'à présent, les structures des dimères de domaines luminaux semblent suggérer qu'il n'est présent que sous une seule forme stable. De plus, la raison pour laquelle les domaines RNase du dimère doivent interagir, étant donné que les résidus catalytiques centraux sont présents dans chaque monomère, reste à élucider¹⁸.

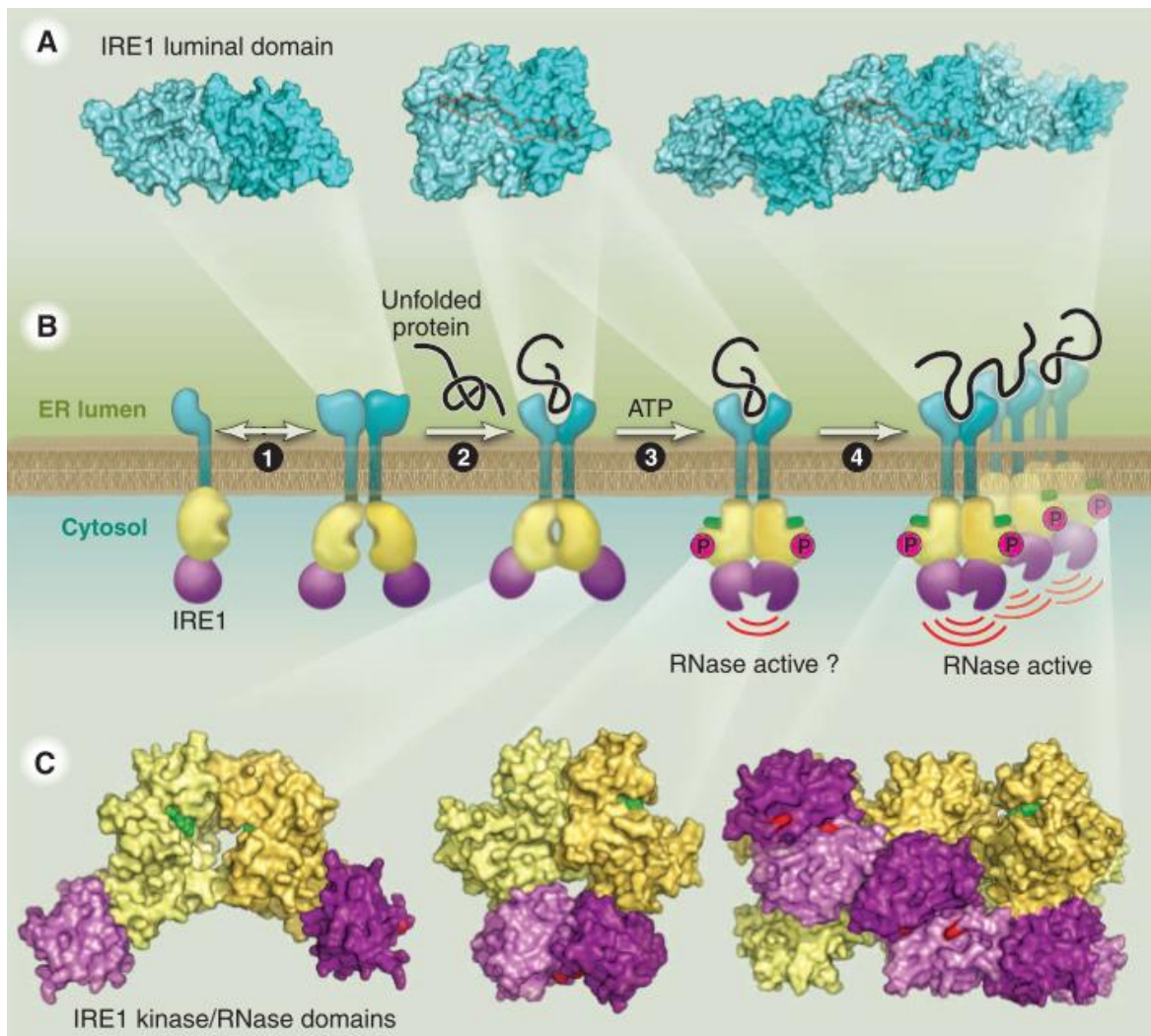


Figure 52. L'activation d'IRE1¹⁹¹.

A) Le domaine luminal

B) La protéine IRE1 à l'état monomère. **1)** Les domaines luminaux forment un dimère en présence de protéines non-repliées. **2)** Le domaine luminal se réorganise, permettant la liaison aux protéines non-repliées, conduisant à un arrangement face-à-face des domaines cytosoliques. **3)** Après l'autotransphosphorylation, les domaines RNases du dimère se mettent en un arrangement dos-à-dos, afin de s'activer. **4)** Les dimères s'empilent en un complexe oligomère.

C) Le domaine cytosolique (kinase-RNase).

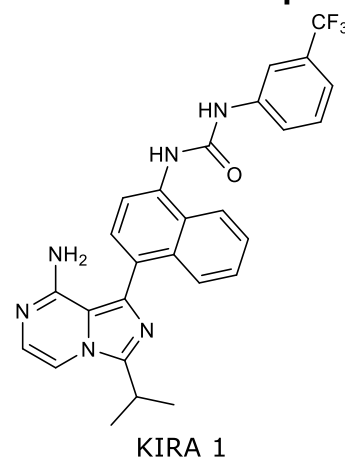
La signalisation *via* IRE1 α chez les mammifères engendre des réponses physiologiques opposées. L'activité kinase de l'IRE1 α peut elle-même produire des résultats favorables à la mort cellulaire, par l'activation d'ASK1 et JNK pro-apoptotiques. D'ailleurs, la surexpression d'IRE1 β contenant une kinase à activité fonctionnelle s'est également avérée favoriser la mort cellulaire¹⁴⁰. Cependant, l'inhibition d'IRE1 peut elle aussi entraîner une apoptose accrue et inhiber la croissance tumorale ainsi que la formation de vaisseaux sanguins, par conséquent^{67,77}. En effet, l'inactivation d'IRE1 dans les cellules cancéreuses du côlon entraîne l'activation de PERK et bloque la traduction des protéines en raison de la phosphorylation d'eIF2 α , réduisant ainsi l'expression de la cycline D1, ce qui inhibe la prolifération cellulaire par conséquent¹¹³. L'inactivation de la voie IRE1 augmente la toxicité dans le cadre d'une thérapie combinatoire d'anticancéreux⁷.

Les inhibiteurs d'IRE1 trouvent leur plus grande utilité dans les situations de différenciation continue des précurseurs en cellules sécrétrices pathogènes. Cela pourrait être le cas dans les maladies causées par les produits de sécrétion de plasmocytes ou leur contrepartie maligne dans le MM¹¹⁷. Le traitement du MM s'est remarquablement amélioré grâce aux nouveaux agents tels que le bortézomib, la **thalidomide** et le **lénalidomide**. Cependant, le MM reste incurable et de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires de toute urgence. En raison des niveaux élevés de stress du RE et de son adaptation par la voie UPR, le ciblage de cette cascade de signalisation et le blocage de cette voie de survie clé représentent une nouvelle stratégie thérapeutique^{148,149}. Les inhibiteurs d'IRE1 pourraient également être utiles pour l'administration locale; par exemple, pour bloquer le développement de cellules caliciformes produisant de la mucine dans les voies respiratoires, qui se différencient continuellement des précurseurs de la muqueuse et contribuent à la pathogenèse de l'asthme et de la BPCO¹¹⁷.

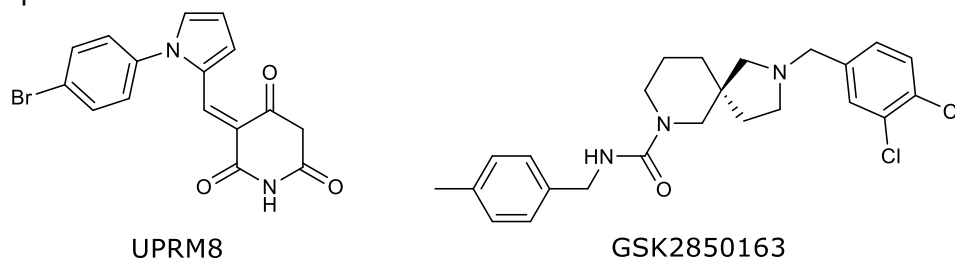
2.7.1. Les ligands du domaine kinase : compétitifs de l'ATP

Les ligands du site actif du domaine kinase inhibent l'activité kinase en raison de la concurrence avec l'ATP. Les inhibiteurs de la kinase peuvent, soit inhiber l'activité RNase en empêchant la réalisation de la conformation du dimère dos-à-dos, soit augmenter l'activité malgré le blocage de l'autotransphosphorylation du domaine kinase^{67,138,150}.

D'une part, 32 inhibiteurs à base d'imidazopyrazine de type « **Kinase Inhibiting RNase Attenuators** » (**KIRA**) inhibent de manière allostérique l'activité RNase d'IRE1 α phosphorylée en déplaçant éventuellement l'hélice- α C d'une conformation active à une conformation inactive incompatible avec la formation de dimères dos-à-dos, stabilisant ainsi l'IRE1 α à l'état monomérique^{67,150}. Le composé **KIRA 1**¹⁵⁰ nommé aussi **Composé 3**¹⁵¹ ou bien le **Composé 7**¹⁵², ayant un squelette imidazopyrazine, inhibe IRE1 α /XBP1 en interférant directement avec la liaison de l'ATP dans le domaine kinase d'IRE1 α . KIRA 1 est un inhibiteur de kinase de type II qui entre en compétition sur le site de liaison à l'ATP d'IRE1 α et stabilise une forme inactive de la protéine. Ce composé bloque l'autophosphorylation, l'oligomérisation et la capacité d'épissage de XBP1 *in vitro* et *in vivo*^{86,138,151}.



Par ailleurs, la pyrimidinedione **UPRM8** inhibe les activités kinase et RNase d'Ire1p et IRE1 *in vitro*. Également, **GSK2850163**, un inhibiteur sélectif d'IRE1 α , inhibe l'activité RNase de par son interaction avec le domaine kinase d'IRE1 α .



En outre, le peptide **FIRE** (**Figure 53.**) permet la modulation de l'oligomérisation d'IRE1 *in vitro* et du clivage de XBP1 *in vitro*, dans des cultures cellulaires et *in vivo* chez *Caenorhabditis elegans*^{67,110}.

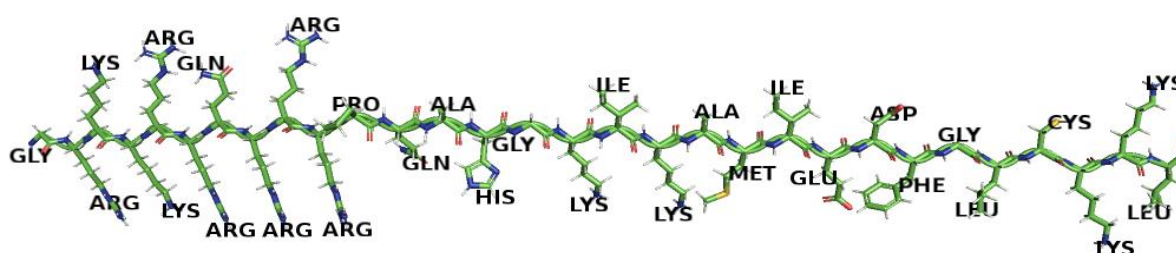
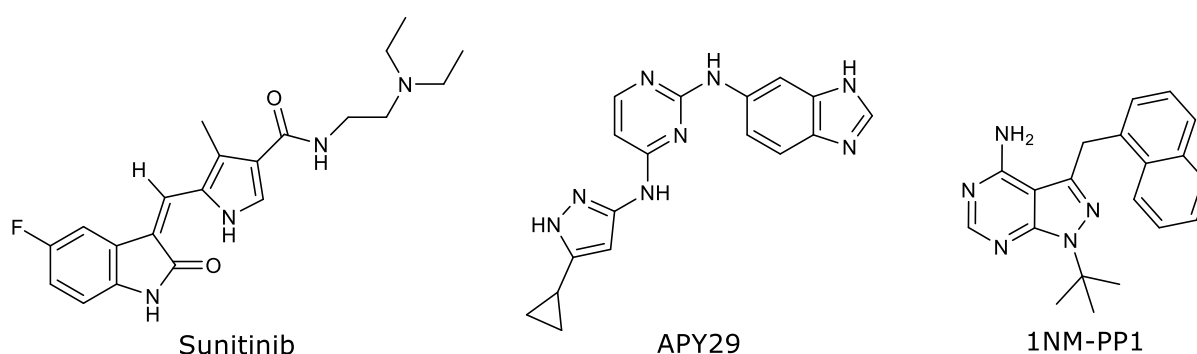


Figure 53. Le peptide FIRE.

Dessiné et présenté à l'aide du logiciel PyMol (The PyMol Molecular Graphics System, Version 2.0.6, Schrödinger, LLC.)

D'autre part, les inhibiteurs de l'activité kinase d'IRE1, de type I, comprennent l'**APY29** et le **sunitinib** (approuvé par la FDA dans le cadre du carcinome rénal), qui ciblent le site de liaison à l'ATP et inhibent la phosphorylation tout en permettant la formation du dimère dos-à-dos de la forme active du domaine RNase^{67,144}. L'inhibition médicamenteuse de la kinase IRE1 α provoquant l'activation simultanée et persistante du domaine RNase peut donc permettre une cytoprotection en dissociant le lien mécaniste obligatoire entre la kinase et la RNase, tout en favorisant les sorties adaptatives émanant de la RNase¹⁴⁰. Par exemple, l'inhibiteur compétitif de l'ATP, **1NM-PP1**, se lie au domaine kinase imposant une conformation fermée de ce domaine, similaire à l'état de liaison à l'ATP/ADP et favorise ainsi la dimérisation pour activer le domaine RNase, ce qui conduit à une transcription cytoprotectrice de XBP1^{60,139,140,153}.



2.7.2. Les ligands du domaine RNase

L'accent a été mis sur le ciblage de la voie IRE1 dans les cellules cancéreuses¹¹³. La désactivation de l'IRE1 α /XBP1 est une stratégie prometteuse pour les traitements anticancéreux. En fait, l'inhibition de l'axe IRE1 α /XBP1 augmente l'apoptose en régulant négativement plusieurs gènes impliqués dans l'UPR et génère des ROS dans les cellules déficientes en XBP1¹¹⁴. L'activité endoribonucléase semble être le principal facteur du rôle d'IRE1 α dans l'UPR¹⁵⁰. Quel que soit l'effet de l'inhibition de la RNase d'IRE1 sur les types de cellules dans l'organisme, le résultat final est une réduction de la charge tumorale et une activité accrue des cellules immunitaires antitumorales. L'inhibition de la RNase d'IRE1 pourrait favoriser l'infiltration immunitaire et la destruction des cellules tumorales sans aucun effet secondaire apparent¹¹⁰. De ce fait, l'inhibition du domaine RNase augmente l'activité cytotoxique et antiproliférative contre les cellules cancéreuses, en particulier dans le contexte du MM, où XBP1 est connu pour être important pour la progression tumorale^{110,114,119,120,148}, du cancer du pancréas^{121,149}, du glioblastome résistant¹¹⁴ et de différents sous-types de cellules de cancer du sein¹¹³. En fait, il semble que l'inhibition de la voie IRE1 α /XBP1 entraîne une augmentation du stress du RE, ce qui déclenche l'activation de PERK. Néanmoins, l'augmentation du stress réticulaire mène à l'UPR terminale et à l'apoptose^{77,148}. Les inhibiteurs d'IRE1 α provoquent donc un stress dans le RE et réduisent considérablement la croissance des tumeurs¹²¹. Le site actif du domaine RNase représente une cible médicamenteuse limitée car il possède des poches hydrophobes peu profondes ou inexistantes en raison de la nécessité d'interactions importantes avec le squelette phosphodiester de l'ARN¹³⁸. Hormis cela, de nombreux inhibiteurs de l'activité RNase ont été développés, brevetés et publiés.

a) Les hydroxy-aryl-aldéhydes

Les composés ayant le motif hydroxy-aldéhyde en ortho et les systèmes biphényles à double cycle, naphthalènes ou coumariniques sont collectivement appelées hydroxy-aryl-aldéhydes (HAA). Les HAA sont hautement sélectifs pour le site actif de la RNase d'IRE1 α *in vivo*¹³⁸ et pourraient donc représenter une nouvelle classe d'agents anticancéreux⁷⁷.

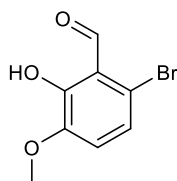
Les salicylaldéhydes

Les salicylaldimines et leurs produits hydrolytiques, les salicylaldéhydes, ont été identifiés en tant qu'inhibiteurs de l'activité d'endoribonucléase d'IRE1 α mais n'inhibent

pas l'autophosphorylation d'IRE1 α médiée par le domaine kinase. Par conséquent, les salicyaldéhydes préviennent l'épissage de l'ARNm *XBP1*, bloquent la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de *XBP1*^S et inhibent la machinerie RIDD^{77,86,138,147,152}. L'activité RIDD est un mécanisme de clivage direct de l'endoribonucléase IRE1¹⁴⁷. Elle favorise la mort cellulaire et peut fonctionner comme suppresseur de tumeur par opposition aux *XBP1*^S pro-tumoraux. Les approches qui bloquent *XBP1* tout en maintenant le RIDD peuvent être plus efficaces que l'inhibition de la RNase dans certaines circonstances¹¹⁰. Parallèlement, les analogues salicyaldéhydes inhibent la voie Ire1p/Hac1p chez la levure¹⁴⁷.

3-méthoxy-6-bromosalicyaldéhyde

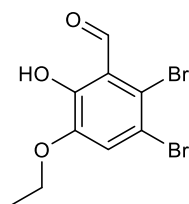
L'analogue **3-méthoxy-6-bromosalicyaldéhyde** inhibe efficacement l'épissage de *XBP1* et l'activité RIDD dans un modèle de stress aigu du RE *in vivo*. C'est un inhibiteur puissant et non compétitif de l'activation de *XBP1*, qui se lie à IRE1 de manière directe, spécifique, réversible et dose-dépendante *in vitro*^{77,86,110,147} (CI₅₀=0,41 μ M¹⁴⁷). Chez la levure, ce composé inhibe le clivage par la RNase avec une CI₅₀ de 18 μ M¹⁴⁷.



3-méthoxy-6-bromosalicyaldéhyde

3-éthoxy-5,6-dibromosalicyaldéhyde

Un autre salicyaldéhyde, le **3-éthoxy-5,6-dibromosalicyaldéhyde** inhibe l'épissage de *XBP1* dans des cellules de myélome *in vitro* et dans plusieurs modèles murins de cancers *in vivo*¹²¹. Il inhibe puissamment l'activité d'IRE1 α *in vitro* avec une CI₅₀=0,12 μ M¹⁴⁷. Chez la levure, cet analogue inhibe le clivage par la RNase avec une CI₅₀=6 μ M¹⁴⁷.

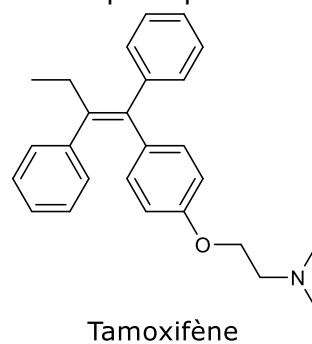
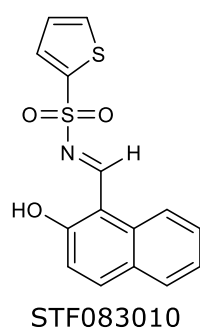


3-éthoxy-5,6-dibromosalicyaldéhyde

Les naphaldéhydes

STF083010

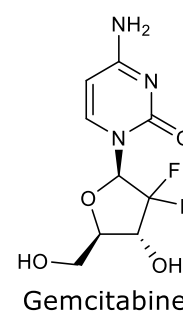
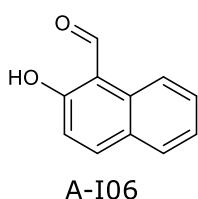
Le composé **STF083010** inhibe l'épissage de *XBP1* et l'activité RIDD en ciblant directement l'activité RNase d'IRE1 α (CI₅₀=9,94 μ M, *in vitro*¹⁵²), sans affecter l'activité kinase^{67,77,86,110,120}. *In vivo*, la molécule STF083010 réduit considérablement la croissance tumorale des cellules de cancer du sein résistantes au **tamoxifène**, à la fois en tant que traitement autonome et en association avec le tamoxifène¹¹⁰. De plus, STF083010 exerce un effet inhibiteur significatif de la croissance des modèles de xénogreffes de MM humains chez le modèle murin^{77,120,154}. En effet, le composé STF083010 a montré une activité cytostatique et cytotoxique en fonction dose et du temps-dépendante¹²⁰.



2-hydroxy-1-naphaldéhyde (A-I06)

L'inhibiteur STF083010 ou son produit d'hydrolyse, **2-hydroxy-1-naphaldéhyde (A-I06)**, bloquent l'épissage de *XBP1*, diminuent l'expression de *XBP1*^S et provoquent l'apoptose dans les cellules cancéreuses du MM et de la LLC sans déclencher de toxicité dans les cellules B normales chez la souris^{116,121}. En effet, l'inhibition de l'épissage de *XBP1* (CI₅₀=7,61 à 9,73 μ M^{116,152}) ralentit la progression maligne des tumeurs associées à la LLC¹¹⁶. Ces inhibiteurs d'IRE1 α provoquent un arrêt

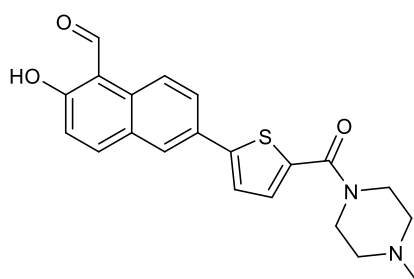
de la croissance aux phases G1 ou G2/M et induisent l'apoptose *via* une induction importante de l'expression du gène *CHOP* et l'activation de la molécule pro-apoptotique BIM, en conséquence¹²¹. Le traitement de première intention à la **gemcitabine** ou à des combinaisons chimiothérapeutiques à base de gemcitabine apporte de petites améliorations cliniques. En fait, des effets synergiques ont été observés entre les inhibiteurs de la RNase et la gemcitabine ou le bortézomib¹²¹.



MKC3946

Le composé **MKC3946** est un inhibiteur du domaine endoribonucléase d'IRE1 α qui bloque l'épissage de l'ARNm *XBP1* et l'activité RIDD sans affecter la phosphorylation d'IRE1 α ^{67,77,86,110,148,154}. De même, MKC3946 inhibe l'activité RNase d'IRE1a murine, avec une CI₅₀=0,39 \pm 0,21 μ M *in vitro*¹³⁸. Il déclenche une inhibition modeste de la croissance et une cytotoxicité sélective vis-à-vis des lignées cellulaires de xénogreffe de MM *in vivo*, sans toxicité pour les cellules mononuclées en bonne santé^{86,148,154}.

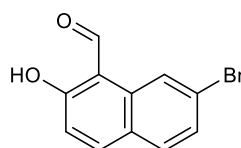
Cependant, l'administration de MKC3946 seul a une faible toxicité sur les cellules du MM, mais, en inhibant l'épissage de *XBP1*, il renforce l'action du bortézomib qui induit le stress réticulaire⁶. MKC3946 seul ou en association avec le bortézomib renforce la liaison d'IRE1 α à TRAF2, ainsi que la phosphorylation de la JNK. L'apoptose induite par le bortézomib est renforcée par MKC3946, associée à une augmentation de l'expression de *CHOP*¹⁴⁸. En effet, ce traitement combiné inhibe l'épissage de *XBP1*, ce qui conduit à l'activation de la voie de compensation PERK/eIF2 α /ATF4 de l'UPR et augmente ensuite l'activité du facteur pro-apoptotique CHOP, conduisant à l'apoptose dans les lignées cellulaires de MM^{86,148}.



MKC3946

MKC3987

Parallèlement, le composé **MKC3987**, inhibe l'activité du domaine RNase d'IRE1 α et l'activité RIDD d'une manière équivalente. Chez la souris, ce composé inhibe le domaine RNase d'IRE1a, avec une CI₅₀=0,39 \pm 0,12 μ M *in vitro*¹³⁸.



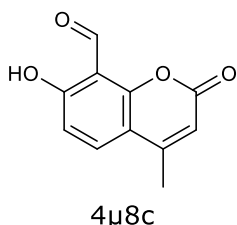
MKC3987

Les coumarines

Les umbelliférones (7-hydroxycoumarine) ont montré une activité inhibitrice de la RNase d'IRE1 dans les essais *in vitro* et *in vivo*¹¹⁷. Ils peuvent être classés en tant que dérivés salicylaldéhydes.

4 μ 8c

Le **8-formyl-7-hydroxy-4-méthylcoumarine**, plus communément appelé 4-méthylumbelliférone-8-carbaldéhyde (**4 μ 8c**), est un puissant inhibiteur non compétitif de la RNase d'IRE1 α avec une CI₅₀=4,6 μ M *in vivo*¹¹⁷. *In vitro*, plusieurs études ont montré que 4 μ 8c est un puissant inhibiteur avec une CI₅₀ de l'ordre du nM (CI₅₀=0,076 μ M¹¹⁷, CI₅₀=0,155 μ M¹¹⁶ ou CI₅₀=0,206 μ M¹⁵²). Le 4 μ 8c possède un mécanisme similaire aux autres salicylaldéhydes⁸⁶. Il inhibe à la fois l'épissage de *XBP1* et l'activité RIDD mais

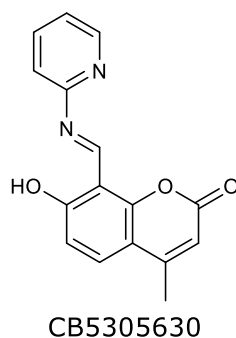


pas l'activité de la kinase d'IRE1. Il n'affecte pas l'expression de *CHOP*, ce qui indique une sélectivité de 4 μ 8C pour le bras IRE1 de l'UPR et la résistance de PERK à ce composé^{86,110,117}. L'association de cisplatine et de 4 μ 8C induit l'apoptose dans les cellules souches

cancéreuses. Ces cellules surmontent les stress infligés lors de la progression tumorale en activant PERK¹¹³. Fait remarquable observé en culture cellulaire, même si le 4 μ 8C bloque l'épissage de *XBP1* et l'activité RIDD, il n'a pas d'impact sur la survie des cellules lors d'un stress aigu du RE⁶.

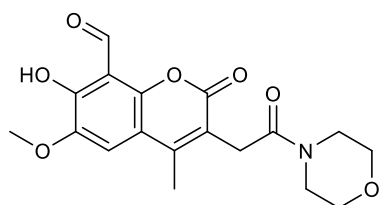
CB5305630

Le composé coumarinique **CB5305630** est un inhibiteur non compétitif de l'activité RNase d'IRE1 α , avec une CI₅₀=0,150 μ M *in vitro* et une CI₅₀=6,8 μ M *in vivo*¹¹⁷. C'est le 4 μ 8C conjugué à la 2-aminopyridine *via* une aldimine^{86,117}. Dans un environnement aqueux, CB5305630 est hydrolysé pour générer le composant actif 4 μ 8c⁸⁶.



MKC8866

Le cancer du sein manque de thérapies ciblées et son pronostic sombre souligne le besoin urgent de nouvelles stratégies et cibles thérapeutiques¹⁵⁵. Récemment, le composé **MKC8866**, a montré, lorsqu'il est administré seul, une réduction sélective de



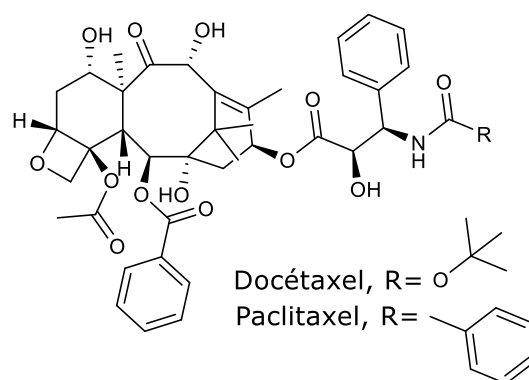
MKC8866

la croissance des tumeurs du sein surexprimant le gène proto-oncogène *MYC in vivo* dans des modèles de xénogreffes^{110,113,154}. C'est un inhibiteur sélectif de la RNase d'IRE1 α , avec une CI₅₀ de 0,29 μ M dans des cellules cancéreuses de la prostate *in vitro*¹⁵⁶. La dérégulation de

MYC entraîne un stress protéotoxique important et perturbe l'homéostasie du RE. La voie IRE1/XBP1 est importante pour la tumorigénicité des tumeurs surexprimant *MYC*. En fait, l'inhibition de l'épissage de *XBP1* bloque sélectivement la croissance des cellules hyperactivées par *MYC*¹⁵⁴. Le composé MKC8866 ne montre aucun effet sur les branches PERK et ATF6 de l'UPR¹⁵⁵. De plus, MKC8866 inhibe l'activité RIDD et sensibilise les tumeurs à la chimiothérapie standard. En effet, un traitement combiné de MKC8866 et de **docétaxel** a rapidement éliminé les tumeurs surexprimant *MYC* dans un modèle de xénogreffe dérivé de patientes. Le traitement par cette combinaison favorise l'apoptose et réduit significativement la prolifération et l'angiogenèse^{110,154}. En outre, l'administration à long terme de MKC8866 n'a causé aucun dommage au pancréas des animaux, organe qui dépend de l'UPR pour sa fonction sécrétrice, sans montrer non plus de signes évidents de toxicité ou de lésions tissulaires dans les principaux organes^{110,154}.

Cependant, une autre étude utilisant un autre modèle de xénogreffe de cancer du sein triple négatif (TNBC) a montré que MKC8866 n'a

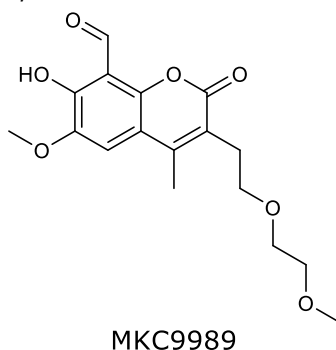
aucun effet sur la croissance tumorale en tant que traitement autonome, mais qu'il empêche néanmoins la repousse de la xénogreffe après le retrait de la chimiothérapie, par le **paclitaxel**. Le paclitaxel induit l'épissage de *XBP1* dans le TNBC et MKC8866 sensibilise de manière significative les tumeurs de TNBC au paclitaxel dans un modèle murin de xénogreffe. En fait, l'addition de MKC8866 était suffisante pour bloquer complètement l'expression de XBP1^S induite par le paclitaxel^{110,155}. L'activité RNase de l'IRE1 contribue à la production basale des facteurs pro- tumorigènes IL-6, IL-8, CXCL1,



du facteur de croissance transformant (TGFβ2) et du facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), dans les cellules du TNBC. Le paclitaxel augmente cette production en activant IRE1. L'inhibition de l'activité IRE1 RNase par MKC8866 dans les cellules cancéreuses du sein entraîne une diminution de la production de ces facteurs pro-tumorigènes^{138,155}. Curieusement, MKC8866 n'inhibe pas l'activité d'Ire1p chez la levure¹⁵⁴.

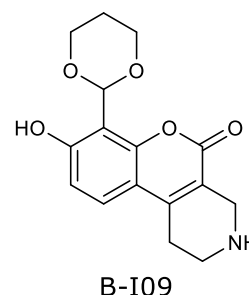
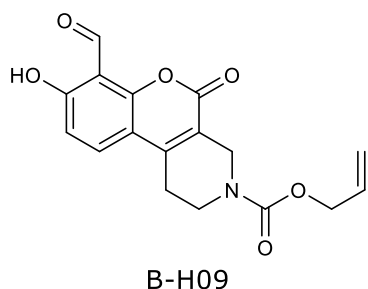
MKC9989

Le composé **MKC9989** inhibe significativement l'activité RNase de l'IRE1α humaine (CI₅₀=0,23 ± 0,03 μM) et IRE1a murine (CI₅₀=0,29±0,04 μM), et dans une moindre mesure, celle de l'Ire1p chez la levure (CI₅₀=44 μM) *in vitro*¹³⁸. Il inhibe en fait l'épissage de *XPB1* ainsi que l'activité RIDD, avec un effet minimal sur l'activité kinase d'IRE1^{86,138}.

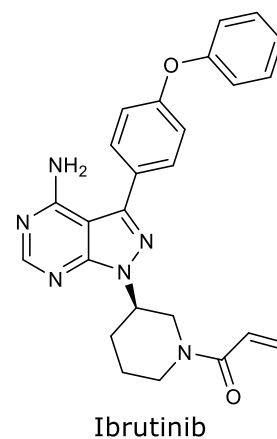


B-H09 & B-I09

Des chroménones tricycliques dérivées de la synthèse chimique d'analogues de 4μ8C, inhibiteurs de l'activité de la RNase d'IRE1, suppriment puissamment l'expression de *XPB1* et induisent l'apoptose. En effet, **B-H09** (CI₅₀=0,111μM) est significativement plus efficace que l'A-I06 (CI₅₀=7,61 à 9,73 μM) pour inhiber l'activité RNase et l'épissage de l'ARNm *XPB1* dans les cellules de LLC humaines. L'administration en monothérapie de B-H09 à des souris porteuses de tumeurs de LLC a inhibé la progression de la leucémie en induisant l'apoptose et n'a pas provoqué de toxicité systémique¹¹⁶. L'expression de *XPB1* est également supprimée par **B-I09** (CI₅₀=1,23 μM), un dérivé moins puissant du B-H09, dans 3 lignées de cellules de LLC humaines. L'inhibition de la croissance résulte l'augmentation de l'apoptose¹¹⁶.



L'**ibrutinib**, un inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton (BTK), est indiqué dans le traitement des LLC et LCM. L'association de B-I09 et de l'ibrutinib inhibe la voie IRE1, induit l'apoptose et exerce un effet cytotoxique synergique dans la LLC, le LCM et dans 4 lignées de MM humaines¹¹⁶.

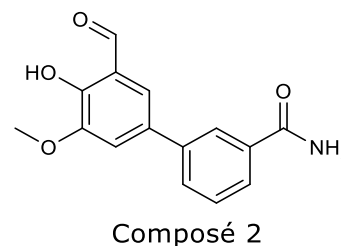


Les biphényles

Des études *in vivo* testant de petites molécules, dérivées du salicylaldéhyde, inhibitrices d'IRE1 α , ont montré une efficacité oncolytique considérablement améliorée dans les modèles de tumeurs résistantes¹⁵⁷.

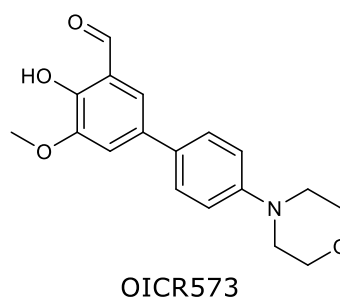
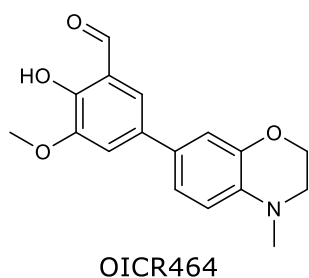
Composé 2

Le composé le plus puissant évalué parmi ceux-ci, le **composé 2**, améliore considérablement l'oncolyse des *Rhabdoviridae* dans les cellules cancéreuses. Ce composé cible IRE1 α en inhibant directement et sélectivement son activité RNase^{86,147,157}. Ceci conduit à l'activation de la mort apoptotique médiée par la caspase-2¹⁵⁷.



OICR464 & OICR573

Les composés **OICR464** et **OICR573** inhibent puissamment l'activité RNase de l'IRE1 α (CI_{50} = 2,30 \pm 0,69 μ M et CI_{50} =5,4 \pm 1,9 μ M, respectivement) et IRE1a (CI_{50} =5,40 \pm 5,2 μ M et CI_{50} =11 \pm 9,9 μ M, respectivement), et dans une moindre mesure, l'Ire1p chez la levure, avec une CI_{50} =2,20 \pm 0,39 μ M et CI_{50} =6,50 \pm 0,66 μ M, respectivement. Les écarts-types sont remarquables. En revanche, ces composés n'ont aucun effet ou inhibent faiblement l'activité kinase d'IRE1¹³⁸.



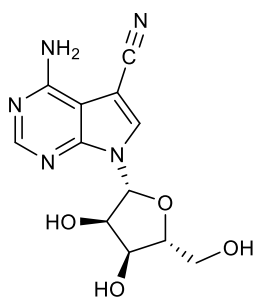
b) Les autres inhibiteurs de la RNase

Les inhibiteurs d'IRE1 α accentuent le stress réticulaire et réduisent considérablement la croissance des tumeurs pancréatiques. Le cancer du pancréas reste une maladie catastrophique avec un taux de survie à 5 ans de 5%. De plus, la chimiothérapie est inefficace et de nouvelles options thérapeutiques sont nécessaires. Les inhibiteurs spécifiques de l'activité RNase d'IRE1 α , tels que STF083010, A-I06, 3-éthoxy-5,6-dibromosalicylaldéhyde et la **toyocamycine**, ont montré une inhibition de la croissance dépendante du temps et de la dose dans des essais de prolifération utilisant un panel de 14 lignées de cellules cancéreuses du pancréas, ainsi que dans des modèles murins *in vivo* de xénogreffe du cancer du pancréas¹²¹.

Toyocamycine

La toyocamycine est un antibiotique analogue de l'adénosine identifié comme un inhibiteur de l'activation de XBP1 induite par le stress du RE. Elle bloque l'épissage de l'ARNm *XBP1*, l'activité RIDD, ainsi que l'expression des gènes cibles de XBP1⁵. En effet, la toyocamycine est un inhibiteur sélectif de l'activité RNase d'IRE1 α avec une CI₅₀=0,08 μ M¹⁴⁹. Elle n'a pas d'incidence directe sur les branches ATF6 α et PERK de l'UPR, ni sur la kinase d'IRE1 α *in vitro*^{67,86,110,113,149}.

La toyocamycine montre une activité antitumorale *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de MM humain, seule ou en combinaison (synergie) avec le bortézomib. La toyocamycine induit une apoptose marquée dans les lignées cellulaires de MM, y compris celles résistantes au traitement par le bortézomib, de manière dose-dépendante^{86,121,149}.



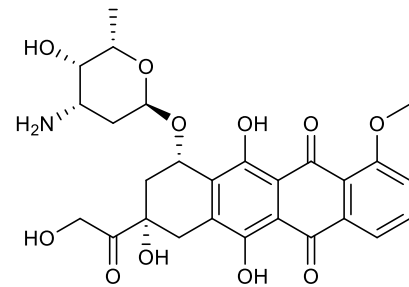
Toyocamycine

Une étude de phase I sur la toyocamycine, a également été réalisée sur les effets antitumoraux possibles chez les patients atteints de tumeurs solides avancées. Toutefois, aucune réponse clinique apparente n'a été observée dans cette étude et aucune évaluation clinique supplémentaire n'a été prévue. Dans cette étude, la toyocamycine n'a montré aucun effet secondaire systémique, tel

qu'un dysfonctionnement d'organe ou une cytopénie et seule une nécrose locale au site de perfusion aurait été constatée lors de l'administration du médicament dans les tissus mous¹⁴⁹.

Doxorubicine

Curieusement, la **doxorubicine**, antibiotique de la famille des anthracyclines, a récemment été identifiée comme un inhibiteur de l'activité RNase d'IRE1^{67,110,158}, avec une $CI_{50} \approx 20 \mu M$ ⁸⁶. Le mécanisme d'action le mieux établi de la doxorubicine en tant que médicament chimiothérapeutique consiste à inhiber la topoisomérase II, bloquant ainsi la réplication de l'ADN et provoquant ainsi son clivage. Cependant, elle présente une cytotoxicité plus puissante contre les lignées cellulaires de MM que d'autres lignées de cellules cancéreuses ayant une activité basale IRE1 α /XBP1 plus basse. La cytotoxicité de la doxorubicine sur les cellules du MM est donc indépendante de la topoisomérase II. La doxorubicine inhibe l'épissage de *XPB1* *in vitro* et *in vivo*.



Doxorubicine

Comparée à STF083010, la doxorubicine s'est révélée être plus puissante dans l'inhibition de l'expression de *XBP1* et a entraîné une plus grande cytotoxicité dans plusieurs lignées cellulaires de MM¹⁵⁸. Il est intéressant de noter qu'elle a simultanément augmenté la phosphorylation d'eIF2 α dans certains types de cellules, suggérant une modulation rétroactive de la voie PERK¹⁵⁸. De plus, la doxorubicine est un médicament cardiotoxique, dû à la génération de ROS, à la dyshoméostasie calcique et à l'induction du stress réticulaire^{122,137}.

2.7.3. L'interaction protéine-ligand dans le domaine RNase

La structure du domaine RNase IRE1 α est composée de neuf hélices α . L'hélice αC fait partie intégrante de l'interface dimère dos-à-dos des domaines RNases actives d'Ire1p. Les résidus invariants Arg697, Asp723 et Arg730 dans Ire1p (correspondant à Arg594, Asp620 et Arg627 respectivement, dans IRE1a murin et IRE1 α) forment un pont de sel essentiel à trois centres sur l'interface dimère dos-à-dos¹³⁸. Ces résidus correspondent à Arg437, Asp463 et Arg470 dans IRE1a chez *A. thaliana* (**Figure 54.**).

Chez l'Homme et la souris, les inhibiteurs de la RNase partagent des modes de liaison similaires, avec une poche peu profonde qui diffère peu entre les espèces, nichée au croisement des hélices $\alpha 3'$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$, et alignée par les chaînes latérales de Leu886, Phe889, Arg902, Lys907, Glu913, Leu914 et Pro915 et les résidus catalytiques conservés sont Tyr892, Arg902, Arg905, Asn906 et His910^{138,147}. Les résidus Tyr892, Arg902, Arg905, Asn906, Lys907, His910, Leu914 et Pro915 sont conservés dans la protéine

Ire1p chez la levure (Tyr1043, Arg1053, Arg1056, Asn1057, Lys1058, His1061, Leu1065 et Pro1066, respectivement) et la protéine IRE1a chez l'Arabette des dames, organisme végétal modèle (Tyr766, Arg776, Arg779, Asn780, Lys781, His784, Leu788 et Pro789, respectivement). La Leu886 est conservée chez la levure (Leu1037) mais ne l'est pas chez *A. thaliana* (Ile760). La Glu913 correspond à la Glu787 chez *A. thaliana* mais elle est remplacée par l'Asp1064 chez *S. cerevisiae*. La Phe889, quant à elle, s'aligne avec Tyr1040 d'Ire1p chez la levure et Tyr763 d'IRE1a chez *A. thaliana* (**Figure 54.**).

Les inhibiteurs de la RNase, tels que les HAA se lient à cette poche au niveau du site actif de la RNase d'IRE1 α via des interactions de type π -stacking avec l'His910 (surface basale) et la Phe889 (surface apicale) et une liaison hydrogène avec la Tyr892^{86,138}. Dans cette configuration stable, les HAA sont interposés entre les chaînes latérales des résidus catalytiques de la RNase, Tyr892 et His910, perturbant ainsi la catalyse¹¹⁷. L'interaction essentielle est une interaction hautement spécifique de base de Schiff (imine) exceptionnellement stable entre le groupement aldéhyde et le groupement amine en ϵ de la Lys907^{6,67,86,116,117,138,146,147}. En raison de l'action de serrage des chaînes latérales Phe889, His910 et Asn906 de part et d'autre de la structure annulaire plane des HAA, l'interaction de la base de Schiff une fois formée serait protégée des attaques de l'eau¹³⁸ (Cf. **V.3.1**). Parmi les résidus Lys dans le domaine cytosolique, seule une modification covalente au niveau de la Lys907 (et dans certains cas Lys599) est observée. Cette sélectivité a été attribuée à une perturbation spécifique du pKa du groupement amine en ϵ de la Lys907, entraînant une nucléophilie accrue permettant la formation d'une base de Schiff avec les inhibiteurs aldéhydes^{117,152}. La Lys599 est un résidu de coordination des phosphates, commun à toutes les kinases enfouies dans la poche de liaison au nucléotide, alors que la chaîne latérale de Lys907 s'enfouie dans le site actif de la RNase. A l'état natif, les résidus Lys907 et Lys599 sont relativement peu exposés et leur groupe amine en ϵ a une accessibilité au solvant relativement faible et un potentiel de liaison hydrogène faible avec l'eau.

sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	1	MRLRRNMLVLTLLVCFVSSIIISCSIPLSRSTRSQIIVEDEVASTKKLNFNFGVDKNIINSPAPARTTEGLPNM	74
sp P32361 IRE1_YEAST	1	9
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	1MPARWLLL.....L	9
sp O75460 ERN1_HUMAN	1MPARRLLL.....L	9
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	75	LSSYPTPNLLNTADNRRANKKGRRAANSISVPLYENRSLNELSLSDILIAADVEGGLHAVDRRNGHIWISIEP	148
sp P32361 IRE1_YEAST	10	LALLLPPPGP.....GSFG.....RTSTVTLPETLLFVSTLDGSLHAVSKRTGSIKWTLKE	60
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	10	LTLLL.....PGL.....GIFG.....STSTVTLPETLLFVSTLDGSLHAVSKRTGSIKWTLKE	58
sp O75460 ERN1_HUMAN	10	LTLLL.....PGL.....GIFG.....STSTVTLPETLLFVSTLDGSLHAVSKRTGSIKWTLKE	58
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	1MPPRC.....	5
sp P32361 IRE1_YEAST	149	ENFQPLIEIQEPRLETYETLIEPFGDGNIIYFN--AHGQLKPLSIRQLVSTPLHLKTNIVVNDGSKIVE	220
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	61	DPVLQV.....PTHVE--EPAFLDPNDGSLYTLGGKNNGLTKLPFTIPELVQASPCRSS.....	114
sp O75460 ERN1_HUMAN	59	PRVLQV.....PTHVE--EPAFLDPNDGSLYTLGGKNNGLTKLPFTIPELVQASPCRSS.....	112
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	6PFLRHLFFLLLLSPWIMSPCGGAADDVITYPI--VPSPPGR.....SILQIRRE.....	53
sp P32361 IRE1_YEAST	221	DEKVTGSMRTIMYTIMNNGEIIISAFGPGSKNGYFGSQSDVCSPEEKIKLQECENMIVIGKTFELGIHSYDG	294
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	115	DGILYMGKKQDIWYVIDLTLGKQQLTSSAFADSL.....CPS.....TSLLYLGRTEYIT--MYDT	170
sp O75460 ERN1_HUMAN	113	DGILYMGKKQDIWYVIDLTLGKQQLTSSAFADSL.....CPS.....TSLLYLGRTEYIT--MYDT	168
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	54PPTPEPNTKLVVDRDQKVFLLKQPKETPYWSFSTGSPMHSLYQAPANNTENAT	106
sp P32361 IRE1_YEAST	295	A.....SYN.....	298
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	171	KTRELRWNATYFDYAASLPEDDQVYKMSHFVSNQDGLVVTVDSESGDVLWIQNYASPV.....	228
sp O75460 ERN1_HUMAN	169	KTRELRWNATYFDYAASLPEDDQVYKMSHFVSNQDGLVVTVDSESGDVLWIQNYASPV.....	228
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	107	EITRPHIIVEYLNNSKAATTVDGYHNTVQEFFR--QKPLVTDGVLGSETTSAYLVDRSGLI.....	170
sp P32361 IRE1_YEAST	299VTYSTWQQNVLDVPLALQNTFSKDGMCIAPFRDKSLASDLDFRIARWVSPTF	351
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	229VAFYVWQGEVLRKVVHINVA.....VETLRYLTFM--SGEVRITKWKYFPF	273
sp O75460 ERN1_HUMAN	227VAFYVWQREGLRKVMHINVA.....VETLRYLTFM--SGEVRITKWKYFPF	271
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	171HVYKSTGDKITNALVKPASTEDFVNEPLLIRRTDSKLEHFSKTTGKLVWNLTVS.....	225
sp P32361 IRE1_YEAST	352	PGIIVGLDFDVFNDLRTNENILVPHFPNPGDHS.....ISSNKVLDQTSNLSWFWALSQNFPSLVESA.....	415
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	274	K.....KLTPTLYVGKYST.....SLYASPSMVHEGVAVV	309
sp O75460 ERN1_HUMAN	272	K.....KLTPTLYVGKYST.....SLYASPSMVHEGVAVV	307
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	226HFRALLCDPV.....FNSGYDLGP.....K-LQTGIYMP	254
sp P32361 IRE1_YEAST	416P-I.....SRYASSDRWRVSSIFEDETLAKNIMGVHQI--YNNEYDHLIYENYKTN--SLDTHHKYPP	474
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	310	PRGSLPLLEGPQTDGVTIGDKGECVITPSTDVKFDPGLKGSKLNLYLRNYWLLIGHHETPLSASTKMLERFPN	383
sp O75460 ERN1_HUMAN	308	PRGSLPLLEGPQTDGVTIGDKGECVITPSTDVKFDPGLKGSKLNLYLRNYWLLIGHHETPLSASTKMLERFPN	381
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	255	LLCGSQIDVRGPEIVIRVLHDQPMNVKMLPS-PSLNHFESSENSIMPF GKARE.....SRKLOEQH.....	313
sp P32361 IRE1_YEAST	475	LMIDSSVD.....TTDLHQNNEMNSLKEY--MSPEDLEAYRKKIHEQISRELDEKN.....	523
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	384	NLPKHREN.....VIPADSEKRSFEEV--INIVG--QTSNDTPTTVSQDVEKRLARAPAK	434
sp O75460 ERN1_HUMAN	382	NLPKHREN.....VIPADSEKRSFEEV--INLVD--QTSENAPTTVSRDVEKPAHAPAR	432
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	314KQKYTYLFGQWSPVKLLAPLVL.....LGVVVS.....	341
sp P32361 IRE1_YEAST	524QNSLLLKFGSLVYRIIETGVFLLLFLIFCALQRFKILP.....PLYVLLSKIGFMPE--KEIPIV	582
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	435	PEAPVDSMLKDMATIIL.....STFLLV--GWVAFIITYPLSVHQQLQHQQFQKELEKIQLLQQ--QQLPFH	499
sp O75460 ERN1_HUMAN	433	PEAPVDSMLKDMATIIL.....STFLLI--GWVAFIITYPLSMHQQLQHQQFQKELEKIQLLQQQQQLPFH	499
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	342VFIKKFSR-GSDV.....SLKAGPSKKKKNRKSAKDTNRQVPRGQDQ--FEL--IEGG	391
sp P32361 IRE1_YEAST	583	ESKSLNCPSSSENVTKPDMSSGKQVVFEGAVNDGSLKSEKNDDADEDEKSLDLTTEKKRKRGRSGGKGR	656
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	500	PHGDLTDQPEFLDSSGPFSESSGTSPPSPS.....PRASNHSL.....HPSSASRAGT	548
sp O75460 ERN1_HUMAN	500	PPGDTAQDQGLDTSGPYSESSGTSPPSTS.....PRASNHSL.....CSGSSASKAGS	548
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	392	QMLLGFNNFQSGATDGRKIGKFLSSKEIAKGSNQTIVFEGIYEGIPVAVRRLVRSHEVAFKEIQNLIASDQH	465
sp P32361 IRE1_YEAST	657	KSRIANIP.....NFEQSLKLVVSEKILGYSGGTVVFGQSFQGPVAVRRLMIDFCDIALMEIKLLTESDHDH	725
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	549	SPSLEQDDDEETRMVIGKISFCPKDVLGHGAEGTIVYKGMFDRDVAVKRILPECFSAADREVQLLRESDEH	622
sp O75460 ERN1_HUMAN	549	SPSLEQDDGDEETSVVIGKISFCPKDVLGHGAEGTIVYKGMFDRDVAVKRILPECFSAADREVQLLRESDEH	622
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	466	TNIIIRWYGV EYDQDFVYLSLERDTCSLDDLKSYLEFSMTKVLNNDSTEGVAAYKIQDLSLEGVIKGNFWKW	539
sp P32361 IRE1_YEAST	726	PNVIRYYGSEETDRFLYIAELCNLNLQDLVSEKNSVDE.....NLK.....L	768
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	623	PNVIRYFCTEKDRQFYIAIELCAATLQEYVEQKDFAHL.....	661
sp O75460 ERN1_HUMAN	623	PNVIRYFCTEKDRQFYIAIELCAATLQEYVEQKDFAHL.....	661
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	540	GGHPSPLMLKLMRDIVCGIVHLHELGIIVHRDLKPNVILISKDMT.....LSAKLSDMGISKRMSRDMS	602
sp P32361 IRE1_YEAST	769	Q--KEYNPTISLLRQIASGVAHLHLSLKIIVHRDLKPNILVSTSSRFTADQQTGAENLRILISDFGLCKKLDGSGS	840
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	662GLEPITLLHQTTSGLAHLHLSLNIIVHRDLKPHNILLSPMN.....AHGRKAMISDFGLCKKLAAGR	723
sp O75460 ERN1_HUMAN	662GLEPITLLHQTTSGLAHLHLSLNIIVHRDLKPHNILLSPMN.....AHGKIKAMISDFGLCKKLAAGR	723
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	603	SLG-HLATGSGSGWQAPEQLLQ.....GRQTRAVDMFSLGCVIFYTI	644
sp P32361 IRE1_YEAST	841	SFRTNLNNPSGTSQWRAPELLLESNNLQCVVETEHSSSRHTVVSQSFYDPDFTKRRLTRSIDIFSMLGCVFYIL	914
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	724	SFSRRSG-VPGTEGWIAPEMLSEDCK.....DNPTTYVDIFSAQCVFYVI	768
sp O75460 ERN1_HUMAN	724	SFSRRSG-VPGTEGWIAPEMLSEDCK.....ENPTYTYVDIFSAQCVFYVI	768
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	645	TGCKHPFGDLEQDVNIVKNKVD-FLV.....EHVPEASDLISRLNPDPLRPSATEVLLHHPFWNSEMRLS	712
sp P32361 IRE1_YEAST	915	SKGKHPFGDKYSRESNIRGIFSLDEMCKLHRSLEIATDLISQMIHDHPLKRPITAMKVLHHPFWSKSKLE	988
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	769	SEGNHPFGKSLQDQANILLGACNLCDFHSDKHEDV--IARELIEKMIAMDPPQRPSAKHVLLKHPFWSLEKQLQ	840
sp O75460 ERN1_HUMAN	769	SEGSHPFGKSLQDQANILLGACNLDCLHPEKHEDV--IARELIEKMIAMDPPQRPSAKHVLLKHPFWSLEKQLQ	840
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	713	FLRDAADRVELENREADSEILKAMESTAPVAIGGKMDKLEPVFITNIGRIRRYKYDSIRDLLRVIIRNHLNH	785
sp P32361 IRE1_YEAST	989	FLKLVSDRLIEINRDPPSALLMKMFDAGSDFVIPSQDVTVKFDKTFMDNLERMRYHSSKLMDDLRLALRNHYH	1062
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	841	FQDVSDRIEKEALDGPVIRQ--LERGGR-AVVKMDWRENITVPLQDURKERTYKGGSVRDLLEAMRNHKKHY	911
sp O75460 ERN1_HUMAN	841	FQDVSDRIEKEALDGPVIRQ--LERGGR-AVVKMDWRENITVPLQDURKERTYKGGSVRDLLEAMRNHKKHY	911
sp Q9C5S2 IRE1A_ARATH	786	RELFPETIQELVGTVPGEFDEYFAVRFPKLLIEVYRVISLHCREEEVFRKYFKCDI.....	841
sp P32361 IRE1_YEAST	1063	MDLFDIAELMGPVDPGFYDYFTKRFPNLLIGVYMIVKENLSDQILREFLYS.....	1115
sp Q9EQY0 ERN1_MOUSE	912	RELFPVEVQETLQSIPTDDVRYFTSRFPHLLSHTYQAMELC-RHERLFTQYYWHEPTEPQPPVPIYAL	977
sp O75460 ERN1_HUMAN	912	RELFAEVRETLGSLPDDFVQYFTSRFPHLLAHTYRAMELC-RHERLFTQYYFHEPPEPQPPVTPDAL	977

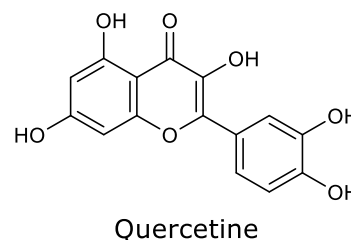
Figure 54. L'alignement des séquences d'acides aminés d'IRE1.

IRE1a chez *Arabidopsis thaliana*, Ire1p chez *Saccharomyces cerevisiae*, IRE1a chez *Mus musculus* et IRE1 α chez *Homo sapiens*. L'intensité de la couleur montre le degré de conservation entre les espèces (Cf. **V.2.1**).

2.7.4. Le ligand de la poche interface dimère « Q site »

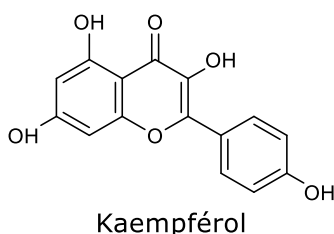
a) Quercétine

La **quercétine** est un flavonoïde qui active le domaine RNase d'IRE1 α et Ire1p et potentialise l'activation par l'ADP, en se liant à la poche d'interface dimère et induit en conséquence l'épissage de l'ARNm *XBP1*. Elle influence marginalement l'activité kinase d'Ire1p tout en améliorant puissamment celle de la RNase, en favorisant la dimérisation *via* son engagement dans le site de liaison de la quercétine, nommé « Q site »^{86,138,159}. L'interface dimère s'étend sur toute la longueur d'IRE1, juxtaposant les domaines kinases situés à l'extrémité C-terminale de chaque protomère d'IRE1, qui atteint ainsi une conformation active pour le clivage de l'ARNm *XBP1* ou *HAC1*^{144,159}. Inversement, les molécules qui accèdent au Q site pour inhiber l'épissage de *XBP1* pourraient être utilisés pour neutraliser la branche IRE1 de l'UPR, ce qui aurait des effets bénéfiques dans la lutte contre les cancers, comme le MM, qui dépendent de cette voie pour leur survie¹⁵⁹.



b) Kaempférol

Le **kaempférol** est un flavonol naturel extrait de plantes (Brocoli, fraise...). Dérivé de la quercétine, c'est un antioxydant qui réduit le stress réticulaire *via* l'inhibition des trois branches de la voie UPR. C'est un traitement potentiel pour certains types de cancer⁷⁶. Le kaempférol est un inhibiteur faible de l'activité kinase d'IRE1, ce qui suggère que sa capacité à activer la RNase d'IRE1 est principalement médiée par la liaison au Q site, avec une activité presque équivalente à celle de la quercétine¹⁵⁹.

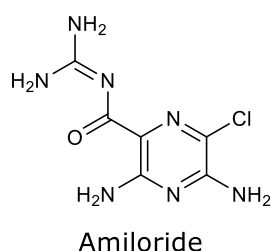


2.7.5. Les autres modulateurs de l'axe IRE1/XBP1

a) Amiloride

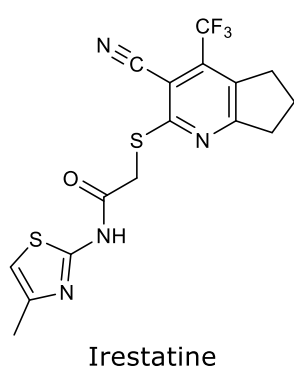
L'**amiloride** est un diurétique épargneur de K⁺. Il inhibe complètement l'activation d'IRE1 α induite par le stress du RE, l'épissage de *XBP1* et l'expression subséquente de BiP. L'amiloride active l'apoptose spécifiquement, induite par le stress chimique du RE, médiée par les caspases¹⁶⁰. Comme l'activation de l'UPR, y compris l'activité de BiP, joue un rôle protecteur contre le stress du RE, la mort cellulaire induite par l'amiloride serait donc due à une activation altérée de l'UPR. L'amiloride peut induire la phosphorylation

d'eIF2 α , ce qui diminue son activité et entraîne par la suite une atténuation de la traduction¹⁶⁰. La phosphorylation d'eIF2 α induite par PERK a un rôle cytoprotecteur¹⁶¹. Une faible dose d'amiloride peut protéger du stress réticulaire en augmentant légèrement la phosphorylation d'eIF2 α , tandis qu'avec une dose élevée d'amiloride, une induction élevée/prolongée de la phosphorylation d'eIF2 α entraînerait une augmentation synergique de la mort cellulaire. L'amiloride inhibe l'expression de CHOP induite par le stress du RE. L'amiloride et ses dérivés seraient efficaces dans le traitement du DTII, de la MH, de la MP et de l'ischémie cérébrale¹⁶⁰.



b) Irestatine

L'**irestatine**, un inhibiteur de l'IRE1 α , inhibe la transcription de *XBP1*. L'inhibition de la RNase d'IRE1 α ralentit la croissance des cellules de MM et diminue la survie des cellules tumorales *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes tumorales sous-cutanées^{77,115}. Les statines sont des principes actifs hypocholestérolémiants bien connus. Les statines peuvent affecter les événements cellulaires et altérer l'homéostasie en agissant dans la progression du cycle cellulaire, la signalisation cellulaire et l'intégrité membranaire. En

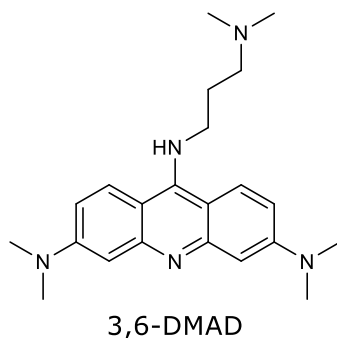


plus de leur rôle principal dans la réduction du cholestérol, ils possèdent des propriétés pharmacologiques y compris des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antithrombotiques, anti-angiogéniques, hypo-uricémiants, anti-athérosclérotiques, en plus de l'amélioration de la fonction vasculaire et de la protection des cellules β . Ces effets pharmacologiques sont liés à l'atténuation du stress du RE¹²². Le

traitement par les statines protège donc contre le stress réticulaire. Les statines inhibent l'expression de CHOP, de la caspase-12 et de la JNK, réduisent l'apoptose induite par le stress du RE et régulent négativement l'expression de *BiP* et de *CHOP*. Cependant, le mécanisme d'action des statines dans les troubles liés au stress réticulaire doit encore être clarifié davantage¹²².

c) 3,6-DMAD

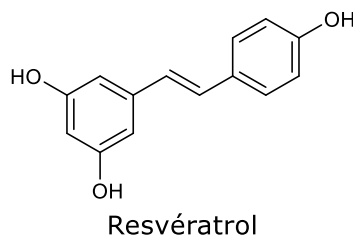
La **N9-(3-(diméthylamino)propyl)-N3,N3,N6,N6-tétraméthylacridine-3,6,9-triamine (3,6-DMAD)** inhibe à la fois l'oligomérisation de l'IRE1 α et son activité endoribonucléase. L'inhibition puissante de l'épissage de *XBP1* par le 3,6-DMAD s'est révélée cytotoxique vis-à-vis des lignées cellulaires de MM et a supprimé la croissance de xénogreffe de MM *in vivo*^{77,110,146}.



Les essais *in vitro* révèlent que les dérivés d'acridine bloquent l'épissage de *XBP1* en interférant avec l'oligomérisation d'IRE1 α , en tant que composés avec un nouveau mode d'action. Le 3,6-DMAD, le plus puissant de cette classe de médicaments, inhibe à la fois l'oligomérisation et l'activité RNase *in vitro*¹⁴⁶.

d) Resvératrol

Le **trans-3,4',5-trihydroxystilbène (resvératrol)**, est un polyphénol naturel qui est aussi présent dans le vin rouge. Le resvératrol inhibe la prolifération, induit l'apoptose et surmonte la chimiorésistance dans les cellules de MM humaines¹¹⁹. C'est un inducteur efficace de l'apoptose dans divers types de cellules cancéreuses. De plus, il a été rapporté que le resvératrol inhibe la tumorigenèse dans plusieurs modèles animaux. Il provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la prolifération *via* l'induction de l'UPR dans des lignées cellulaires de leucémie humaine¹¹⁵.



En fait, le resvératrol active IRE1 α , induit l'épissage de *XBP1* et la phosphorylation d'IRE1 α et de la JNK en aval, dans les cellules de MM. Ces réponses ont été associées à la cytotoxicité induite par le resvératrol dans les cellules du MM. Ce dernier inhibe sélectivement l'activité transcriptionnelle de *XBP1* tout en stimulant l'expression des

molécules régulées par l'axe IRE1/XBP1. Les tests indiquent que le resvératrol supprime l'activité transcriptionnelle par l'intermédiaire de la sirtuine 1 codée par *SIRT1*, une cible moléculaire du resvératrol. Le resvératrol diminue la capacité de liaison de XBP1 à l'ADN et sensibilise les cellules à l'apoptose induites par le stress réticulaire¹¹⁹. Son efficacité comme anti-myélome est liée à sa capacité à induire le stress, à supprimer les voies de signalisation constitutives du NF- κ B et à moduler l'expression de protéines régulatrices apoptotiques^{67,119}. Le resvératrol induit l'expression de CHOP et des molécules pro-apoptotiques, en aval de PERK. Il induit donc la réponse au stress du RE et l'induction des effets pro-apoptotiques représente un nouveau mécanisme sous-jacent à la mort cellulaire induite par le resvératrol^{119,137}.

3. Conclusion

Quel que soit l'effet de l'inhibition de la RNase d'IRE1 sur les types de cellules dans l'organisme, le résultat final est une réduction de la charge tumorale et une activité accrue des cellules immunitaires antitumorales. L'inhibition de la RNase d'IRE1 pourrait favoriser l'infiltration immunitaire et la destruction des cellules tumorales sans aucun effet secondaire apparent¹¹⁰. De ce fait, l'inhibition du domaine RNase augmente l'activité cytotoxique et antiproliférative contre les cellules cancéreuses, en particulier dans le contexte du MM, où XBP1 est connu pour son importance dans la progression tumorale^{110,114,119,120,148}, du cancer du pancréas^{121,149}, du glioblastome résistant¹¹⁴ et de différents sous-types de cellules de cancer du sein¹¹³. En fait, il semble que l'inhibition de la voie IRE1 α /XBP1 entraîne une augmentation du stress du RE, ce qui déclenche l'activation de PERK. Néanmoins, l'augmentation du stress réticulaire mène à l'UPR terminale et à l'apoptose^{77,148}. Les inhibiteurs d'IRE1 α provoquent donc un stress dans le RE et réduisent considérablement la croissance des tumeurs¹²¹.

Le site actif du domaine RNase représente une cible médicamenteuse très prometteuse mais limitée car il possède des poches hydrophobes peu profondes ou inexistantes en raison de la nécessité d'interactions importantes avec le squelette phosphodiester de l'ARN¹³⁸. Hormis cela, de nombreux inhibiteurs de l'activité RNase ont été développés, brevetés et publiés. Dans cette étude, le site actif du domaine RNase de la protéine IRE1 est choisi pour être ciblé par des composés xanthoniques.

V. CHAPITRE IV : Étude « *Docking* » *in silico* des xanthones du mangoustan avec IRE1 α /a

1. Introduction : les xanthoïdes et la voie UPR

Le mangoustanier, *Garcinia mangostana* L. (Figure 55.), de la famille des Clusiacées, est un arbre bisannuel à croissance lente qui atteint une hauteur de 6 à 25 m. Originaire de la péninsule malaise, le mangoustanier n'est connu qu'en culture dans les forêts tropicales du Sud-Est d'Asie (Myanmar, Thaïlande, Indonésie, Malaisie, Philippines, Sri Lanka, ...) pour son délicieux fruit, le mangoustan violet, désigné « reine des fruits » qui peut généralement être récolté pour la première fois après 10 ans (~500/arbre). C'est un fruit violet foncé, voir rougeâtre, avec une pulpe consommable blanche qui ne présente qu'environ 30% du fruit. Ayant une saveur douce un peu acide, il est transformé en bonbons froids, crèmes glacées, cocktails, salades de fruits et puddings^{134,162-168}. Traditionnellement, le mangoustan est connu et utilisé depuis des siècles pour traiter diverses pathologies telles que l'inflammation, la diarrhée, les douleurs abdominales, la fièvre, la dysenterie, l'eczéma, les infections des plaies et les troubles liés à la tuberculose et à l'ulcère chronique^{163-165,169}.

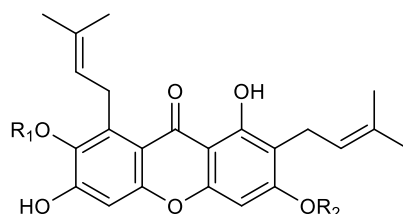


Figure 55. *Garcinia mangostana* L.¹⁶⁷.

Selon diverses études *in vivo* et *in vitro*, l'extrait du mangoustan possède une variété d'activités pharmacologiques, notamment antioxydantes, anti-allergiques, anti-inflammatoires, antidiabétiques, antibactériennes, antifongiques, antivirales, cardioprotectrices, ainsi qu'antitumorales^{162,164-166,169-172}. En effet, l'extrait du mangoustan induit une apoptose et diminue la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate dans un modèle *in vivo* de xénogreffe, sans générer de toxicité évidente. Ceci, en augmentant les taux de la caspase-3 et de la protéine pro-apoptotique BAX. En fait, l'extrait du mangoustan est un inducteur puissant du stress du RE qui augmente l'activité des protéines impliquées dans la voie UPR chez les cellules cancéreuses de la prostate, telles que PERK, CHOP, IRE1 α , XBP1, BiP et la caspase-4 ; tout en diminuant l'activité de ces mêmes protéines dans les cellules épithéliales de la prostate^{134,173}. De plus, il a démontré une diminution des lésions prénéoplasiques dans le côlon de rats¹⁶⁶. Tel que discuté précédemment (Cf. **IV.2.3**), les agents inducteurs du stress du RE peuvent être utilisés directement comme agents chimiothérapeutiques, seuls ou en combinaison avec d'autres anticancéreux. Ils provoquent la mort cellulaire en induisant des sorties cytotoxiques des voies de signalisation UPR⁷⁴.

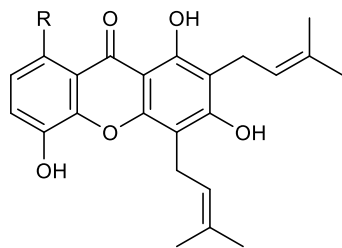
Le mangoustan est une source riche en polyphénols bioactifs, tels que les xanthones, les proanthocyanidines, les anthocyanines et les acides phénoliques. Parmi ceux-ci, les xanthones, des polyphénols tricycliques, sont les principaux métabolites secondaires extraits du péricarpe, de 6 à 10 mm^{134,163,169,170} (**Figure 55**). Ce sont des métabolites secondaires bioactifs obtenus à partir d'une famille de plantes supérieures, de champignons et de lichens. Environ 1 000 xanthones différentes ont été isolées de sources naturelles dont 70 xanthones sont présentes dans le fruit et son péricarpe, les feuilles, l'écorce, le duramen et les racines de *Garcinia mangostana* L.^{163,165,166,170,173,174}. L' α -**mangostin**, la première xanthone isolée, en 1855, est la xanthone la plus abondante (>35%) dans l'extrait du fruit. C'est une xanthone isoprénylée, qui a reçu le plus d'attention pour ses propriétés thérapeutiques, y compris les activités antifongiques, anticancéreuses, antibactériennes, antioxydantes, antipaludiques et anti-inflammatoires^{163,166,173,174}. L' α -mangostin inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans diverses lignées de cellules cancéreuses, telles que le cancer de la prostate^{134,166}, le cancer du côlon¹⁷⁵, la leucémie¹⁷⁶, le carcinome de la langue¹⁷⁷, etc... En fait, ce composé module les voies de signalisation intracellulaires, telles que SERCA et MAPK. De plus, il module l'activité des chaperonnes et des protéines impliquées dans la voie UPR^{134,175}.

En effet, l' α -mangostin inhibe la prolifération, diminue la viabilité, induit l'arrêt du cycle cellulaire au stade G1 et induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate. L'administration de l' α -mangostin augmente les marqueurs du stress réticulaire, tels que PERK, CHOP, IRE1 et XBP1⁵ dans les cellules cancéreuses, mais pas dans les cellules épithéliales de la prostate^{134,166,178}. De plus, l' α -mangostin augmente l'expression de la caspase-3 et celle du facteur pro-apoptotique BAX, tandis qu'il diminue celle du facteur anti-apoptotique BCL-2, entraînant finalement une apoptose dans les cellules du carcinome de la langue¹⁷⁷. Cependant, dans des essais *in vitro* de S-J Kim et ses collaborateurs en 2012, l' α -mangostin n'augmente pas le stress du RE, alors qu'il réduit le stress induit chimiquement par la thapsigargine¹⁷⁵. *In vivo*, l' α -mangostin active l'autophagie^{175,178}. L'activité, le mécanisme d'action et l'effet chez l'homme de l' α -mangostin et des autres xanthones du mangoustan demandent à être étudiés plus profondément.

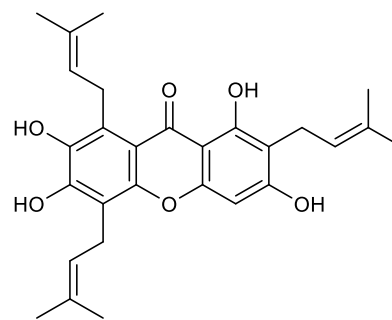


α -mangostin, R₁=CH₃, R₂=H
 β -mangostin, R₁=R₂=CH₃
 γ -mangostin, R₁=R₂=H

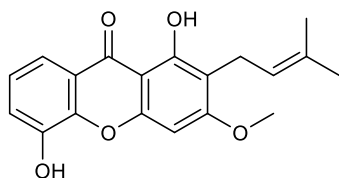
Les xanthones les plus étudiées sont l' α -, β - et γ -**mangostin**, la **garcinone E**, la **gartanine**, la **8-désoxygartanine**, la **cudraxanthone** et la **9-hydroxycalabaxanthone**. Ce sont les xanthones les plus abondantes dans le péricarpe^{134,165,170,173}. La gartanine, isolée à partir du péricarpe et du fruit entier de *Garcinia mangostana* L., montre une activité antitumorale contre diverses lignées de cellules cancéreuses, y compris le cancer du poumon à petites cellules, le cancer de la vessie et de la prostate¹⁶⁵. De plus, La garcinone E est rapportée pour ses effets apoptotiques, antimitotiques et antiprolifératifs dans le cas du cancer de l'ovaire. Elle induit le stress réticulaire, active la voie d'IRE1 α et augmente l'expression du facteur CHOP et de la chaperonne BiP¹⁷⁹.



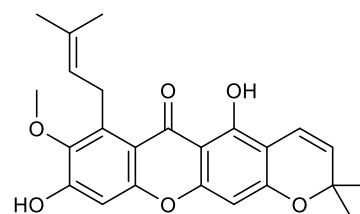
Gartanine, R=OH
8-désoxygartanine, R=H



Garcinone E



Cudraxanthone



9-hydroxycalabaxanthone

Ayant comme bagage les études sus-citées, traitant des xanthones et, afin de pouvoir valoriser sa chimiothèque de produits naturels et d'hémisynthèse en tant que modulateurs de la voie UPR, le laboratoire SONAS (Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux), en collaboration avec l'équipe FUNGISEM de l'IRHS (Institut de Recherche en Horticulture et Semences), teste ses molécules sur un modèle de *Saccharomyces Cerevisiae* dont Ire1p est l'unique effecteur de la voie UPR. Antérieurement, différentes classes chimiques ont été testées et, à ce jour, plusieurs hits potentiels ont été identifiés comme inhibiteurs de la voie UPR en agissant sur l'IRE1, dont des xanthones isolées du mangoustan, l' α -mangostin et la garcinone E. Nous nous intéressons donc, dans ce projet, à l'étude de l'amarrage et du mode d'action des xanthones principales du péricarpe du mangoustan, au sein de la protéine IRE1. Ce projet permettra de mieux comprendre le mode de liaison des molécules naturelles xanthoniques inhibitrices au sein du domaine RNase de l'IRE1.

2. Matériels & Méthodes

2.1. L'alignement des séquences d'acides aminés

Tout d'abord les séquences d'AA correspondant à la protéine IRE1 α chez *Homo sapiens* (UniProtKB:O75460), IRE1a chez *Mus musculus* (UniProtKB:Q9EQY0), Ire1p chez *Saccharomyces cerevisiae* (UniProtKB:P32361) et IRE1a chez *Arabidopsis thaliana* (UniProtKB:Q9C5S2) sont téléchargées en format FASTA à partir du site uniprot.org, via le portail UniProtKB⁵³. Ensuite, l'alignement de ces séquences est effectué grâce au

programme d'alignement de séquences multiples Clustal Ω , version 1.2.4, disponible en ligne *via* la plateforme de l'institut européen des bio-informatiques EMBL-EBI¹⁸⁰. Enfin, le résultat est téléchargé en format .jvl afin d'être visualisé dans le logiciel JalView, version 2¹⁸¹. (**Figure 54.**)

2.2. Le choix des structures cristallines 3D

Les structures cristallines en 3D du domaine cytosolique (kinase-RNase) d'IRE1 α chez *H. sapiens*, IRE1a chez *M. musculus* et Ire1p chez *S. cerevisiae* sont disponibles en ligne dans la banque de données des protéines (PDB-101, rcsb.org)¹⁸², avec une résolution allant de 6,6 Å à 2,14 Å. La structure 3D d'IRE1 chez *A. thaliana* n'est pas disponible.

2.2.1. Chez *Homo sapiens*

Espèce	PDB ID	Séquence	Résolution (Å)	R-Value free/R-Value Work	Référence
<i>Homo sapiens</i>	3P23	547-977	2,7	0,294/0,235	141
	4U6R	540-977	2,5	0,246/0,202	183
	4Z7H	562-977	2,9	0,225/0,200	143
	4Z7G	562-977	2,6	0,226/0,203	
	4YZD	562-966	3,102	0,273/0,232	142
	4YZC	562-966	2,494	0,289/0,247	
	4YZ9	562-966	2,463	0,283/0,235	
	5HGI	547-977	2,584	0,247/0,213	150
	6HX1	562-964	2,14	0,268/0,217	184
	6HV0	562-977	2,73	0,269/0,212	
6URC	574-977	2,2	0,274/0,220	185	

Tableau 2. Les structures cristallines du domaine cytosolique de la protéine IRE1 α humaine.

Parmi les structures présentées dans le **Tableau 2**, 3P23, 4U6R, 4Z7H, 4Z7G, 4YZD, 5HGI et 6HV0 sont co-cristallisées avec un ligand et possèdent une résolution $\geq 2,5$ Å. Elles seront écartées en amont. Afin d'affiner le choix parmi les quatre co-cristaux restants, les structures sont visualisées sur le site de la PDB (PDB-101, rcsb.org) avec le paramètre couleur « *By Density Fit* » et les autres paramètres par défaut.

La protéine 6HX1 montre la meilleure résolution (2,14 Å) et la meilleure densité électronique de la chaîne latérale au niveau de la poche de liaison du site actif de la RNase. Ces paramètres sont cruciaux pour le choix de la protéine. Meilleure est la qualité de ces paramètres, meilleure sera la prédiction de l'orientation et la conformation du

complexe ligand-protéine. La protéine 6HX1 sera retenue pour l'étude *in silico*. Ci-dessous la représentation la structure 3D de la protéine 6HX1 coloriée selon la densité électronique, ainsi que le résumé des valeurs de validation et de qualité de la structure (**Figure 56.**).

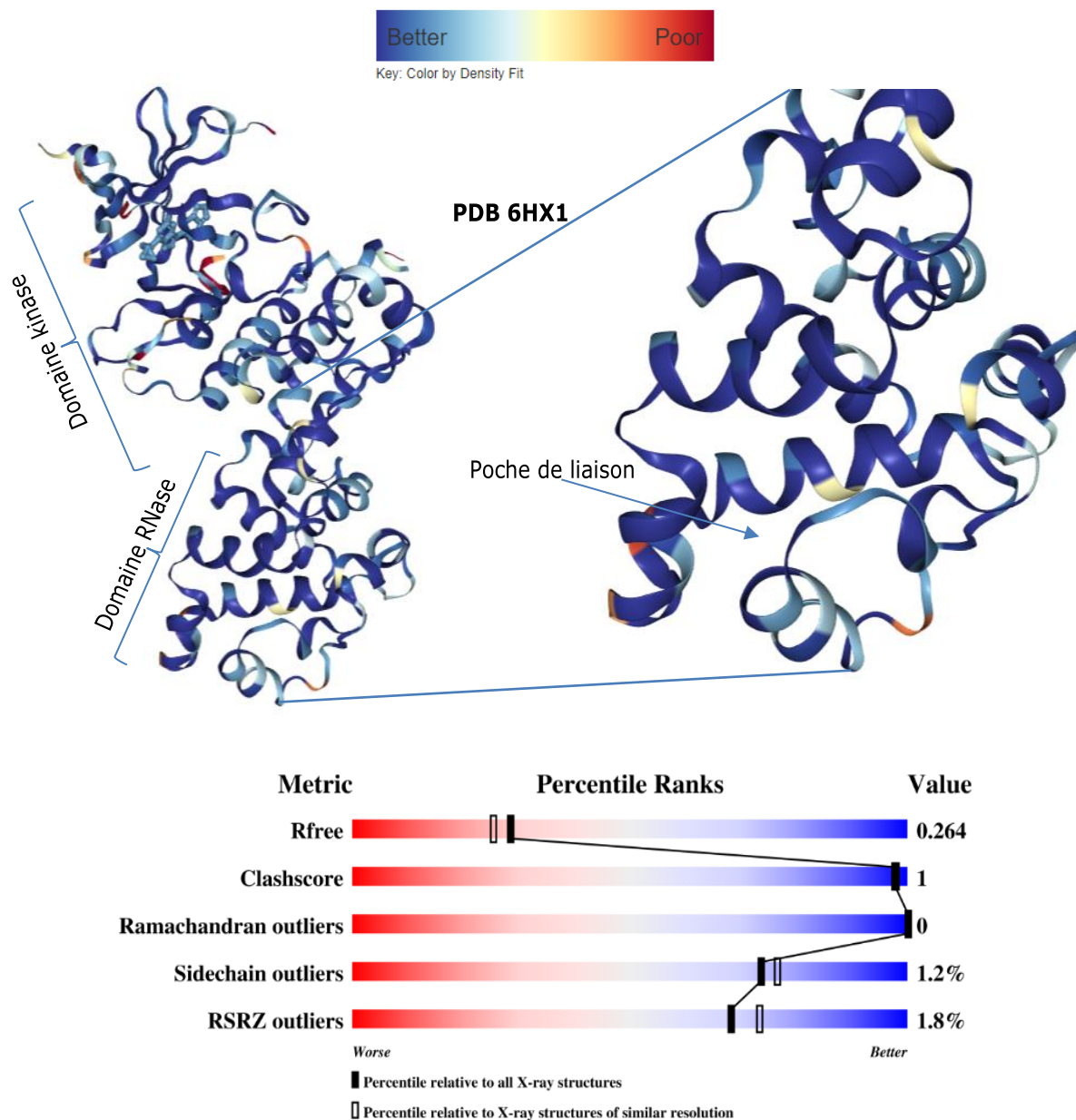


Figure 56. La structure 3D de la protéine 6HX1 et le résumé des valeurs de la résolution.

Les valeurs présentées dans le graphique ci-dessus sont par rapport à des structures d'une résolution similaire dans l'archive de la PDB. Il est préférable que tous les curseurs se trouvent à droite dans la zone bleue. Le **Tableau 3** adapté du site de la PDB (PDB-101, rcsb.org) vise à expliquer brièvement les termes employés dans le graphique des curseurs :

R_{free}/R	C'est une mesure de l'ajustement du modèle à un petit sous-ensemble de données expérimentales. Des valeurs plus faibles et des différences plus petites entre les deux statistiques sont généralement meilleures. R_{free} doit être supérieur à R car il est calculé en utilisant des réflexions non utilisées dans le raffinement.
Clashscore	Ce score fournit des détails sur les contacts trop étroits entre des paires d'atomes dans le modèle qui sont inhabituellement proches les uns des autres. Ce score est défini comme le nombre de chocs pour 1000 atomes (y compris les hydrogènes).
Ramachandran outliers	Un résidu est considéré comme une valeur aberrante du tracé de Ramachandran si la combinaison de ses angles de torsion ϕ et ψ (décrivant la conformation d'un squelette protéique) est inhabituelle. Ce score pour une entrée est calculé comme le pourcentage de valeurs aberrantes Ramachandran par rapport au nombre total de résidus dans l'entrée pour lesquels l'évaluation des valeurs aberrantes est disponible.
Sidechain outliers	Les chaînes latérales des protéines adoptent principalement certaines (combinaisons de) valeurs d'angle de torsion préférées (appelées rotamères ou conformères rotamériques). Une conformation de la chaîne latérale d'un résidu est considérée comme une valeur aberrante si son ensemble d'angles de torsion n'est pas similaire à une combinaison préférée. Le score des valeurs aberrantes de la chaîne latérale est calculé comme le pourcentage de résidus avec une conformation de chaîne latérale inhabituelle par rapport au nombre total de résidus pour lesquels l'évaluation est disponible.
RSRZ outliers	La valeur R dans l'espace réel (RSR) est une mesure de la qualité de l'ajustement entre une partie d'un résidu et les données dans l'espace réel. Le RSR Z-score (RSRZ) est une normalisation du RSR spécifique à un type de résidu et à un bac de résolution. RSRZ est calculé uniquement pour les acides aminés et nucléotides standard dans les chaînes de protéines, d'ADN et d'ARN. Un résidu est considéré comme une valeur aberrante RSRZ si sa valeur RSRZ est supérieure à 2. Le score des valeurs aberrantes RSRZ tel qu'indiqué dans le graphique est calculé comme le pourcentage de valeurs aberrantes RSRZ par rapport au nombre total de résidus pour lesquels RSRZ a été calculé.

Tableau 3. L'explication des termes de la PDB.

2.2.2. Chez *Mus musculus*

Espèce	PDB ID	Séquence	Résolution (Å)	R-Value free/ R-Value Work	Inhibiteur RNase	Référence
<i>Mus musculus</i>	4PL3	550-977	2,9	0,234/0,201	MKC9989	138
	4PL4	550-977	3	0,276/0,210	OICR464	
	4PL5	550-977	3,4	0,285/0,222	OICR573	

Tableau 4. Les structures cristallines de la protéine IRE1a murine.

Ces trois co-cristaux représentent le domaine cytosolique entre la Pro550 et la Leu977, contenant le domaine kinase et le domaine RNase (**Tableau 4.**). Ces protéines sont les seules, disponibles sur la PDB, co-cristallisées avec des inhibiteurs de la RNase (MKC9989, OICR464 et OICR753). Bien que la protéine 4PL3 soit co-cristallisée avec l'ADP et l'ion Mg^{2+} en plus de l'inhibiteur MKC9989, la structure 4PL3 présente la meilleure résolution et les valeurs R les plus basses. De plus, elle présente la meilleure densité

électronique au niveau de la poche de liaison du domaine de la RNase. Elle est donc retenue pour l'amarrage des inhibiteurs RNase. Ci-dessous la structure 3D de la protéine 4PL3 colorée selon la densité électronique ainsi que les valeurs de résolution de la structure (**Figure 57.**).

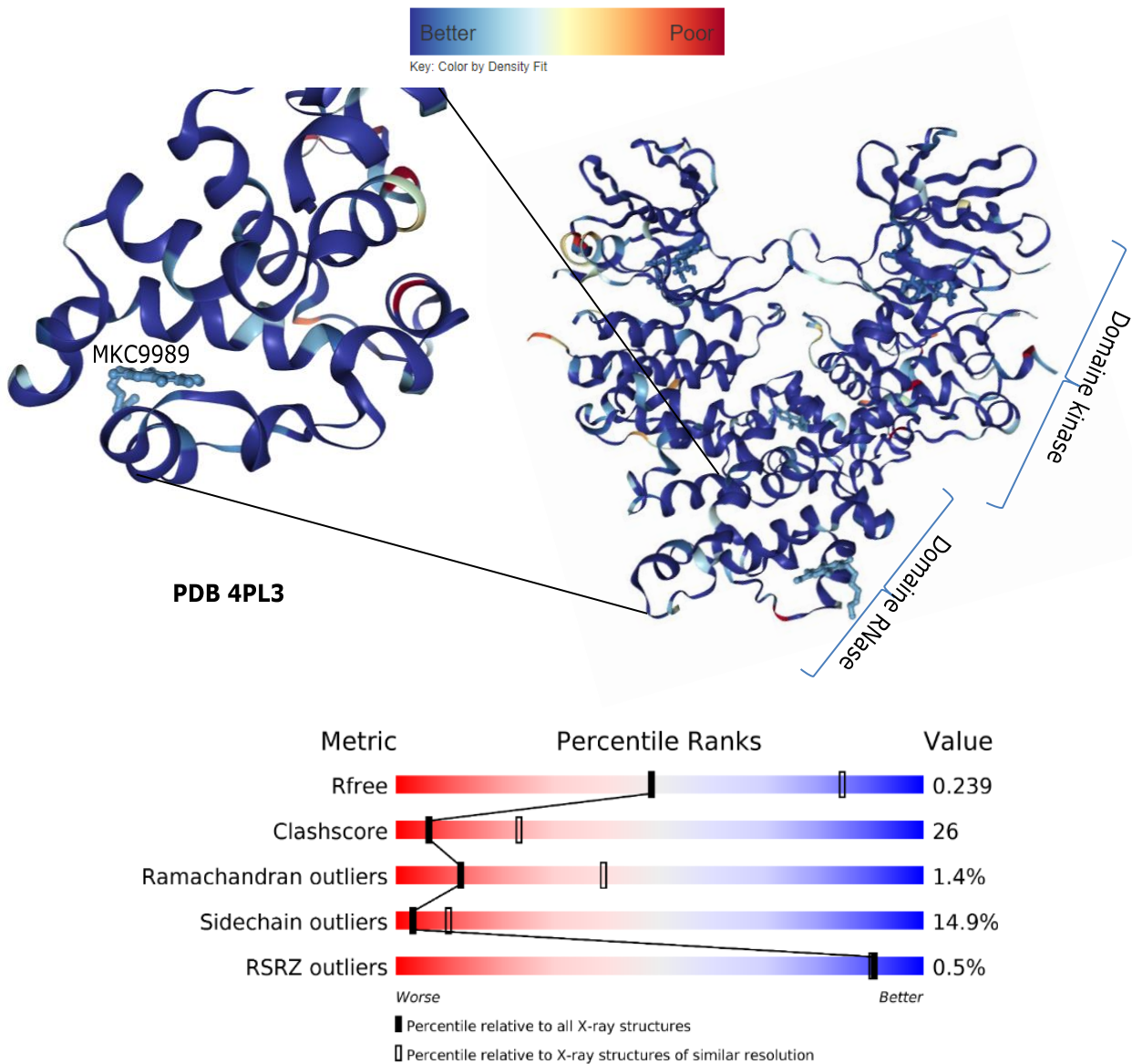


Figure 57. La structure 3D de la protéine 4PL3 et le résumé des valeurs de la résolution.

Malgré les scores médiocres pour certaines valeurs, 4PL3 est le cristal ayant la meilleure qualité chez la souris, pour cette étude.

2.2.3. Chez *Saccharomyces cerevisiae*

Espèce	PDB ID	Séquence	Résolution (Å)	R-Value free/R-Value Work	Référence
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2RIO	Partie luminale, 658-804, 907-1115	2,4	0,266/0,222	139
	3FBV	641-1115	3,2	0,283/0,235	144
	3LJ0	658-1115	3,2	0,224/0,217	159
	3LJ1	658-1115	3,33	0,284/0,263	
	3LJ2	658-1115	3,33	0,293/0,254	
	3SDM	641-1115	6,6	0,317/0,286	186
	3SDJ	641-1115	3,65	0,287/0,248	

Tableau 5. Les structures cristallines du domaine cytosolique de la protéine IRE1p de la levure.

Au regard du nombre limité de valeurs biologiques des tests effectués chez la levure et en raison de la médiocrité de la résolution de la structure protéique au niveau du domaine RNase (**Tableau 5.**), l'étude de l'amarrage des xanthones avec la protéine Ire1p sera abandonnée pour le reste du projet. Ci-dessous la représentation 3D des domaines RNase de deux protéines, celle de 3LJ0 (à gauche) et celle de 2RIO (à droite), coloriées selon la densité électronique. Les poches de liaison du site actif de la RNase montrent une qualité médiocre de la densité électronique détectée au niveau des chaînes latérales. De plus, certaines structures, telles que 2RIO, nécessitent une optimisation et une modélisation de la structure de la chaîne latérale qui manque dans le co-cristal disponible en ligne (**Figure 58.**).

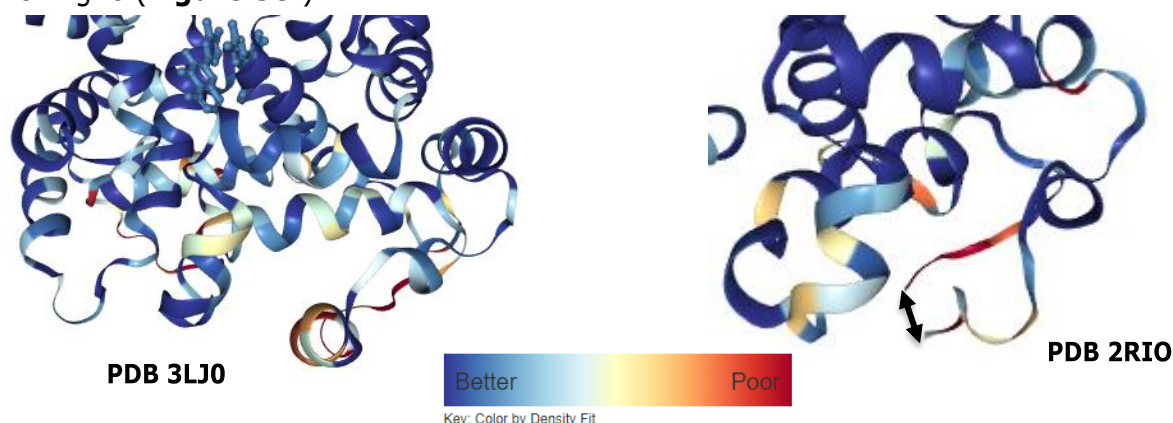


Figure 58. La structure 3D du domaine RNase des protéines 3LJ0 et 2RIO.

2.3. La préparation des ligands

Toutes les structures 2D des ligands sont dessinées à l'aide du logiciel ChemDraw[®] (PerkinElmer Informatics), version 16. Puis, le fichier contenant chaque molécule est sauvegardé en format .sdf. Ensuite, la structure d'énergie minimale de chaque molécule est obtenue avec le champs de force MMFF94¹⁸⁷, en utilisant la fonction « minimize

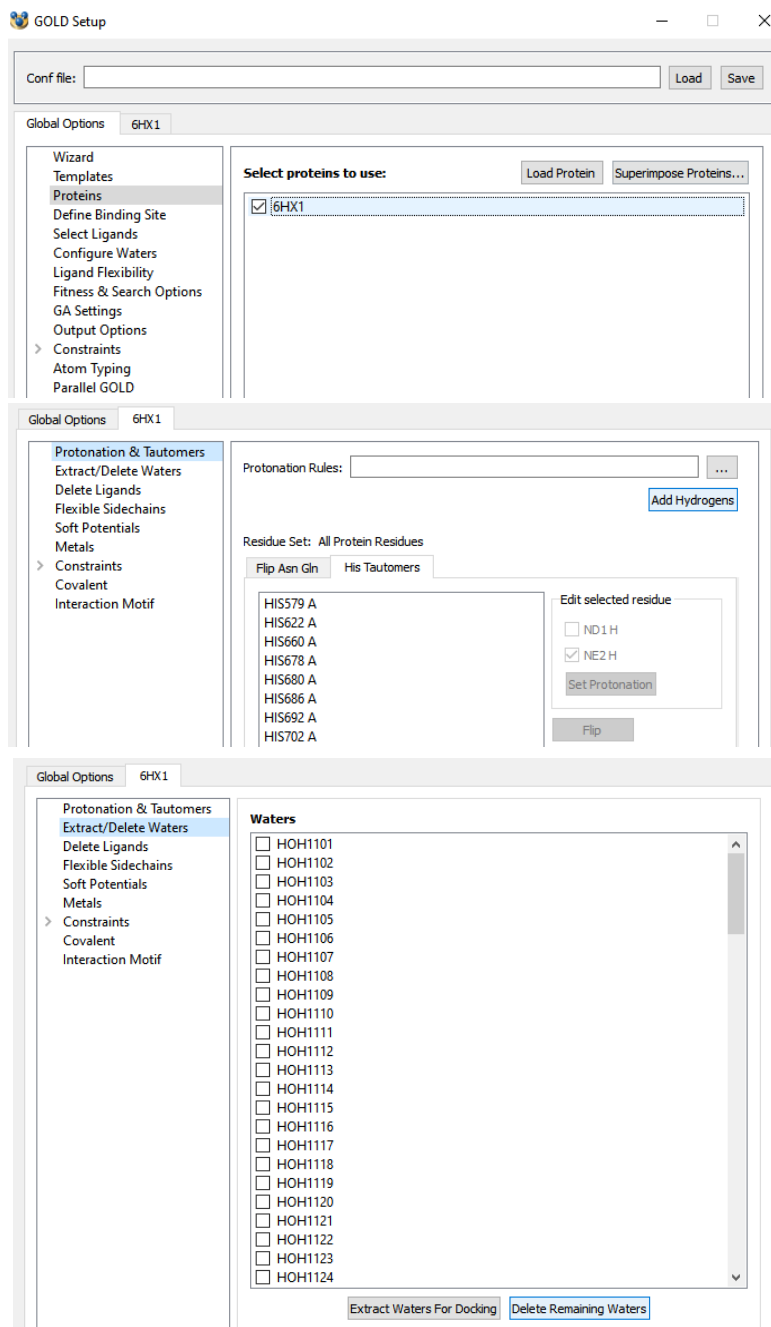
MMFF94 energy » du logiciel LigandScout[®] (Inte:Ligand GmbH), version 4.3. Puis le fichier est sauvegardé sous le format .mol2. Dans le cas spécifique des inhibiteurs aldéhydes, la fonction aldéhyde est substituée par $-CH^+-N^{2-}$ afin de forcer la formation d'une base de Schiff avec la Lys907. Le modèle où la liaison covalente n'est pas forcée est étudié aussi.

2.4. L'amarrage « Docking » des ligands sur le logiciel GOLD[®]

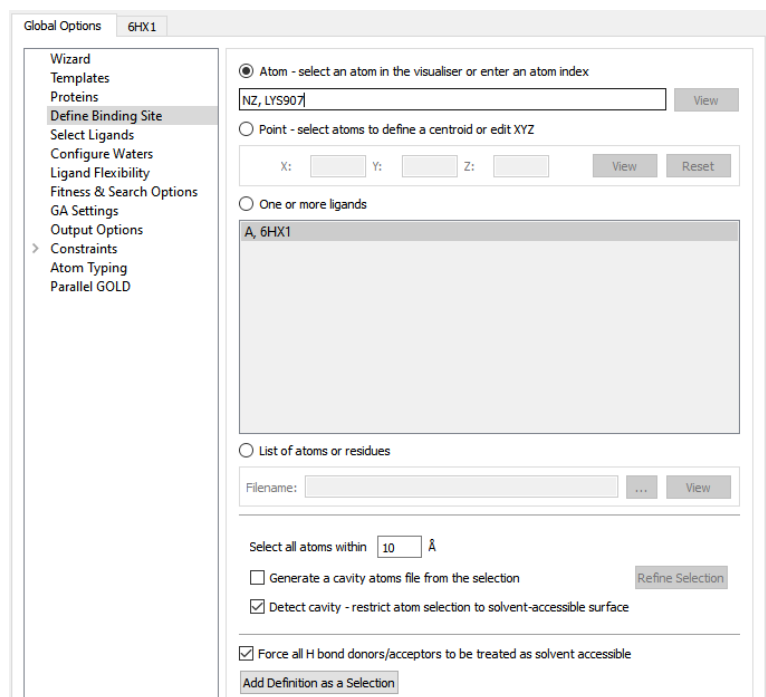
La technique du « Docking » est une approche informatique qui permet de prédire, en se basant sur la structure tridimensionnelle d'une protéine et d'un ligand, les interactions les plus probables du ligand au niveau du site actif de la protéine. C'est une prédiction de la position, de l'orientation et de la conformation accessibles au ligand pour interagir avec la cible protéique. Le logiciel GOLD[®] (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*)¹⁸⁸, version 5.6.3, disponible au laboratoire SONAS est utilisé à cette fin. C'est un programme d'amarrage de ligand automatisé qui utilise un algorithme génétique pour explorer la gamme complète de flexibilité des conformations du ligand avec la flexibilité partielle des chaînes latérales de la protéine. C'est une approche « clé /serrure ». Les sites de liaison aux protéines présentent une reconnaissance hautement sélective des petites molécules organiques, dans la mesure où l'évolution les a équipés d'une « serrure » tridimensionnelle complexe dans laquelle seules des « clés » spécifiques pourront s'insérer. Les interactions attendues sont des propositions à la suite de l'observation des répétitivités des interactions entre les molécules fortement actives et le site actif de la protéine (récepteur). Après l'application de ~100 000 opérations génétiques, l'algorithme présente l'amarrage avec les scores les plus élevés. Les propositions d'interactions les plus probables sont classées avec un score théorique appelé « *PLP.Fitness score* », d'après le calcul fourni par l'algorithme génétique. Naturellement, le fitness score va être différent d'un amarrage à l'autre, tout en restant dans le même ordre de grandeur, même en appliquant des contraintes et des paramètres identiques à chaque fois¹⁸⁸.

Un large éventail de contraintes peut être utilisé pour garantir, par exemple, que les interactions clés des liaisons H soient remplies, ou pour biaiser les résultats d'amarrage vers un motif de liaison connu. Dans le cas des aldéhydes, par exemple, si la liaison covalente est forcée dans les paramètres de GOLD[®], le fitness score doublera au minimum de valeur, montrant une très grande affinité et probabilité de la formation de la base de Schiff.

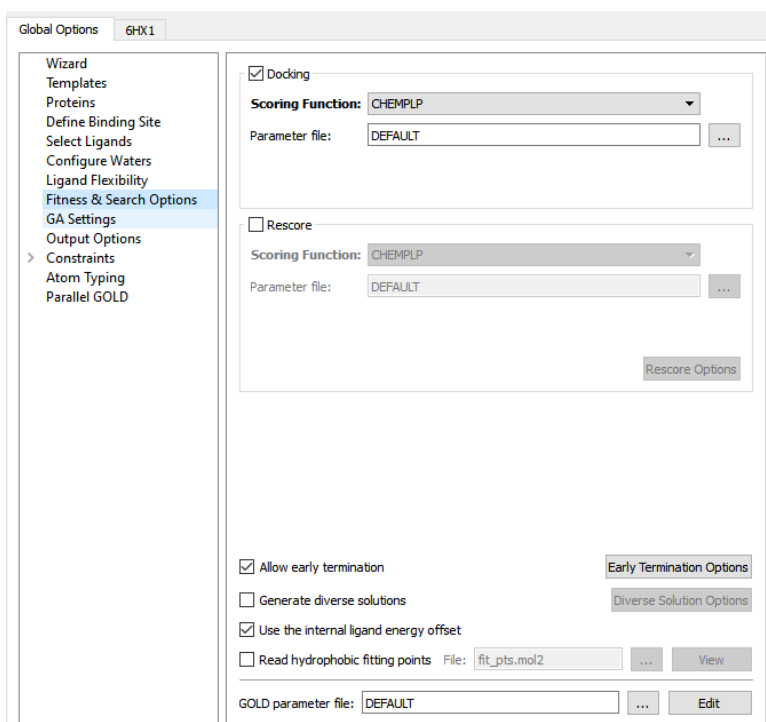
Afin de procéder à l'amarrage, tout d'abord les hydrogènes sont ajoutés à la structure de la protéine choisie à partir de la PDB, en format .pdb. Puis, les résidus d'eau sont supprimés, selon leur existence dans le co-cristal.



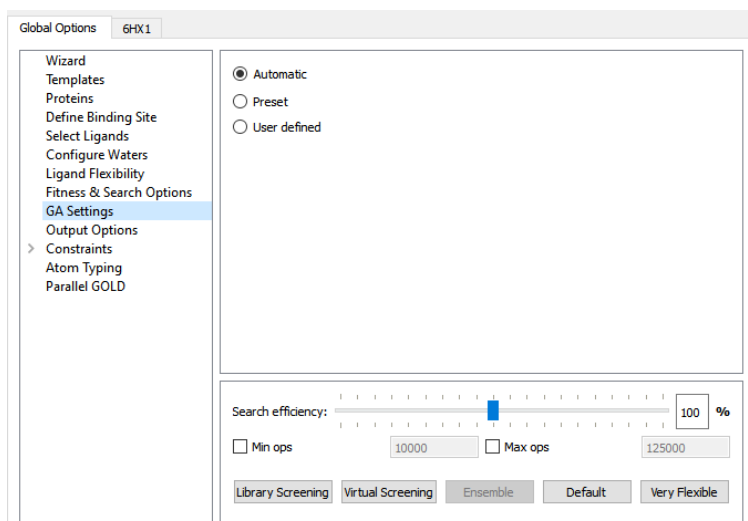
Le site de liaison sélectionné est la poche de liaison au niveau du domaine RNase, à une distance de 10 Å autour de l'amine du résidu Lys907 (Cf. **IV.2.7.3**). Dans le cas de la protéine 4PL3 co-cristallisée avec l'inhibiteur de la RNase, le ligand est extrait de la structure afin de libérer la poche de liaison au niveau du domaine RNase.



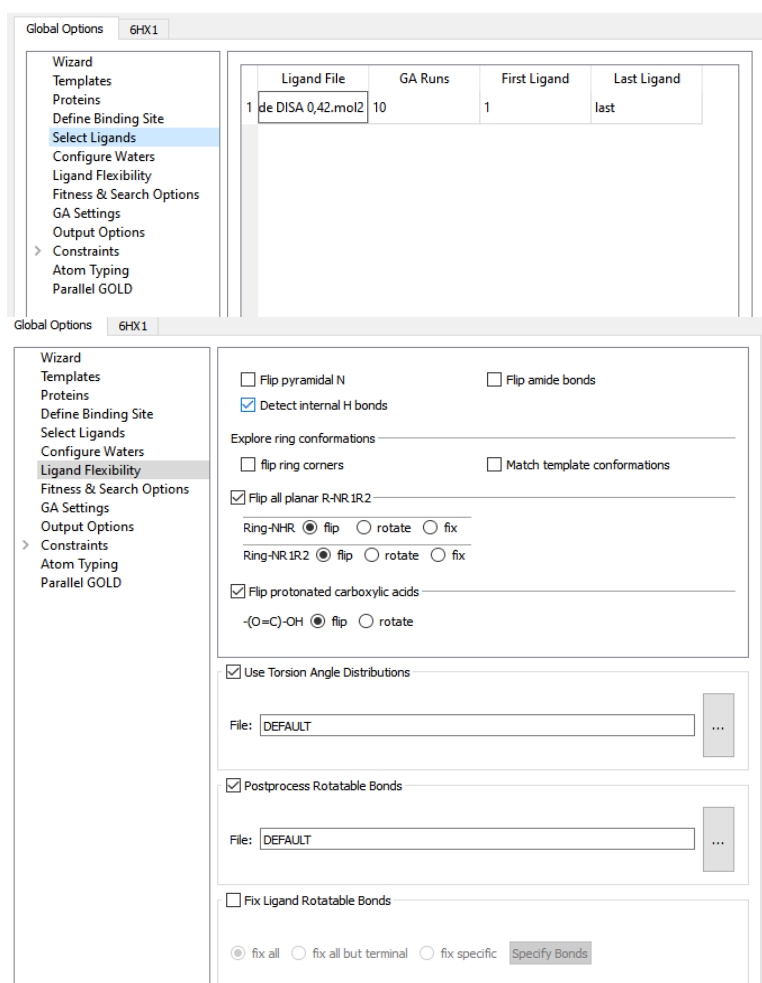
La configuration du mode calcul est « *chemscore_kinase* ». La fonction de score choisie est « *CHEMPLP* ».



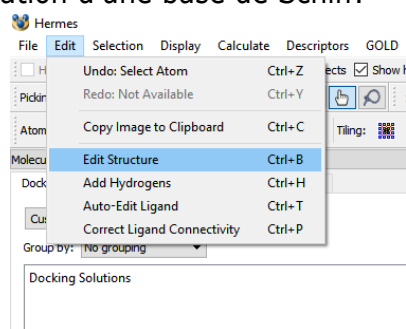
La vitesse automatique est choisie pour l'algorithme de recherche.



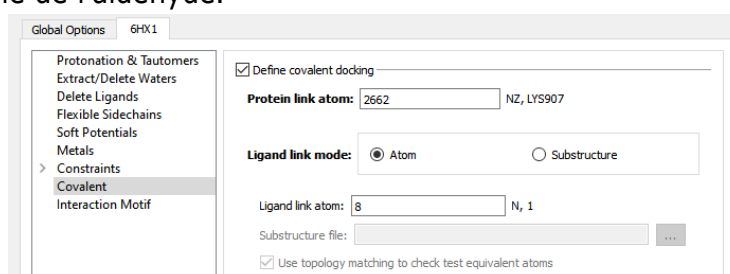
Ensuite le ligand préparé précédemment en format .mol2 est sélectionné pour l'amarrage et dans les paramètres de la flexibilité du ligand, l'option de détection des liaisons hydrogène est activée.



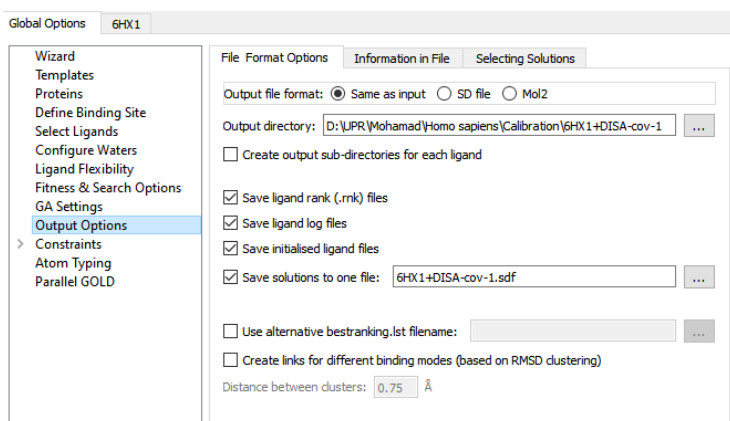
Dans le cas de l'amarrage d'un aldéhyde, un hydrogène est supprimé au niveau de la Lys907 afin de forcer la formation d'une base de Schiff.



Puis la contrainte de la liaison covalente est définie dans les paramètres de l'amarrage en sélectionnant l'azote de la Lys907 et l'azote de la fonction $-CH^+-N^{2-}$ substituant la fonction carbonyle de l'aldéhyde.



Le résultat est sauvegardé sous le format .sdf, afin d'être visualisé dans le logiciel LigandScout®.



Certaines étapes de ce protocole d'amarrage sont susceptibles de changer dans des prochaines mises à jours du logiciel...

2.5. L'étude des interactions ligand-protéine

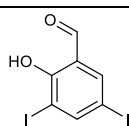
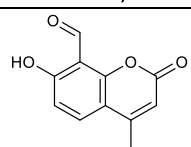
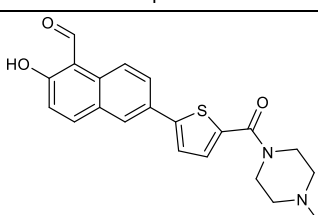
Le logiciel LigandScout® est utilisé afin de visualiser en haute qualité l'interaction ligand-protéine en 3D, ainsi que la génération des pharmacophores 2D et 3D. Le modèle de pharmacophore 3D basé sur les interactions chimiques importantes de la structure du complexe IRE1-xanthone est généré à l'aide de LigandScout®. Le criblage virtuel (screening) des xanthonés dans ce pharmacophore 3D génère un « *Pharmacophore Fit*

Score » qui mesure l'ajustement géométrique des caractéristiques de la molécule au modèle de pharmacophore 3D, à titre de comparaison. Un fit score plus élevé indique un meilleur ajustement au modèle et un meilleur alignement géométrique des caractéristiques du composé sur le pharmacophore 3D¹⁸⁹. Un minimum de trois interactions est exigé pendant le criblage effectué de la librairie des huit xanthones du mangoustan.

3. Résultats & Discussion

3.1. Validation du site de liaison

Dans cette partie, l'amarrage de quelques inhibiteurs références de la RNase, disponibles dans la littérature (Cf. **IV.2.7.2**), est effectuée avec les deux protéines 6HX1 et 4PL3, afin de valider la poche de liaison de ces inhibiteurs avec le domaine RNase et d'avoir des valeurs de références (**Tableau 6.**) auxquelles comparer les scores générés durant l'amarrage des xanthones. Deux cas de figures sont étudié : avec ou sans liaison covalente. Les scores présentés dans le tableau ci-dessous sont générés en résultats de l'amarrage de ces inhibiteurs sans fixer la contrainte de la liaison covalente. Ce sont des valeurs comparables de la même grandeur que les scores générés par les xanthones (Cf. **V.3.2**). En revanche, les Fitness scores ont tendance à doubler dans le cas où la liaison covalente est fixée dans les paramètres du logiciel GOLD[®].

Inhibiteur	PLP.Fitness Score	
	6HX1	4PL3
 3,5-diiodosalicylaldéhyde	29,5	38,9
 4μ8c	29,2	51,9
 MKC3946	49,2	60,6

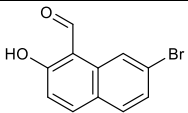
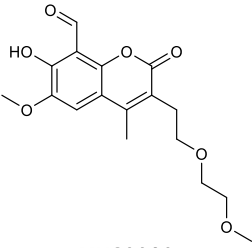
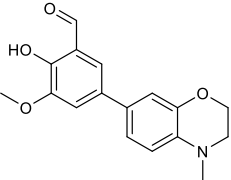
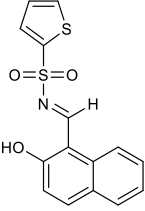
 MKC3987	51,4	51,0
 MKC9989	29,2	63,3
 OICR464	38,7	60,1
 STF083010	45,9	58,8

Tableau 6. Les scores PLP.Fitness (GOLD[®]) des inhibiteurs références de la RNase.

Ci-dessous sont présentés les poses de l'inhibiteur de la RNase, le **3,5-diiodosalicylaldéhyde (DISA)** avec la protéine 6HX1 (**Figure 59.**). Dans le cas de l'amarrage en fixant la contrainte de la liaison covalente, la base de Schiff se produit en orientant la fonction aldéhyde du DISA vers le résidu Lys907. Cependant l'amarrage du même inhibiteur sans fixer la contrainte de la liaison covalente montre une orientation de la fonction aldéhyde de l'inhibiteur DISA vers le résidu Lys888 pour former une liaison H avec l'ammonium de ce résidu. Les interactions ligand-protéine sont donc modifiées quand on fixe la contrainte de la liaison covalente qui influence aussi sur le PLP.Fitness Score en l'augmentant presque du double.

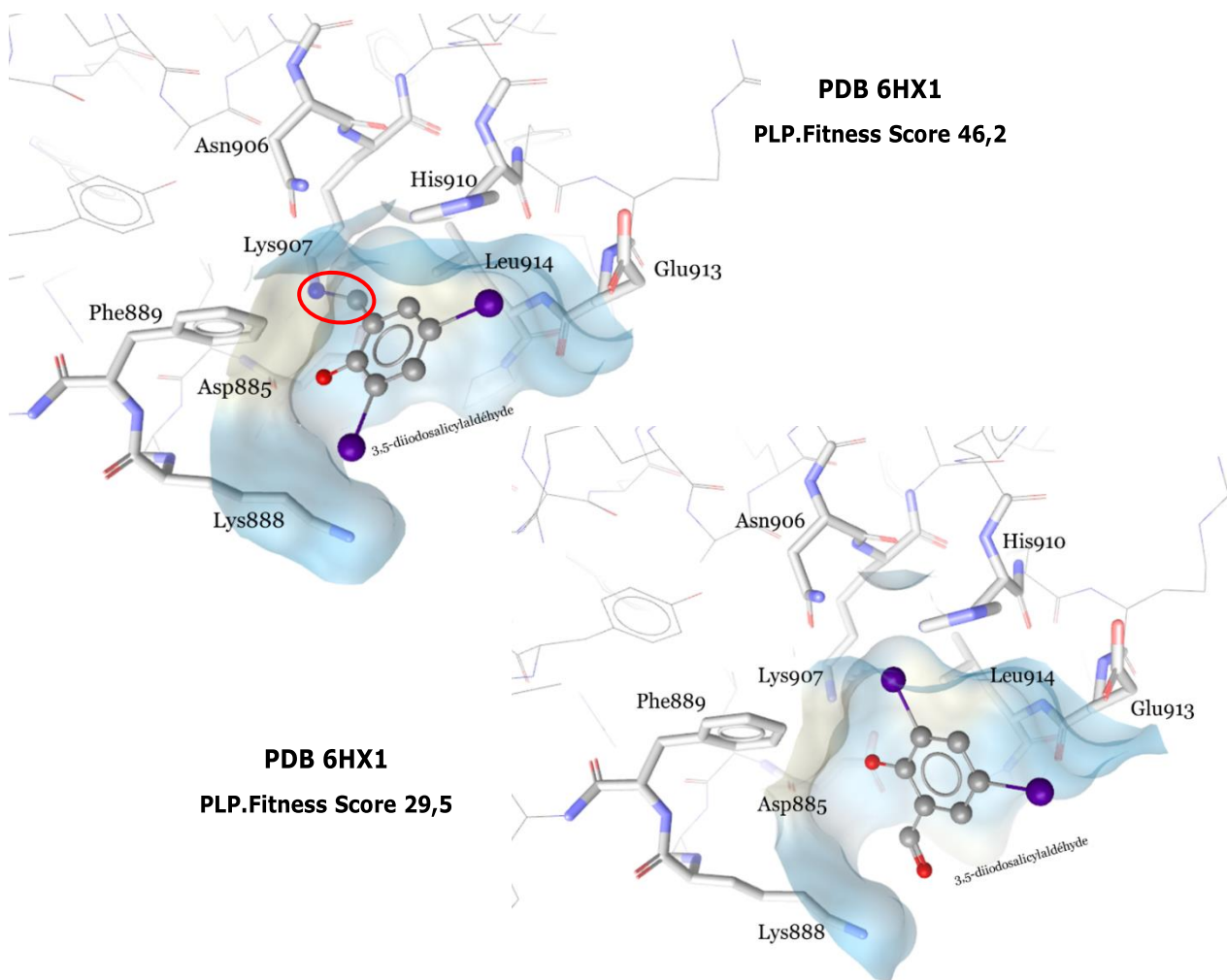


Figure 59. Les poses de l'inhibiteur DISA avec 6HX1, avec ou sans liaison covalente.

Le site de liaison des inhibiteurs connus de la RNase à la protéine 6HX1 est défini par les résidus Asp885, Lys888, Phe889, Asn906, Lys907, His910, Glu913 et Leu914 (**Figure 60.**).

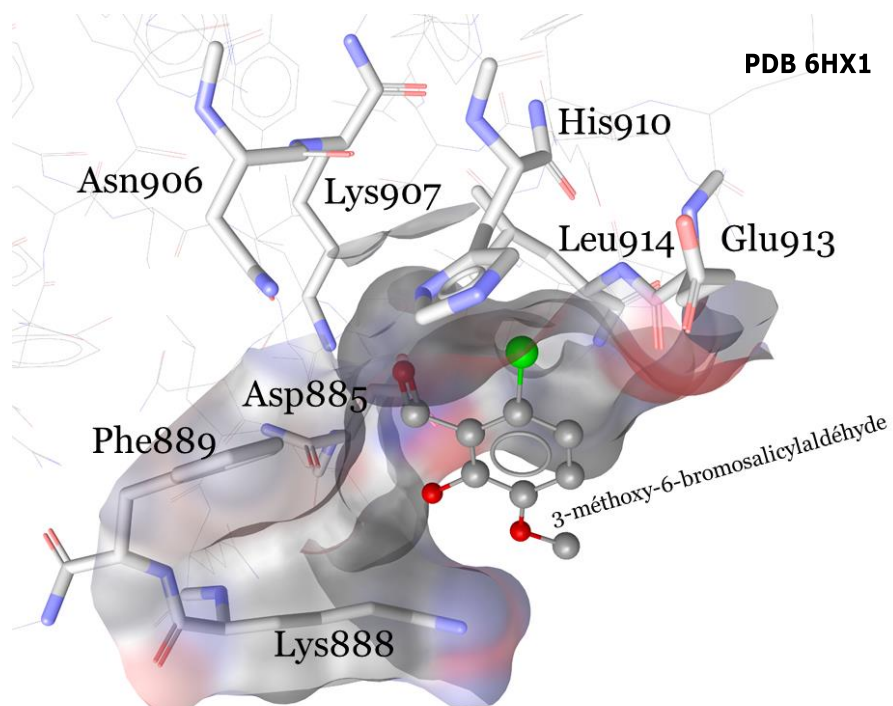


Figure 60. Docking du 3-méthoxy-6-bromosalicylaldehyde dans le site actif d'IRE1 α .

Celui de la protéine 4PL3 est défini par les résidus Phe889, Thr891, Tyr892, Asn906, Lys907, His910, Glu913 et Leu914 (**Figure 61.**).

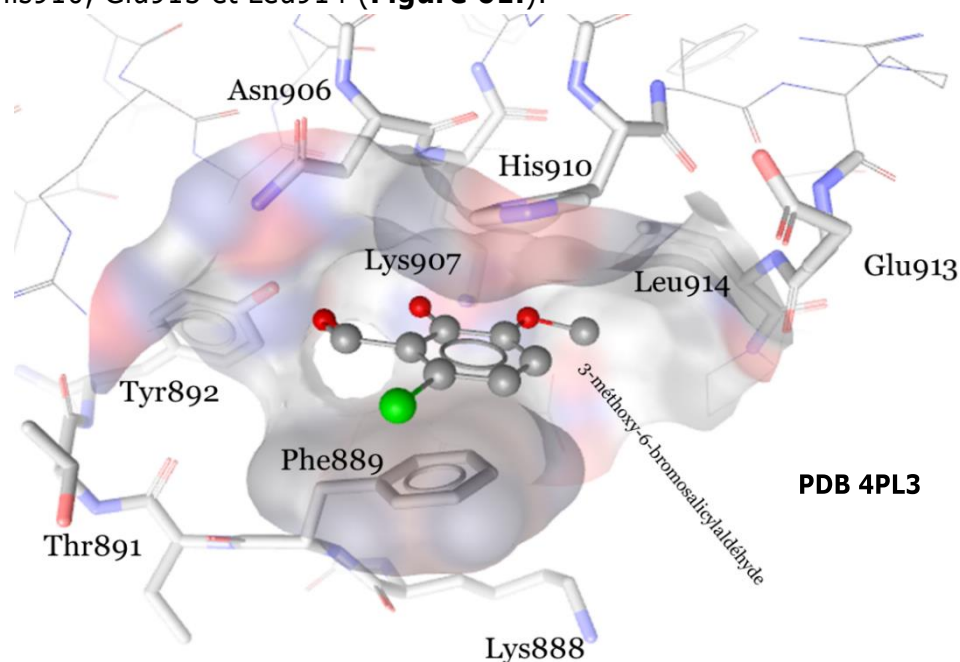
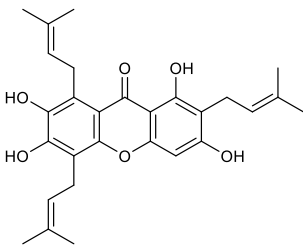
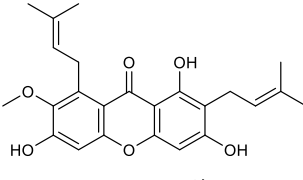


Figure 61. Docking du 3-méthoxy-6-bromosalicylaldéhyde dans le domaine RNase d'IRE1a.

3.2. Les résultats de l'amarrage des xanthones avec IRE1 α /a

L'amarrage des xanthones du péricarpe du mangoustan est réalisé avec le logiciel GOLD[®]. Les résultats du docking de ces composés sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 7.**). Sachant que le modèle murin est inévitable dans le développement de nouveaux actifs chez l'humain (PBD 6HX1), l'amarrage des xanthones du péricarpe du mangoustan est aussi réalisé avec la protéine 4PL3 murine.

Ligand	PLP.Fitness Score	
	6HX1	4PL3
 Garcinone E	64,4	80,3
 α -mangostin	55,8	68,1

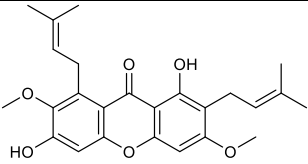
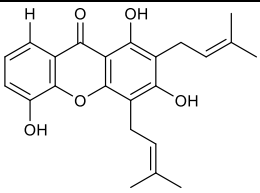
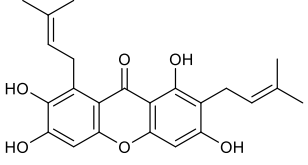
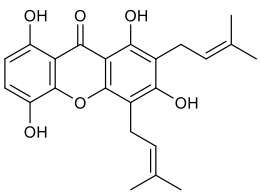
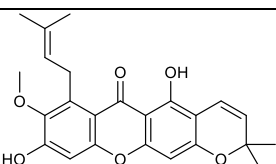
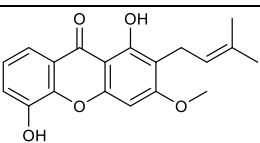
 <p>β-mangostin</p>	54,7	62,8
 <p>8-désoxygartanine</p>	53,7	65,5
 <p>γ-mangostin</p>	53,5	72,5
 <p>Gartanine</p>	52,2	69,1
 <p>9-hydroxycalabaxanthone</p>	51,3	57,6
 <p>Cudraxanthone</p>	46,0	63,6

Tableau 7. Les scores PLP.Fitness (GOLD[®]) des xanthones du mangoustan.

La numérotation suivante des composants du squelette xanthonique sera utilisée pour l'étude des interactions ligand-protéine des xanthones du mangoustan avec le domaine RNase de la protéine IRE1 α (PDB 6HX1) et IRE1a (PDB 4PL3) (**Figure 62.**).

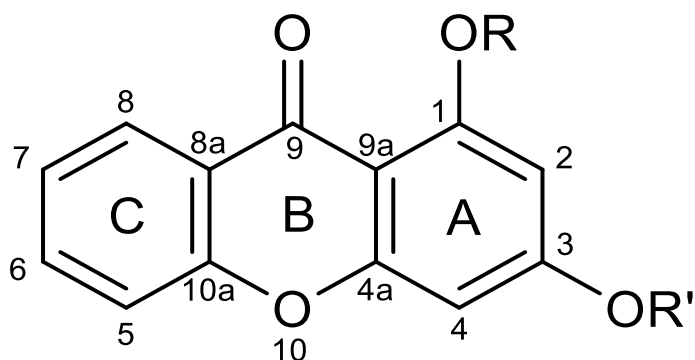


Figure 62. La numérotation du squelette xanthonique.

3.2.1. Garcinone E

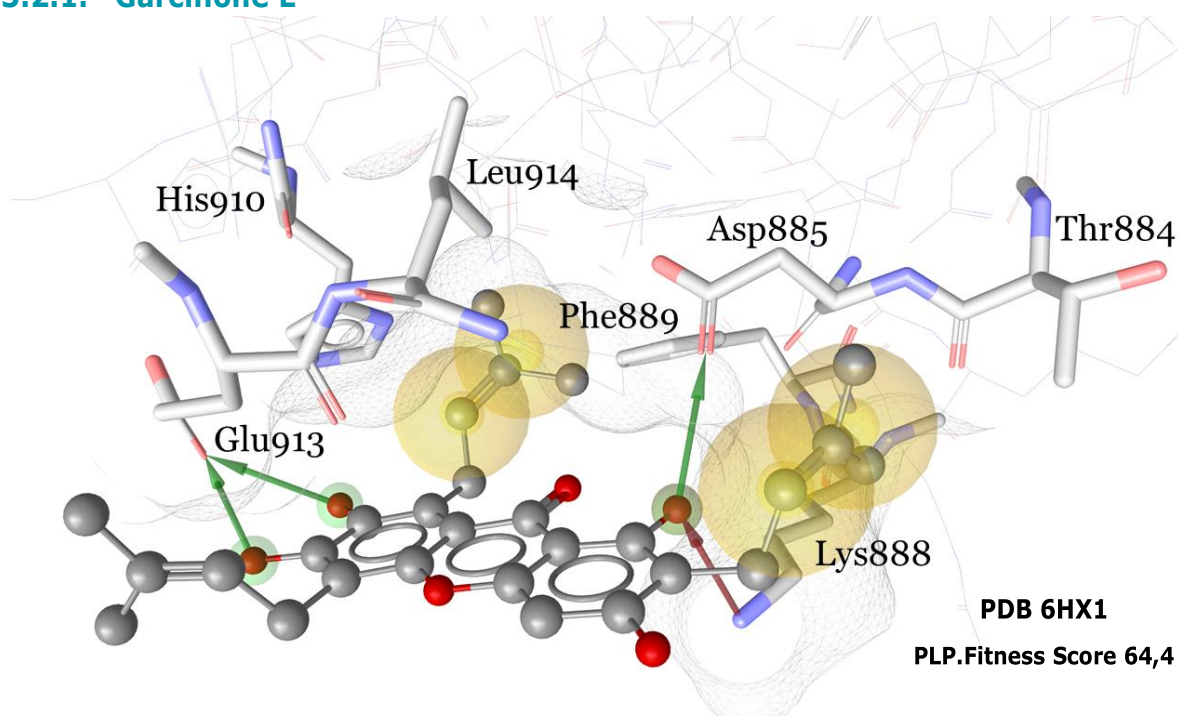


Figure 63. Docking de la garcinone E dans le domaine RNase d'IRE1 α .

La garcinone E présente le meilleur fitness score dans le docking effectué dans les deux protéines. La meilleure pose suggérée par le logiciel GOLD[®] montre deux liaisons hydrogènes (LH) entre le carbonyle de l'acide terminal du Glu913 comme accepteur (ALH) et les deux phénols du cycle C. L'isoprényle en position 8 montre une interaction de type Van der Waals (VDW) avec le cycle aromatique du Phe889, ainsi que la chaîne latérale et principale des résidus His910 et Leu914. L'hydroxyle en position 1 du cycle A est engagé dans deux LH. D'un côté en tant que donneur de liaison H (DLH) avec le carbonyle de la fonction acide de l'Asp885 et d'un autre côté, en tant qu'ALH, de la part de l'ammonium de la Lys888. Enfin, l'isoprényle sur la position 2 du cycle A interagit *via* une liaison de type VDW avec le méthyle de la chaîne principale de la Thr884.

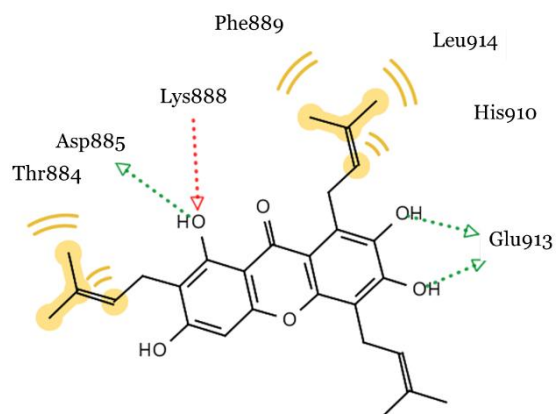


Figure 64. Le pharmacophore 2D des interactions garcinone E-IRE1 α .

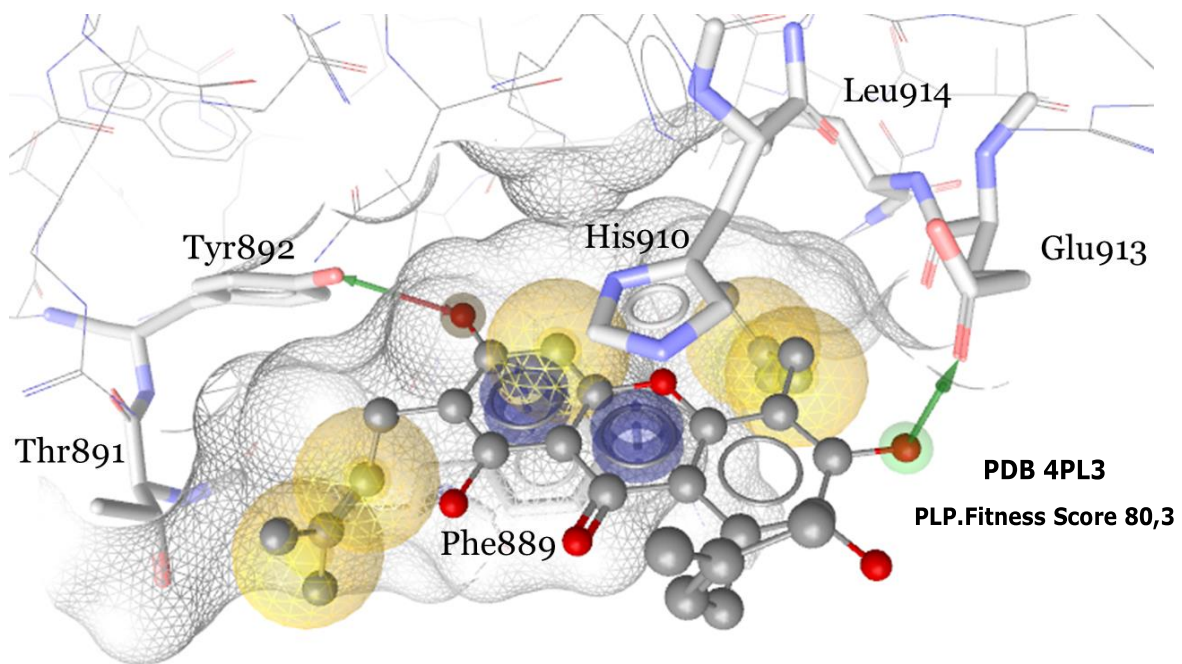


Figure 65. Docking de la garcinone E dans le domaine RNase d'IRE1a.

L'interaction de la garcinone E avec la protéine 4PL3 montre une LH entre le carbonyle de l'acide terminal de la Glu913 comme ALH et l'hydroxyle en position 6 du cycle C. L'isoprényle en position 5 montre une interaction de type VDW avec le cycle aromatique de la Phe889 et de la chaîne principale de la Leu914. L'isoprényle en position 2 interagit avec la Thr891 *via* une liaison VDW. L'hydroxyle en position 3 du cycle A est engagé dans une LH en tant que ALH et DLH avec le phénol de la Tyr892. Enfin, des interactions de type π - π stacking se forment entre le cycle A et le résidu Phe889 d'un côté et entre le cycle B et le résidu His910 de l'autre côté. Contrairement à celle chez l'Homme, la conformation de la poche de liaison chez la souris permet l'interaction de type π - π stacking entre les cycles du squelette xanthonique et les cycles des résidus Phe889 et His910.

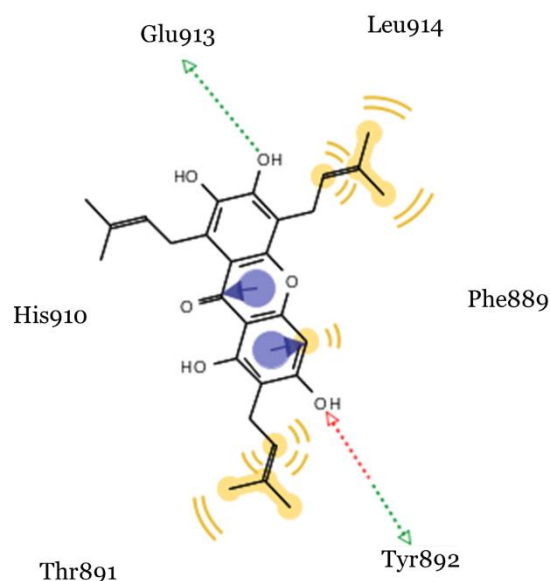


Figure 66. Le pharmacophore 2D des interactions garcinone E-IRE1a.

3.2.2. α -mangostin

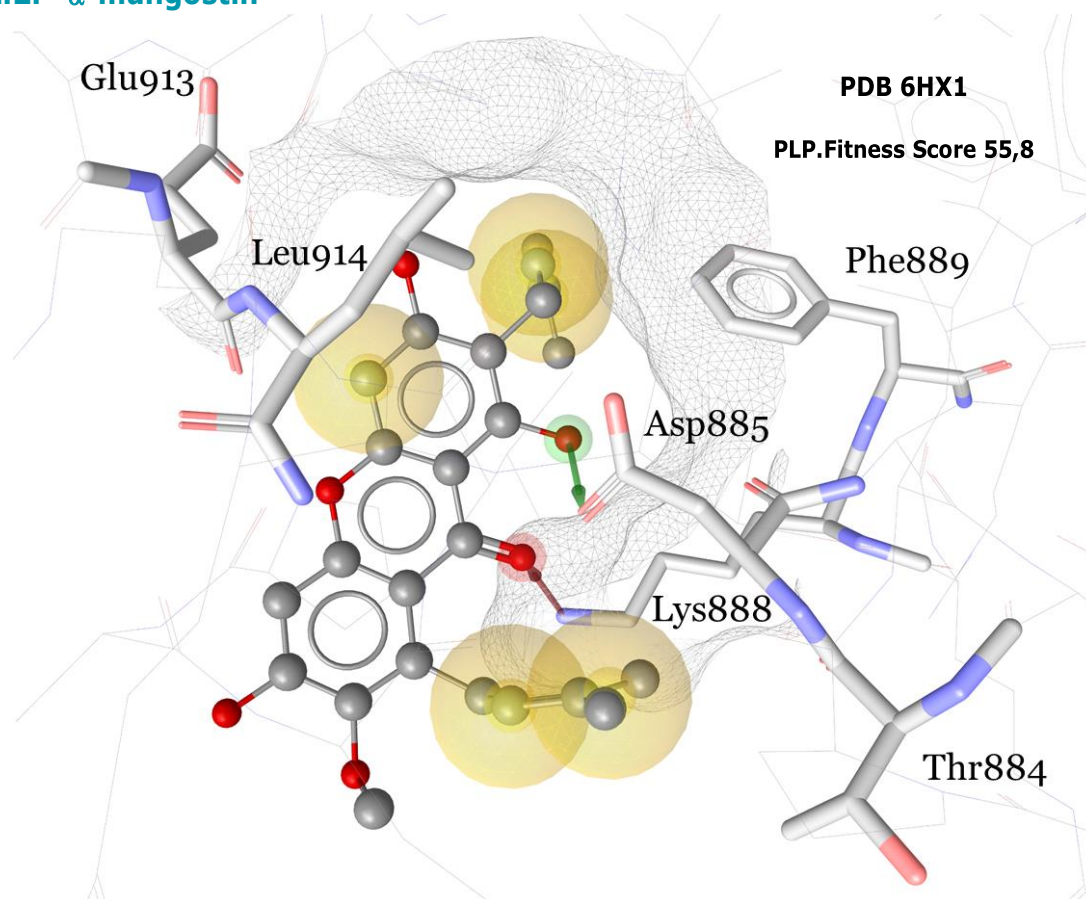


Figure 67. Docking de l' α -mangostin dans le domaine RNase d'IRE1 α .

Le docking de l' α -mangostin avec 6HX1 montre une LH entre le carbonyle de la fonction acide de l'Asp885 et l'hydroxyle en position 1 du cycle A. L'isoprényle en position 2 montre une interaction de type VDW

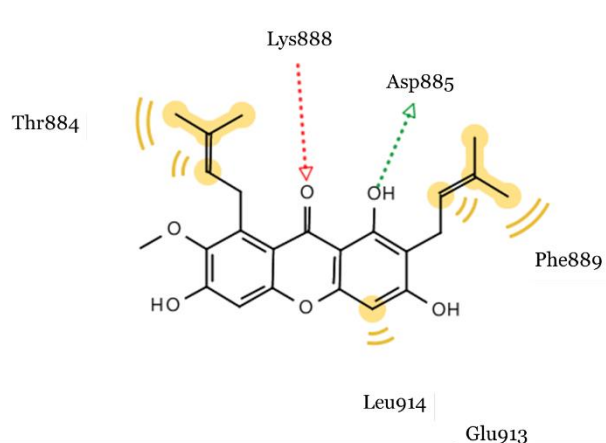


Figure 68. Le pharmacophore 2D des interactions α -mangostin-IRE1 α .

avec le cycle aromatique de la Phe889. Le carbone aromatique en position 4 montre une interaction VDW avec la chaîne latérale et principale de la Leu914, ainsi que la chaîne latérale de la Glu913. Le carbonyle en position 9 du cycle B est un ALH du NH₃⁺ de la Lys888. L'isoprényle sur la position 8 du cycle C interagit *via* une liaison de type VDW avec le méthyle de la chaîne principale de la Thr884 et la chaîne latérale de l'Asp885.

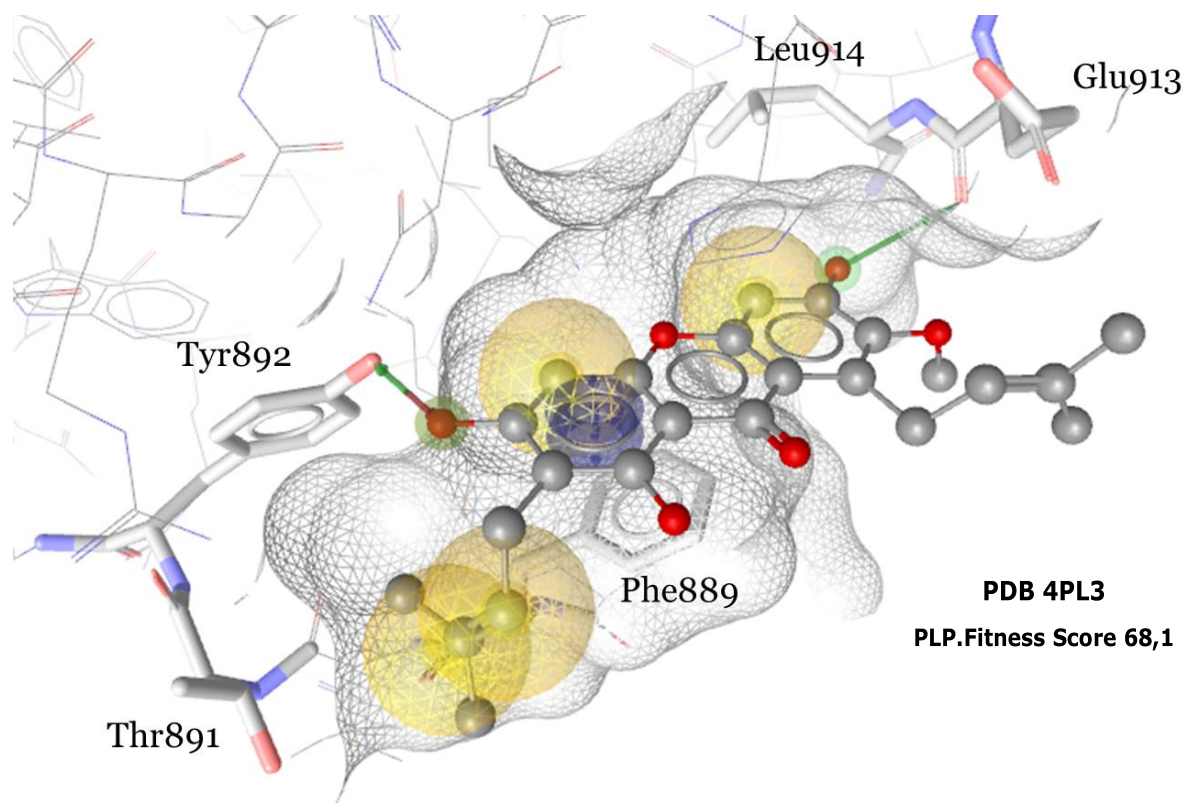


Figure 69. Docking de l' α -mangostin dans le domaine RNase d'IRE1a.

Le docking de l' α -mangostin chez la souris montre une LH entre le carbonyle de la fonction acide de la Glu913 et l'hydroxyle en position 6 du cycle C. L'isoprényle en position 2 montre une interaction de type VDW avec le cycle aromatique de la Phe889 et la chaîne latérale et principale de la Thr884. L'hydroxyle en position 3 du cycle A est engagé dans une LH en tant que ALH et DLH avec le phénol de la Tyr892. Le carbone aromatique en position 4 montre une interaction VDW avec la Phe889. Le carbone en position 5 interagit avec la Phe889 et la Leu914 *via* une liaison de type VDW. Finalement, une interaction de type π - π stacking se forme entre le cycle A et le cycle aromatique de la Phe889.

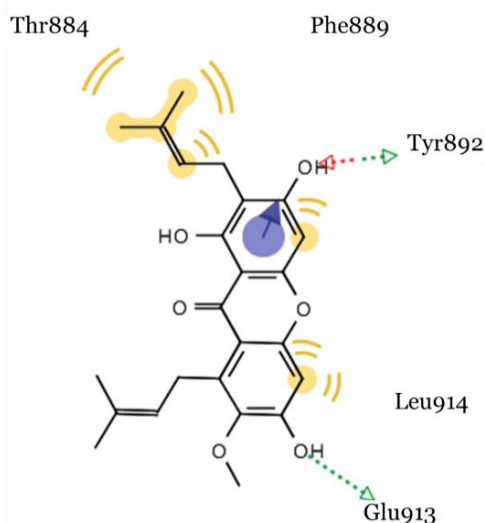


Figure 70. Le pharmacophore 2D des interactions α -mangostin-IRE1a.

3.2.3. Cudraxanthone

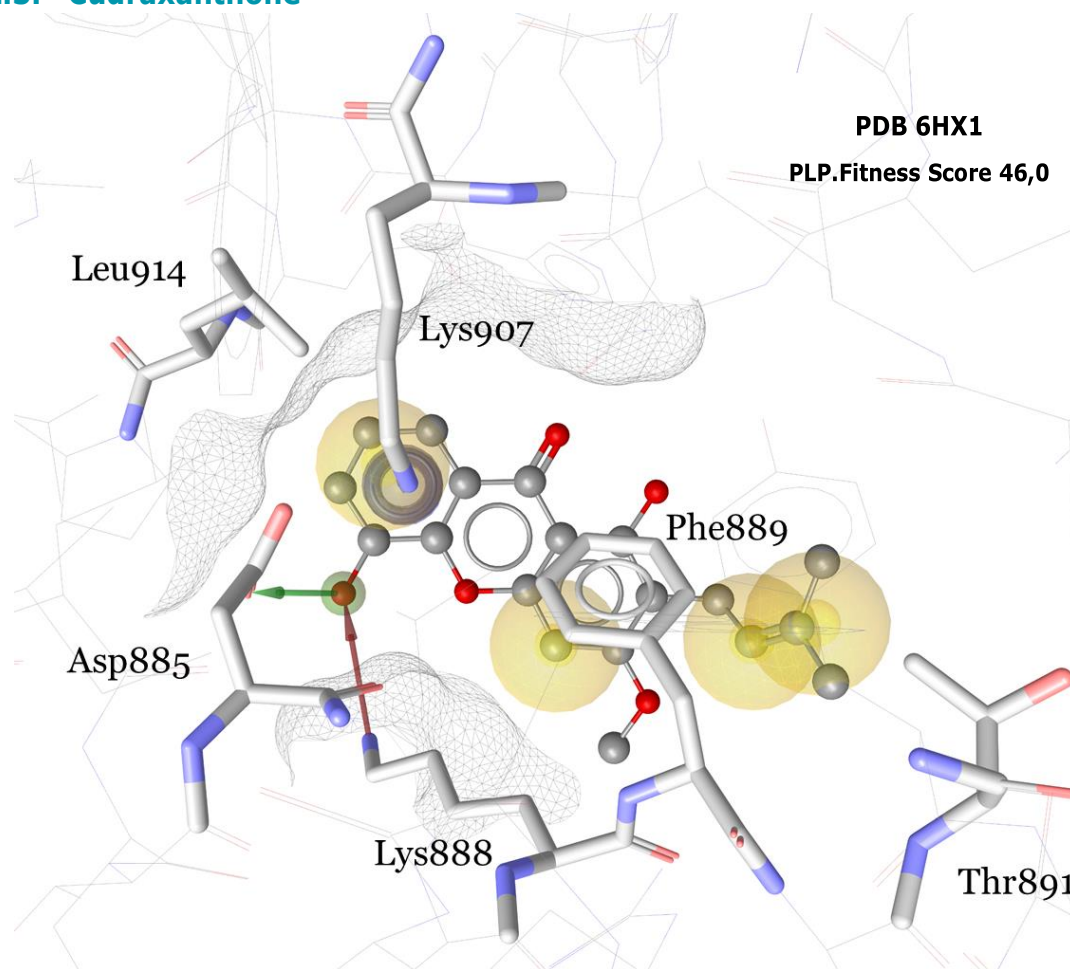


Figure 71. Docking de la cudraxanthone dans le domaine RNase d'IRE1 α .

Le docking de la cudraxanthone montre que l'isoprényle en position 2 opère une interaction de type VDW avec la chaîne latérale du cycle aromatique de la Phe889 et la chaîne carbonyle de la Thr891. Le carbone aromatique en position 4 montre une

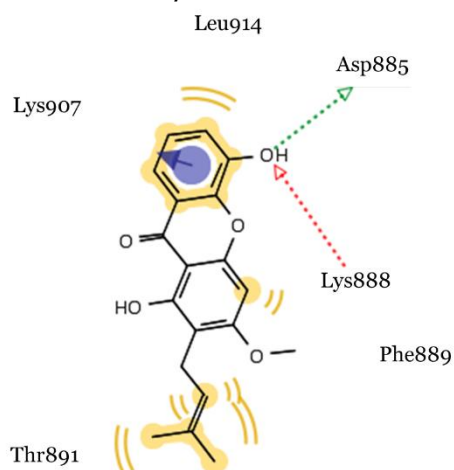


Figure 72. Le pharmacophore 2D des interactions cudraxanthone-IRE1 α .

interaction VDW avec la chaîne latérale et principale de la Lys888, ainsi que le cycle aromatique de la Phe889. De plus, d'une part, une LH entre le carbonyle de la fonction acide de l'Asp885 et l'hydroxyle en position 5 du cycle C se forme. D'autre part, une autre LH se forme entre le même hydroxyle et l'ammonium de la Lys888. Le cycle aromatique C montre une interaction VDW avec la chaîne latérale et principale de la Leu914.

Étonnement, la cudraxanthone est la seule parmi les xanthones étudiées chez l'Homme à interagir avec l'ammonium de la Lys907 *via* une interaction cation- π avec le cycle aromatique A, en plus de l'interaction avec le résidu Thr891. La cudraxanthone se distingue des autres xanthones en partageant le même côté de la poche de liaison que les inhibiteurs références. Les xanthones du mangoustan dans cette étude présentent des interactions avec le site de liaison au niveau du domaine de la RNase. La plupart s'engagent dans la poche de liaison des inhibiteurs RNase mais du côté opposé à celui des inhibiteurs de référence sauf pour la cudraxanthone (**Figure 73.**).

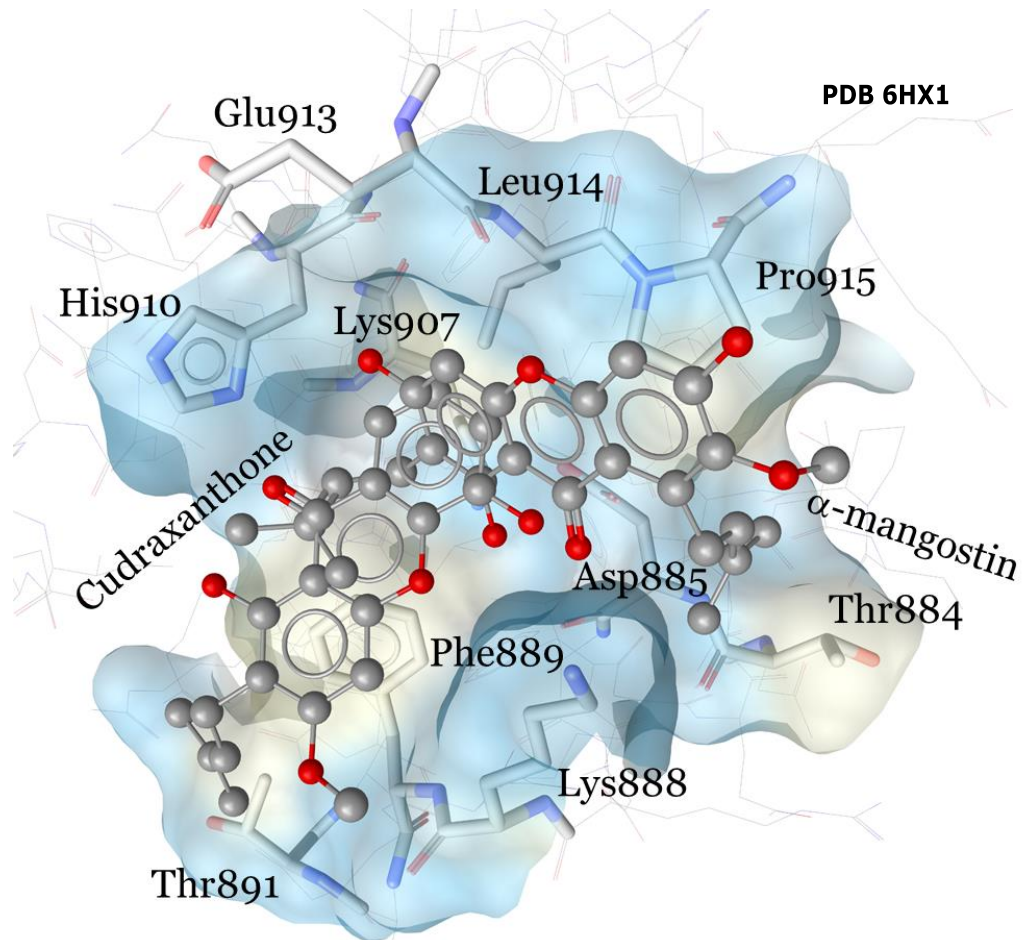


Figure 73. La pose de l' α -mangostin et la cudraxanthone dans la poche de liaison d'IRE1 α .

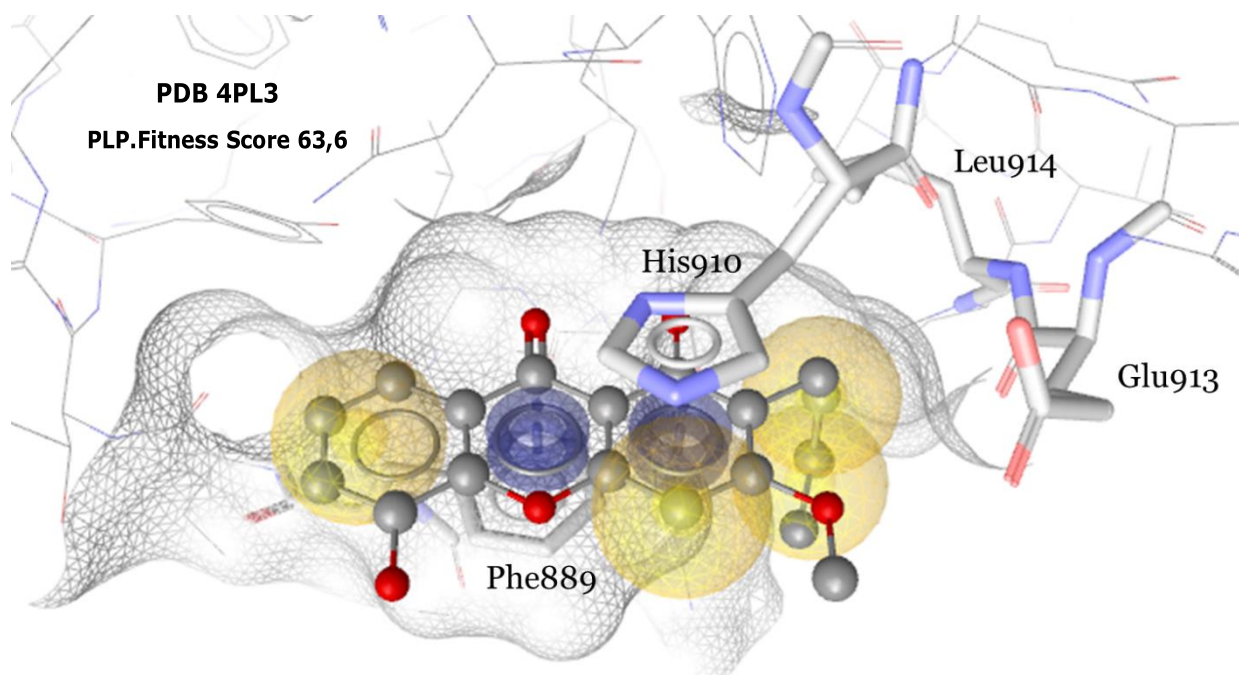


Figure 74. Docking de la cudraxanthone dans le domaine RNase d'IRE1a.

Cependant, le docking de la cudraxanthone chez la souris montre une interaction de type VDW entre l'isoprényle en position 3 et la chaîne latérale du cycle aromatique de la Phe889 et la chaîne latérale de la Leu914. Le carbone aromatique en position 4 montre une interaction VDW avec l'hétérocycle azoté du résidu His910. Le cycle C forme une interaction VDW avec le cycle aromatique de la Phe889. Enfin, des interactions de type π - π stacking se forment entre le cycle A et le résidu His910 d'un côté et entre le cycle B et le résidu Phe889 de l'autre côté (l'inverse de la garcinone E).

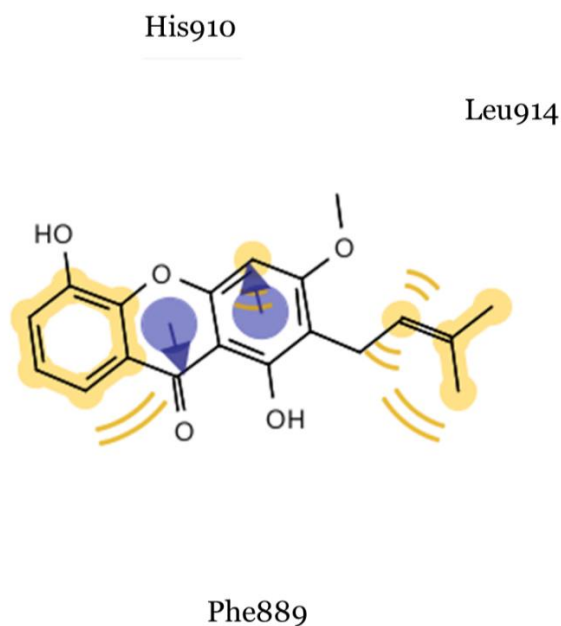


Figure 75. Le pharmacophore 2D des interactions cudraxanthone-IRE1a.

3.2.4. Les interactions ligand-protéine

Le résidu Lys888 chez la souris s'éloigne du site actif par l'orientation de sa chaîne principale vers l'extérieur de la poche. Ceci explique l'interaction de ce résidu avec les xanthones dans le docking avec la protéine 6HX1 et l'absence de cette interaction avec la protéine 4PL3. Le résidu Phe889, quant à lui, est orienté vers l'intérieur du site actif de 4PL3 d'une manière qui cache le résidu Lys888 et qui permet une interaction de type π - π stacking avec les xanthones. Ce genre d'interaction n'est pas observé avec la protéine 6HX1. De même, l'orientation du résidu His910 dans la protéine 4PL3 lui confère la capacité d'interagir avec les ligands *via* une interaction de type π - π stacking avec la protéine IRE1a. Ce type d'interaction n'est pas observé avec la protéine IRE1 α .

6HX1	Type d'interaction				
	ALH	DLH	VDW	π - π stacking	Cation- π stacking
Thr884			✗		
Asp885	✗				
Lys888		✗			
Phe889			✗		
Thr891			✗		
Lys907					✗
His910			✗		
Glu913	✗				
Leu914			✗		
Pro915			✗		

Tableau 8. Les interactions xanthones-IRE1 α (6HX1).

4PL3	Type d'interaction				
	ALH	DLH	VDW	π - π stacking	Cation- π stacking
Asp885	✗				
Phe889			✗	✗	
Thr891			✗		
Tyr892	✗	✗	✗		
Lys907		✗			
His910			✗	✗	
Glu913	✗				
Leu914			✗		

Tableau 9. Les interactions xanthones-IRE1a (4PL3).

3.3. Validation du modèle

3.3.1. Le modèle semi-quantitatif

L'amarrage des inhibiteurs de la RNase rapportés dans le chapitre III (Cf. **IV.2.7.2**) est réalisé à l'aide du logiciel GOLD[®] dans les deux modèles, 6HX1 humain et 4PL3 murin. Sachant que ces inhibiteurs possèdent des fonctions aldéhydes, deux méthodes d'amarrage ont été testées : en forçant la formation d'une base de Schiff dans les paramètres du logiciel dans la première méthode et en laissant les paramètres de la liaison covalente par défaut dans la deuxième méthode. Néanmoins, dans les deux cas, les tests biologiques et les valeurs de CI_{50} des inhibiteurs de la RNase disponibles dans la littérature ne sont pas suffisants pour permettre la construction d'un modèle quantitatif prédictif robuste de l'activité inhibitrice d'une molécule donnée en interaction avec le site actif. Le jeu de données exploitables des CI_{50} *in vitro* est de $n=16$ chez l'Homme^{116,117,138,147,152,156}, $n=7$ chez la souris¹³⁸ et $n=4$ chez la levure¹³⁸. Un couple de valeurs biologiques *in vivo* est rapporté par Volkmann et ses collaborateurs chez l'Homme et la levure¹⁴⁷. Le nombre limité de valeurs exploitables ne permet donc pas de déduire une corrélation entre les valeurs réelles (CI_{50}) et les valeurs prédictives calculées par GOLD[®] ($R^2 < 0,30$). Le calcul de valeurs biologiques prédictives n'étant pas possible avec le jeu de données actuel, le reste de cette étude se concentre sur le caractère qualitatif des interactions protéine-ligand.

3.3.2. Le modèle qualitatif

Grâce aux interactions observées entre les xanthones et les protéines IRE1a et α lors du docking effectué sur le logiciel GOLD[®], un modèle de pharmacophore 3D est généré à l'aide de LigandScout[®] (**Figure 76.**).

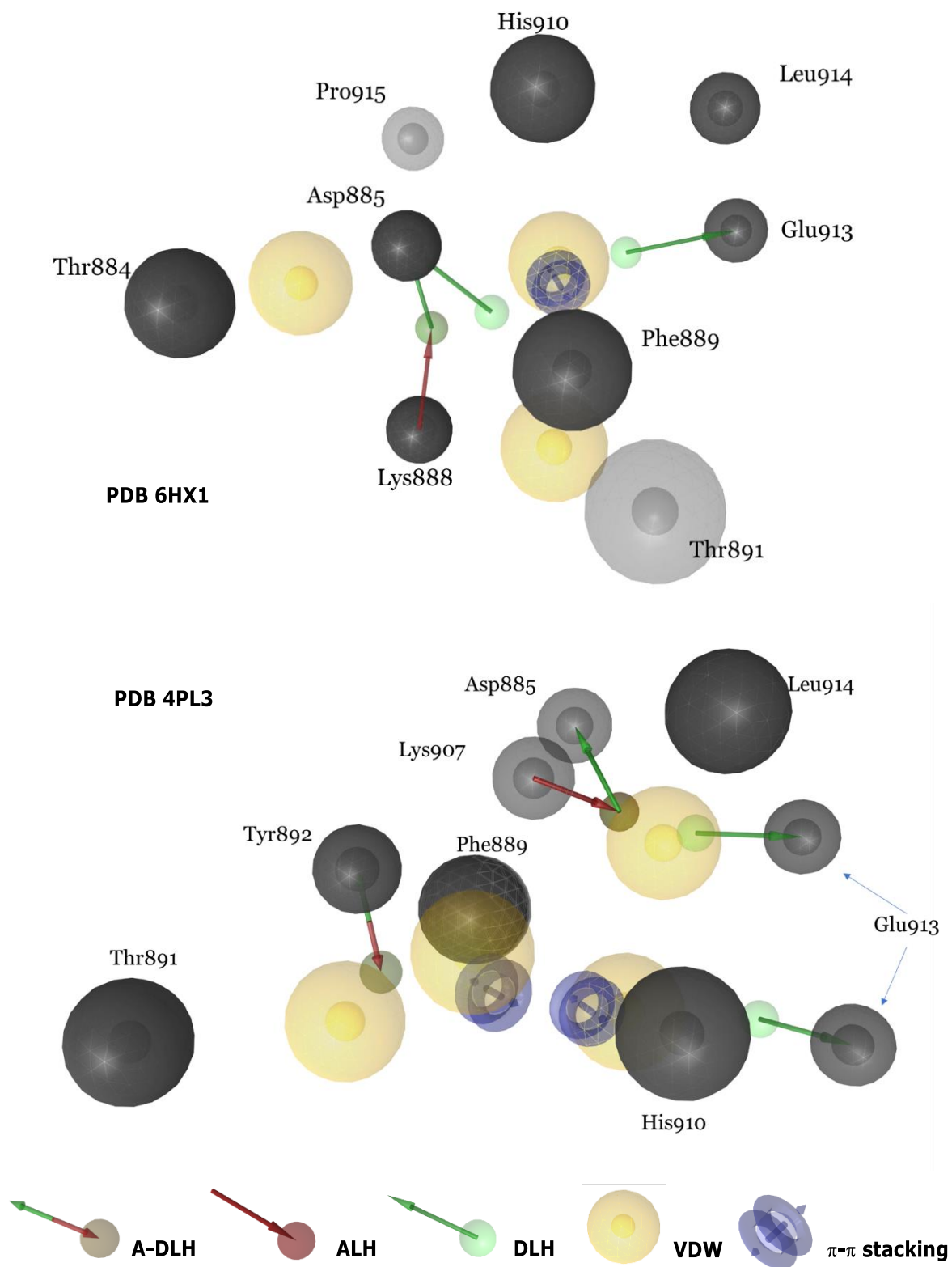


Figure 76. Le pharmacophore 3D des interactions xanthoniques-IRE1 α/a .

Le criblage virtuel de la librairie des huit xanthonnes avec les modèles 3D de pharmacophore génère des Pharmacophore Fit Scores présentés dans le **Tableau 10** ci-dessous.

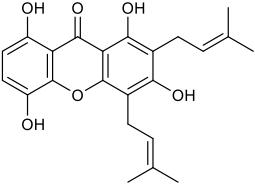
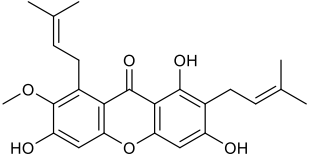
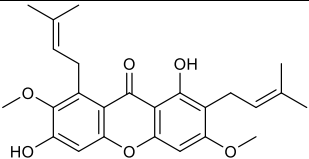
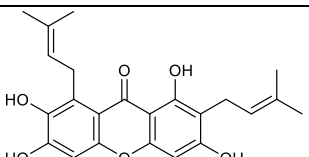
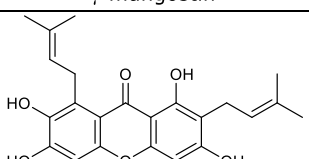
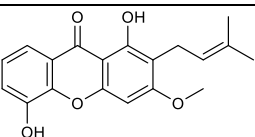
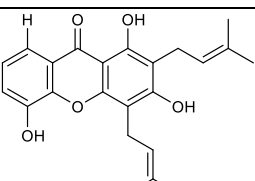
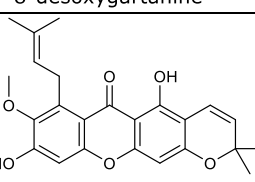
Ligand	Pharmacophore Fit Score	
	6HX1	4PL3
 <p>Gartanine</p>	75,1	97,0
 <p>α-mangostin</p>	66,9	86,2
 <p>β-mangostin</p>	66,7	86,2
 <p>γ-mangostin</p>	66,7	105,2
 <p>Garcinone E</p>	66,5	105,7
 <p>Cudraxanthone</p>	66,0	87,0
 <p>8-désoxygartanine</p>	65,9	96,1
 <p>9-hydroxycalabaxanthone</p>	57,3	77,0

Tableau 10. Les scores Pharmacophore Fit (LigandScout[®]) des xanthones du mangoustan.

Le fit score le plus élevé indique un meilleur alignement géométrique des caractéristiques du composé sur le pharmacophore 3D. Chez l'Homme c'est la gartanine et c'est la garcinone E chez la souris. Pendant le criblage virtuel, le logiciel LigandScout® aligne les ligands en fonction de leurs caractéristiques sur le pharmacophore 3D dans l'espace à l'aide d'un algorithme. Une forte corrélation entre les Pharmacophore Fit scores et les PLP.Fitness scores est observé dans le modèle murin ($R^2 = 0,79$) (**Figure 77.**). Ce type de corrélation n'est pas observé dans le modèle humain.

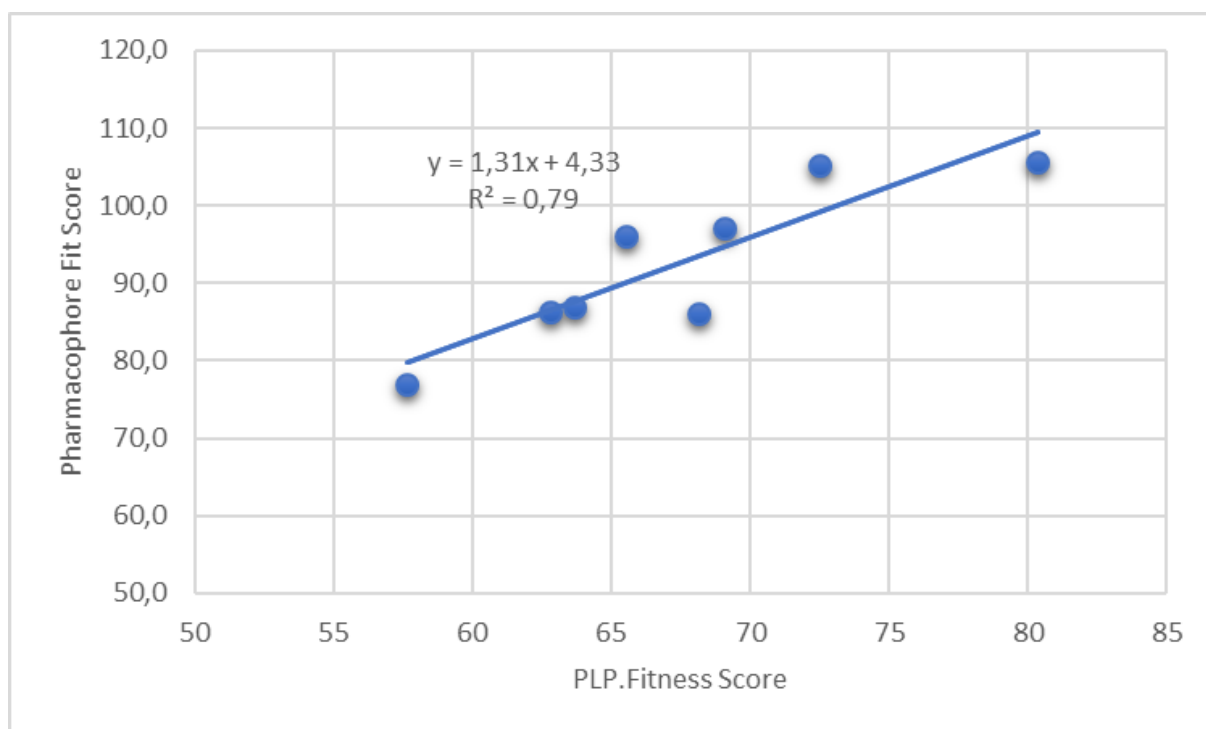


Figure 77. La droite de régression du Pharmacophore Fit Score en fonction du PLP.Fitness Score dans le modèle murin.

VI. Conclusion & Perspectives

Les travaux effectués durant ce projet permettent de mettre en évidence l'importance de la voie UPR et plus précisément celle de la voie IRE1 conservée à travers des espèces. De plus, ce projet montre l'implication de la voie UPR *via* ces trois branches, IRE1, ATF6 et PERK dans l'étiologie, l'épidémiologie et la symptomatologie de diverses maladies humaines. Dans certains états pathologiques, comme le diabète, il peut être bénéfique de soulager le stress du RE et/ou de bloquer certaines sorties de la voie UPR dans les cellules β pancréatiques⁷⁹, alors que dans d'autres affections, telles que les infections virales, induisant un stress du RE, l'induction et l'activation de l'UPR peut être nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique. Le développement de nouveaux composés actifs sur la voie UPR, non seulement dans le traitement du cancer, mais aussi dans d'autres

maladies connues pour être associées au stress du RE, telles que les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et neurologiques, est une piste qui fournit un large éventail de possibilités. Toutefois, compte tenu de la diversité des fonctions de l'UPR chez les plantes et les mammifères et comme chaque branche de l'UPR peut mener à la survie ou à la mort des cellules, tout nouvel agent thérapeutique doit être testé avec soin sur des organismes modèles appropriés, afin d'éviter des effets secondaires inattendus, voire des résultats diamétralement opposés à ceux souhaités. Une activation inappropriée de l'UPR peut également être nocive en tuant la cellule ou même en la protégeant de la mort, lors d'une transformation néoplasique ou d'une infection virale⁷⁴.

La nature conservée de la voie IRE1 combinée aux stratégies *in silico*, fournissent une multitude d'outils pour étudier les interactions ligand-protéine et désigner des hits potentiels naturels ou hémisynthétiques, tout en prenant en compte les paramètres pharmacocinétiques (ADME) et les cinq règles de Lipinski. Au vu du nombre limité des modulateurs connus de l'UPR et encore moins ceux de l'IRE1, cette étude expose le potentiel des xanthones du péricarpe du mangoustan, ressource renouvelable et peu coûteuse de xanthones naturelles, en tant qu'inhibiteurs du domaine RNase de la protéine IRE1 α chez l'Homme et IRE1a chez la souris. De plus, cette étude permet la validation d'un modèle quantitatif avec 4PL3 chez la souris. Cette action inhibitrice des xanthones pourrait être bénéfique dans diverses pathologies humaines. Par exemple, l'inhibition de l'UPR est associée à une virulence atténuée et à une augmentation spectaculaire (dramatique) de la sensibilité aux antifongiques⁸⁹. Cependant, à ce jour, la validation *in vivo* des inhibiteurs de l'UPR dans les modèles précliniques pertinents pour le patient fait encore défaut. Il est difficile de savoir quelle population de patients répondrait aux modulateurs de l'UPR et plus précisément ceux de la RNase de la protéine IRE1. Pour cela, un modèle d'inhibition de l'UPR (Ire1p) chez la levure est mis en place par l'équipe FUNGISEM du laboratoire IRHS en collaboration avec le laboratoire SONAS. Ce test biologique permettrait de valider un modèle quantitatif chez la levure.

Finalement, dans le domaine de la santé végétale, ces molécules potentialiseraient les mécanismes de défense naturels de la plante et pourraient être la solution pour lutter contre certains phytopathogènes. Ces molécules pourraient se substituer seules à l'usage des pesticides et fongicides utilisés actuellement dans la lutte chimique ayant des effets néfastes pour l'Homme et l'environnement, ou en association et limiter ainsi l'usage de ces derniers.

Bibliographie

1. Kaufman, R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: Coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes and Development*, 13(14), 1898. <https://doi.org/10.1101/gad.13.10.1211>.
2. Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 739–789. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>.
3. Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>.
4. Cheon, S. A., Jung, K. W., Bahn, Y. S., & Kang, H. A. (2014). The Unfolded Protein Response (UPR) pathway in *Cryptococcus*. *Virulence*, 5(2), 341–350. <https://doi.org/10.4161/viru.26774>.
5. Foufelle, F., & Ferré, P. (2007). Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology. *Medecine/Sciences*, 23(3), 291–296. <https://doi.org/10.1051/medsci/2007233291>.
6. Taouji, S., & Chevet, É. (2015). Modulation pharmacologique de la réponse au stress du réticulum endoplasmique. *Medecine/Sciences*, 31(6–7), 667–673. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153106021>.
7. Shen, K., Johnson, D. W., Vesey, D. A., McGuckin, M. A., & Gobe, G. C. (2018). Role of the unfolded protein response in determining the fate of tumor cells and the promise of multi-targeted therapies. *Cell Stress and Chaperones*, 23(3), 317–334. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0844-3>.
8. Rao, R. V., Ellerby, H. M., & Bredesen, D. E. (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death and Differentiation*, 11(4), 372–380. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401378>.
9. Mori, K. (2015). The unfolded protein response: the dawn of a new field. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 91(9), 469–480. <https://doi.org/10.2183/pjab.91.469>.
10. Ding, W.-X., Ni, H.-M., Gao, W., Hou, Y.-F., Melan, M. A., Chen, X., Stolz, D. B., Shao, Z.-M., & Yin, X.-M. (2007). Differential Effects of Endoplasmic Reticulum Stress-induced Autophagy on Cell Survival. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4702–4710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609267200>.
11. Mulder, H. J. (2010). *Unravelling the stepwise activation mechanism of HacA, the key regulator of the Unfolded Protein Response in Aspergillus niger* [Leiden University]. <http://hdl.handle.net/1887/14647>.
12. Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1988). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332(6163), 462–464. <https://doi.org/10.1038/332462a0>.
13. Shiu, R. P., Pouyssegur, J., & Pastan, I. (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(9), 3840–3844. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.3840>.
14. Haas, I. G., & Wabl, M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, 306(5941), 387–389. <https://doi.org/10.1038/306387a0>.
15. Munro, S., & Pelham, H. R. B. (1986). An hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding

- protein. *Cell*, 46(2), 291–300. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90746-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90746-4).
16. Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M. J., & Mori, K. (1993). The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biology*, 13(2), 877–890. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.2.877>.
 17. Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., & Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 18773–18784. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509487102>.
 18. Adams, C. J., Kopp, M. C., Larburu, N., Nowak, P. R., & Ali, M. M. U. (2019). Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(MAR), 11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00011>.
 19. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2(6), 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>.
 20. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., & Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>.
 21. Harding, H. P., Calfon, M., Urano, F., Novoa, I., & Ron, D. (2002). Transcriptional and Translational Control in the Mammalian Unfolded Protein Response. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), 575–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.011402.160624>.
 22. Bao, Y., Pu, Y., Yu, X., Gregory, B. D., Srivastava, R., Howell, S. H., & Bassham, D. C. (2018). IRE1B degrades RNAs encoding proteins that interfere with the induction of autophagy by ER stress in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy*, 14(9), 1562–1573. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1462426>.
 23. Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology*, 10(12), 524–530. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01852-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01852-3).
 24. Deng, Y., Humbert, S., Liu, J. X., Srivastava, R., Rothstein, S. J., & Howell, S. H. (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7247–7252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102117108>.
 25. Leber, J. H., Bernales, S., & Walter, P. (2004). IRE1-independent gain control of the unfolded protein response. *PLoS Biology*, 2(8), 1197–1207. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020235>.
 26. Nikawa, J.-I., & Yamashita, S. (1992). IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 6(11), 1441–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00864.x>.
 27. Cox, J. S., Shamu, C. E., & Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 73(6), 1197–1206. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90648-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90648-A).
 28. Sidrauski, C., & Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90(6), 1031–1039. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80369-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80369-4).

29. Koizumi, N., Martinez, I. M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., & Chrispeels, M. J. (2001). Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiology*, *127*(3), 949–962. <https://doi.org/10.1104/pp.010636>.
30. Shamu, C. E., & Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO Journal*, *15*(12), 3028–3039. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00666.x>.
31. Tirasophon, W., Welihinda, A. A., & Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes and Development*, *12*(12), 1812–1824. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1812>.
32. Cox, J. S., & Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, *87*(3), 391–404. [https://doi.org/S0092-8674\(00\)81360-4](https://doi.org/S0092-8674(00)81360-4) [pii].
33. Dröge-Laser, W., Snoek, B. L., Snel, B., & Weiste, C. (2018). The Arabidopsis bZIP transcription factor family — an update. *Current Opinion in Plant Biology*, *45*, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.001>.
34. Mori, K. (2009). Signalling pathways in the unfolded protein response: Development from yeast to mammals. *Journal of Biochemistry*, *146*(6), 743–750. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp166>.
35. Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., & Marton, M. J. (2001). Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(13), 4347–4368. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4347-4368.2001>.
36. Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *The EMBO Journal*, *11*(7), 2583–2593. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05323.x>.
37. Iwata, Y., & Koizumi, N. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(14), 5280–5285. Iwata, Y., Koizumi, N. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(14), 5280–5285. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408941102>.
38. Rose, M. D., Misra, L. M., & Vogel, J. P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, *57*(7), 1211–1221. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90058-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90058-5).
39. Wimalasena, T. T., Enjalbert, B., Guillemette, T., Plumridge, A., Budge, S., Yin, Z., Brown, A. J. P., & Archer, D. B. (2008). Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of Hac1 in the polarized growth, of *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, *45*(9), 1235–1247. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.06.001>.
40. Tang, H., Bao, X., Shen, Y., Song, M., Wang, S., Wang, C., & Hou, J. (2015). Engineering protein folding and translocation improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(9), 1872–1882. <https://doi.org/10.1002/bit.25596>.
41. Ogawa, N., & Mori, K. (2004). Autoregulation of the HAC1 gene is required for sustained activation of the yeast unfolded protein response. *Genes to Cells*, *9*(2), 95–104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2004.00704.x>.

42. Patil, C. K., Li, H., & Walter, P. (2004). Gcn4p and novel upstream activating sequences regulate targets of the unfolded protein response. *PLoS Biology*, 2(8), 1208–1223. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020246>.
43. Fernandez, J., Yaman, I., Merrick, W. C., Koromilas, A. E., Wek, R. C., Sood, R., Hensold, J., & Hatzoglou, M. (2002). Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2 α phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 2050–2058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109199200>.
44. Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A. A., Koromilas, A. E., Zhou, L., Snider, M. D., Scheuner, D., Kaufman, R. J., & Hatzoglou, M. (2003). The zipper model of translational control: A small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell*, 113(4), 519–531. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00345-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00345-3).
45. Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P., & Howell, S. H. (2007). An Endoplasmic Reticulum Stress Response in Arabidopsis Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28. *The Plant Cell Online*, 19(12), 4111–4119. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.050021>.
46. Nawkar, G. M., Lee, E. S., Shelake, R. M., Park, J. H., Ryu, S. W., Kang, C. H., & Lee, S. Y. (2018). Activation of the Transducers of Unfolded Protein Response in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 214. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00214>.
47. Che, P., Bussell, J. D., Zhou, W., Estavillo, G. M., Pogson, B. J., & Smith, S. M. (2010). Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in Arabidopsis. *Science Signaling*, 3(141). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001140>.
48. Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 100(4), 391–398. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80675-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80675-3).
49. Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P., & Howell, S. H. (2007). Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant Journal*, 51(5), 897–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03195.x>.
50. Iwata, Y., Ashida, M., Hasegawa, C., Tabara, K., Mishiba, K. I., & Koizumi, N. (2017). Activation of the Arabidopsis membrane-bound transcription factor bZIP28 is mediated by site-2 protease, but not site-1 protease. *Plant Journal*, 91(3), 408–415. <https://doi.org/10.1111/tpj.13572>.
51. Lai, Y.-S., Stefano, G., Zemelis-Durfee, S., Ruberti, C., Gibbons, L., & Brandizzi, F. (2018). Systemic signaling contributes to the unfolded protein response of the plant endoplasmic reticulum. *Nature Communications*, 9(1), 3918. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06289-9>.
52. Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999). Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3787–3799. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>.
53. Bateman, A. (2019). UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.
54. Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271–274. <https://doi.org/10.1038/16729>.
55. Shi, Y., Vattem, K. M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., & Wek, R. C. (1998).

- Identification and Characterization of Pancreatic Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha-Subunit Kinase, PEK, Involved in Translational Control. *Molecular and Cellular Biology*, 18(12), 7499–7509. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.12.7499>.
56. Yoshida, H., Uemura, A., & Mori, K. (2009). pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. *Cell Structure and Function*, 34(1), 1–10. <https://doi.org/10.1247/csf.06028>.
 57. Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P., & Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *The Journal of Cell Biology*, 153(5), 1011–1022. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1011>.
 58. Brush, M. H., Weiser, D. C., & Shenolikar, S. (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology*, 23(4), 1292–1303. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.4.1292>.
 59. Scheuner, D., Patel, R., Wang, F., Lee, K., Kumar, K., Wu, J., Nilsson, A., Karin, M., & Kaufman, R. J. (2006). Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the α -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21458–21468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603784200>.
 60. Ariyasu, D., Yoshida, H., & Hasegawa, Y. (2017). Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Endocrine Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 382. <https://doi.org/10.3390/ijms18020382>.
 61. Wang, X. Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M., & Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO Journal*, 17(19), 5708–5717. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5708>.
 62. Bertolotti, A., Wang, X. Z., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J. H., West, A. B., & Ron, D. (2001). Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 107(5), 585–593. <https://doi.org/10.1172/JCI11476>.
 63. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881–891. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0).
 64. Tirosh, B., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H., & Ploegh, H. L. (2006). Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5852–5860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509061200>.
 65. Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., & Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *Journal of Cell Biology*, 172(4), 565–575. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508145>.
 66. Rutkowski, D. T. (2019). Liver function and dysfunction - a unique window into the physiological reach of ER stress and the unfolded protein response. *The FEBS Journal*, 286(2), 356–378. <https://doi.org/10.1111/febs.14389>.
 67. Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultzinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Bellerocche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman,

- A. M., ... Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, 286(2), 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>.
68. Haze, K., Okada, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. (2001). Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochemical Journal*, 355(1), 19–28. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3550019>.
 69. Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454(7203), 455–462. <https://doi.org/10.1038/nature07203>.
 70. Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K. M., LaVail, M. M., & Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*, 318(5852), 944–949. <https://doi.org/10.1126/science.1146361>.
 71. Manalo, R. V. M., & Medina, P. M. B. (2018). The endoplasmic reticulum stress response in disease pathogenesis and pathophysiology. In *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* (Vol. 19, Issue 2, pp. 59–68). <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2017.07.004>.
 72. Fros, J. J., Major, L. D., Scholte, F. E. M., Gardner, J., Van Hemert, M. J., Suhrbier, A., & Pijlman, G. P. (2015). Chikungunya virus non-structural protein 2-mediated host shut-off disables the unfolded protein response. *Journal of General Virology*, 96(3), 580–589. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071845-0>.
 73. Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., De Falco, F., Di Ianni, M., Falzetti, F., Fettucciari, K., Bartoli, A., Screpanti, I., & Marconi, P. (2010). Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL. *Blood*, 116(15), 2713–2723. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275628>.
 74. Lin, J. H., Walter, P., & Yen, T. S. B. (2008). Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3(1), 399–425. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434>.
 75. Sherman, M. Y., & Goldberg, A. L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, 29(1), 15–32. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00177-5).
 76. Pathinayake, P. S., Hsu, A. C. Y., Waters, D. W., Hansbro, P. M., Wood, L. G., & Wark, P. A. B. (2018). Understanding the Unfolded Protein Response in the Pathogenesis of Asthma. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), 1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00175>.
 77. Ojha, R., & Amaravadi, R. K. (2017). Targeting the unfolded protein response in cancer. *Pharmacological Research*, 120, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.04.003>.
 78. Schmitz, M., Shaban, M., Albert, B., Gökçen, A., & Kracht, M. (2018). The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF-κB: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection. *Biomedicines*, 6(2), 58. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020058>.
 79. Hotamisligil, G. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>.
 80. Martin, J. B. (1999). Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *The New England Journal of Medicine*, 340(25), 1970–1980. <https://doi.org/10.1056/NEJM199906243402507>.

81. Taylor, J. P., Hardy, J., & Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 296(5575), 1991–1995. <https://doi.org/10.1126/science.1067122>.
82. Koeberle, A., & Werz, O. (2018). Natural products as inhibitors of prostaglandin E2 and pro-inflammatory 5-lipoxygenase-derived lipid mediator biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 36(6), 1709–1723. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.010>.
83. Dennis, E. A., & Norris, P. C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 511–523. <https://doi.org/10.1038/nri3859>.
84. Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*, 294(5548), 1871–1875. <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1871>.
85. Shimizu, T. (2009). Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49(1), 123–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145616>.
86. Jiang, D., Niwa, M., & Koong, A. C. (2015). Targeting the IRE1 α -XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. *Seminars in Cancer Biology*, 33, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.04.010>.
87. Hansson, G. K., & Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 6(7), 508–519. <https://doi.org/10.1038/nri1882>.
88. Wang, X., Xu, L., Gillette, T. G., Jiang, X., & Wang, Z. V. (2018). The unfolded protein response in ischemic heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 117, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.02.013>.
89. Richie, D. L., Hartl, L., Amanianda, V., Winters, M. S., Fuller, K. K., Miley, M. D., White, S., McCarthy, J. W., Latgé, J. P., Feldmesser, M., Rhodes, J. C., & Askew, D. S. (2009). A role for the unfolded protein response (UPR) in virulence and antifungal susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 5(1), 1000258. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000258>.
90. Antoniou, A. N., Lenart, I., Kriston-Vizi, J., Iwawaki, T., Turmaine, M., McHugh, K., Ali, S., Blake, N., Bowness, P., Bajaj-Elliott, M., Gould, K., Nesbeth, D., & Powis, S. J. (2019). Salmonella exploits HLA-B27 and host unfolded protein responses to promote intracellular replication. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(1), 74–82. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213532>.
91. Gladwyn-Ng, I., Cordón-Barris, L., Alfano, C., Creppe, C., Couderc, T., Morelli, G., Thelen, N., America, M., Bessières, B., Encha-Razavi, F., Bonnière, M., Suzuki, I. K., Flamand, M., Vanderhaeghen, P., Thiry, M., Lecuit, M., & Nguyen, L. (2018). Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nature Neuroscience*, 21(1), 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0038-4>.
92. International Diabetes Federation. (2017). Diabetes facts & figures. <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>.
93. Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), e442. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>.
94. Organisation Mondiale de la Santé. (2018). Diabète. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
95. Fédération Française des Diabétiques. (2019). Les chiffres du diabète en France.

- D., Lanoix, J., Kearney, R. E., & Paiement, J. (2010). Proteomic analysis of the transitional endoplasmic reticulum in hepatocellular carcinoma: An organelle perspective on cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1804*(9), 1869–1881. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.05.008>.
113. Madden, E., Logue, S. E., Healy, S. J., Manie, S., & Samali, A. (2019). The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biology of the Cell*, *111*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/boc.201800050>.
 114. Kim, C., & Kim, B. (2018). Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: A Review. *Nutrients*, *10*(8), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu10081021>.
 115. Li, X., Zhang, K., & Li, Z. (2011). Unfolded protein response in cancer: the Physician's perspective. *Journal of Hematology & Oncology*, *4*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-8>.
 116. Tang, C. H. A., Ranatunga, S., Kriss, C. L., Cubitt, C. L., Tao, J., Pinilla-Ibarz, J. A., Del Valle, J. R., & Hu, C. C. A. (2014). Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(6), 2585–2598. <https://doi.org/10.1172/JCI73448>.
 117. Cross, B. C. S., Bond, P. J., Sadowski, P. G., Jha, B. K., Zak, J., Goodman, J. M., Silverman, R. H., Neubert, T. A., Baxendale, I. R., Ron, D., & Harding, H. P. (2012). The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(15), E869–E878. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115623109>.
 118. Wang, Q., Li, A., & Ye, Y. (2008). Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(12), 7445–7454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708347200>.
 119. Wang, F.-M., Galson, D. L., Roodman, G. D., & Ouyang, H. (2011). Resveratrol triggers the pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress response and represses pro-survival XBP1 signaling in human multiple myeloma cells. *Experimental Hematology*, *39*(10), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2011.06.007>.
 120. Papandreou, I., Denko, N. C., Olson, M., Van Melckebeke, H., Lust, S., Tam, A., Solow-Cordero, D. E., Bouley, D. M., Offner, F., Niwa, M., & Koong, A. C. (2011). Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*, *117*(4), 1311–1314. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-303099>.
 121. Chien, W., Ding, L. W., Sun, Q. Y., Torres-Fernandez, L. A., Tan, S. Z., Xiao, J., Lim, S. L., Garg, M., Lee, K. L., Kitajima, S., Takao, S., Leong, W. Z., Sun, H., Tokatly, I., Poellinger, L., Gery, S., & Koeffler, P. H. (2014). Selective inhibition of unfolded protein response induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, *5*(13), 4881–4894. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2051>.
 122. Mollazadeh, H., Atkin, S. L., Butler, A. E., Ruscica, M., Sirtori, C. R., & Sahebkar, A. (2018). The effect of statin therapy on endoplasmic reticulum stress. *Pharmacological Research*, *137*(SEP), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.10.006>.
 123. Ignashkova, T. I., Gendarme, M., Peschk, K., Eggenweiler, H. M., Lindemann, R. K., & Reiling, J. H. (2017). Cell survival and protein secretion associated with Golgi integrity in response to Golgi stress-inducing agents. *Traffic*, *18*(8), 530–544. <https://doi.org/10.1111/tra.12493>.
 124. Fribley, A. M., Miller, J. R., Brownell, A. L., Garshott, D. M., Zeng, Q., Reist, T. E.,

- Narula, N., Cai, P., Xi, Y., Callaghan, M. U., Kodali, V., & Kaufman, R. J. (2015). Celastrol induces unfolded protein response-dependent cell death in head and neck cancer. *Experimental Cell Research*, *330*(2), 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.014>.
125. Özcan, U., Yilmaz, E., Özcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Görgün, C. Z., & Hotamisligil, G. S. (2006). Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Science*, *313*(5790), 1137–1140. <https://doi.org/10.1126/science.1128294>.
126. Fu, S., Yalcin, A., Lee, G. Y., Li, P., Fan, J., Arruda, A. P., Pers, B. M., Yilmaz, M., Eguchi, K., & Hotamisligil, G. S. (2015). Phenotypic assays identify azoramidate as a small-molecule modulator of the unfolded protein response with antidiabetic activity. *Science Translational Medicine*, *7*(292), 292ra98–292ra98. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa9134>.
127. Hosoi, T., Yamaguchi, R., Noji, K., Matsuo, S., Baba, S., Toyoda, K., Suezawa, T., Kayano, T., Tanaka, S., & Ozawa, K. (2014). Flurbiprofen ameliorated obesity by attenuating leptin resistance induced by endoplasmic reticulum stress. *EMBO Molecular Medicine*, *6*(3), 335–346. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303227>.
128. Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ma, D., Coen, D. M., Ron, D., & Yuan, J. (2005). A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5711), 935–939. <https://doi.org/10.1126/science.1101902>.
129. Hetz, C., Chevet, E., & Harding, H. P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(9), 703–719. <https://doi.org/10.1038/nrd3976>.
130. Gallagher, C. M., Garri, C., Cain, E. L., Ang, K. K. H., Wilson, C. G., Chen, S., Hearn, B. R., Jaishankar, P., Aranda-Diaz, A., Arkin, M. R., Renslo, A. R., & Walter, P. (2016). Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6 α branch. *ELife*, *5*(JUL), e11878. <https://doi.org/10.7554/eLife.11878>.
131. AFM-Téléthon. (2018). *CMT1A: une nouvelle étape du développement de l'IFB-088*. <https://www.afm-telethon.fr/actualites/cmt1a-nouvelle-etape-developpement-ifb-088-114313>.
132. Bai, H., Chen, T., Ming, J., Sun, H., Cao, P., Fusco, D. N., Chung, R. T., Chorev, M., Jin, Q., & Aktas, B. H. (2013). Dual Activators of Protein Kinase R (PKR) and Protein Kinase R-Like Kinase (PERK) Identify Common and Divergent Catalytic Targets. *ChemBioChem*, *14*(10), 1255–1262. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300177>.
133. Xie, W., Pariollaud, M., Wixted, W. E., Chitnis, N., Fornwald, J., Truong, M., Pao, C., Liu, Y., Ames, R. S., Callahan, J., Solari, R., Sanchez, Y., Diehl, A., & Li, H. (2015). Identification and Characterization of PERK Activators by Phenotypic Screening and Their Effects on NRF2 Activation. *PLOS ONE*, *10*(3), e0119738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119738>.
134. Li, G., Petiwala, S. M., Nonn, L., & Johnson, J. J. (2014). Inhibition of CHOP accentuates the apoptotic effect of α -mangostin from the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*) in 22Rv1 prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *453*(1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.054>.
135. Bu, L.-J., Yu, H.-Q., Fan, L.-L., Li, X.-Q., Wang, F., Liu, J.-T., Zhong, F., Zhang, C.-J., Wei, W., Wang, H., & Sun, G.-P. (2017). Melatonin, a novel selective ATF-6 inhibitor, induces human hepatoma cell apoptosis through COX-2 downregulation. *World Journal of Gastroenterology*, *23*(6), 986.

- <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i6.986>.
136. Plate, L., Cooley, C. B., Chen, J. J., Paxman, R. J., Gallagher, C. M., Madoux, F., Genereux, J. C., Dobbs, W., Garza, D., Spicer, T. P., Scampavia, L., Brown, S. J., Rosen, H., Powers, E. T., Walter, P., Hodder, P., Luke Wiseman, R., & Kelly, J. W. (2016). Small molecule proteostasis regulators that reprogram the ER to reduce extracellular protein aggregation. *ELife*, 5(JUL), e15550. <https://doi.org/10.7554/eLife.15550>.
 137. Choy, K. W., Murugan, D., & Mustafa, M. R. (2018). Natural products targeting ER stress pathway for the treatment of cardiovascular diseases. In *Pharmacological Research* (Vol. 132, Issue April, pp. 119–129). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.04.013>.
 138. Sanches, M., Duffy, N. M., Talukdar, M., Thevakumaran, N., Chiovitti, D., Canny, M. D., Lee, K., Kurinov, I., Uehling, D., Al-awar, R., Poda, G., Prakesch, M., Wilson, B., Tam, V., Schweitzer, C., Toro, A., Lucas, J. L., Vuga, D., Lehmann, L., ... Sicheri, F. (2014). Structure and mechanism of action of the hydroxy-aryl-aldehyde class of IRE1 endoribonuclease inhibitors. *Nature Communications*, 5(MAY), 4202. <https://doi.org/10.1038/ncomms5202>.
 139. Lee, K. P. K., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T. E., & Sicheri, F. (2008). Structure of the Dual Enzyme Ire1 Reveals the Basis for Catalysis and Regulation in Nonconventional RNA Splicing. *Cell*, 132(1), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.057>.
 140. Han, D., Upton, J. P., Hagen, A., Callahan, J., Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2008). A kinase inhibitor activates the IRE1 α RNase to confer cytoprotection against ER stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365(4), 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.040>.
 141. Ali, M. M. U., Bagratuni, T., Davenport, E. L., Nowak, P. R., Silva-Santisteban, M. C., Hardcastle, A., McAndrews, C., Rowlands, M. G., Morgan, G. J., Aherne, W., Collins, I., Davies, F. E., & Pearl, L. H. (2011). Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *EMBO Journal*, 30(5), 894–905. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.18>.
 142. Concha, N. O., Smallwood, A., Bonnette, W., Totoritis, R., Zhang, G., Federowicz, K., Yang, J., Qi, H., Chen, S., Campobasso, N., Choudhry, A. E., Shuster, L. E., Evans, K. A., Ralph, J., Sweitzer, S., Heerding, D. A., Buser, C. A., Su, D. S., & DeYoung, M. P. (2015). Long-range inhibitor-induced conformational regulation of human IRE1 α endoribonuclease activity. *Molecular Pharmacology*, 88(6), 1011–1023. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100917>.
 143. Joshi, A., Newbatt, Y., McAndrew, P. C., Stubbs, M., Burke, R., Richards, M. W., Bhatia, C., Caldwell, J. J., McHardy, T., Collins, I., & Bayliss, R. (2015). Molecular mechanisms of human IRE1 activation through dimerization and ligand binding. *Oncotarget*, 6(15), 13019–13035. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3864>.
 144. Korenykh, A. V., Egea, P. F., Korostelev, A. A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K. M., Stroud, R. M., & Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature*, 457(7230), 687–693. <https://doi.org/10.1038/nature07661>.
 145. Sidrauski, C., & Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90(6), 1031–1039. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80369-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80369-4).
 146. Jiang, D., Tam, A. B., Alagappan, M., Hay, M. P., Gupta, A., Kozak, M. M., Solow-Cordero, D. E., Lum, P. Y., Denko, N. C., Giaccia, A. J., Le, Q. T., Niwa, M., & Koong, A. C. (2011). The unfolded protein response is a critical component of the hypoxia response in cancer cells. *Cell*, 146(1), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.025>.

- A. C. (2016). Acridine derivatives as inhibitors of the IRE1 α -XBP1 pathway are cytotoxic to human multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *15*(9), 2055–2065. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-1023>.
147. Volkmann, K., Lucas, J. L., Vuga, D., Wang, X., Brumm, D., Stiles, C., Kriebel, D., Der-Sarkissian, A., Krishnan, K., Schweitzer, C., Liu, Z., Malyankar, U. M., Chiovitti, D., Canny, M. D., Durocher, D., Sicheri, F., & Patterson, J. B. (2011). Potent and Selective Inhibitors of the Inositol-requiring Enzyme 1 Endoribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(14), 12743–12755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199737>.
148. Mimura, N., Fulciniti, M., Gorgun, G., Tai, Y. T., Cirstea, D., Santo, L., Hu, Y., Fabre, C., Minami, J., Ohguchi, H., Kiziltepe, T., Ikeda, H., Kawano, Y., French, M., Blumenthal, M., Tam, V., Kertesz, N. L., Malyankar, U. M., Hokenson, M., ... Anderson, K. C. (2012). Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*, *119*(24), 5772–5781. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366633>.
149. Ri, M., Tashiro, E., Oikawa, D., Shinjo, S., Tokuda, M., Yokouchi, Y., Narita, T., Masaki, A., Ito, A., Ding, J., Kusumoto, S., Ishida, T., Komatsu, H., Shiotsu, Y., Ueda, R., Iwawaki, T., Imoto, M., & Iida, S. (2012). Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood Cancer Journal*, *2*(7), e79–e79. <https://doi.org/10.1038/bcj.2012.26>.
150. Feldman, H. C., Tong, M., Wang, L., Meza-Acevedo, R., Gobillot, T. A., Lebedev, I., Gliedt, M. J., Hari, S. B., Mitra, A. K., Backes, B. J., Papa, F. R., Seeliger, M. A., & Maly, D. J. (2016). Structural and Functional Analysis of the Allosteric Inhibition of IRE1 α with ATP-Competitive Ligands. *ACS Chemical Biology*, *11*(8), 2195–2205. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00940>.
151. Wang, L., Perera, B. G. K., Hari, S. B., Bhatarai, B., Backes, B. J., Seeliger, M. A., Schürer, S. C., Oakes, S. A., Papa, F. R., & Maly, D. J. (2012). Divergent allosteric control of the IRE1 α endoribonuclease using kinase inhibitors. *Nature Chemical Biology*, *8*(12), 982–989. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1094>.
152. Ranatunga, S., Tang, C. H. A., Kang, C. W., Kriss, C. L., Kloppenburg, B. J., Hu, C. C. A., & Del Valle, J. R. (2014). Synthesis of novel tricyclic chromenone-based inhibitors of IRE-1 RNase activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(10), 4289–4301. <https://doi.org/10.1021/jm5002452>.
153. Papa, F. R., Zhang, C., Shokat, K., & Waiter, P. (2003). Bypassing a Kinase Activity with an ATP-Competitive Drug. *Science*, *302*(5650), 1533–1537. <https://doi.org/10.1126/science.1090031>.
154. Zhao, N., Cao, J., Xu, L., Tang, Q., Dobrolecki, L. E., Lv, X., Talukdar, M., Lu, Y., Wang, X., Hu, D. Z., Shi, Q., Xiang, Y., Wang, Y., Liu, X., Bu, W., Jiang, Y., Li, M., Gong, Y., Sun, Z., ... Chen, X. (2018). Pharmacological targeting of MYC-regulated IRE1/XBP1 pathway suppresses MYC-driven breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(4), 1283–1299. <https://doi.org/10.1172/JCI95873>.
155. Logue, S. E., McGrath, E. P., Cleary, P., Greene, S., Mnich, K., Almanza, A., Chevet, E., Dwyer, R. M., Oommen, A., Legembre, P., Godey, F., Madden, E. C., Leuzzi, B., Obacz, J., Zeng, Q., Patterson, J. B., Jäger, R., Gorman, A. M., & Samali, A. (2018). Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nature Communications*, *9*(1), 3267. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05763-8>.
156. Sheng, X., Nenseth, H. Z., Qu, S., Kuzu, O. F., Frahnnow, T., Simon, L., Greene, S.,

- Zeng, Q., Fazli, L., Rennie, P. S., Mills, I. G., Danielsen, H., Theis, F., Patterson, J. B., Jin, Y., & Saatcioglu, F. (2019). IRE1 α -XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nature Communications*, *10*(1), 323. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08152-3>.
157. Mahoney, D. J., Lefebvre, C., Allan, K., Brun, J., Sanaei, C. A., Baird, S., Pearce, N., Grönberg, S., Wilson, B., Prakesh, M., Aman, A., Isaac, M., Mamai, A., Uehling, D., Al-Awar, R., Falls, T., Alain, T., & Stojdl, D. F. (2011). Virus-Tumor Interactome Screen Reveals ER Stress Response Can Reprogram Resistant Cancers for Oncolytic Virus-Triggered Caspase-2 Cell Death. *Cancer Cell*, *20*(4), 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.005>.
 158. Jiang, D., Lynch, C., Medeiros, B. C., Liedtke, M., Bam, R., Tam, A. B., Yang, Z., Alagappan, M., Abidi, P., Le, Q. T., Giaccia, A. J., Denko, N. C., Niwa, M., & Koong, A. C. (2016). Identification of Doxorubicin as an Inhibitor of the IRE1 α -XBP1 Axis of the Unfolded Protein Response. In *Scientific Reports* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/srep33353>.
 159. Wiseman, R. L., Zhang, Y., Lee, K. P. K., Harding, H. P., Haynes, C. M., Price, J., Sicheri, F., & Ron, D. (2010). Flavonol activation defines an unanticipated ligand-binding site in the kinase-RNase domain of IRE1. *Molecular Cell*, *38*(2), 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.001>.
 160. Hosoi, T., Kume, A., Otani, K., Oba, T., & Ozawa, K. (2010). A unique modulator of endoplasmic reticulum stress-signalling pathways: the novel pharmacological properties of amiloride in glial cells. *British Journal of Pharmacology*, *159*(2), 428–437. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00544.x>.
 161. Lu, P. D., Harding, H. P., & Ron, D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *Journal of Cell Biology*, *167*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408003>.
 162. Obolskiy, D., Pischel, I., Siritwatanametanon, N., & Heinrich, M. (2010). *Garcinia mangostana* L. Ein phytochemisches und pharmakologisches Porträt. In *Zeitschrift für Phytotherapie* (Vol. 31, Issue 2, pp. 110–118). <https://doi.org/10.1055/s-0030-1247648>.
 163. Karim, N., & Tangpong, J. (2018). Biological properties in relation to health promotion effects of *Garcinia mangostana* (queen of fruit): A short report. In *Journal of Health Research* (Vol. 32, Issue 5). <https://doi.org/10.1108/JHR-08-2018-043>.
 164. Liu, Y., Park, J.-M., Chang, K.-H., Chin, Y.-W., & Lee, M.-Y. (2015). α - and γ -mangostin cause shape changes, inhibit aggregation and induce cytolysis of rat platelets. *Chemico-Biological Interactions*, *240*, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.021>.
 165. Li, G., Petiwala, S. M., Yan, M., Won, J. H., Petukhov, P. A., & Johnson, J. J. (2016). Gartanin, an isoprenylated xanthone from the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*), is an androgen receptor degradation enhancer. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*(6), 1458–1469. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600037>.
 166. Johnson, J. J., Petiwala, S. M., Syed, D. N., Rasmussen, J. T., Adhami, V. M., Siddiqui, I. A., Kohl, A. M., & Mukhtar, H. (2012). α -mangostin, a xanthone from mangosteen fruit, promotes cell cycle arrest in prostate cancer and decreases xenograft tumor growth. *Carcinogenesis*, *33*(2), 413–419. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr291>.
 167. Kew Science. (2018). *Plants of the World Online*, *Garcinia mangostana* L. <http://powo.science.kew.org/taxon/428073-1>.
 168. The Plant List. (2012). *Garcinia mangostana* L.

- <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2816978>.
169. Naczek, M., Townsend, M., Zadernowski, R., & Shahidi, F. (2011). Protein-binding and antioxidant potential of phenolics of mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 128(2), 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.017>.
 170. Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., & Pérez-Rojas, J. M. (2008). Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology*, 46(10), 3227–3239. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.024>.
 171. Li, X., Lao, Y., Zhang, H., Wang, X., Tan, H., Lin, Z., & Xu, H. (2015). The natural compound Guttiferone F sensitizes prostate cancer to starvation induced apoptosis via calcium and JNK elevation. *BMC Cancer*, 15(1), 254. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1292-z>.
 172. Janardhan, S., Mahendra, J., Girija, A. S. S., Mahendra, L., & Priyadharsini, V. (2017). Antimicrobial effects of *Garcinia mangostana* on cariogenic microorganisms. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(1), ZC19–ZC22. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22143.9160>.
 173. Li, G., Petiwala, S. M., Pierce, D. R., Nonn, L., & Johnson, J. J. (2013). Selective modulation of endoplasmic reticulum stress markers in prostate cancer cells by a standardized mangosteen fruit extract. *PloS One*, 8(12), e81572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081572>.
 174. Lin, S., Sin, W. L. W., Koh, J.-J., Lim, F., Wang, L., Cao, D., Beuerman, R. W., Ren, L., & Liu, S. (2017). Semisynthesis and Biological Evaluation of Xanthone Amphiphilics as Selective, Highly Potent Antifungal Agents to Combat Fungal Resistance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 31(6–7), acs.jmedchem.7b01348. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01348>.
 175. Kim, S.-J., Hong, E.-H., Lee, B.-R., Park, M.-H., Kim, J.-W., Pyun, A.-R., Kim, Y.-J., Chang, S.-Y., Chin, Y.-W., & Ko, H.-J. (2012). α -Mangostin Reduced ER Stress-mediated Tumor Growth through Autophagy Activation. *Immune Network*, 12(6), 253. <https://doi.org/10.4110/in.2012.12.6.253>.
 176. Matsumoto, K., Akao, Y., Kobayashi, E., Ohguchi, K., Ito, T., Tanaka, T., Iinuma, M., & Nozawa, Y. (2003). Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines. *Journal of Natural Products*, 66(8), 1124–1127. <https://doi.org/10.1021/np020546u>.
 177. Lee, H. N., Jang, H. Y., Kim, H. J., Shin, S. A., Choo, G. S., Park, Y. S., Kim, S. K., & Jung, J. Y. (2016). Antitumor and apoptosis-inducing effects of α -mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen fruit (*Garcinia mangostana* L.) in YD-15 tongue mucoepidermoid carcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(4), 939–948. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2517>.
 178. Huang, W., Liang, Y., & Ma, X. (2019). Alpha-mangostin induces endoplasmic reticulum stress and autophagy which count against fatty acid synthase inhibition mediated apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Cell International*, 19(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0869-z>.
 179. Xu, X.-H., Liu, Q.-Y., Li, T., Liu, J.-L., Chen, X., Huang, L., Qiang, W.-A., Chen, X., Wang, Y., Lin, L.-G., & Lu, J.-J. (2017). Garcinone E induces apoptosis and inhibits migration and invasion in ovarian cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 10718. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11417-4>.
 180. Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI

- search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>.
181. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
 182. Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
 183. Harrington, P. E., Biswas, K., Malwitz, D., Tasker, A. S., Mohr, C., Andrews, K. L., Dellamaggiore, K., Kendall, R., Beckmann, H., Jaeckel, P., Materna-Reichert, S., Allen, J. R., & Lipford, J. R. (2015). Unfolded Protein Response in Cancer: IRE1 α Inhibition by Selective Kinase Ligands Does Not Impair Tumor Cell Viability. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(1), 68–72. <https://doi.org/10.1021/ml500315b>.
 184. Colombano, G., Caldwell, J. J., Matthews, T. P., Bhatia, C., Joshi, A., McHardy, T., Mok, N. Y., Newbatt, Y., Pickard, L., Strover, J., Hedayat, S., Walton, M. I., Myers, S. M., Jones, A. M., Saville, H., McAndrew, C., Burke, R., Eccles, S. A., Davies, F. E., ... Collins, I. (2019). Binding to an Unusual Inactive Kinase Conformation by Highly Selective Inhibitors of Inositol-Requiring Enzyme 1 α Kinase-Endoribonuclease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(5), 2447–2465. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01721>.
 185. Harnoss, J. M., Le Thomas, A., Shemorry, A., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Lu, M., Chen, Y. C. A., Qing, J., Totpal, K., Kan, D., Segal, E., Merchant, M., Reichelt, M., Wallweber, H. A., Wang, W., Clark, K., Kaufman, S., Beresini, M. H., Laing, S. T., ... Ashkenazi, A. (2019). Disruption of IRE1 α through its kinase domain attenuates multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(33), 16420–16429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906999116>.
 186. Korennykh, A. V., Korostelev, A. A., Egea, P. F., Finer-Moore, J., Stroud, R. M., Zhang, C., Shokat, K. M., & Walter, P. (2011). Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1. *BMC Biology*, 9(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-47>.
 187. Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, 17(5–6), 490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P).
 188. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.
 189. Muchtaridi, M., Syahidah, H. N., Subarnas, A., Yusuf, M., Bryant, S. D., & Langer, T. (2017). Molecular docking and 3D-pharmacophore modeling to study the interactions of chalcone derivatives with estrogen receptor alpha. *Pharmaceuticals*, 10(4), 81. <https://doi.org/10.3390/ph10040081>.
 190. Karuranga, S., Fernandes, J. da R., Huang, Y., & Malanda, B. (2017). Le diabète par Région - Europe. In *Atlas du Diabète de la FID* (8e édition, pp. 70–71). https://diabetesatlas.org/IDF_Diabetes_Atlas_8e_interactive_FR/.
 191. Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>.

Liste des Figures

Figure 1. L'organisation des organites à l'intérieur de la cellule.....	1
Figure 2. La biosynthèse protéique.	2
Figure 3. BiP et le cycle ADP/ATP ²	5
Figure 4. La protéine Ire1p au sein du RE.	8
Figure 5. L'épissage d'un intron inconventionnel de l'ARNm <i>HAC1^u</i> ¹¹	9
Figure 6. Le mécanisme de l'épissage inconventionnel de l'ARNm <i>HAC1^u</i> ⁹	10
Figure 7. Le mécanisme d'action de la protéine transmembranaire Ire1p chez <i>S. cerevisiae</i> ¹¹	12
Figure 8. Les facteurs de transcription bZIP17 et bZIP28 ⁴⁶	14
Figure 9. Le modèle proposé pour l'activation protéolytique de bZIP28 ⁵⁰	15
Figure 10. L'interaction de la protéine IRE1 avec les protéines luminales et l'ARNm <i>bZIP60</i> ²²	16
Figure 11. Le facteur de transcription bZIP60 ⁴⁶	17
Figure 12. L'activation du promoteur de <i>BiP</i> par le facteur bZIP60 ³⁷	17
Figure 13. Le mécanisme d'action des facteurs de transcription bZIP28 et bZIP60 ³³	18
Figure 15. Le mécanisme d'activation des facteurs de transcription NAC ⁴⁶	19
Figure 14. A) Acide abscissique ; B) Acide gibbéréllique ; C) Cytokinine.....	19
Figure 16. La réponse végétale au stress environnemental ⁴⁶	20
Figure 17. L'autophagie chez <i>A. thaliana</i> ²²	21
Figure 18. La voie UPR chez les mammifères ³⁴	22
Figure 19. La voie de la protéine PERK ¹¹	24
Figure 20. La voie de la protéine IRE1 ¹¹	25
Figure 21. L'épissage inconventionnel de XBP1 ⁶³	26
Figure 22. La voie Ubiquitine-Protéasome ⁷⁵	26
Figure 23. La structure en tige-boucle de <i>XBP1</i> ⁶³	27
Figure 24. La voie de la protéine ATF6 ¹¹	29
Figure 25. Le transport protéique et l'activité de la voie UPR dans le RE ²	30
Figure 26. Les composants moléculaires de l'UPR conduisant à la signalisation de la mort cellulaire ou de la survie cellulaire ⁸	31
Figure 27. Les voie d'activation de l'apoptose ^{2,8}	32
Figure 28. La voie intrinsèque de l'apoptose ⁷³	34
Figure 29. L'influence de la durée du stress réticulaire sur le destin de la cellule ⁷⁰	35
Figure 30. Récapitulatif de l'activité des trois branches de la voie UPR chez l'homme ¹¹³	37
Figure 31. La voie EOR en réponse aux perturbations homéostatiques ⁷¹	40
Figure 32. La boucle « stress réticulaire-inflammation » dans les cellules spécialisées ²⁰	40
Figure 33. Le repliement oxydatif des protéines ⁶⁹	42
Figure 34. Les mécanismes des maladies cardiovasculaires induites par le stress ER ¹³⁷	43
Figure 35. Le modèle proposé par Zhang K. et Kaufmann R. pour l'activation médiée par l'UPR de la JNK et le facteur NF-κB ⁶⁹	44
Figure 36. La composition cellulaire des plaques d'athérome ⁸⁷	46
Figure 37. L'activation, la rupture de la plaque et la thrombose ⁸⁷	46
Figure 38. Estimation de la prévalence (%) du diabète (20-79 ans) en Europe en 2017 ¹⁹⁰	52
Figure 39. La régulation de l'autophagie via l'axe IRE1/XBP1 ⁹⁸	56
Figure 40. A) La protéine APP, B) clivage normal et anormal de la protéine et C) les conséquences d'un clivage anormal ⁸⁰	58

Figure 41. La voie UPR participe activement à la pathogenèse et à la physiopathologie de la MA ⁷¹	60
Figure 42. La voie UPR participe activement à la pathogenèse et à la physiopathologie de la MP ⁷¹	62
Figure 43. La réponse au stress du RE et la tumorigenèse ⁷¹	67
Figure 44. Le double rôle de l'UPR dans le cancer ¹¹³	68
Figure 45. Les facteurs de stress associés aux tumeurs induisent le stress réticulaire et la voie UPR ¹¹⁰	71
Figure 46. Les biomarqueurs UPR des maladies et les cibles thérapeutiques ⁶⁷	73
Figure 47. Le modèle d'association directe ¹⁸	88
Figure 48. Le modèle de compétition avec BiP ¹⁸	89
Figure 49. Le modèle allostérique ¹⁸	89
Figure 50. Les différentes conformations d'IRE1 ¹⁴³	90
Figure 51. La surface de la structure de l'oligomère 3FBV.....	91
Figure 52. L'activation d'IRE1 ¹⁹¹	92
Figure 53. Le peptide FIRE.....	94
Figure 54. L'alignement des séquences d'acides aminés d'IRE1.....	106
Figure 55. <i>Garcinia mangostana</i> L. ¹⁶⁷	111
Figure 56. La structure 3D de la protéine 6HX1 et le résumé des valeurs de la résolution. ..	116
Figure 57. La structure 3D de la protéine 4PL3 et le résumé des valeurs de la résolution. ...	118
Figure 58. La structure 3D du domaine RNase des protéines 3LJ0 et 2RIO.....	119
Figure 59. Les poses de l'inhibiteur DISA avec 6HX1, avec ou sans liaison covalente.....	127
Figure 60. Docking du 3-méthoxy-6-bromosalicylaldéhyde dans le site actif d'IRE1 α	127
Figure 61. Docking du 3-méthoxy-6-bromosalicylaldéhyde dans le domaine RNase d'IRE1 α	128
Figure 62. La numérotation du squelette xanthonique.....	129
Figure 63. Docking de la garcinone E dans le domaine RNase d'IRE1 α	130
Figure 64. Le pharmacophore 2D des interactions garcinone E-IRE1 α	130
Figure 65. Docking de la garcinone E dans le domaine RNase d'IRE1 α	131
Figure 66. Le pharmacophore 2D des interactions garcinone E-IRE1 α	131
Figure 67. Docking de l' α -mangostin dans le domaine RNase d'IRE1 α	132
Figure 68. Le pharmacophore 2D des interactions α -mangostin-IRE1 α	132
Figure 69. Docking de l' α -mangostin dans le domaine RNase d'IRE1 α	133
Figure 70. Le pharmacophore 2D des interactions α -mangostin-IRE1 α	133
Figure 71. Docking de la cudraxanthone dans le domaine RNase d'IRE1 α	134
Figure 72. Le pharmacophore 2D des interactions cudraxanthone-IRE1 α	134
Figure 73. La pose de l' α -mangostin et la cudraxanthone dans la poche de liaison d'IRE1 α	135
Figure 74. Docking de la cudraxanthone dans le domaine RNase d'IRE1 α	136
Figure 75. Le pharmacophore 2D des interactions cudraxanthone-IRE1 α	136
Figure 76. Le pharmacophore 3D des interactions xanthones-IRE1 α /a.....	139
Figure 77. La droite de régression du Pharmacophore Fit Score en fonction du PLP.Fitness Score dans le modèle murin.....	141

Liste des tableaux

Tableau 1. La nomenclature suivie dans cette étude pour désigner les gènes et les protéines dans les différentes espèces.	12
Tableau 2. Les structures cristallines du domaine cytosolique de la protéine IRE1 α humaine.	115
Tableau 3. L'explication des termes de la PDB.	117
Tableau 4. Les structures cristallines de la protéine IRE1a murine.	117
Tableau 5. Les structures cristallines du domaine cytosolique de la protéine IRE1p de la levure.	119
Tableau 6. Les scores PLP.Fitness (GOLD [®]) des inhibiteurs références de la RNase	126
Tableau 7. Les scores PLP.Fitness (GOLD [®]) des xanthones du mangoustan.....	129
Tableau 8. Les interactions xathones-IRE1 α (6HX1).....	137
Tableau 9. Les interactions xathones-IRE1a (4PL3).....	137
Tableau 10. Les scores Pharmacophore Fit (LigandScout [®]) des xanthones du mangoustan.	140

Annexe

Inhibiteurs des protéines chaperonnes	
OSU03012, MAb159, 17-AAG	
Inhibiteurs ERAD	
Bortézomib, EerI	
Inducteurs du stress	
Tunicamycine, Castanospermine, 1-désoxynojirimycine, Hydropéroxyde de <i>t</i> -butyle, 2-désoxy-D-glucose, DTT, β-mercaptoéthanol, BFA, AMF-26, Golgicide A, A23187, thapsigargine, acide cyclopiazonique, BHQ, Dihydrocélastrol, célastrol, CBD, THC	
Inhibiteurs du stress	
TUDCA, 4-PBA, Vaticanol B, Flurbiprofène	
Modulateurs de PERK	
Inhibiteurs	GSK2606414, GSK2656157, AMG PERK 44, ISRIB,
Activateurs	DHBDC, Icariine, Composés A, B et C
Modulateurs d'ATF6	
Inhibiteurs	Céapine-A1, Céapine-A7, AEBSF, Mélatonine
Activateurs	Apigénine, Baicaléine, Composés 147 et 263
Inhibiteurs de la Kinase IRE1	
Activateurs RNase	APY29, Sunitinib, 1NM-PP1
Inhibiteurs RNase	KIRA 1, UPRM8, GSK2850163, FIRE
Inhibiteurs de la RNase IRE1	
HAA	
Salicyaldéhydes	3,5-diiodosalicyaldéhyde, 3-méthoxy-6-bromosalicyaldéhyde, 3-éthoxy-5,6-dibromosalicyaldéhyde
Naphtaldéhydes	STF083010, A-I06, MKC3946, MKC3987
Coumarines	4μ8c, CB5305630, MKC8866, MKC9989, B-H09, B-I09
Biphényles	Composé 2, OICR464, OICR573
Autres inhibiteurs de la RNase IRE1	
Toyocamycine, Doxorubicine	
Activateurs RNase IRE1	
Quercétine, kaempférol	
Autres modulateurs d'IRE1	
Amiloride, Irestatine, 3,6-DMAD, Resvératrol	

CHAMAS Mohamad

La conception par modélisation moléculaire de nouveaux actifs xanthoniques, inhibiteurs de la protéine IRE1 impliquée dans la voie UPR (Unfolded Protein Response)

RÉSUMÉ

La voie UPR est impliquée dans la régulation systémique du métabolisme protéique, lipidique et glucidique. De plus, cette voie interagit avec de multiples cascades de signalisation impliquées dans la mort cellulaire programmée, l'inflammation, la prolifération, la croissance... Chez les mammifères, les signaux induisant l'UPR sont transduits *via* trois capteurs UPR situés au niveau de la membrane du RE : IRE1, PERK et ATF6. Parmi ceux-ci, la voie médiée par IRE1 est la plus conservée chez les eucaryotes et son inhibition semble être bénéfique dans la lutte contre la progression de certaines pathologies. Dans le domaine médical, la voie UPR est impliquée dans multiples maladies métaboliques, neurodégénératives et inflammatoires chez l'homme.

Cette étude permet de mettre en évidence l'importance de la voie UPR et son implication *via* ces trois branches dans la gravité et la progression de diverses affections pathologiques. De plus, elle montre le nombre restreint, disponible dans la littérature, des modulateurs de la voie UPR. Ce projet permet de mettre en évidence le potentiel des xantones du péricarpe du mangoustan, grâce à une étude d'amarrage *in silico*, en tant qu'inhibiteurs du domaine RNase de la protéine IRE1 α chez l'Homme et IRE1a chez le modèle murin. Cette action inhibitrice pourrait être bénéfique dans diverses pathologies humaines, animales et végétales.

Mots-clés : UPR, IRE1 α , xanthone, Mangoustan, Docking, Pathologie

The design by molecular modelling of new xanthonic active agents, inhibitors of the protein IRE1 involved in the Unfolded Protein Response (UPR) pathway

ABSTRACT

The UPR pathway is involved in the systemic regulation of protein, lipid and carbohydrate metabolism. In addition, this pathway interacts with multiple signalling cascades involved in programmed cell death, inflammation, proliferation, growth... In mammals, the signals inducing UPR are transduced *via* three UPR sensors located in the RE membrane: IRE1, PERK and ATF6. Among these, the pathway mediated by IRE1 is the most conserved in eukaryotes and its inhibition seems to be beneficial in the fight against the progression of certain pathologies. In the medical field, the UPR pathway is involved in multiple metabolic, neurodegenerative and inflammatory diseases in humans.

This study highlights the importance of the UPR pathway and its involvement *via* these three branches in the severity and progression of various pathological conditions. In addition, it shows the limited number available in the literature of modulators of the UPR pathway. Moreover, this project highlights the potential of xantones of the mangosteen pericarp, through an *in-silico* docking study, as inhibitors of the RNase domain of the protein IRE1 α in humans and IRE1a in the murine model. This inhibitory action could be beneficial in various human, animal and plant pathologies.

Keywords: UPR, IRE1 α , xanthone, Mangosteen, Docking, Pathology