ARTICLE

Le protéasome, la seconde vie d'une cible thérapeutique validée : aspects structuraux et nouveaux inhibiteurs

Michèle Reboud-Ravaux*

Sorbonne Université, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), CNRS UMR 8256, Inserm ERL U1164, 7 quai Saint Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France

Reçu le 6 avril 2021

Résumé – Le protéasome est la principale machinerie de dégradation des protéines pour toutes les cellules eucaryotes. Il est en effet impliqué dans une multitude de fonctions physiologiques. Ce rôle central dans l'homéostasie des protéines en fait une cible attractive pour des interventions thérapeutiques variées, des aberrations ayant été observées dans beaucoup de pathologies humaines. Le protéasome constitutif 26S (2,4 MDa) est formé de la particule catalytique 20S qui peut s'associer à une ou deux particules régulatrices 19S. Des analyses structurales remarquables ont permis de comprendre le fonctionnement de ce complexe multicatalytique et la régulation de la dégradation des protéines dépendant de l'ATP et de l'ubiquitine. Des changements conformationnels coordonnés de la particule régulatrice 19S permettent de coupler l'hydrolyse de l'ATP à la translocation du substrat protéique et de réguler l'ouverture du pore de la particule catalytique afin d'initier la dégradation itérative des protéines par les trois types de sites actifs. Une très grande variété d'inhibiteurs de ces activités a été découverte, qu'ils soient synthétiques ou d'origine naturelle, avec un premier succès en 2003 avec le bortezomib utilisé dans le traitement du myélome multiple, puis du lymphome du manteau. Une seconde génération d'inhibiteurs (carfilzomib et ixazomib) est employée en clinique. L'immunoprotéasome, distinct du protéasome constitutif et exprimé de manière prédominante dans les cellules immunitaires, se substitue au protéasome constitutif après induction par l'INF- γ et le TNF- α . Il devient actuellement une cible thérapeutique majeure pour traiter des cancers, des désordres auto-immuns et des troubles neurologiques à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. Les protéasomes de certains microorganismes retiennent également l'attention en vue du développement d'inhibiteurs à visée thérapeutique. Enfin, l'activation du protéasome est une nouvelle approche pouvant aboutir au traitement des désordres protéotoxiques comme les neurodégénérescences.

Mots clés : protéasomes, immunoprotéasome, inhibiteurs, myélome multiple, conception de médicaments

Abstract – The proteasome – structural aspects and inhibitors: a second life for a validated drug target. The proteasome is the central component of the adaptable ubiquitin proteasome system (UPS) discovered in the 1980's. It sustains protein homeostasis (proteostasis) under a large variety of physiological and pathological conditions. Its dysregulation has been often associated to various human diseases. Its potential regulation by modulators has emerged as promising avenue to develop treatments of various pathologies. The FDA approval in 2003 of the proteasome inhibitor bortezomib to treat multiple myeloma, then mantle lymphoma in 2006, has considerably increased the clinical interest of proteasome inhibition. Second-generation proteasome inhibitors (carfilzomib and ixazomib) have been approved to overcome bortezomib resistance and improved toxicity profile and route of administration. Selective inhibition of immunoproteasome is a promising approach towards the development of immunomodulatory drugs. The design of these drugs relies greatly on the elucidation of high-resolution structures of the targeted proteasomes. The ATPase-dependent 26S proteasome (2.4 MDa) consists of a 20S proteolytic core and one or two 19S regulatory particles. The 20S core contains three types of catalytic sites. In recent years, due to technical advances especially in atomic cryo-electron microscopy, significant progress has been made in the understanding of 26S proteasome structure and its dynamics. Stepwise conformational changes of the 19S particle induced by ATP hydrolysis lead to substrate translocation, 20S pore opening and processive protein degradation by the 20S proteolytic subunits ($2\beta 1$, $2\beta 2$ and $2\beta 5$). A large variety of structurally different inhibitors, both natural products or synthetic compounds targeting immuno- and

*Auteur correspondant : michele.reboud@sorbonne-universite.fr

constitutive proteasomes, has been discovered. The latest advances in this drug discovery are presented. Knowledge about structures, inhibition mechanism and detailed biological regulations of proteasomes can guide strategies for the development of next-generation inhibitors to treat human diseases, especially cancers, immune disorders and pathogen infections. Proteasome activators are also potentially applicable to the reduction of proteotoxic stresses in neurodegeneration and aging.

Keywords: proteasomes, immunoproteasome, inhibitors, multiple myeloma, drug design

Abréviations

AAA-ATPase	ATPase associée à diverses activités cellulaires
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Hydrolase catalysant l'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate inorganique
ATP γ S	Adénosine-5'-O-(3-thio)triphosphate
Bax	<i>Bcl-2-like protein 4</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
cPC	Particule catalytique du protéasome constitutif
Cdk	Kinase dépendante de cycline
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique
Da	Dalton
DHFR	Dihydrofolate réductase
Drp1	<i>Dynamin-1-like protein</i>
DUB	Dé-ubiquitinase
DYRK2	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2</i>
ERAD	<i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i>
E2F-1	<i>Target of retinoblastoma protein</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fos1	Facteur de transcription nucléaire
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
IC ₅₀	Concentration d'inhibiteur conduisant à 50 % d'inhibition de l'activité catalytique dans des conditions expérimentales données
iPC	Particule catalytique de l'immunoprotéasome
I- κ B	Inhibiteur du facteur de transmission NF- κ B
IMiD	<i>Immunomodulatory drugs</i>
JNK	<i>c-Jun-amino-terminal kinase</i>
LBVLS	<i>Ligand-based virtual ligand screening</i>
Mfn	<i>Mitofusin</i>
Miro	<i>Mitochondrial Rho GTPase</i>
MoAB	Anticorps monoclonaux
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
p21	<i>Cyclin-dependent inhibitor 1</i>
p27	Inhibiteur de kinase dépendant de la cycline
p53	<i>Tumor protein 53 (tumor suppressor)</i>
PC	Particule catalytique

PDE4	Phosphodiesterase de type 4
PKA	Protéine kinase A
PR	Particule régulatrice
PSD-95	<i>Postsynaptic density protein 95</i>
RE	Réticulum endoplasmique
Rpn	<i>Regulatory particle non-ATPase protein</i>
Rpt	<i>Regulatory particle triple A protein (ATPase)</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SBVL	<i>Structure-based virtual ligand screening</i>
SUP	Système ubiquitine protéasome
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α
Topo II	Topoisomérase de type II
TORC1	<i>Target of rapamycin (TOR) complex 1</i>
TPPII	Tripeptidyl peptidase II
UCH	<i>Ubiquitin carboxy terminal hydrolase</i>
Wnt	<i>Wingless-type</i>

Introduction

Les protéines ont longtemps été considérées comme des constituants biologiques doués d'une grande stabilité. Cependant, dès 1942, la preuve de l'existence d'un état dynamique permanent entre leur synthèse et leur dégradation était apportée (Schoenheimer, 1942). Lors de la croissance cellulaire ou de la croissance des organismes, la biosynthèse des protéines excède leur dégradation alors que dans des conditions défavorables comme le manque de nutriments, la dégradation prend le dessus. Si d'importants efforts ont visé très tôt à élucider les mécanismes de la biosynthèse des protéines, les recherches sur leur dégradation ont été pendant longtemps beaucoup moins actives. Les travaux des années 1950–1970 ont permis d'établir que vitesse de synthèse et vitesse de dégradation des protéines étaient la clé de leur concentration cellulaire. Les protéines individuelles sont dégradées à des vitesses très différentes avec des demi-vies variant de quelques minutes (pour certaines protéines de régulation) à quelques jours (chaîne lourde de la myosine) ou quelques mois (hémoglobine des érythrocytes) (Lecker *et al.*, 2006). La dégradation cellulaire des protéines est réalisée par le système ubiquitine-protéasome (SUP) et par différentes formes de protéasomes ainsi que par le système autophagie-lysosome. Ce dernier dégrade des protéines cytosoliques et celles de grands constituants cellulaires *via* des compartiments, les autophagosomes, qui fusionnent avec les lysosomes (Nakatogawa *et al.*, 2009). En réponse à la dénutrition, la macroautophagie augmente pour recycler en nutriments les composants

intracellulaires. Cependant, la majorité des protéines est dégradée par des complexes appelés collectivement « protéasomes » ou de manière encore plus simplifiée, « le protéasome » (Arrigo *et al.*, 1988). Des complexes protéasomes analogues en taille, forme, composition en polypeptides et activités protéolytiques ont été identifiés dans les trois domaines du vivant (archéobactéries, eucaryotes, vertébrés) (Tanaka *et al.*, 1988; Goldberg, 2007). Une avancée majeure dans la connaissance des processus protéolytiques a été la découverte du rôle essentiel joué par une protéine très conservée de 76 acides aminés, l'ubiquitine, qui se lie par covalence au substrat protéique à dégrader selon un processus dépendant de l'ATP (Ciechanover *et al.*, 1980; Hershko *et al.*, 1980; Wilkinson *et al.*, 1980). L'élucidation du rôle de cette conjugaison à l'ubiquitine, véritable marquage des protéines en vue de leur dégradation, a valu à Irwin Rose, Aaron Ciechanover et Avram Hershko l'attribution du prix Nobel de Chimie en 2004 (Ciechanover, 2005).

Chez les mammifères, le protéasome est donc un système protéolytique extra-lysosomal majeur, présent de manière ubiquitaire dans le noyau et le cytoplasme. Il peut représenter jusqu'à 1–2 % des protéines dans certains organes (foie, testicules). Machinerie de dégradation de plus de 80 % des protéines de courte et de longue durée de vie, il confère un caractère irréversible à certains processus biologiques. Il joue ainsi un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie des protéines et la régulation d'une très grande variété de processus physiologiques, donc dans la vie et la mort cellulaires. Cette multiplicité de rôles et l'implication dans de nombreuses pathologies expliquent la recherche très active d'une modulation de l'activité des protéasomes par des inhibiteurs (et aussi actuellement par des activateurs) en vue de traitements appropriés.

Cet article présente les multiples rôles physiologiques et physiopathologiques du protéasome, l'architecture modulaire des différents types de protéasome, leur mécanisme d'action, la dynamique du fonctionnement moléculaire du protéasome 26S lors de la dégradation de protéines et finalement, les succès thérapeutiques obtenus avec des inhibiteurs du protéasome constitutif. Cependant de nouveaux chapitres du domaine s'ouvrent actuellement. Ainsi, l'inhibition sélective de l'immunoprotéasome est porteuse d'un très grand potentiel clinique pour les désordres auto-immuns et l'inflammation. Les inhibiteurs du protéasome peuvent aussi constituer de nouveaux agents thérapeutiques pour la malaria et le contrôle de divers microorganismes. La découverte de nouveaux médicaments ne s'arrête donc pas à la recherche exclusive de modulateurs de l'activité du protéasome constitutif. Enfin, l'utilisation de la force destructive du protéasome pour dégrader sélectivement des protéines impliquées dans le développement de désordres pathologiques chez l'Homme fait l'objet d'un autre article dans ce même numéro de *Biologie Aujourd'hui* (Reboud-Ravaux, 2021). Ces nouvelles technologies dont celle des emblématiques chimères moléculaires PROTAC (*PRO*teolysis *T*argeting

Chimeras) ouvrent une aire nouvelle pour la découverte de médicaments pouvant révolutionner une partie de la recherche pharmaceutique.

Les protéasomes, machineries de destruction des protéines

La cellule eucaryote contient des millions de molécules de protéasome qui vont assurer la dégradation des protéines dont on n'a plus besoin ou des protéines abîmées ou mal conformées. Cette dégradation peut se faire de manière dépendante ou indépendante de l'ubiquitine. Une schématisation de la voie dépendante de l'ubiquitine est présentée sur la figure 1. Elle comporte deux étapes successives hautement coordonnées : la conjugaison à l'ubiquitine de la protéine à éliminer suivie de sa dégradation en peptides de 2 à 22 acides aminés, catalysée par la particule catalytique (PC) 20S (720 Da) du protéasome constitutif 26S (2,4 MDa). Celui-ci est représenté ici avec deux particules régulatrices (PR) 19S. Les peptides libérés peuvent ensuite être dégradés en acides aminés par des peptidases cellulaires et être réutilisés dans la biosynthèse de protéines. Parmi ces peptidases, la tripeptidyl peptidase II (TPPII) est une peptidase à sérine cytosolique géante (~6 MDa) commune chez les eucaryotes et douée d'une activité exopeptidasique. Des études structurales *in situ* montrent une association spatiale entre la TPPII et les protéasomes. Cette proximité physique facilite la coupure séquentielle des protéines par le protéasome, puis celle des peptides libérés par la TPPII (Fukada *et al.*, 2017). Dans les conditions normales, 80 % des acides aminés sont produits selon cette voie permettant leur recyclage, seulement 20 % étant apportés par la nutrition. Le protéasome est donc nécessaire à l'homéostasie des acides aminés. Une partie des peptides (de 8 à 9 acides aminés) libérés par suite de l'action du protéasome 26S sont des antigènes pouvant être dirigés vers le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I).

Le processus d'attachement de l'ubiquitine à la protéine à dégrader utilise une cascade séquentielle de trois types d'enzymes : les enzymes d'activation de l'ubiquitine dépendant de l'ATP (E1), les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine (E2) et les ubiquitine-protéine ligases E3 (Pickard & Eddins, 2004). Les enzymes E3 peuvent réagir spécifiquement avec une très grande variété de protéines-subsstrats. Plus de 600 d'entre elles sont trouvées dans le génome humain alors que seulement 2 E1 et environ 40 E2 ont été identifiées à ce jour. La reconnaissance des substrats protéiques par les E3 est essentielle pour aboutir à leur dégradation sélective. Elle est réalisée par une variété de motifs peptidiques bien définis, les N- et C-dégrons, découverts respectivement en 1986 et 2018 et situés au niveau des extrémités N- et C-terminales de la protéine à dégrader (Varshavsky, 1991, 2019). Cependant, l'ubiquitylation des protéines n'est pas obligatoire pour une dégradation par le protéasome 26S (cas des protéines c-FOS et p21). Celui-ci peut aussi

Figure 1. Schématisation de la dégradation des protéines par les protéasomes 26S, 20S et l'immunoprotéasome. Le système ubiquitine-protéasome (SUP) nécessite une action hautement coordonnée de ses composants lors de l'ubiquitinylation des protéines à dégrader, de la dé-ubiquitinylation et de la dégradation des protéines. La chaîne de poly-ubiquitine est liée *via* la lysine 48. La dégradation des protéines se fait sans ubiquitinylation préalable lorsqu'elle est catalysée par le protéasome 20S, l'immunoprotéasome et, dans certains cas, par le protéasome 26S.

dégrader des protéines intrinsèquement désordonnées, oxydées ou mal conformées (Figure 1), même si ces dernières sont plutôt considérées comme essentiellement dégradées par le protéasome 20S, donc indépendamment de tout processus d'ubiquitinylation. Il en est de même pour la dégradation des protéines exogènes par l'immunoprotéasome induit par l'interféron gamma (IFN- γ) ou le facteur de nécrose tumorale TNF- α et qui est spécialisé dans la production de peptides antigéniques (Zerfas *et al.*, 2020) (Figure 1). L'immunoprotéasome produit plus de peptides présentant un acide aminé hydrophobe en C-terminal, une caractéristique nécessaire des peptides antigéniques pour leur reconnaissance par le CMH I. Les fonctions de l'immunoprotéasome s'expliquent par des distinctions dans la spécificité de coupure des protéines et les régulations (Winter *et al.*, 2017).

Rôles physiologiques et physiopathologiques multiples des protéasomes

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est exprimé dans toutes les cellules eucaryotes. *Via* ce système, le protéasome 20S et l'immunoprotéasome, des actions essentielles de régulation sont exercées au niveau de

quasiment toutes les voies biologiques du milieu cellulaire (Figure 2). Parmi ces multiples processus, on trouve la progression du cycle cellulaire, la division et la différenciation cellulaires, la transcription, la signalisation, le trafic cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, les immunités innée et adaptative, la régulation de l'expression des gènes et la réponse au stress protéotoxique (Konstantinova *et al.*, 2008). Les protéines mal conformées du réticulum endoplasmique (RE) sont rétrolocalisées dans le cytoplasme, polyubiquitinylées et dégradées par le protéasome selon un processus appelé dégradation de protéines associées au réticulum endoplasmique (ERAD, selon l'abréviation anglaise) (Smith *et al.*, 2011 ; Wu & Rapoport, 2018 ; Wu *et al.*, 2020). La dégradation des protéines par le protéasome est donc vitale pour toutes les cellules et tous les organismes. Cette complexité d'intervention dans la régulation de la dégradation des protéines pour une grande variété de processus physiologiques (Tomko & Hochstrasser, 2013) explique l'implication des protéasomes dans de nombreuses pathologies héritées ou acquises. En effet, le système UPS est fréquemment dérégulé ou défaillant dans des pathologies humaines comme les cancers, les pathologies inflammatoires, les désordres immunologiques et les neurodégénérescences (Schmidt & Finley, 2014 ; Tundo

Figure 2. Résumé des multiples rôles physiologiques ou physiopathologiques joués par les protéasomes. Des exemples de substrats protéiques impliqués sont indiqués.

et al., 2020). À titre d'exemple, l'organisation du Golgi est régulée par la dégradation protéasomale (Eisenberg-Lerner *et al.*, 2020). Plate-forme centrale pour le tri et la régulation du trafic des protéines cellulaires, l'assemblage correct du Golgi est crucial pour l'homéostasie cellulaire. Des perturbations dans sa structure ont été observées dans de nombreux désordres pathologiques allant de la neurodégénérescence au cancer. Ainsi la recherche très active d'inhibiteurs du protéasome et celle plus récente d'activateurs répondent à un souci d'applications thérapeutiques déjà couronné de succès pour les cancers hématologiques (Moreau *et al.*, 2012).

Architecture hiérarchisée et propriétés uniques des protéasomes

Les protéasomes sont constitués d'une PC de 28 sous-unités (720 kDa) en forme de tonneau dite 20S et qui est porteuse des sites actifs catalysant l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines. Elle peut se lier à différents types de particules dites régulatrices ou PR.

Le protéasome 20S. On retrouve des particules de protéasome 20S chez les archéobactéries, certains eucaryotes et les vertébrés (Tanaka *et al.*, 1988; Goldberg, 2007; Kniepert & Groettrup, 2014). Elles présentent beaucoup d'homologie en termes d'architecture globale, de structure quaternaire et de géométrie des sites actifs (Figure 3). Une étape très importante a été l'élucidation de la structure tridimensionnelle des protéasomes 20S par cristallographie aux rayons X pour l'archéobactérie *Thermoplasma acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995), puis la levure (Groll *et al.*, 1997) et le bœuf (Umno *et al.*, 2002). Les structures cristallographiques de la particule catalytique du protéasome constitutif (cPC) et de l'immunoprotéasome (iPC) de souris ont été obtenues en 2012 (Huber *et al.*, 2012). Celles de *Mycobacterium tuberculosis* ont été élucidées en 2006 (Hu *et al.*, 2006) et un peu plus tard celles de *Plasmodium falciparum* l'ont été par cryo-EM et analyse d'une particule unique (Li *et al.*, 2016). Le 20S constitutif humain s'est révélé très difficile à cristalliser et

sa première structure cristallographique ne date que de 2015 (Harshbarger *et al.*, 2015). Les PC sont toutes constituées de deux anneaux de 7 sous-unités α enserrant deux anneaux de 7 sous-unités β . La co-cristallisation des PC avec des inhibiteurs covalents a permis de localiser les sites actifs. Chez les archéobactéries, toutes les sous-unités α sont identiques et il en est de même pour toutes les sous-unités β , ce qui conduit à 14 sites actifs identiques portés par chaque sous-unité β . Au contraire, chez les eucaryotes, toutes les sous-unités α comme toutes les sous-unités β sont distinctes. Seuls trois types de sous-unités β présentent un site actif. Elles sont distinguées par leur capacité d'hydrolyse de substrats peptidiques synthétiques fluorogéniques (Figure 4). Ces sites sont nommés par comparaison avec ceux d'enzymes montrant une activité protéolytique ou une spécificité similaire. Dans le protéasome constitutif, les deux sous-unités β 1c sont dites de type caspase ou post-acide (PA), les deux sous-unités β 2c sont dites de type tryptique (T-L) et les deux sous-unités β 5c sont dites de type chymotryptique (ChT-L). En réalité, vis-à-vis de substrats protéiques naturels, tout type de liaison peptidique sera coupé *in fine* par le protéasome avec seulement quelques préférences. Dans les cellules hématopoïétiques et les cellules stimulées par l'interféron IFN- γ ou le facteur de nécrose tumorale TNF- α , les sous-unités protéolytiques actives β 1c, β 2c et β 5c sont remplacées par de nouvelles sous-unités β 1i [Low Molecular Mass Polypeptide (LMP2)], β 2i (Multicatalytic Endopeptidase Complex-Like, MECL1) et β 5i (LMP7), constituant ainsi la particule iCP de l'immunoprotéasome (Figure 3). À noter que la sous-unité β 1i a une activité chymotryptique, ce qui la distingue de la sous-unité β 1c (Kimura *et al.*, 2015). Le thymoprotéasome possède les mêmes sous-unités β 1i et β 2i que le iCP mais une sous-unité β 5t distincte de β 5i (Murata *et al.*, 2018). Dans le testicule, on trouve très représenté un protéasome spécial, le spermatoprotéasome, ce terme désignant un 20S associé à la particule régulatrice PA200. Il possède une sous-unité spécifique α 4s et les mêmes sous-unités β que le protéasome constitutif (et non celles de l'immunoprotéasome comme suggéré

Figure 3. Les protéasomes 20S des grands domaines du vivant. A noter l'analogie existant en termes de taille, forme, composition en polypeptides et activités protéolytiques. Les sept sous-unités α constituant chaque anneau α sont représentées en gris foncé sauf la sous-unité α_{4s} typique du spermatoprotéasome qui est colorée en violet. Les sous-unités β porteuses d'un site actif sont colorées.

précédemment) (Figure 3) (Uechi *et al.*, 2014). Contrairement aux archées, les anneaux α et β des eucaryotes montrent un repliement identique dû à une grande similarité de séquence. L'analyse de la composition et de l'activité des différentes isoformes de protéasomes est réalisée *in cellulo* par l'utilisation de sondes fluorescentes particulières, mono- ou bifonctionnelles, créées chimiquement et susceptibles d'agir sélectivement sur un type de sous-unité (Verdoes *et al.*, 2010; de Bruin *et al.*, 2016; Zervas & Trader, 2019).

Au cours de l'assemblage des sous-unités pour former l'édifice de 28 sous-unités des PC, seuls trois types de sous-unités β subissent une modification post-traductionnelle par autolyse avec libération d'un propeptide et formation d'une thréonine N-terminale accessible à l'intérieur des sites actifs (Huber & Groll, 2012). Cette Thr1 est impliquée dans le mécanisme catalytique classant le protéasome dans la catégorie des hydrolases à nucléophile N-terminal. Le protéasome a donc la particularité remarquable d'utiliser une thréonine en tant que cataly-

Figure 4. Composition du protéasome 20S eucaryote constitutif. Coupe et agencement des sous-unités α et β. Les sous-unités β comportant un site actif sont colorées en fonction de leur spécificité établie vis-à-vis des petits substrats synthétiques peptidiques. Les sites actifs sont localisés dans la chambre catalytique, elle-même entourée de deux chambres antérieures où les substrats peptidiques peuvent être stockés. La position du pore devant s'ouvrir lors de la translocation des substrats est indiquée. amc : 7-amino-4-méthylcoumarine ; βNA, β-naphtylamine.

seur nucléophile. Autre particularité remarquable, les peptides résultant de la protéolyse des protéines ne sont libérés qu'en dessous de la taille de 22–23 acides aminés. La dégradation des protéines est donc itérative. Ce contrôle de la libération des produits par le CP s'accompagne d'un contrôle à l'accès des substrats. L'association CP-particule régulatrice est impliquée dans ce contrôle en provoquant l'ouverture du pore au niveau des sous-unités α (Figures 4 et 5) selon des mécanismes distincts en fonction de la nature de la particule régulatrice impliquée.

Les particules régulatrices. Le contrôle de l'ouverture du pore permettant l'accès de la protéine à dégrader à la chambre catalytique du 20S est assuré par différentes particules régulatrices qui jouent le rôle d'activateurs. La plus connue est la particule 19S (PA700). Ce constituant du protéasome 26S (Figure 5A) est un complexe dynamique dont la structure cristallographique n'a pu être obtenue. Des études génétiques et biochimiques combinées à la microscopie électronique (et plus récemment à la cryo-microscopie électronique, cryo-EM) et à des modélisations intégratives ont conduit, par reconstruction, à sa structure tridimensionnelle (Lander *et al.*, 2012 ; Lasker *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2016 ; Dong *et al.*, 2019).

La particule 19S (19 sous-unités) est constituée de deux grands sous-complexes qui s'assemblent de manière indépendante : le couvercle formé de 9 sous-unités non-ATPases (Rpn 3, 5–9, 11, 12, 15) et la base constituée de 6 ATPases (Rpt 1–6) et 4 sous-unités non-ATPases (Rpn 1, 2, 10, 13) (Figures 5A et 5B). Les sous-unités Rpn 1, 10 et 13 permettent la fixation initiale de la chaîne de polyubiquitine liée au substrat à dégrader alors que la sous-unité Rpn11 est une dé-ubiquitinase (DUB) pouvant enlever l'ubiquitine (Figure 5B). La sous-unité Usp14 est aussi une DUB associée au 19S, comme la DUB Uch37 (ou UCHL15) non représentée sur la figure 5A. Alors que Rpn11 est une métalloprotéase, Usp14 et Uch37 sont des protéases à cystéine. La fixation d'ATP sur l'anneau formé par les 6 ATPases et son hydrolyse induisent ensuite des changements conformationnels permettant le dépliage du substrat, l'ouverture du pore *via* les sous-unités α2, α3 et α4 (Figures 5B et 5C), puis la translocation du substrat vers la particule 20S. Il existe deux autres particules régulatrices chez les eucaryotes supérieurs, la particule 11S ou PA28 et la particule PA200 (Figure 6A). Contrairement au 19S, elles ne requièrent pas l'intervention d'ATP pour permettre l'ouverture du pore. Leur

Figure 5. Structure et fonctionnement du protéasome 26S. A. Schématisation de la particule 19S associée au protéasome 20S et formée de deux sous-complexes : le couvercle (Rpn 3, 5–9, 11, 12, 15) et la base (Rpt 1–6 {ATPases} et Rpn1, 2 et 13). Sont indiquées les sous-unités ayant une fonction particulière. En rose foncé, les sous-unités Rpn1, 10 et 13 capables de fixer la chaîne d'ubiquitine ; en orange, la dé-ubiquitinase Rpn11 (métalloprotéase) ; en rose clair, la dé-ubiquitinase Usp14 (cystéine protéase) nommée Ubp6 chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'anneau formé par les 6 ATPases est coloré en bleu turquoise. B. Fonctionnement schématisé du protéasome 26S. Le substrat (en jaune) porteur d'une chaîne de poly-ubiquitine (en violet) est déplié à la suite des changements conformationnels coordonnés des ATPases et des sous-unités α . Les sites actifs des six sous-unités catalytiques sont représentés par des pastilles rouges. La chaîne protéique dépliée est alors injectée dans la chambre catalytique du 20S où elle subit une dégradation itérative. C. Schématisation du pore fermé du 20S (avant la complexation avec la particule régulatrice 19S) et du pore ouvert (après complexation). Avant complexation, les extrémités N-terminales des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ obstruent le pore. Les changements conformationnels induits par le fonctionnement des six ATPases situées en regard des sous-unités α conduisent à une interaction entre les extrémités C-terminales des ATPases Rpt1et Rpt6 et les sous-unités de l'anneau α déclenchant l'ouverture du pore.

simple interaction avec un protéasome 20S provoque l'ouverture de celui-ci qui se trouve ainsi stabilisé (Whitby *et al.*, 2000 ; Ortega *et al.*, 2005). La particule PA200, par exemple, possède comme le 19S une extrémité C-terminale conservée de séquence Hb-Y-X (acide aminé hydrophobe-tyrosine-n'importe quel acide aminé). L'insertion de ces motifs dans des poches créées entre les sous-unités α provoque l'activation par ouverture du pore et ceci sans nécessité d'une rotation de ces sous-unités (consommatrice d'ATP) comme dans le cas du 19S (voir le paragraphe « Dynamique des interactions protéasome 26S-substrat »). Des expériences récentes de cryo-EM pour la particule humaine PA200 et son complexe avec la particule 20S fournissent des indications sur la régulation de l'ouverture du pore (Guan *et al.*, 2020) Il existe trois sous-unités régulatrices du 11S : PA28 α , β , γ . L'entité

PA28 α , β est un heptamère inductible localisé dans le cytoplasme alors que PA28 γ est un homoheptamère exprimé de façon constitutive dans le noyau (Finley *et al.*, 2016). Leur expression est augmentée en cas de stress oxydatif (Pickering & Davies, 2012). La particule PA200 jouerait un rôle notamment dans la spermatogenèse (Khor *et al.*, 2006) et l'héritage mitochondrial (Sadre-Bazzaz *et al.*, 2010). La particule $\alpha 4$ s typique du spermatoprotéasome (Figure 3), contrairement à la particule $\alpha 4$, favoriserait l'association au PA200. Elle permettrait aussi le recrutement des sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ plutôt que celles de l'immunoprotéasome (Zhang *et al.*, 2021). Le complexe ainsi formé est essentiel pour la réparation de l'ADN en métaphase I, la progression de la méiose et la fertilité masculine en favorisant, au moins partiellement, la dégradation des histones.

Figure 6. Edifices moléculaires de protéasomes. A. Schématisation de la structure d'un protéasome 20S associé à des particules régulatrices PA28 (11S), 19S ou PA200. B. Les différentes associations 20S-particules régulatrices trouvées en milieu cellulaire.

Hétérogénéité des édifices moléculaires des protéasomes dans les cellules

Différentes associations entre la particule catalytique 20S et les différentes particules régulatrices sont retrouvées dans les cellules (Figures 6A et 6B). Dans les cellules HeLa par exemple, on trouve environ 41 % de protéasome 20S, c'est-à-dire non complexé, 15 % de 20S complexé à une ou deux particule(s) 19S (ce dernier est quelquefois nommé « protéasome 30S »), 24 % de protéasomes hybrides (20S complexé à une particule 11S et une particule 19S), 20 % d'immunoprotéasome (particule 20S de cette forme complexée à une ou deux particule(s) 11S) (Tanahashi *et al.*, 2000). Ces proportions peuvent varier selon le type cellulaire comme cela a été vu pour la distribution du protéasome constitutif, de l'immunoprotéasome et de PA28 chez le rat (Noda *et al.*, 2000). Des expériences *in vitro* de cryo-EM, qui permettent d'atteindre de plus hautes résolutions, ont montré que les préparations de protéasomes 26S sont clairement hétérogènes (Dong *et al.*, 2019). La signification des différences de composition des protéasomes 26S dans les cellules demeure à ce jour largement inconnue. Les protéasomes atypiques qui contiennent à la fois la particule régulatrice

PA200 et la sous-unité $\alpha 4s$, jouent un rôle important dans la fertilité masculine (Zhang *et al.*, 2021). Par ailleurs, dans des neurones cultivés d'hippocampe, la cryo-EM montre que 80 % des molécules de protéasome 26S se trouvent dans la forme appelée parfois « inactive », c'est-à-dire sans substrat lié (Asano *et al.*, 2015). Ce grand excès de protéasomes non liés à des substrats peut certainement être mobilisé dans des conditions de stress comme une privation de nutriments ou un jeûne prolongé (Collins & Goldberg, 2017).

Dynamique des interactions protéasome 26S-substrat

La cryo-EM a permis de déterminer la structure de l'état fondamental du protéasome 26S (résolution quasi atomique) et de la comparer à celle d'états conformationnels adoptés par l'enzyme complexée à un substrat protéique (résolution subnanométrique). Parmi ces travaux remarquables, on peut citer ceux obtenus avec la levure démontrant l'existence de deux (Luan *et al.*, 2016), puis de quatre états conformationnels distincts conservés chez le rat et chez l'Homme (Bard *et al.*, 2018). La continuité spatio-temporelle entre les différents événements impliqués a été disséquée chez la levure (Ding *et al.*, 2017, 2019; Eisele *et al.*, 2018) et chez l'Homme (Chen *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020), permettant de comprendre avec une grande précision les mouvements conformationnels coordonnés au sein du protéasome lors du passage de l'état fermé du pore à son état ouvert (Figure 5C). Cette ouverture est gérée par les interactions entre les sous-unités α localisées à la surface externe du 20S et les extrémités C-terminales des six sous-unités ATPases.

Une illustration concrète des expériences de cryo-EM permettant de suivre l'interaction dynamique d'un substrat protéique avec le protéasome 26S humain a été rapportée par Dong *et al.* (2019). En l'occurrence, le protéasome humain 26S a été traité pendant un temps court par un excès de substrat protéique en présence de 1 mM d'ATP avant l'addition de 1 mM d'ATP γ S, puis la mise en route du processus de cryo-EM. L'ATP γ S (lentement hydrolysé) entre en compétition avec l'ATP pour occuper le site actif des ATPases, ce qui arrête le processus engagé dans n'importe lequel des états conformationnels où se trouve l'édifice macromoléculaire et ceci, avant que la dégradation du substrat n'ait pu se faire. Ainsi, 2 700 000 particules de protéasome ont été étudiées dont 1 500 000 ont été trouvées associées à deux particules 19S. Après classement, sept états conformationnels distincts dans lesquels le substrat est engagé ont été identifiés : deux pour la reconnaissance initiale de l'ubiquitine par le 19S ; un pour un complexe compatible avec une dé-ubiquitylation (la liaison isopeptidique liant le substrat à l'ubiquitine est visible et se trouve à proximité du site actif de la dé-ubiquitinase Rpn11) ; deux états successifs compatibles avec l'initiation de la translocation du substrat (le pore est encore fermé) ; enfin, deux

consécutifs pour la translocation du substrat, le pore étant ouvert. Une continuité spatiotemporelle a ainsi été démontrée entre les processus de reconnaissance de la chaîne de poly-ubiquitine puis de dé-ubiquitinylation du substrat et la translocation de celui-ci impliquant des changements conformationnels induits par l'hydrolyse séquentielle de l'ATP par les 6 ATPases synchronisée à leur interaction avec des sous-unités α du 20S (Lander *et al.*, 2012). Cette synchronisation permet des rotations des ATPases agissant comme une charnière : en interaction avec le substrat, elles permettent à celui-ci de progresser de manière unidirectionnelle dans l'anneau d'ATPases tout en favorisant son dépliement. L'obstruction initiale du pore est réalisée par les extrémités N-terminales des sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (Figure 5C).

Les mécanismes par lesquels les protéines peuvent être ciblées et dégradées par le protéasome 20S en absence d'ubiquitine et de 19S sont moins bien connus. Quel que soit le mode de ciblage, la présence de régions non structurées est un prérequis pour l'initiation de la dégradation du substrat (Saeki, 2017; Yu & Matouschek, 2017). Ce dépliement de la structure protéique serait en soi une façon directe de contrôler la survenue de la dégradation.

Régulation de l'assemblage et de l'activité des protéasomes

Les cellules peuvent survivre en l'absence d'autophagie si les nutriments sont abondants, mutations ou délétions des gènes d'autophagie ne compromettant pas la viabilité cellulaire. Ce n'est pas le cas pour les gènes codant les sous-unités du protéasome. L'activité de celui-ci doit être très finement régulée. Il dégrade en effet des milliers de protéines de durée de vie courte, de protéines régulatrices, de protéines endommagées ou mal conformées, ce qui lui permet d'assurer la régulation d'un grand nombre de fonctions cellulaires (Figure 2). Le fonctionnement du SUP demeure donc important même lorsque les nutriments sont abondants. La protéolyse étant irréversible, les conséquences cellulaires seraient sévères si les protéasomes détruisaient les protéines de manière non sélective ou s'ils fonctionnaient de manière non itérative en libérant des polypeptides partiellement dégradés. Deux types de signaux indiquent que les protéines doivent être dégradées : (a) leur ubiquitinylation, habituellement sous la forme de chaînes d'ubiquitine liées à la Lys-48 (Finley, 2009; Komander & Rape, 2012; Saeki, 2017; Yu & Matouschek, 2017); (b) la présence dans leur conformation de régions non structurées qui sont des initiateurs de dégradation (Prakash *et al.*, 2004; Inobe & Matouschek, 2014).

Depuis la découverte du rôle critique de l'ubiquitine dans le renouvellement des protéines et celle du protéasome 26S dans la dégradation de protéines conjuguées à l'ubiquitine, on a fait au départ l'hypothèse de vitesses de protéolyse régulées uniquement par l'ubiquitinylation. On sait maintenant que l'ubiquitinylation et même l'association des protéines ubiquitinylées au protéasome ne

conduisent pas nécessairement à leur dégradation (Finley, 2009; Inobe & Matouschek 2014; Harrigan *et al.*, 2018). Il existe ce que Collins & Goldberg (2017) ont appelé une « logique du protéasome 26S » qui va déterminer si une protéine ubiquitinylée subira une dégradation ou survivra intacte. Dans une étape initiale réversible, il y a une fixation très affine de la chaîne d'ubiquitine sur les récepteurs à l'ubiquitine du 19S (Rpn1, Rpn10, Rpn13), puis, avec une plus forte affinité, sur la sous-unité Usp14 (protéase à cystéine), ce qui induit des changements conformationnels du 19S (Kim & Goldberg, 2017). La dé-ubiquitinase Usp14 (ainsi que Uch37) agirait avant l'engagement vers la protéolyse par compétition cinétique entre la dé-ubiquitinylation conduisant à la survie cellulaire et l'activation allostérique due aux changements conformationnels qu'elle induit et qui augmentent la probabilité de capture du substrat par les ATPases et ainsi la translocation dans le 20S (Collins & Goldberg, 2017; de Poot *et al.*, 2017; Reboud-Ravaux, 2021). La fixation à l'Usp14 de substrats ubiquitinylés expose aussi le site actif de la Rpn11 et augmente son activité catalytique (Bashore *et al.*, 2015). L'activité de ces deux dé-ubiquitinases est donc coordonnée en empêchant une dé-ubiquitylation prématurée par la Rpn11. Plus récemment, Kim & Goldberg (2018) ont démontré que le domaine *ubiquitin-like* de l'Usp14 peut stimuler l'activation des protéasomes par les protéines ubiquitinylées. Des inhibiteurs de Usp14 augmentent la probabilité de dégradation du substrat (Lee *et al.*, 2010, 2016). L'action de la sous-unité Usp14 est très complexe d'autant plus qu'Usp14 contient, outre son domaine catalytique C-terminal, un domaine N-terminal *ubiquitin-like* (UBL). Ce domaine UBL peut en lui-même stimuler plusieurs fonctions du protéasome.

La présence de régions mal structurées dans les protéines facilite leur élimination. Les protéines ont tendance à devenir plus stables lorsque des complexes multimériques se forment, ce qui, en minimisant des régions ou des domaines moins structurés, peut les protéger de la dégradation protéasomale (McShane *et al.*, 2016). De même l'enzyme DHFR est rapidement dégradée par le protéasome *in vitro* et *in cellulo* alors que, complexée à son inhibiteur méthotrexate hautement affin, elle ne l'est plus (Thrower *et al.*, 2000). La situation est encore rendue plus complexe par la présence de « protéines navettes » contenant un domaine ubiquitine et un domaine associé à l'ubiquitine qui leur permettent de se lier simultanément à des conjugués d'ubiquitine et au 26S (Shi *et al.*, 2016).

Outre ce ciblage sélectif des protéines vers le protéasome, les cellules disposent d'une autre voie pour ajuster la dégradation protéasomale à leur besoin : la régulation de l'abondance de protéasome *via* une expression coordonnée des sous-unités du protéasome et de leur assemblage par des chaperonnes. Les mécanismes complexes de l'assemblage de la particule PC et de la particule régulatrice 19S ne seront qu'évoqués ici. La revue de Rousseau & Bertolotti (2018) explique de manière claire les trois étapes de l'assemblage du PC (formation de l'anneau α , de l'anneau β et dimérisation des demi-protéasomes avec maturation) ainsi

que la formation multi-étapes du 19S avec les assemblages indépendants des deux grands sous-complexes (base et couvercle). L'assemblage de la base est assisté par cinq chaperonnes alors que celui du couvercle s'effectue seul ou sous l'action de facteurs facilitants encore non découverts. L'assemblage du protéasome est donc un processus complexe très régulé, intégré dans le métabolisme cellulaire *via* le complexe régulateur du stress et de la croissance cellulaire TORC1 (Hara *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2002).

La vitesse de dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome dépend également du degré d'activité du protéasome, qui peut être régulé par la phosphorylation de certaines de ses sous-unités (VerPlanck & Goldberg, 2018). Bien que plus de 300 sites de phosphorylation de sous-unités du protéasome aient été détectés (Guo *et al.*, 2017), l'influence de seulement deux protéines kinases a été clairement démontrée. Elles augmentent la capacité du protéasome à dégrader les protéines ubiquitinylées et à promouvoir la dégradation intracellulaire des protéines. Il s'agit de la protéine kinase A (PKA) qui, après une augmentation du cAMP, phosphoryle la sous-unité Rpn6 du 19S (Lokireddy *et al.*, 2015) et de la kinase DYRK2 qui phosphoryle la sous-unité ATPase Rpt3 de ce même 19S (Guo *et al.*, 2016). L'idée simple de l'ubiquitylation comme unique signal de mort des protéines est donc bien obsolète. L'activation du protéasome *in vivo* *via* la voie cAMP-PKA apparaît comme une réponse cellulaire commune à divers stimuli endocrines (glucagon, épinephrine, forskoline) (VerPlanck *et al.*, 2019). Ce processus d'élimination rapide de protéines régulatrices, en éventuelle synergie avec une augmentation de l'expression de nouveaux gènes, peut donc aider les cellules à adapter la composition des protéines à de nouvelles conditions physiologiques. Ainsi, une augmentation de l'activité des protéasomes et de la phosphorylation de la sous-unité Rpn6 est observée dans des cœurs traités à l'épinéphrine, dans des muscles lors de l'exercice musculaire chez l'Homme ainsi que dans des muscles murins excités électriquement. Il en résulte un accroissement rapide de la capacité des tissus cibles à dégrader les protéines régulatrices préexistantes et les protéines mal conformées comme celles endommagées par de l'exercice ou celles impliquées dans des maladies dégénératives, notamment les protéines Tau mutantes (Lokireddy *et al.*, 2015 ; Myeku *et al.*, 2016).

Propriétés catalytiques uniques des protéasomes

Les protéasomes ont l'originalité d'être des protéases à thréonine. La thréonine catalytique étant en position 1, elle intervient de deux façons dans le processus hydrolytique : (a) par sa fonction hydroxyle, attaque nucléophile du carbonyle de la liaison peptidique scissile ; (b) par son groupe α -aminé, catalyse générale acide lors de la coupure du premier intermédiaire tétraédrique (IT1) conduisant à la libération du premier produit, puis catalyse générale basique facilitant l'attaque de la molécule d'eau sur

l'acyl-enzyme (Figure 7A) (Huber *et al.*, 2016). Comme lors de la catalyse de l'hydrolyse des liaisons peptidiques par les protéases à sérine, la libération des deux produits résultant de l'hydrolyse de la liaison peptidique scissile est séquentielle avec formation d'un intermédiaire lié par covalence à l'enzyme, l'acyl-enzyme. Sa formation comme sa coupure nécessitent la formation d'un intermédiaire tétraédrique (IT1, puis IT2) dont l'oxygène chargé négativement est stabilisé par une liaison hydrogène impliquant le groupe NH de la Gly47 dans ce que l'on nomme le trou oxyanion. Le groupe ϵ -aminé de la Lys33 exacerbe la nucléophilie de la fonction alcool de la Thr1 par arrachement de son proton. La charge positive ainsi acquise de la Lys33 est stabilisée par deux liaisons hydrogène impliquant un atome d'oxygène des résidus Arg19 et Asp17 (non représentés sur la Figure 7A). Lors de la biogenèse du protéasome, les sous-unités β 1, β 2 et β 5 possèdent à leur extrémité N-terminale un propeptide qui sera éliminé de manière autocatalytique après la formation des anneaux β . C'est encore la Lys33 qui initie le processus d'attaque nucléophile du propeptide en arrachant un proton au groupe hydroxyle de la Thr1 (Huber *et al.*, 2016). Ce processus d'activation autocatalytique permet la libération des propeptides et l'obtention de la particule 20S pleinement active présentant la thréonine catalytique en position 1 dans les trois types de sites actifs.

Comme habituellement pour les autres protéases, une fixation étendue des substrats protéiques dans les sites actifs des protéasomes est observée. Chaque site actif des sous-unités β 1, β 2 et β 5 apparaît comme une longue crevasse constituée de sous-sites (S1...Sn et S'1...S'n) localisés de part et d'autre du site catalytique porteur de la Thr1 (nomenclature de Schechter & Berger, 1967). Les positions P des acides aminés du substrat sont numérotées à partir de son point de coupure et ont la même numérotation que les sous-sites qu'ils occupent (Figure 7B). Les données cristallographiques (Huber *et al.*, 2012) et l'analyse de la fixation d'une grande variété d'inhibiteurs ont permis d'identifier les différences structurales entre les sous-sites de fixation des substrats pour le cPC et pour l'iPC. Ces données sont importantes pour la conception rationnelle d'inhibiteurs. Le sous-site de reconnaissance S1 de l'immunoprotéasome est plus grand que celui du protéasome constitutif car la Met45, présente à ce niveau, adopte une conformation différente ; le sous-site S3 accommode de petits groupes polaires et non de grands groupes apolaires comme le 20S constitutif. La poche S4 de l'immunoprotéasome a la particularité de présenter une cystéine en position 48.

Myélome multiple et inhibiteurs du protéasome

Depuis 2003, l'utilisation du bortezomib, un inhibiteur du protéasome a considérablement amélioré le traitement et la survie des malades atteints de myélome multiple et de lymphome du manteau (Figure 8A). Deux autres inhibiteurs ont par la suite été mis sur le marché, le carfilzomib

Figure 7. Hydrolyse des protéines catalysée par le protéasome. A. Mécanisme proposé pour l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines. La thréonine catalytique Thr1 est représentée en bleu. Un premier intermédiaire tétraédrique IT1 est formé après l'attaque du carbonyle de la liaison scissile par la fonction hydroxyle de la Thr1 ce qui conduit à la formation d'une acyl-enzyme. Un deuxième intermédiaire tétraédrique IT2 résulte de l'attaque du carbonyle de l'acyl-enzyme par une molécule d'eau. Ces deux intermédiaires chargés négativement sont stabilisés *via* la formation d'une liaison hydrogène entre leur oxygène chargé négativement et le groupe NH de la Gly47 dans le trou oxyanion. B. Représentation schématisée selon [Schechter & Berger \(1967\)](#) de la crevasse du site actif d'un protéasome accommodant la séquence d'une protéine en vue de son hydrolyse. La Thr1 est indiquée ainsi que la liaison sécable. Les acides aminés sont représentés par des rectangles et leurs chaînes latérales sont numérotées respectivement P1-Pn et P1'et Pn' selon que les acides aminés sont en amont ou en aval de la liaison sécable. Les chaînes latérales sont reconnues respectivement par les sous-sites de spécificité S1-Sn et S1'-Sn'. Le sous-site S4 de l'iPC présente une cystéine en position 48. Les sous-sites accommodant les chaînes latérales des acides aminés sont représentés par des croissants gris.

(2012) et l'ixazomib (2016) pour les mêmes indications (Figure 8A). Les inhibiteurs du protéasome sont donc devenus un des piliers de la thérapie du myélome multiple, pathologie représentant 1% des cancers totaux. Ces

inhibiteurs font partie des nombreux agents thérapeutiques nouvellement validés à côté des agents immunomodulateurs IMiD (lénalidomide et pomalidomide, analogues de la thalidomide) et d'anticorps monoclonaux (MoAB) ([Nadeem et al., 2020](#)). Mais malgré ces progrès, cette maladie demeure encore incurable.

L'exceptionnelle sensibilité des cellules plasmatiques de myélome multiple aux inhibiteurs de protéasome est reliée à leur grande dépendance vis-à-vis du système de contrôle de qualité des protéines. Cela repose en grande partie sur les différents mécanismes qui constituent l'ERAD. Les protéines sécrétoires et membranaires mal conformées passent du réticulum endoplasmique au cytosol où elles sont dégradées par le protéasome ([Smith et al., 2011](#)). Le renouvellement des immunoglobulines anormales est très élevé. La présence d'inhibiteurs du protéasome augmentant le nombre de protéines à dégrader, l'accumulation de protéines mal conformées ou dépliées conduit à un stress du réticulum endoplasmique et éventuellement à la mort cellulaire. Du fait de l'implication du protéasome dans un grand nombre de processus biologiques, son inhibition a aussi de multiples effets sur la toxicité cellulaire : diminution de la prolifération cellulaire et induction d'apoptose, arrêt du cycle cellulaire, déficit des mécanismes de réparation de l'ADN et altération du métabolisme cellulaire. Cette inhibition affecte à la fois les constituants cellulaires et non cellulaires du micro-environnement de l'hôte en diminuant l'expression de plusieurs molécules d'adhésion comme ICAM1 et VCAM1, en perturbant l'interaction de cellules de myélome multiple avec les cellules accessoires de la moelle osseuse, en inhibant la sécrétion de cytokines (comme IL6, VEGF, IGF-1) et l'angiogenèse, et en modifiant le renouvellement de l'os et l'activité des ostéoclastes ([Kubiczkova et al., 2014](#); [Nunez & Annuziata, 2017](#); [Nadeem et al., 2020](#)). La plupart de ces effets reposent, au moins en partie, sur l'inhibition directe de la voie NF- κ B, une des voies majeures de survie et de prolifération des cellules de myélome multiple. Ainsi, le bortezomib empêche la dégradation de l'inhibiteur I κ B, ce qui augmente l'efficacité thérapeutique des traitements conventionnels comme la dexaméthasone et le lénalidomide ([Hideshima et al., 2001](#)). La dégradation de régulateurs clés du cycle cellulaire comme p53 (anti-apoptotique) est empêchée. L'accumulation de protéines mal conformées coïncide également avec l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'activation de la voie JNK conduit à celle des caspases, comme les caspases 3 et 7, et oriente vers l'apoptose ([Pérez-Galan et al., 2006](#)).

Le succès thérapeutique des inhibiteurs du protéasome dans les cancers hématologiques a conduit à rechercher de nouvelles indications thérapeutiques. Des essais cliniques de combinaisons thérapeutiques avec d'autres types de molécules sont conduits notamment pour les leucémies, les lymphomes, les tumeurs solides, les maladies auto-immunes et la réaction du greffon contre l'hôte.

Figure 8. Structure chimique des inhibiteurs du protéasome constitutif et de l'immunoprotéasome utilisés en clinique ou en préclinique et leur mécanisme d'action. A. Inhibiteurs du protéasome constitutif : bortezomib, carfilzomib et ixazomib sont utilisés en clinique. Les modes d'administration sont intraveineux (pour le carfilzomib, Kyprolis[®], Proteolyx Inc.), ou, préférentiellement, sous-cutané (pour le bortezomib, Velcade[®], Millenium Pharmaceuticals) ou *per os* (pour la prodrogue MNL2238 qui, par hydrolyse, libérera l'ixazomib, Ninlaro[®], Takeda). Le marizomib et l'oprozomib sont des molécules en étude clinique développées respectivement par Nereus et ONYX Pharmaceuticals. Les sous-sites de sélectivité liant les inhibiteurs sont indiqués. Les boronates conduisent à des inhibitions lentement réversibles alors que les époxycétone et le marizomib entraînent des inhibitions irréversibles. Les époxycétone conduisent à un adduit hexagonal 1,4-morpholine avec le protéasome de levure tandis qu'un adduit cyclique heptagonal 1,4-oxazepane a été mis en évidence avec le protéasome 20S humain. B. Mécanismes d'action sur les protéasomes des boronates (bortezomib, ixazomib), des époxycétone (carfilzomib, oprozomib, ONX-0914 et KZR-616) et du marizomib. C. Inhibiteurs actuellement en étude clinique et agissant sélectivement sur l'immunoprotéasome.

Les différents inhibiteurs du protéasome

Au cours des deux dernières décennies, une recherche très active d'inhibiteurs sélectifs du protéasome s'est mise en place aussi bien aux niveaux universitaires qu'industriels en vue d'obtenir d'une part des outils de recherche, d'autre part des médicaments. Elle a abouti à une grande variété d'inhibiteurs qu'ils soient d'origine naturelle, issus de synthèses organiques ou de criblage de collections de molécules patrimoniales (Borrissenko & Groll, 2007; Genin *et al.*, 2010; Gräwert & Groll, 2012; Huber & Groll, 2012). Ce foisonnement de molécules a permis de passer des aldéhydes peptidiques (premiers inhibiteurs analogues d'inhibiteurs de protéases à sérine dont le bien connu et peu sélectif MG132) à des inhibiteurs du protéasome de structures diverses utilisés aujourd'hui en oncologie (Cromm & Crews, 2017; Manasanch & Orlowski, 2017; Sherman & Li, 2020; Tundo *et al.*, 2020).

Inhibiteurs en clinique et pré-clinique. Comme déjà brièvement souligné plus haut, la recherche d'inhibiteurs du protéasome susceptibles de traiter la cachexie a abouti en fait au premier inhibiteur de protéasome approuvé en 2003 par la FDA dans le traitement du myélome multiple

récidivant ou réfractaire, puis en 2006 dans celui du lymphome du manteau (Kane *et al.*, 2006). Ce premier inhibiteur utilisé en thérapeutique, fruit d'une recherche translationnelle, est le bortezomib (Velcade[®], PS-341) (Figure 8A). Ce boronate dipeptidique cible préférentiellement les sous-unités $\beta 5c$ et $\beta 5i$ avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de 7 et 4 nM et crée un adduit lentement réversible avec la Thr1 (Figure 8B; Tableau 1). Il déclenche des effets secondaires importants (neuropathie périphérique, thrombocytopénie, désordres gastro-intestinaux), qui peuvent cependant être minimisés si une administration sous-cutanée remplace l'administration classique intraveineuse (Moreau *et al.*, 2011). Des inhibiteurs de deuxième génération ont ensuite été mis au point. L'un d'eux, le carfilzomib (Kyprolis[®]), approuvé par la FDA en 2012, est un inhibiteur synthétique irréversible analogue de l'époxomicine, molécule anticancéreuse naturelle pour laquelle des perturbations du système immunitaire avaient été observées et attribuées à l'inhibition du protéasome (Figure 8A). Carfilzomib et époxomicine sont porteurs d'une fonction époxycétone typique, responsable de la sélectivité d'action sur le protéasome. Ils conduisent en effet à des adduits stables

Tableau 1. Caractéristiques des inhibiteurs de protéasome utilisés en clinique ou en cours d'études cliniques.

Inhibiteur	Type chimique	IC ₅₀ (nM)				Réversibilité	Administration
		β5c	β5i	β1c	β2c		
Bortezomib (PS-341)	Boronate	7	4	24–74	1200–4200	t _{1/2} = 110 min ^a	I.V./percutanée
Carfilzomib (PR-171)	Expoxycéton	6	33	2400	3600	Irréversible	I.V.
Ixazomib (MLN9708)	Boronate	3,4	n.i.	31	3500	t _{1/2} = 18 min ^a	Orale
Marizomib (Salinosporamide A)	β-lactone	3,5		430	28	Irréversible	I.V.
Orprozomib (ONX-0912)	Expoxycéton	36	82	–	–	Irréversible	Orale

^a Inhibiteur lentement réversible. Le temps de demi-vie de l'adduit formé entre le groupe réactif de l'inhibiteur et la Thr1 est indiqué en min.

I.V. : administration intraveineuse ; n.i. : non inhibiteur.

avec liens covalents impliquant à la fois la fonction alcool et la fonction α-aminée de la Thr1. Ces adduits ont été identifiés par cristallographie pour la levure (Groll *et al.*, 2000) et l'Homme (Schrader *et al.*, 2016) (Figure 8B). Les effets secondaires du carfilzomib sont moins importants que ceux du bortezomib. Il inhibe lui aussi quasi exclusivement les activités des sous-unités β5c et β5i (IC₅₀ de 6 et 33 nM, respectivement) (Tableau 1). Administré par voie intraveineuse, son temps de demi-vie est court (30 min environ). Le troisième inhibiteur du protéasome utilisé en thérapeutique dans le myélome multiple est un boronate peptidique, l'ixazomib (Ninlaro[®]) (Figures 8A et 8B), qui a l'avantage de pouvoir être administré oralement. Il est libéré sous forme de boronate actif par hydrolyse rapide de la prodrogue MLN9708 (Kupperman *et al.*, 2010). Son temps de demi-vie est un peu plus court que celui du bortezomib. Il inhibe les activités β5c (IC₅₀ de 3,4 nM) et β1c (IC₅₀ de 31 nM) sans effet sur la sous-unité β5i. Deux inhibiteurs du protéasome sont actuellement en phase d'étude clinique : l'époxycéton oprozomib (Ninlaro[®]), une époxycéton presque aussi puissante que le carfilzomib avec des IC₅₀ de 36 nM (β5c) et 82 nM (β5i) (Chauhan *et al.*, 2010) et un produit naturel, la salinosporamide A, issue de la bactérie océanique *Salinospora* CNC-392 et connue sous le nom de marizomib (Figure 8A). Il s'agit du seul inhibiteur non peptidique de faible poids moléculaire possédant des propriétés anticancéreuses. De courte durée de vie (< 15 min), il inhibe de manière irréversible le protéasome : IC₅₀ de 3,4 nM (β5c), de 26 nM (β2c) et 330 nM (β1c) (Figure 8B) (Groll *et al.*, 2006b). Il est aussi en étude clinique pour traiter le glioblastome.

Résistances. Des résistances acquises au bortezomib ont été observées. Par ailleurs, certains types cellulaires peuvent également l'être au carfilzomib, mais de manière inhérente (Lee *et al.*, 2019). Une hyperactivation des activités tryptique (β2) et de type caspase (β1) peut compenser l'inhibition du site chymotryptique (β5). Des nouveaux inhibiteurs tels que le marizomib qui bloquent irréversiblement les trois activités sont susceptibles d'empêcher cette compensation. Des mutations dans la

sous-unité β5 peuvent également être responsables de cette résistance en restreignant l'accès des inhibiteurs au site actif (Huber *et al.*, 2015). Il a été démontré récemment que l'immunoprotéasome peut jouer un rôle important dans la progression de cancers. Il est en effet surexprimé par rapport au protéasome constitutif dans le myélome multiple, le cancer de la prostate et certaines formes de cancers du sein, ce qui facilite la survie de la cellule cancéreuse. La résistance aux inhibiteurs du protéasome constitutif est aussi liée à cette surexpression. L'immunoprotéasome est exprimé en permanence dans le système immunitaire (cellules T, B, thymiques ; macrophages). Il est fortement induit par l'INF-γ et le TNF-α dans quasiment toutes les cellules sauf dans le cerveau où il est confiné à la microglie et aux leucocytes invasifs. Lors d'infections virales, bactériennes ou fongiques, il remplace 90 % du protéasome constitutif. Ceci explique la recherche actuelle très active d'inhibiteurs sélectifs de l'immunoprotéasome pour élucider ses différents rôles et analyser le potentiel de son inhibition en thérapeutique (Sherman & Li, 2020 ; Zervas *et al.*, 2020).

Inhibiteurs de l'immunoprotéasome. L'immunoprotéasome a été associé non seulement à certains types de cancer mais aussi au développement et à la progression des maladies neurodégénératives, à des désordres de l'auto-immunité et à l'inflammation (Figure 9) (Groettrup *et al.*, 2010 ; Zervas *et al.*, 2020). Au niveau cellulaire, deux voies majeures sont impliquées, la sécrétion de cytokines et la différenciation de cellules T *helper*. Ceci suggère que l'immunoprotéasome est une cible thérapeutique dans le traitement des pathologies inflammatoires. Pour améliorer les profils pharmacologiques et toxicologiques, de nouveaux inhibiteurs présentant une sélectivité améliorée pour l'immunoprotéasome ont été développés pour diverses pathologies. Les différences structurales observées chez la souris entre la particule iPC et la particule cPC ont été exploitées (Figure 7B) (Huber *et al.*, 2012). Des inhibiteurs sélectifs des sous-unités β1i, β2i et β5i ont été développés (Zervas *et al.*, 2020). Parmi eux, la molécule PR-957, rebaptisée plus tard ONX 0914, est un inhibiteur époxycéton de la sous-unité β5i de l'iPR (IC₅₀ de 28 nM)

avec une sélectivité augmentée d'un facteur 10 par rapport à $\beta 5c$ (Figure 8C). Sa cocristallisation avec l'iPR a permis de comprendre les bases structurales de cette sélectivité : elle est due à une différence de positionnement de la Met45 dans les deux types de protéasomes (Kniepert & Groettrup, 2014; Xin *et al.*, 2019). La comparaison de l'effet de l'ONX-0914 et d'autres inhibiteurs à celui d'inhibiteurs du cPC a permis de déterminer le bénéfice des inhibiteurs de l'iPC pour combattre les résistances observées avec les inhibiteurs du cPC. Ces études ont été facilitées par le développement de nouveaux outils ou nouvelles techniques d'essais, notamment *in cellulo* (Zerfas *et al.*, 2020). Si les inhibiteurs du protéasome peuvent constituer une nouvelle classe d'anticancéreux en conjonction avec d'autres inhibiteurs du protéasome, ils ont également un grand potentiel pour le traitement des maladies auto-immunes. La molécule KZR-616 (Figure 8C) a une meilleure solubilité que la molécule ONX-0914 et est quarante fois plus efficace. Elle est entrée en phase clinique afin de démontrer son potentiel dans le traitement des désordres de l'auto-immunité (lupus érythémateux) et de maladies inflammatoires (arthrite rhumatoïde) (Johnson *et al.*, 2018). Les travaux de l'équipe de Groettrup (Université de Constance) ont montré qu'un traitement prolongé par l'ONX-0914 conduit à l'inhibition à la fois des sous-unités $\beta 5i$ et $\beta 1i$. Un effet synergique entre l'ONX-0914 et des inhibiteurs sélectifs de $\beta 1i$ (PRN116, LU-001i or ML604440) a démontré que la co-inhibition de $\beta 5i$ et $\beta 1i$ était nécessaire pour bloquer l'auto-immunité (Basler *et al.*, 2018). La molécule ONX 0914 semble aussi d'intérêt pour le traitement de la myocardite virale aiguë (Althof *et al.*, 2018). En empêchant l'activation des cellules B et T, les inhibiteurs de l'immunoprotéasome ont donc un véritable potentiel thérapeutique pour une large gamme de pathologies comme les désordres auto-immuns, le rejet de greffes, les cancers et les dommages tissulaires associés aux infections virales (Schmidt *et al.*, 2018).

Développement d'inhibiteurs non covalents. Tous les inhibiteurs du protéasome constitutif utilisés en thérapeutique et ceux actuellement en clinique sont des entités électrophiles qui réagissent avec la Thr1 des sous-unités catalytiques en créant un adduit lié par covalence. Il en est de même des candidats thérapeutiques visant l'immunoprotéasome (Figures 8A–8C). Or la toxicité des inhibiteurs des protéasomes sera toujours une préoccupation, compte tenu de leur implication dans une très grande variété de fonctions physiologiques. La présence d'une fonction réactive électrophile dans les inhibiteurs covalents est souvent associée à des effets secondaires dus à une réactivité excessive, une instabilité et un manque de sélectivité. En effet, les protéines humaines contiennent de nombreux groupes nucléophiles qui peuvent, par covalence, capturer les groupes électrophiles puissants des inhibiteurs. Au contraire, la fixation non covalente d'un inhibiteur dépourvu de fonction réactive conduit d'une part à une absence de réactions avec des groupes nucléophiles de protéines et d'autre part à des complexes enzyme-inhibiteur de durée de vie limitée favorisant une

Figure 9. L'immunoprotéasome et son inhibition. Quand les cellules sont exposées aux cytokines proinflammatoires (INF- γ et TNF- α), la particule catalytique de l'immunoprotéasome est exprimée. Lors des désordres immunitaires, les auto-antigènes activent les cellules T conduisant à l'apoptose. En présence d'un inhibiteur de l'iPC, la production des cytokines est réduite donc aussi l'inflammation locale ce qui permet d'échapper au déclenchement de la réponse immunitaire. Dans le cancer, des inhibiteurs de l'iPC permettraient de contourner les résistances observées avec les inhibiteurs du cPC comme le bortezomib. Le contrôle de l'expression de l'iPC par des inhibiteurs pourrait (encore controversé) participer au contrôle des dommages dus au vieillissement et aux pathologies neurodégénératives.

distribution tissulaire plus large. Les inhibiteurs non covalents du protéasome peuvent donc constituer une alternative aux inhibiteurs covalents. Notre équipe a utilisé deux grandes stratégies pour découvrir des inhibiteurs non covalents originaux : d'une part l'élaboration rationnelle s'inspirant d'inhibiteurs ou de substrats connus de l'enzyme cible, d'autre part des techniques de criblage : criblage virtuel, criblage *in vitro* ou criblage par cristallographie (Figures 10A–10D). L'inhibiteur cyclopeptidique naturel TMC95A issu du champignon ascomycète *Apiospora montagnei* Sacc. (Koguchi *et al.*, 2000) se lie de manière non covalente et efficace dans le centre actif du protéasome 20S (Groll *et al.*, 2001, 2006a). Sa synthèse complexe en 17 étapes et sa richesse en centres asymétriques étaient défavorables pour une utilisation en thérapeutique. Des mimes cycliques simplifiés, de synthèse moins exigeante, ont été obtenus par l'équipe de Moroder mais restaient peu efficaces (Kaiser *et al.*, 2004; Groll *et al.*, 2006a). Nos mimes linéaires basés sur la séquence tripeptidique du TMC95A (Figure 10 A_a) ont conduit à des inhibiteurs non covalents, d'affinité submicromolaire malgré l'absence d'une conformation cyclique entropiquement favorable, et toxiques pour des cellules cancéreuses (Basse *et al.*, 2007; Groll *et al.*, 2010). Afin d'augmenter à la fois l'efficacité et la sélectivité pour le protéasome, le principe de multivalence exploité de manière ubiquitaire dans la nature (Mammen *et al.*, 1988) a été utilisé puisque la topographie des six sites actifs du protéasome est unique (Figure 9 A_b). Deux têtes inhibitrices dérivées de nos mimes linéaires non covalents ont été liées par un espaceur de longueur contrôlée pour une fixation optimale dans deux sites actifs sélectionnés (Figure 10 A_a) (Maréchal *et al.*, 2012; Desvergne *et al.*, 2013). La co-cristallisation avec le protéasome de levure a démontré que c'est bien la multivalence et non un changement conformationnel qui

est responsable de l'augmentation très importante d'affinité (d'un facteur supérieur à 577) par rapport à l'inhibiteur monovalent. Par marquage fluorescent, la pénétration cellulaire des mimes linéaires du TMC95A a été démontrée (Desvergne *et al.*, 2014). Des modifications structurales ultérieures de ces mimes ont conduit à une inhibition d'un, deux ou trois types d'activités de l'immunoprotéasome et un effet cytotoxique sur cellules cancéreuses (Richy *et al.*, 2018). Des pseudopeptides fluorés (Formicola *et al.*, 2009), des α - et β -hydrazino-pseudopeptides (Bordessa *et al.*, 2013) ou des lipopeptides (Basse *et al.*, 2006) ont aussi été élaborés et synthétisés conduisant à d'autres séries d'inhibiteurs non covalents des protéasomes (Figure 10B). Afin de s'affranchir du caractère peptidique des inhibiteurs et ainsi avoir notamment une meilleure stabilité métabolique, des séries d'inhibiteurs organiques de faible poids moléculaire (< 600 Da) ont été identifiés par un criblage combiné *in silico* et *in vitro* (Basse *et al.*, 2010) (Figure 10C). Le criblage d'une banque de 430 000 molécules organiques a permis de sélectionner 1167 molécules susceptibles de se fixer dans le site actif de la sous-unité $\beta 5$ du protéasome de bœuf, dont 65 se sont révélées être des inhibiteurs efficaces du protéasome humain. Les molécules obtenues ont des structures et des propriétés variées pouvant inhiber un seul ou simultanément deux ou trois type(s) d'activités catalytiques. Parmi celles-ci, la série des 1,2,4-oxadiazoles agissant sélectivement sur le protéasome a été optimisée par synthèse chimique et présente une particularité mécanistique nouvelle : l'inhibiteur se fixe exclusivement dans le sous-site S5 de la sous-unité $\beta 5$ (Maréchal *et al.*, 2013) (Figure 10C). Une sélectivité pour l'immunoprotéasome, confirmée par modélisation moléculaire, a été obtenue pour les sulfonyl pipérazines douées d'une action anti-proliférative de l'invasion tumorale (Villoutreix *et al.*, 2017) (Figure 10C). Un criblage par cristallographie a permis de démontrer une fixation inhabituelle d'un de nos sulfonamides (Figure 10D). Il existe dans cette zone de fixation, située à la jonction des sous-unités $\beta 1$ (sous-site S4) et $\beta 2$ (sous-sites S1 et S1'), une grande différence de structure entre cPC et iPC, ce qui constitue une aide structurale pour une évolution vers de nouveaux inhibiteurs sélectifs de l'iPC (Beck *et al.*, 2015). Le criblage cristallographique a l'avantage de pouvoir détecter la fixation de composés même peu affins et ceci dans des régions qui peuvent être totalement inattendues.

D'autres équipes ont aussi développé des inhibiteurs non covalents parmi lesquels on peut citer des dérivés peptidiques (Furet *et al.*, 2004) et organiques comme les hydroxyurées (Gallastegui *et al.*, 2012), ainsi que les dipeptides modifiés synthétisés par les chercheurs de la firme Millenium (découverte du bortezomib). Il s'agit de dipeptides dont les extrémités N- et C-terminales sont bloquées par des groupes chimiques. Sélectionnés par criblage de grandes bibliothèques de dipeptides, ont été obtenus des inhibiteurs distinguant cCP et iCP (Blackburn *et al.*, 2010a, 2010b) ainsi que des inhibiteurs agissant spécifiquement sur le protéasome de *Mycobacterium tuberculosis* Mtb20S (Lin *et al.*, 2013;

Zhan *et al.*, 2019). Les différences structurales observées entre les sous-sites S1 et S3 de cCP, iCP et Mtb20S ont été exploitées. Le protéasome Mtb20S est une cible thérapeutique car il joue un rôle très important dans la résistance aux stress oxydatif et nitroso-oxydatif de l'hôte humain. Des 1,3,4-oxathiazole-2-ones (Lin *et al.*, 2009) et des dérivés de syringoline (Totaro *et al.*, 2017), eux aussi sélectifs de Mtb20S, se fixent au contraire par covalence sur la Thr1 des sites actifs.

La grande variété des inhibiteurs connus du protéasome. La liste des inhibiteurs connus du protéasome est excessivement longue comme le montrent les différentes revues citées plus haut. Il ne sera donc pas possible dans cette revue d'être exhaustif. L'extrême diversité structurale des inhibiteurs est à mettre en relation avec la faculté dégradative du protéasome sur une infinité de protéines différentes qui, de plus, se fait au niveau de sites actifs étendus non réellement stringents. Ces sites actifs fournissent une grande palette de possibilités de liaison et aussi de mécanismes, qu'il s'agisse d'inhibiteurs mono- ou bivalents. Ils permettent également d'obtenir une sélectivité d'action entre différents protéasomes et, pour un protéasome donné, entre différents sites actifs. On peut citer quelques exemples. Le criblage *in vitro* de collections de molécules naturelles ou synthétiques nous a permis d'identifier des inhibiteurs sélectifs de l'immunoprotéasome (piperlongumine et analogues; Bosc *et al.*, 2018; Figure 9E), de la sous-unité $\beta 1i$ (dérivés de bisbenzimidazole; Koroleva *et al.*, 2015), des sous-unités $\beta 1i/\beta 1c$ ou $\beta 5i/\beta 5c$ avec, dans certains cas, des possibilités d'inhibition covalente par des dérivés de cerpégine (Pham *et al.*, 2012; Hovhannisyan *et al.*, 2013, 2014; Figure 9F). À noter que l'inhibition simultanée de l'activité chymotryptique et de l'activité tryptique ou de l'activité de type caspase augmente l'efficacité inhibitrice du bortezomib ou du carfilzomib dans des cultures de cellules cancéreuses (Britton *et al.*, 2009; Mirabella *et al.*, 2011). Cette co-inhibition peut être réalisée en traitant simultanément par deux inhibiteurs spécifiques ou, de manière plus avantageuse, par des inhibiteurs bivalents comme ceux décrits plus haut. L'intérêt de la co-inhibition est aussi démontrée pour l'immunoprotéasome dans le traitement des maladies auto-immunes (Zerfas *et al.*, 2020).

Le protéasome de *Plasmodium falciparum* a été identifié comme cible valable pour combattre la malaria (Le Chapelain & Groll, 2016). Comme dans le cas de *Mycobacterium tuberculosis*, la reconnaissance par les sous-sites S1 et S3 est essentielle pour une sélectivité d'action par rapport au protéasome humain. La présence de tryptophane dans la vinylsulfone (vs) WLW-vs assure la sélectivité de l'inhibition de la sous-unité $\beta 2$ par rapport à la $\beta 2$ humaine (Li *et al.*, 2014). Un co-traitement WLW-vs/déhydroartémisinine est efficace contre des parasites résistants à l'artémisinine. La vinylsulfone apparentée WLL-vs qui inhibe sélectivement $\beta 2/\beta 5$ a une fenêtre thérapeutique plus large, inhibant aussi *Plasmodium chabaudi* (Li *et al.*, 2016). Récemment, un inhibiteur hautement sélectif a été proposé (Zhan *et al.*, 2021).

Figure 10. Structures d'inhibiteurs du protéasome constitutif et de l'immunoprotéasome. A_a. Mimes linéaires mono- et bivalents non covalents du TMC95A obtenus par élaboration rationnelle. A_b. Représentation schématique du protéasome 20S de levure montrant la symétrie de l'édifice. Les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ sont indiquées, ainsi que les distances entre les oxygènes O $^{\gamma}$ des Thr1 catalytiques. B. Hydrazinopseudo-peptides et dipeptides modifiés non covalents. C. Inhibiteurs non covalents issus d'un criblage *in silico* d'une collection de molécules organiques ayant conduit en particulier à la série des 1,2,4-oxadiazoles se fixant exclusivement dans le sous-site S5 du cCP et à celle des sulfonyle pipérazines présentant une préférence pour l'iCP par rapport au cCP. D. Inhibiteur non covalent détecté par criblage cristallographique se fixant de manière originale sur les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$. E. Quelques inhibiteurs covalents. Les références correspondant à ces différentes structures sont indiquées dans le texte.

Freinage ou augmentation de l'activité du protéasome. Au cours du vieillissement, on note une accumulation de protéines endommagées ou mal repliées alors que, en parallèle, l'activité du protéasome diminue. L'accumulation de protéines redondantes est observée dans les neurodégénérescences et dans beaucoup de cancers. L'augmentation de l'activité du protéasome, encore peu explorée, est reconnue comme une nouvelle approche thérapeutique impliquant différents mécanismes (Njomen & Tepe, 2019). On peut jouer sur les modifications post-translotionnelles : inhibition de la PDE4 pour augmenter le cAMP, activation de la PKA et de l'activité du protéasome *via* la phosphorylation de la sous-unité Rpt6. On peut aussi provoquer l'ouverture du pore du 20S par des petites molécules : petits peptides hydrophobes, imidazoline TCH-165 par exemple. Des manipulations génétiques visant à augmenter l'expression des sous-unités du protéasome ont aussi été conduites.

Autres cibles possibles pour une inhibition. Le blocage des récepteurs à l'ubiquitine ainsi que l'inhibition des déubiquitinasés Rpn11 et Usp14 peuvent efficacement freiner la dégradation des protéines (Lee *et al.*, 2010, 2016 ; Harrigan *et al.*, 2018) (Figure 11). L'inhibition des

DUB se dégage comme une voie thérapeutique émergente de grand intérêt dans beaucoup de pathologies, du cancer à la neurodégénérescence. Il en est de même de l'inhibition des AAA-ATPases, notamment de l'ATPase Rpt6 qui a une structure et un rôle particuliers lors des changements conformationnels.

Le système ubiquitine-protéasome peut avoir une fonction duale dans les pathogenèses virales. Il peut constituer un mécanisme de défense de l'hôte contre l'infection virale, ou, au contraire, être utilisé par les virus pour s'affranchir de ces défenses et augmenter l'infektivité (Luo, 2016). L'élucidation du rôle de ce système dans le cycle cellulaire des coronavirus (Raaben *et al.*, 2010) conduit actuellement à des recherches notamment sur les potentialités des inhibiteurs du protéasome dans une thérapie anti-SARS-CoV-2 visant à réduire l'entrée du virus et l'orage cytokinique (Kircheis *et al.*, 2020a, 2020b ; Longhitano *et al.*, 2020),

Inspiré par les mécanismes des infections virales, le détournement du système UPS par de petites molécules synthétiques pour induire la dégradation sélective par le protéasome d'une protéine donnée est en train de devenir une voie majeure de découverte de nouveaux médicaments (Reboud-Ravaux, 2021).

Actuellement	Dans le futur
<ul style="list-style-type: none"> . Développement de nouveaux inhibiteurs . Traitement du myélome multiple et du lymphome du manteau . Essais cliniques sur les tumeurs solides et autres pathologies . Usage potentiel dans le rejet de greffe 	<ul style="list-style-type: none"> . Développement de combinaisons thérapeutiques . Nouvelles indications (malaria, tuberculose) . Inhibiteurs de l'immunoprotéasome . Modulation immunitaire . Rôle dans les infections virales

Figure 11. L'inhibition des protéasomes : présent et futur.

Conclusion

Le protéasome, machine macromoléculaire de dégradation des protéines, empêche l'accumulation des protéines mal conformées, contrôle le cycle cellulaire et régule la réponse immunitaire, ce qui explique son lien avec des pathologies humaines variées. La caractérisation structurale de ses différentes formes, sa dynamique fonctionnelle et sa régulation demeurent des domaines de recherche très actuels. Les inhibiteurs du protéasome ont conduit à des molécules efficaces dans le traitement des cancers hématologiques en révolutionnant le traitement du myélome multiple et en prolongeant grandement la vie des patients. Ce succès a été facilité par les caractéristiques uniques des cellules plasmatiques transformées. L'extension de l'utilisation des inhibiteurs au traitement de tumeurs solides s'est heurtée à leur toxicité et à l'apparition de résistances sans oublier le passage nécessaire de la barrière hémato-encéphalique pour les cancers cérébraux. Il convient donc de trouver un équilibre entre une inhibition utile et le maintien d'un certain niveau d'activité du protéasome là où elle est nécessaire. Les études fondamentales et cliniques actuelles informent sur les directions à prendre pour élaborer

des molécules contournant ces problèmes, compte tenu de la très grande diversité des participants au système ubiquitine-protéasome. La découverte et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'immunoprotéasome modulant la présentation des antigènes devraient être très actives dans le futur. Des inhibiteurs spécifiques du protéasome sont aussi cliniquement nécessaires dans la crise protéotoxique impliquée dans beaucoup de pathologies humaines. Si l'inhibition irréversible de longue durée est une méthode de choix dans certains cas, notamment dans des thérapies anti-parasitaires, une inhibition plus limitée peut être souhaitable. Un large éventail d'inhibiteurs de structures et mécanismes différents (covalents, non covalents) est donc nécessaire afin de privilégier une sélectivité entre espèces de protéasomes et, pour une espèce donnée, entre sous-sites de types catalytiques différents à cibler soit individuellement, soit simultanément, que ce soit par des inhibiteurs mono- ou bifonctionnels (Figure 11).

Remerciements. Je remercie Madame Sophie Gournet (Plateforme Illustration & Graphisme ; IBPS, Sorbonne Université) qui a réalisé la représentation graphique de tous les édifices moléculaires des protéasomes.

Références

- Althof, N., Goetzke, C.C., Kespohl, M., Pinkert, S., Kaya, Z., Klingel, K., Beling, A. (2018). The immunoproteasome-specific inhibitor ONX-0914 reverses susceptibility to acute viral myocarditis. *EMBO Mol Med*, 10, 200-218.
- Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L., Welch, W.J. (1988). Identity of the 19S "prosome" particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*, 331, 192-194.
- Asano S., Fukada, Y., Beck, F., Aufderheide, A., Förster, F., Danev, R., Baumeister, W. (2015). Proteasomes. A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons. *Science*, 347, 439-442.
- Bajevic, M., Orlowski, R.Z. (2019). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of proteasome inhibitors for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 15, 459-473.
- Bard, J.A.M., Goodall, E.A., Greene, E.R., Jonsson, E., Dong, K. C., Martin, A. (2018). Structure and function of the 26S proteasome. *Ann Rev Biochem*, 87, 697-724.
- Bashore, C., Dambacher, C.M., Goodall, E.A., Matyskiela, M. E., Lander G.C., Martin, A. (2015). Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation by the 26S proteasome. *Nat Struct Mol Biol*, 22, 712-719.
- Basler, M., Lindstrom, M.M., LaStant, J.J., Bradshaw, J.M., Owens, T.D., Schmidt, C., Maurits, E., Tsu, C., Overkleeft, H.S., Kirk, C.J., Langrish, C.L., Groettrup, M. (2018). Co-inhibition of immunoproteasome subunits LMP2 and LMP7 is required to block autoimmunity. *EMBO Rep*, 19, e46512.
- Basse, N., Papapostolou, D., Pagano, M., Reboud-Ravaux, M., Bernard, E., Felten, A.S., Vanderses, R. (2006). Development of lipopeptides for inhibiting 20S proteasomes. *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 3277-3281.
- Basse, N., Piguel, S., Papapostolou, D., Ferrier-Berthelot, A., Richy, N., Pagano, M., Sarthou, P., Sobczak-Thépot, J., Reboud-Ravaux, M., Vidal, J. (2007). Linear TMC-95-based proteasome inhibitors. *J Med Chem*, 50, 2842-2850.
- Basse, N., Montes, M., Maréchal, X., Qin, L., Bouvier-Durand, M., Genin, E., Vidal, J., Villoutreix, B.O., Reboud-Ravaux, M. (2010). Novel organic proteasome inhibitors identified by virtual and in vitro screening. *J Med Chem*, 53, 509-513.
- Beck, P., Reboud-Ravaux, M., Groll, M. (2015). Identification of a β 1/ β 2-specific sulfonamide proteasome ligand by crystallographic screening. *Angew Chem Int Ed Engl*, 4, 11275-11278.
- Blackburn, C., Barrett, C., Blank, J. L., Bruzzese, F.J., Bump, N., Dick, L. R., Fleming, P., Garcia, K., Hales, P., Hu, Z.G., Jones, M., Liu, J.X., Sappal, D. S., Sintchak, M.D., Tsu, C., Gigstad, K.M. (2010a). Optimization of a series of dipeptides with a P3 threonine residue as non-covalent inhibitors of the chymotrypsin-like activity of the human 20S proteasome. *Bioorg Med Chem Lett*, 20, 6581-6586.
- Blackburn, C., Gigstad, K.M., Hales, P., Garcia, K., Jones, M., Bruzzese, F.J., Barrett, C., Liu, J.X., Soucy, T. A., Sappal, D. S., Bump, N., Olhava, E.J., Fleming, P., Dick, L.R., Tsu, C., Sintchak, M.D., Blank, J.L. (2010b). Characterization of a new series of non-covalent proteasome inhibitors with exquisite potency and selectivity for the 20S beta5-subunit. *Biochem J*, 430, 461-476.
- Bordessa, A., Keita, M., Maréchal, X., Formicola, L., Lagarde, N., Rodrigo, J., Bernadat, G., Bauvais, C., Soulier, J.L., Dufau, L., Milcent, T., Crousse, B., Reboud-Ravaux, M., Onger, S. (2013). α - and β -hydrazino acid-based pseudopeptides inhibit the chymotrypsin-like activity of the eukaryotic 20S proteasome. *Eur J Med Chem*, 70, 505-524.
- Borrissenko, L., Groll, M. (2007). 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev*, 107, 687-717.
- Bosc, E., Nastri, J., Lefort, V., Valli, M., Contiguiba, F., Pioli, R., Furlan, M., Bolzani, V.D.S., El Amri, C., Reboud-Ravaux, M. (2018). Piperlongumine and some of its analogs inhibit selectively the human immunoproteasome over the constitutive proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, 496, 961-966.
- Britton, M., Lucas, M.M., Downey, S.L., Screen, M., Pletnev, A. A., Verdoes, M., Tokhunts, R.A., Amir, O., Goddard, A.L., Pelphrey, P.M., Wright, D.L. Overkleeft, H.S., Kisselev, A.L. (2009). Selective inhibitor of proteasome's caspase-like sites sensitizes cells to specific inhibition of chymotrypsin-like sites. *Chem Biol*, 16, 1278-1289.
- Chauhan, D., Singh, A.V., Aujay, M., Kirk, C.J., Bandi, M., Ciccarelli, B., Raje, N., Richardson, P., Anderson, K.C. (2010). A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, 116, 4906-4915.
- Chen, S., Wu, J., Lu, Y., Ma, Y.-B., Lee, B.-H., Yu, Z., Ouyang, Q., Finley, D.J., Kirschner, M.W., Mao, Y. (2016). Structural basis for dynamic regulation of the human 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, 12991-12996.
- Chen, X., Htet, Z.M., López-Alfonzo, E., Martin, A., Walter, K. J. (2020). Proteasome interaction with ubiquitinated substrates: from mechanisms to therapies. *FEBS J*, 19 nov. 2020, 1-21. <https://doi.org/10.1111/febs.15638>.
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, H., Haas, A.L., Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 1365-1368.
- Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 6, 79-87.
- Collins, G.A., Goldberg, A.L. (2017). The logic of the 26S proteasome. *Cell*, 169, 792-806.
- Collins, G.A., Goldberg, A.L. (2020). Proteins containing ubiquitin-like (Ubl) domains not only bind to 26S proteasomes but also induce their activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 117, 4664-4674.
- Cromm, P.M., Crews, C.M. (2017). Targeted protein degradation: from chemical biology to drug discovery. *Cell Chem Biol*, 24, 1181-1190.
- de Bruin, G., Xin, B.T., Kraus, M., van der Stelt, M., van der Marel, G.A., Kisselev, A.F., Driessen, C., Florea, B.I., Overkleeft, H.S. (2016). A set of activity-based probes to visualize human (immuno)-proteasome activities. *Angew Chem Int Ed*, 55, 4199-4203.
- De Poot, A.H., Tian, G., Finley, D. (2017). Meddling with fate: the proteasomal deubiquitinating enzymes. *J Mol Biol*, 429, 3525-3545.
- Desvergne, A., Genin, E., Maréchal, X., Gallastegui, N., Dufau, L., Richy, N., Groll, M., Vidal, J., Reboud-Ravaux, M. (2013). Dimerized linear mimics of a natural cyclopeptide (TMC-95A) are potent noncovalent inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome. *J Med Chem*, 56, 3367-3378.
- Desvergne, A., Cheng, Y., Grosay-Gaudrel, S., Maréchal, X., Reboud Ravaux, M., Genin, E., Vidal J. (2014). Noncovalent fluorescent probes of human immuno- and constitutive proteasomes. *J Med Chem*, 57, 9211-9217.
- Ding, Z., Fu, Z., Xu, C., Wang, Y., Wang, Y., Li, J., Kong, L., Chen, J., Li, N., Zhang, R., Cong, Y. (2017). High-resolution cryo-EM structure of the proteasome in complex with ADP-AlFx. *Cell Res*, 27, 373-385.
- Ding, Z., Xu, C., Sahu, I., Wang, Y., Fu, Z., Huang, M., Wong, C. C.L., Glickman, M.H., Cong, Y. (2019). Structural snapshots of 26S proteasome reveals tetra-ubiquitin-induced conformations. *Mol Cell*, 73, 1150-1161.

- Dong, Y., Zhang, S., Wu, Z., Li, X., Wang, W.L., Zhu, Y., Stoilova-McPhie, S., Lu, Y., Finley, D., Mao, Y. (2019). Cryo-EM structures and dynamics of substrate engaged human 26S proteasome. *Nature*, 565, 49-55.
- Eisele, M.R., Reed, R.G., Rudack, T., Schweizer, A., Beck, F., Nagy, I., Pfeifer, G., Plitzko, J.M., Baumeister, W., Tomko, R.J., Sakata, E. (2018). Expanded coverage of the 26S proteasome conformational landscape reveals mechanisms of peptide gating. *Cell Rep*, 24, 1301-1315.
- Eisenberg-Lerner, A., Benyair, R., Hizkiahou, N., Nudel, N., Maor, R., Kramer, M.P., Shmueli, M.D., Zigdon, I., Cherniavsky Lev M., Ulman, A., Sagiv, J.Y., Dayan, M., Dassa, B., Rosenwald, M., Shachar, I., Li, J., Wang, Y., Dezorella, N., Khan, S., Porat, Z., Shimoni, E., Avinoam, O., Merbl, Y. (2020). Golgi organization is regulated by proteosomal degradation. *Nat Commun*, 11, 409-422.
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Ann Rev Biochem*, 78, 477-513.
- Finley, D., Chen, X., Walters, K.J. (2016). Gates, channels, and switches: elements of the proteasome machine. *Trends Biochem Sci*, 41, 77-93.
- Formicola, L., Maréchal, X., Basse, N., Bouvier-Durand, M., Bonnet-Delpon, D., Milcent, T., Reboud-Ravaux, M., Ongeri, S. (2009). Novel fluorinated pseudopeptides as proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 83-86.
- Fukada, Y., Beck, F., Plitzko, J.M., Baumeister, W. (2017). In situ structural studies of tripeptidyl peptidase II (TPPII) reveal spatial association with proteasomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114, 4412-4417.
- Furet, P., Imbach, P., Noorani, M., Koeppler, J., Laumen, K., Lang, M., Guagnano, V., Fürst, P., Roesel, J., Zimmermann, J., Garcia Echeverria, C. (2004). Entry into a new class of potent proteasome inhibitors having high antiproliferative activity by structure-based design. *J Med Chem*, 47, 4810-4813.
- Gallastegui, N., Beck, P., Arciniega, M., Huber, R., Hillebrand, S., Groll, M. (2012). Hydroxyureas as noncovalent proteasome inhibitors. *Angew Chem Int Ed*, 51, 247-249.
- Genin, E., Reboud-Ravaux, M., Vidal, J. (2010). Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem*, 10, 232-256.
- Goldberg, A.L. (2007). Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans*, 35, 12-17.
- Gräwert, M.A., Groll, M. (2012). Exploiting nature's rich source of proteasome inhibitors as starting points in drug development. *Chem Commun*, 48, 1364-1378.
- Groettrup, M., Kirk, C.J., Basler, M. (2010). Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol*, 10, 73-78.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 386, 463-471.
- Groll, M., Kim, K.B., Kairies, N., Huber, R., Crews, C.M. (2000). Crystal structure of epoxomicin: 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of α' , β' -epoxyketone proteasome inhibitors. *J Am Chem Soc*, 122, 1237-1238.
- Groll, M., Koguchi, Y., Huber, R., Kohn, J. (2001). Crystal structure of the 20S proteasome: TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor. *J Mol Biol*, 311, 543-548.
- Groll, M., Götz, M., Kaiser, M., Weyher, E., Moroder, L. (2006a). TMC-95-based inhibitor design provides evidence for the catalytic versatility of the proteasome. *Chem Biol*, 13, 607-614.
- Groll, M., Huber, R., Potts, B.C.M. (2006b). Crystal structures of Salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in complex with the 20S proteasome reveal important consequences of beta-lactone ring opening and a mechanism for irreversible binding. *J Am Chem Soc*, 128, 5136-5141.
- Groll, M., Gallastegui, N., Maréchal, X., Le Ravalec, V., Basse, N., Richy, N., Genin, E., Huber, R., Moroder, L., Vidal, J., Reboud-Ravaux, M. (2010). 20S Proteasome inhibition: designing noncovalent linear peptide mimics of the natural product TMC-95A. *Chem Med Chem*, 5, 1701-1705.
- Guan, H., Wang, Y., Yu, T., Huang, Y., Li, M., Saeed, A.F.U.H., Perculija, V., Li, D., Xiao, J., Wang, D. (2020). Cryo-EM structures of the human PA200 and PA200-20S complex reveal regulation of proteasome gate opening and two PA200 apertures. *PLOS Biol*, 18, e3000654.
- Guo, X., Wang, X., Wang, Z., Banerjee, S., Yang, J., Huang, L., Dixon, J.E. (2016). Site-specific proteasome phosphorylation controls cell proliferation and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 18, 202-212.
- Guo, X., Huang, X., Chen, M.J. (2017). Reversible phosphorylation of the 26S proteasome. *Protein Cell*, 8, 255-272.
- Hara, K., Maruki, Y., Xiaomeng, L., Ken-ichi, Y., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110, 177-189.
- Harrigan, J.A., Jacq, X., Martin, N.M., Jackson, S.P. (2018). Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nature Rev Drug Discov*, 17, 57-77.
- Harshbarger, W., Miller, C., Diedrich, C., Sacchetti, J. (2015). Crystal structure of the human 20S proteasome in complex with carfilzomib. *Structure*, 23, 418-424.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 1783-1786.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., Anderson, K.C. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 61, 3071-3076.
- Hovhannisyan, A., Pham, T.H., Bouvier, D., Tian, L., Reboud-Ravaux, M., Melikyan, G., Bouvier-Durand, M. (2013). C¹ and N⁵ derivatives of cerpegin: synthesis of a new series based on structure-activity relationships to optimize their inhibitor effect on 20S proteasome. *Bioorg Med Chem Lett*, 23, 2693-2703.
- Hovhannisyan, A., Pham, T.H., Bouvier, D., Piroyan, A., Dufau, L., Qin, L., Cheng, Y., Melikyan, G., Reboud-Ravaux, M., Bouvier-Durand, M. (2014). New C(4)- and C(1)-derivatives of furo[3, 4-c]pyridine-3-ones and related compounds: evidence for site-specific inhibition of the constitutive proteasome and its immunosubunit. *Bioorg Med Chem Lett*, 24, 1571-1580.
- Hu, G., Lin, G., Wang, M., Dick, L., Xu, R.-M., Nathan, C., Li, H. (2006). Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome and mechanism of inhibition by a peptidyl boronate. *Mol Microbiol*, 59, 1417-1428.
- Huber, E., Basler, M., Schwab, R., Heinemeyer, W., Kirk, C.J., Groettrup, M., Groll, M. (2012). Immuno- and constitutive crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell*, 148, 727-738.
- Huber, E.M., Groll, M. (2012). Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development. *Angew Chem Int Ed*, 51, 8708-8720.
- Huber, E., Heinemeyer, W., Groll, M. (2015). Bortezomib-resistant mutant proteasomes: structural and biochemical evaluation with carfilzomib and ONX 0914. *Structure*, 23, 407-417.
- Huber, E., Heinemeyer, W., Li, X., Arendt, C.S., Hochstrasser, M., Groll, M. (2016). A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome. *Nature Commun*, 7, 10900.

- Inobe, T., Matouschek, A. (2014). Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Curr Opin Struct Biol*, 24, 156-164.
- Kaiser, M., Groll, M., Siciliano, C., Assfalg-Machleidt, I., Weyher, E., Kohno, J., Milbradt, A.G., Renner, C., Huber, R., Moroder, L. (2004). Binding mode of TMC-95A analogues to eukaryotic 20S proteasome. *Chem Bio Chem*, 5, 1256-1266.
- Kane, R.C., Farrell, A.T., Sridhara, R., Pazdur, R. (2006). United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res*, 12, 2955-2960.
- Khor, B., Bredemeyer, A.L., Huang, C.-Y., Turnbull, I.R., Evans, R., Maggi, L.B. Jr, White, J.M., Walker, L.M., Carnes, K., Hess, R.A., Sleckman, B.P. (2006). Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol Cell Biol*, 26, 2999-3007.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Siraj, M.A., King, J.E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110, 163-175.
- Kim, H.T., Goldberg, A.L. (2017). The deubiquitinating enzyme Usp14 allosterically inhibits multiple proteasome activities and ubiquitin-independent proteolysis. *J Biol Chem*, 292, 9830-9839.
- Kim, H.T., Goldberg, A.L. (2018). UBL domain of Usp14 and other proteins stimulates proteasome activities and protein degradation in cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115, E11642-E11650.
- Kimura, H., Caturegli, P., Takahashi, M., Suzuki, K. (2015). New insights into the function of the immunoproteasome in immune and nonimmune cells. *J Immunol Res*, 2015, 541984. <https://doi.org/10.1155/2015/541984>.
- Kirchels, R., Haasbach, E., Lueftenegger, D., Heyken, W.T., Ocker, M., Planz, O. (2020a). Potential of proteasome inhibitors to inhibit cytokine storm in critical stage COVID-19 patients. eprint *arXiv*:2008.10404.
- Kirchels, R., Haasbach, E., Lueftenegger, D., Heyken, W.T., Ocker, M., Planz, O. (2020b). NF- κ B pathway as a potential target for treatment of critical stage COVID-19 patients. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.598444>.
- Kniepert, A., Groettrup, M. (2014). The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem Sci*, 39, 17-24.
- Koguchi, Y., Kohno, J., Nishio, M., Takahashi, K., Okuda, T., Ohnuki, T., Komatsubara, S. (2000). TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation, and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 53, 105-109.
- Komander, D., Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Ann Rev Biochem*, 81, 203-229.
- Konstantinova, I.M., Tsimokha, A.S., Mittenberg, A.G. (2008). Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol*, 267, 59-124.
- Koroleva, O.N., Pham, T.H., Bouvier, D., Dufau, L., Qin, L., Reboud-Ravaux, M., Ivanov, A.A., Zhuze, A.L., Gromova, E. S., Bouvier-Durand, M. (2015). Bisbenzimidazole derivatives as potent inhibitors of the trypsin-like sites of the immunoproteasome core particle. *Biochimie*, 108, 94-100.
- Kubiczkova, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., Sevcikova, S. (2014). Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med*, 18, 947-961.
- Kupperman, E., Lee, E.C., Cao, Y., Bannerman, B., Fitzgerald, M., Berger, A., Yu, J., Yang, Y., Hales, P., Bruzzese, F., Liu, J., Blank, J., Garcia, K., Tsu, C., Dick, L., Fleming, P., Yu, L., Manfredi, M., Rolfe, M., Bolen, J. (2010). Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res*, 70, 1970-1980.
- Johnson, H.W.B., Lowe, E., Anderl, J.L., Fan, A., Muchamuel, T., Bowers, S., Moebius, D.C., Kirk, C., McMinn, D.L. (2018). Required immunoproteasome subunit inhibition profile for anti-inflammatory efficacy and clinical candidate KZR-616 ((2*S*, 3*R*)-*N* -((*S*)-3-(cyclopent-1-En-1-Yl)-1-((*R*)-2-methyloxiran-2-Yl)-1-oxopropan-2-Yl)-3-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-((*S*)-2-(2-morpholino-acetamido)propanamido)propanamide). *J Med Chem*, 61, 11127-11143.
- Lander, C.G., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogamls, E., Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*, 482, 186-191.
- Lasker, K., Förster, F., Bohn, S., Walzthoeni, T., Villa, E., Unverdorben, P., Beck, F., Aebersold, R., Sali, A., Baumeister, W. (2012). Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative method. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 1380-1387.
- Le Chapelain, C., Groll, M. (2016) Rational design of proteasome inhibitors as antimalarial drugs. *Angew Chem Int Ed*, 55, 6370-6372.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., Mitch, W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and diseases states. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1807-1819.
- Lee, B.H., Lee, M.J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Che, P.-C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gugi, S.P., Wilson, S.M., King, R.W., Finley, D. (2010). Enhancement of proteasome activity by a small inhibitor of USP14. *Nature*, 467, 179-184.
- Lee, B.H., Lu, Y., Prado, M.A., Shi, Y., Tian, G., Elsasser, S., Gygi, S.P., King, R.W., Finley, D. (2016). USP14 deubiquitinates proteasome-bound substrates that are ubiquitinated at multiple sites. *Nature*, 532, 398-401.
- Lee, M.J., Miller, Z., Park, J.E., Bhattarai, D., Lee, W., Kim, K. B. (2019). H727 cells are inherently resistant to the proteasome inhibitor carfilzomib, yet require proteasome activity for cell survival and growth. *Sci Rep*, 9(1), Article 4089. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40635-1>.
- Li, H., Tsu, C., Blackburn, C., Li, G., Hales, P., Dick, L., Bogyo, M. (2014). Identification of potent and selective non-covalent inhibitors of the *Plasmodium falciparum* proteasome. *J Am Chem Soc*, 136, 13562-13565.
- Li, H., O'Donoghue, A.J., van der Linden, W.A., Xie, S.C., Yoo, E., Foe, I.T., Tilley, L., Craik, C.S., da Fonseca, P.C.A., Bogyo, M. (2016). Structure- and function-based design of *Plasmodium*-selective proteasome inhibitors. *Nature*, 530, 233-236.
- Lin, G., Li, D., de Carvalho, L.P., Deng, H., Tao, H., Vogt, G., Wu, K., Schneider, J., Chidawanyika, T., Warren, J.D., Li, H., Nathan, C. (2009). Inhibitors selective for *Mycobacterium* versus human proteasomes. *Nature*, 461, 621-626.
- Lin, G., Chidawanyika, T., Tsu, C., Warrier, T., Vaubourgeix, J., Blackburn, C., Gigstad, K., Sintchak, M., Dick, L., Nathan, C. (2013). N, C-capped dipeptides with selectivity for *Mycobacterial* proteasome over human proteasomes: role of S3 and S1 binding pockets. *J Am Chem Soc*, 135, 9968-9971.
- Lokireddy, S., Kukushkin, N.V., Goldberg, A.L. (2015). cAMP-induced phosphorylation of 26S proteasomes on Rpn6/PSMD11 enhances their activity and the degradation of misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, E7176-E7185.
- Longhitano, L., Tibullo, D., Giallongo, C. Lazzarino, G., Tartaglia, N., Galimberti, S., Li Volti, G., Palumbo, G.A., Liso, A. (2020). Proteasome inhibitors as a possible therapy for SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci*, 21, 3622-3633.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwicky, P., Baumeister, W., Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 268, 533-539.

- Luan B., Huang, X., Wu, J, Mei, Z., Wang, Y., Xue, X., Yan, C., Wang, J., Finley, D.J., Shi, Y., Wang, F. (2016). Structure of an endogenous yeast proteasome reveals two major conformational states. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, 2642-2647.
- Luo, H. (2016). Interplay between the virus and the ubiquitin-proteasome system: molecular mechanism of viral pathogenesis. *Curr Opin Virol*, 17, 1-10.
- McShane, E., Sin, C., Zauber, H., Wells, J.N., Donnelly, N., Wang, Y., Hou, J., Chen, W., Storchova, Z., Marsh, J.A., Valleriani, A., Selbach, M. (2016). Kinetic analysis of protein stability reveals age-dependent degradation. *Cell*, 167, 803-815.
- Mammen, M., Choi, S.-K., Whitesides, G.M. (1988). Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed*, 37, 2754-2794.
- Manasanch, E.E., Orlowski, R.Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 14, 417-433.
- Maréchal, X., Pujol, A., Richy, N., Genin, E., Basse, N., Reboud-Ravaux, M., Vidal, J. (2012). Noncovalent inhibition of 20S proteasome by pegylated dimerized inhibitors. *Eur J Med Chem*, 52, 322-327.
- Maréchal, X., Genin, E., Qin, L., Sperandio, O., Montes, M., Basse, N., Richy, N., Miteva, M.A., Reboud-Ravaux, M., Vidal, J., Villoutreix, B.O. (2013). 1, 2, 4-Oxadiazoles Identified by virtual screening and their non-covalent inhibition of the human 20S proteasome. *Current Med Chem*, 20, 2351-2362.
- Mirabella, A.C., Pletnev, A.A., Downey, S.L., Florea, B.I., Shabaneh, T.B., Britton, M., Verdoes, M., Filippov, D.V., Overkleeft, H.S., Kisselev, A.F. (2011). Specific cell-permeable inhibitor of proteasome trypsin-like sites selectively sensitizes myeloma cells to bortezomib and carfilzomib. *Chem Biol*, 18, 608-618.
- Moreau, P., Pylypenko, H., Grosicki, S., Karamanesht, I., Leleu, X., Grishunina, M., Rekhman, G., Masliak, Z., Robak, T., Shubina, A., Arnulf, B., Kropff, M., Cavet, J., Esseltine, D.L., Feng, H., Girgis, S., van de Velde, H., Deraedt, W., Harousseau, J.L. (2011). Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomized, Phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol*, 12, 431-440.
- Moreau, P., Richardson, P. G., Cavo, M., Orlowski, R.Z., San Miguel, J.F., Palumbo, A., Harousseau, J.-L. (2012). Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*, 120, 947-959.
- Murata, S., Takahama, Y., Kasahara, M., Tanaka, K. (2018). The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. *Nat Immunol*, 19, 923-931.
- Myeku, N., Clelland, C.L., Emrani, S., Kukushi, N.V., Yu, W.H., Goldberg, A.L. (2016). Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nat Med*, 22, 46-53.
- Nadern, O., Tai, Y.-T., Anderson, K.C. (2020). Immunotherapeutic and targeted approaches in multiple myeloma. *Immunotargets Ther*, 9, 201-215.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 458-467.
- Njomen, E., Tepe, J.J. (2019). Proteasome activation as a new therapeutic approach to target proteotoxic disorders. *J Med Chem*, 62, 6469-6581.
- Noda, C., Tanahashi, N., Shimbara, N., Hendim, K.B., Tanaka, K. (2000). Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes and PA28 in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 277, 348-354.
- Nunez, A.T., Annuziata, C.M. (2017). Proteasome inhibitors: structure and function. *Semin Oncol*, 44, 377-380.
- Ortega, J., Heymann, J.B., Kajava, A.V., Ustrell, V., Rechsteiner, M., Steven, A.C. (2005). The axial channel of the 20S proteasome opens upon binding of the PA200 activator. *J Mol Biol*, 346, 1221-1227.
- Pérez-Galan, P., Roué, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E., Colomer, D. (2006). The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, 107, 257-264.
- Peth, A., Uchiki, T., Goldberg, A.L. (2010). ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation. *Mol Cell*, 40, 7781-7790.
- Pham, T.H., Hovhannisyan, A., Bouvier, D., Tian, L., Reboud-Ravaux, M., Melikyan, G., Bouvier-Durand, M. (2012). A new series of N⁵ derivatives of the 1, 1, 5-trimethyl furo[3, 4-c] pyridine-3, 4-dione (cerpegin) selectively inhibits the post-acid activity of mammalian 20S proteasomes. *Bioorg Med Chem Lett*, 22, 3822-3827.
- Pickard, C.M., Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1695, 55-72.
- Pickering, A.M., Davies, K.J.A. (2012). Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 α β , Pa28 γ and PA200 in the degradation of oxidized proteins. *Arch Biochem Biophys*, 523, 181-190.
- Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E., Matouschek, A. (2004). An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 830-837.
- Raaben, M., Posthuma, C.C., Verheije, M.H., Lintelo, E.G., Kikkert, M., Drijfhout, J.W., Snijder, E.J., Rottier, P.J., de Haan, C.A.M. (2010). The ubiquitin-proteasome system plays an important role during various stages of the coronavirus infection cycle. *J Virol*, 84, 7869-7879.
- Reboud-Ravaux, M. (2021). Dégradation induite des protéines par des molécules PROTAC et stratégies apparentées: développements à visée pharmacologique. *Biol Aujourd'hui*, 215.
- Richy, N., Sarraf, D., Maréchal, X., Janmamode, N., Le Guével, R., Genin, E., Reboud-Ravaux, M., Vidal, J. (2018). Structure-based design of human immuno- and constitutive proteasomes inhibitors. *Eur J Med Chem*, 145, 570-587.
- Rousseau, A., Bertolotti, A. (2018). Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 697-712.
- Sadre-Bazzaz, K., Whitby, F.G., Robinson, H., Formosa, T., Hill, C.P. (2010). Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening. *Mol Cell*, 37, 728-735.
- Saeki, Y. (2017). Ubiquitin recognition by the proteasome. *J Biochem*, 161, 113-124.
- Sanchez-Serrano, I. (2006). Success in translational research: lessons from the development of bortezomib. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 107-114.
- Schechter, I., Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 27, 157-162.
- Schmidt, M., Finley, D. (2014). Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 13-25.
- Schmidt, C., Berger, T., Groettrup, M., Basler, M. (2018). Immunoproteasome inhibition impairs T and B cell activation by restraining ERK signaling and proteostasis. *Front Immunol*, article 02386.
- Schoenheimer, R., The dynamic state of body constituents, Harvard University Press, Cambridge, MA, 1942.

- Schrader, J., Henneberg, F., Ricardo A., Mata, R.A., Tittmann, K., Schneider, T.R., Stark, H., Bourenkov, G., Chari, A. (2016). The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science*, 353, 594-598.
- Sherman, D.J., Li, J. (2020). Proteasome inhibitors: harnessing proteostasis to combat disease. *Molecules*, 25, 671-701.
- Shi, Y., Chen, X., Elsasser, S., Stocks, B.B., Tian, G., Lee, B.H., Shi, Y., Zhang, N., de Poot, S.A.H., Tuebing, F., Sun, S., Vannoy, J., Tarasov, S.G., Engen, J.R., Finley, D., Walters, K.J. (2016). Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science*, 351, aad942.
- Smith, M.H., Ploegh, H.L., Weissman, J.S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 334, 1086-1090.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., Tanaka, K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, 275, 14336-14345.
- Tanaka, K., Yoshimura, T., Kumatori, A., Ichihara, A., Ikai, A., Nishigai, M., Kameyama, K., Takagi, T. (1988). Proteasomes (multi-protease complexes) as 20S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J Biol Chem*, 263, 16209-16217.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19, 94-102.
- Tomko, R.J., Hochstrasser, M. (2013). Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Ann Rev Biochem*, 82, 415-445.
- Totaro, K.A., Barthelme, D., Simpson, P.T., Jiang, X., Lin, G., Nathan, C.F., Sauer, R.T., Sello, J.K. (2017). Rational design of selective and bioactive inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *ACS Infect Dis*, 3, 176-181.
- Tundo, G.R., Sbarella, D., Santoro, A.M., Coletta, A., Oddone, F., Grasso, G., Milardi, D., Lacal, P.M., Marini, S., Purello, R., Graziani, G., Coletta, M. (2020). The proteasome as a druggable target with multiple therapeutic potentialities: cutting and not cutting edges. *Pharm Therap*, 213, 1-66.
- Uechi, H., Hamazaki, J., Murata, S. (2014). Characterization of the testis-specific proteasome subunit $\alpha 4$ s in mammals. *J Biol Chem*, 289, 12365-12374.
- Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., Tsukihara, T. (2002). The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure*, 10, 609-618.
- Varshavsky, A. (1991). Naming a targeting signal. *Cell*, 64, 13-15.
- Varshavsky, A. (2019). N-degron and C-degron pathways of protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116, 358-366.
- Verdoes, M., Willems, L.I., van der Linden, W.A., Duivenvoorden, B.A., van der Marel, G.A., Florea, B.I., Kisselev, A.F., Overkleeft, H.S. (2010). A Panel of Subunit-Selective Activity-Based Proteasome Probes. *Org Biomol Chem*, 8, 2719-2727.
- VerPlanck, J.J.S., Goldberg, A.L. (2018). Regulating protein breakdown through proteasome phosphorylation. *Biochem J*, 474, 3355-3371.
- VerPlanck, J.J.S., Lokireddy, S., Zhao, J., Goldberg, A.L. (2019). 26S Proteasomes are rapidly activated by diverse hormones and physiological states that raise cAMP and cause Rpn6 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116, 4228-4237.
- Villoutreix, B.O., Khatib, A.M., Cheng, Y., Miteva, M.A., Maréchal, X., Vidal, J., Reboud-Ravaux, M. (2017). Blockade of the malignant phenotype by β -subunit selective noncovalent inhibition of immuno- and constitutive proteasomes. *Oncotarget*, 8, 10437-10449.
- Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C.C., Hill, C.P. (2000). Structural basis for the activation of 20 S proteasomes by 11 S regulators. *Nature*, 408, 115-120.
- Wilkinson, K.D., Urban, M.K., Haas, A.L. (1980). Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*, 255, 7529-7532.
- Winter, M.B., La Greca, F., Arastu-Kapur, S., Caiazza, F., Cimerancic, P., Buchholz, T.J., Anderl, J.L., Ravalin, M., Bohn, M.F., Sali, A., O'Donoghue, A.J., Craik, C. (2017). Immunoproteasome functions explained by divergence in cleavage specificity and regulation. *eLife*, 6, e27364.
- Wu, X., Rapoport, T.A. (2018). Mechanistic insights into ER-associated protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*, 53, 22-28.
- Wu, X., Siggel, M., Ovchinnikov, S., Mi, W., Svetlov, V. (2020). Structural basis of ER-associated protein degradation mediated by Hrd1 ubiquitin ligase complex. *Science*, 368, 6489, eaaz2449.
- Xin, B.T., Huber, E.M., de Bruin, G., Heinemeyer, W., Mauritis, E., Espinal, C., Du, Y., Janssens, M., Weyburne, E.S., Kisselev, A.F., Florea, B.I., Driessen, C., van der Marel, G.A., Groll, M., Overkleeft, H.S. (2019). Structure-based design of inhibitors selective for human proteasome $\beta 2c$ or $\beta 2i$ subunits. *J Med Chem*, 62, 1626-1642.
- Yu, H., Matouschek, A. (2017). Recognition of client proteins by the proteasome. *Ann Rev Biophys*, 46, 149-173.
- Zhan, W., Hsu, H.-C., Morgan, T., Ouellette, T., Burns-Huang, K., Hara, R., Wright, A.G., Meinke, P.T., Foley, M., Nathan, C.F., Li, H., Lin, G. (2019). Selective phenylimidazole-based inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *J Med Chem*, 62, 9246-9253.
- Zhan, W., Zhang, H., Ginn, J., Leung, A., Liu, Y.J., Michino, M., Toita, A., Okamoto, R., Wong, T.T., Imaeda, T., Hara, R., Yukawa, T., Chelebieva, S., Tumwebaze, P.K., Lafuente-Monasterio, M.J., Martinez-Martinez, M.S., Vendome, J., Beuming, T., Sato, K., Aso, K., Rosenthal, P.J., Cooper, R. A., Meinke, P.T., Nathan, C.F., Kirkman, L.A., Lin, G. (2021). Development of a highly selective *Plasmodium falciparum* proteasome inhibitor with anti-malaria activity in humanized mice. *Angew Chem Int Ed Engl*, Jan 12. <https://doi.org/10.1002/ange.202015845>.
- Zhang, Z.-H., Jiang, T.-X., Chen, L.-B., Zhou, W., Liu, Y., Gao, F., Qiu, X.-B. (2021). Proteasome subunit $\alpha 4$ s is essential for formation of spermatoproteasomes and histone degradation during meiotic DNA repair in spermatocytes. *J Biol Chem*, 296, 1-14.
- Zerfas, B.L., Trader, D.J. (2019). Monitoring the immunoproteasome in live cells using an activity-based peptide-peptoid hybrid probe. *J Am Chem Soc*, 141, 525.
- Zerfas, B.L., Maresh, M.E., Trader, D.J. (2020). The immunoproteasome : an emerging target in cancer and autoimmune and neurological disorders. *J Med Chem*, 63, 1841-1858.