

Quantification par ELISA du proteasome 20S sérique et intracellulaire dans une population Marocaine saine

[Quantification by ELISA of serum and intracellular 20S proteasome in a healthy Moroccan population]

Hassan FILALI¹, Asmaa QUESSAR², Laurent HENRY³, Nadia TAHIRI-JOUTI⁴, Mohamed Nabil BENCHEKROUN¹, Said EL ANTRI¹, and Souad ABOUDKHIL¹

¹Laboratoire de Biochimie, Environnement et d'agroalimentaire (URAC 36),
Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia,
Université Hassan II Mohammedia Casablanca, Morocco

²Service Hématologie et Oncologie Pédiatrique,
Hôpital 20 Aout Casablanca,
Centre Hospitalier Universitaire IBN ROCHD Casablanca, Morocco

³Laboratoire de Biologie Cellulaire et de Cytogénétique Moléculaire,
Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes, France

⁴Laboratoire Anatomie Pathologique,
Faculté de médecine et de pharmacie Casablanca,
Université Hassan II Aïn Chock, Morocco

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The failure of the protein degradation machinery namely «the ubiquitin -proteasome pathway " is involved in the onset of various diseases. In particular with different forms of cancer, related to the degradation of proteins such as transcription factors, regulators cell cycle proteins or tumor suppressors. Mainly localized in the nucleus and cytoplasm of cells, the proteasome can be detected in the cell culture supernatant or in the peripheral blood (plasma or serum) of patients. The aim of this work is to confirm a significant presence of circulating proteasome (1264 ± 601 ng/ml) compared to the intracellular concentration (2948.7 ± 223 ng / ml) in a healthy Moroccan population ($n = 62$) by sandwich ELISA essay . This study led to the identification of a strong link between the level of proteasome detected in the serum as well as the intracellular level with the age of individuals. These results open new possibilities to consider and allow the identification of this assay as a marker of predisposition to certain diseases in the elderly.

KEYWORDS: Proteasome 20S, Moroccan healthy patients, age, Sandwich ELISA.

RESUME: La défaillance de la machinerie de dégradation des protéines à savoir " la voie Ubiquitine-protéasome » est impliquée dans l'apparition de différentes pathologies. Notamment différentes formes de cancer, liées à la dégradation des protéines, telles que les facteurs de transcription, les régulateurs du cycle cellulaire ou de protéines supprimeurs de tumeurs. Principalement localisé au niveau du noyau et du cytoplasme des cellules, le Protéasome peut être détecté dans le surnageant de culture cellulaire ou dans le sang périphérique (plasma & sérum) des patients. L'objectif de ce travail est de confirmer une présence significative du protéasome 20S circulant (1264 ± 601 ng/ml), par rapport à la concentration intracellulaire ($2948,7 \pm 223$ ng/ml) chez une population marocaine saine ($n= 62$) par un test ELISA en sandwich. Cette étude

a conduit à l'identification d'un fort lien entre le niveau du proteasome détecté aussi bien dans le sérum qu'à l'échelle intracellulaire avec l'âge des individus. Ces résultats ouvrent de nouvelles pistes qui permettent d'envisager l'utilisation du protéasome comme marqueur de prédisposition à certaines pathologies chez les personnes âgées.

MOTS-CLEFS: Protéasome 20S, patients marocains sains, âge, ELISA en Sandwich.

1 INTRODUCTION

Le vieillissement est un processus complexe qui dépend de plusieurs facteurs biologiques. Les progrès de la recherche ont permis de reconnaître le rôle important des facteurs génétiques, des altérations du fonctionnement cellulaire ou de systèmes de protection contre l'oxydation, ou encore le rôle des modifications du métabolisme protéique telle la glycation non enzymatique. Les protéines sont en effet la cible de diverses modifications post-traductionnelles (oxydation, glycation, conjugaison avec des produits issus de la peroxydation lipidique) [1]. Les cellules eucaryotes utilisent deux principaux moyens pour éliminer les organites et les molécules (en particulier les protéines) devenues inutiles ou nocives: l'autophagie et le système Ubiquitine-Protéasome [2]. L'accumulation de protéines endommagées avec l'âge, et l'augmentation de la demi-vie des protéines, pose le problème en général d'un relâchement de leur contrôle de qualité, en particulier une réduction de l'efficacité du système protéasomique [3], [4].

La machinerie protéolytique Ubiquitine-Protéasome assure un contrôle-qualité dans la cellule en dégradant les protéines produites en excès, défectueuses ou mal repliées suite à des mutations génétiques ou un stress oxydatif, qui tendent à former des agrégats néfastes pour la cellule [5], [6].

Le complexe catalytique Ubiquitine-Protéasome est un complexe multimérique de 2500 kDa. Il est formé d'un cœur catalytique : le protéasome 20S, qui renferme les sites protéolytiques, associé à un complexe régulateur appelé complexe 19S ou PA700 [7]. Présent à la fois dans le cytoplasme et le noyau, le protéasome catalyse la dégradation rapide de différentes enzymes (Cdc 25 phosphatase, Tyrosine aminotransferase TAT, Topoisomérase I et II α), de régulateurs de transcription (Ik-B et β -Catenine, et le précurseur de NF- κ B), de protéines intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire. Il contrôle aussi l'activité d'oncogènes (C-fos/C-Jun, C-myc, N-myc) ou de gènes suppresseurs de tumeurs (p53 et p73) [7], [8].

Le protéasome participe ainsi à la régulation de nombreux processus biologiques : la régulation du cycle cellulaire (par la dégradation des protéines p21 et p27), de l'apoptose, de la transcription, de la présentation de l'antigène, de la transduction des signaux, du contrôle de l'intégrité des protéines.

Etant donnée la diversité des protéines ciblées par cette voie de dégradation (Ub-Pr) et l'importance des fonctions cellulaires concernées, il n'est pas surprenant que des anomalies de cette voie soient à l'origine de nombreuses pathologies, comme certains cancers [9], des maladies génétiques, une grande partie des maladies neuro-dégénératives [10] et musculaires, ainsi que des pathologies immunes et inflammatoires [11]. Le protéasome, suscite actuellement un intérêt majeur comme un nouveau marqueur dans différentes pathologies [12], [13]. Des études antérieures ont montré que la concentration du proteasome est élevée chez des patients atteints de maladie auto-immune systémique. Les patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs, de cancers solides [14], ou d'un carcinome cellulaire rénal [15] affichent des niveaux de proteasome circulant bien plus élevés que celui observé chez les control.

En effet, d'après plusieurs travaux [14], [16] l'utilisation systématique du protéasome comme marqueur pourrait permettre un meilleur diagnostic, la stratification du risque, et l'identification des patients avec une plus grande probabilité de réponse à la thérapie ciblée.

La population âgée est caractérisée par une grande hétérogénéité. En effet, les conséquences du vieillissement peuvent être très importantes chez certains sujets âgés et être minimales voire absentes chez d'autres individus du même âge. La meilleure connaissance des mécanismes du vieillissement permet aujourd'hui d'envisager des stratégies susceptibles de prévenir certains effets du vieillissement.

Suite à ces données, on s'est posé la question sur l'intérêt que peut apporter le dosage sérique et intracellulaire du protéasome chez les personnes âgées, et son utilité en tant que facteur prédictif de risque pour certaines pathologies. En outre, au Maroc aucune étude n'a été réalisée sur le protéasome, encore plus sur la relation entre le protéasome et l'apparition ou l'évolution d'une pathologie donnée chez la population marocaine.

Par le biais de cette étude, On a fait appel à la technique d'ELISA en Sandwich développée par l'équipe de Dutaud et al, [17] pour apprécier le niveau sérique et intracellulaire du Protéasome 20S et sa variation en fonction de deux paramètres (âge et sexe).

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 PATIENTS

62 patients sains ont été inclus dans cette étude, 29 hommes et 33 femmes, présentant un âge moyen de 42 ± 21 ans. Le dosage au niveau sérique et intracellulaire est réalisé respectivement chez 27 et 35 personnes.

L'échantillon sanguin est récupéré, après obtention d'un consentement éclairé de tous les patients recrutés, au service d'Hématologie et Oncologie Pédiatrique – Hôpital 20 Aout Casablanca- Centre Hospitalier Universitaire IBN ROCHD Casablanca.

2.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Le Sérum est récupéré à partir d'un échantillon frais de sang humain, refroidit progressivement à 4°C puis à -20°C.

2.3 RÉCUPÉRATION DES GLOBULES BLANCS

Brièvement on éclate les globules rouges de l'échantillon sanguin par l'ajout d'une solution du Tris - EDTA (20/5) au sang total, après centrifugation, on élimine le surnageant et on répète cette manœuvre jusqu'à obtention d'une couche cellulaire claire.

2.4 LYSE DES GLOBULES BLANCS

On ajoute rapidement 200 µl du tampon de lyse (KCl 10 mM, NaCl 10 mM, HEPES 10 mM, EDTA 1 mM PH 7.1, DTT 0.1 mM, Triton 1 %, supplémenté d'Anti protéases (PMSF 2 nM) sur chaque échantillon. Les cellules sont éclatées avec des périodes de cassure de 20s alternées avec 30s de repos pour éviter le réchauffement excessif des échantillons pouvant entraîner une dénaturation des enzymes [18].

Le protocole est répété 3 fois. Les extraits obtenus peuvent être conservés à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation.

2.5 QUANTIFICATION DU PROTÉASOME 20S HUMAIN PAR ELISA

Le dosage du Protéasome 20S sérique et intracellulaire, par la technique d'ELISA Indirect [17], se base sur la reconnaissance en « sandwich » de complexes de protéasome 20S par des anticorps spécifiques de la sous-unité α du cœur catalytique MCP20 (Enzolifesciences).

En premier, on procède à la fixation de l'anticorps monoclonal MCP20 (1/3000) sur la microplaque 1 h à 37 °c «Coating». Les sites non spécifiques sont bloqués par ajout de 200 µl du PBS-BSA 2%. On dépose la gamme étalon et les échantillons à doser (100 µl/ puits). Les sous unités du protéasome capturés sont détectés par le deuxième Anticorps polyclonal 1571 (1/5000). La révélation est faite après ajout du Conjugué marqué à la peroxydase. Après l'ajout du Substrat (OPD), on procède au suivi de la DO à 492 nm sur un Lecteur ELISA (ELx800 UV). Les résultats sont exprimés en concentration de Protéasomes en ng/ml, après comparaison avec la courbe standard obtenue avec la gamme étalon du protéasomes 20S purifiés Humains.

2.6 STATISTIQUES

L'analyse statistique des concentrations moyennes du protéasome 20S sérique et intracellulaire, a fait appel au test de **STUDENT** et à la **corrélation standard**. Les valeurs qui sont significatives définissent une valeur de P inférieure à **0.05**.

3 RÉSULTAT

3.1 DOSAGE SÉRIQUE DU PROTÉASOME

La concentration du protéasome sérique a été analysée chez des patients sains, l'âge des patients est compris entre 7 et 74 ans (figure 1).

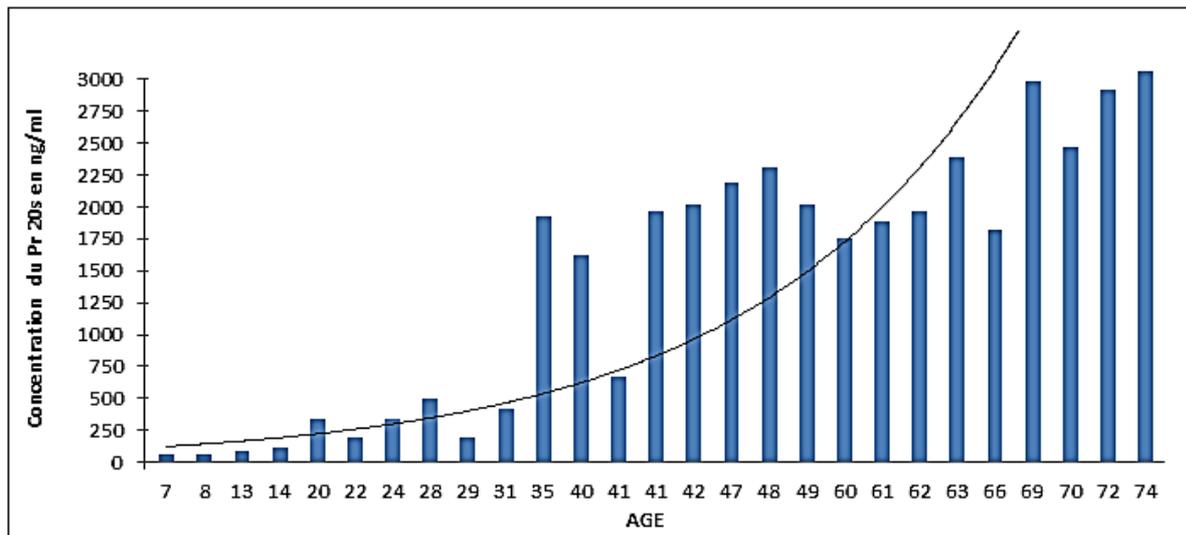


Fig. 1. Evolution de la concentration du Protéasome sérique en ng/ml en fonction de l'âge

D'après les résultats obtenues sur 27 échantillons de Sérums, la moyenne de la concentration sérique du protéasome est de : 1264 ± 601 ng/ml.

La figure 1, montre une évolution progressive de la concentration sérique du protéasome en fonction de l'âge, en effet elle passe de 60 ng/ml chez un enfant de 7 ans, pour atteindre une valeur de 2730 ng/ml chez une personne âgée de 74 ans.

En effet, une forte corrélation a été notée entre la concentration sérique du protéasome et l'âge de l'individu ($R^2 = 0.8528$, $p < 0.05$) (figure 2).

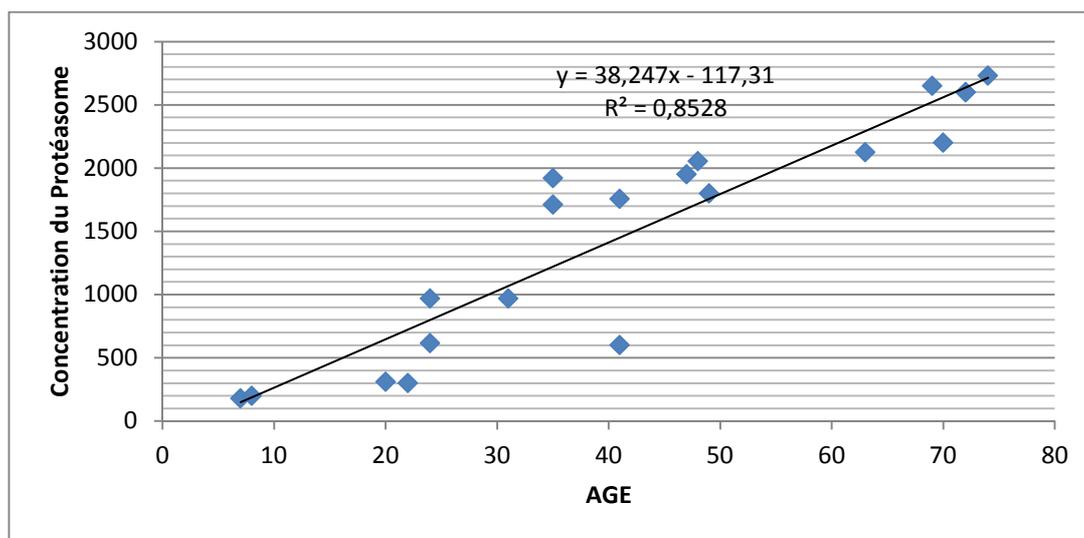


Fig.2. Corrélation entre l'âge et la concentration Sérique du protéasome 20S ($R^2 = 0.8528$, $p < 0.05$)

Les sujets analysés sont répartis en 3 catégories d'âges : les jeunes (7 à 29 ans), Adultes (de 39 à 54 ans) et personnes âgées (de 60 à 75 ans) (figure 3).

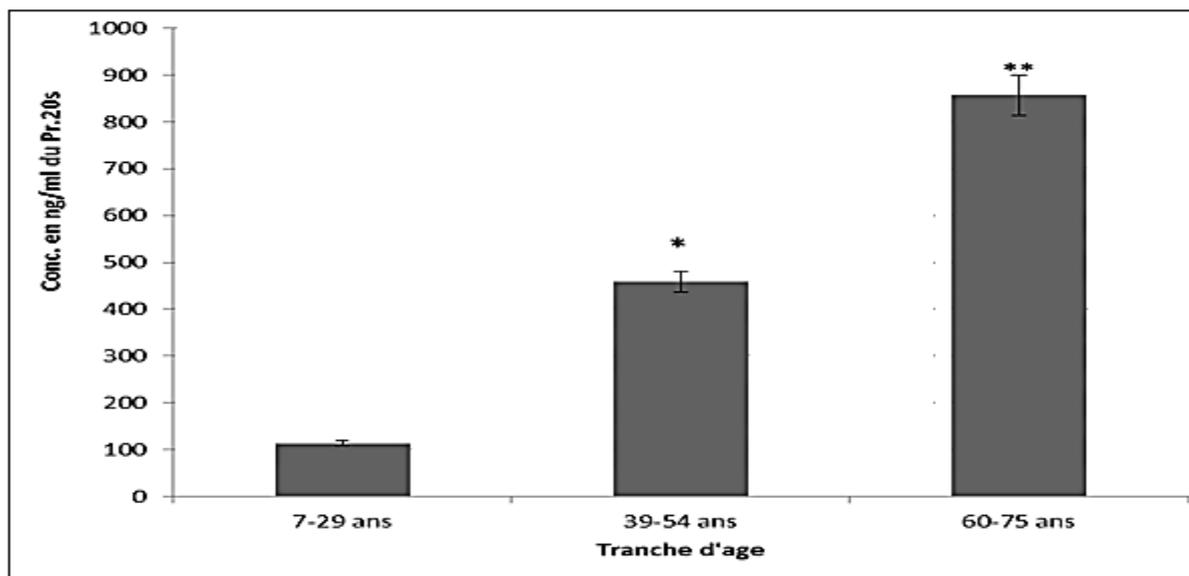


Fig. 3. Evolution de la Concentration Moyenne du protéasome 20s sérique en fonction de 3 tranches d'âge (7 –29 ans ; 39-54 ans et 60-75 ans)

* : $P < 0.005$ en comparaison aux sujets jeunes

** : $P < 0.0001$ en comparaison aux sujets jeunes

La répartition des moyennes de concentration du protéasome sérique selon la tranche d'âge affiche une augmentation significative, elle passe de : 113.5 ± 59 ng/ml chez les jeunes de 7 à 29 ans, 458 ± 122 ng/ml chez les adultes de 39 à 54 ans ($P < 0,005$), pour atteindre 857.2 ± 197 ng/ml chez les personnes âgées de 60 à 75 ans ($P < 0,0001$).

3.2 DOSAGE INTRACELLULAIRE DU PROTÉASOME 20S HUMAIN

Afin de comprendre la cinétique du protéasome au niveau de la cellule en fonction de l'âge, on a effectué un dosage intracellulaire, par la technique d'ELISA Indirecte à partir d'un lysat total du culot cellulaire Blanc. Les résultats sont représentés sur la figure ci-dessous.

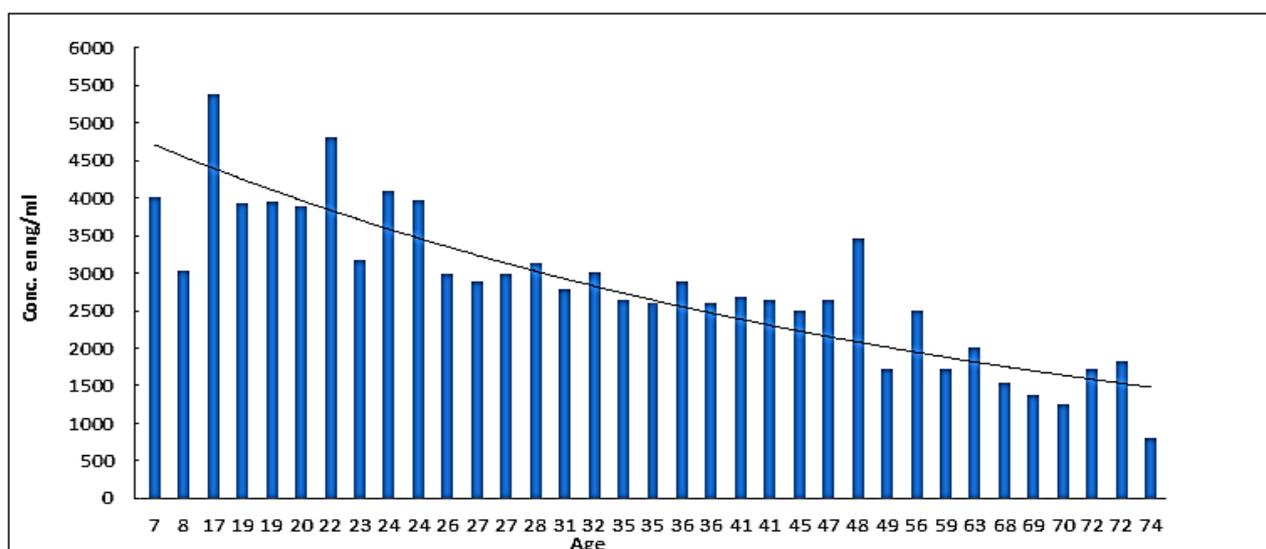


Fig. 4. Evolution de la concentration intracellulaire du protéasome en fonction de l'âge

D'après les résultats obtenus sur 35 échantillons de lysats cellulaires, on a obtenu une concentration moyenne de 2948,7 ±223 ng/ml.

On remarque une évolution régressive de la concentration intracellulaire du protéasome qui passe d'une valeur de 4170 ng/ml chez un enfant de 7ans, pour atteindre la valeur minimale de 850 ng/ml chez une personne âgée (74 ans).

En effet, une forte corrélation, a été constatée (figure 5) entre l'âge de l'individu et la concentration intracellulaire du protéasome 20 S ($R^2=0.8621$; $p < 0.005$).

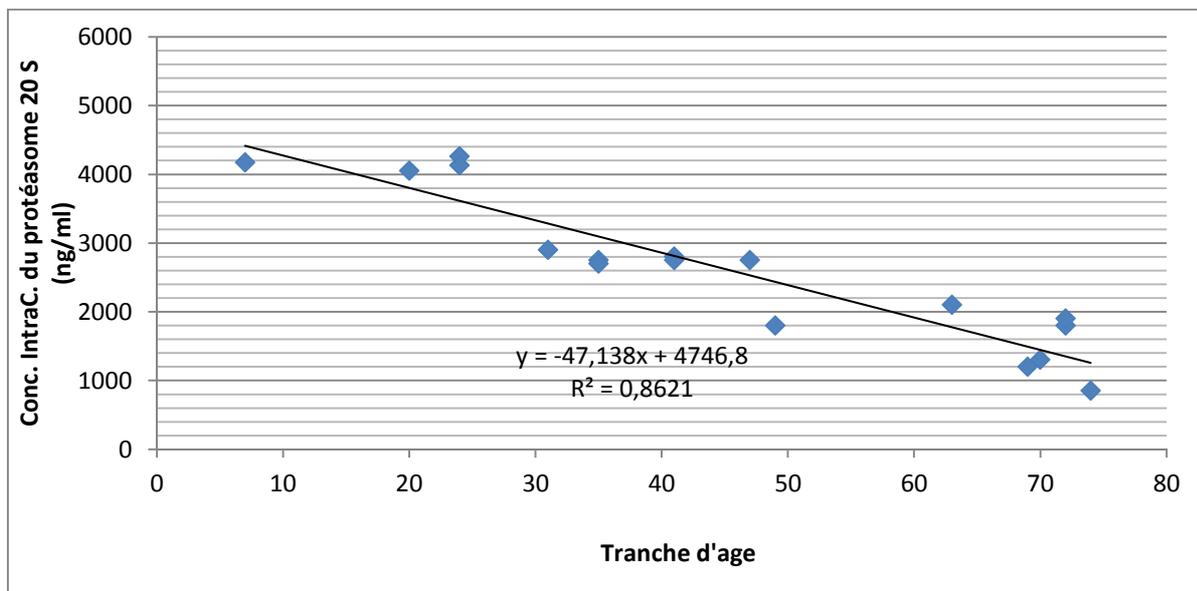


Fig. 5. Corrélation Linéaire entre concentration intracellulaire et tranche d'âge ($R^2=0.8621$; $p < 0.005$)

Les résultats obtenus sont classés en 3 catégories d'âge : la première représente la classe des jeunes (7- 29 ans), la deuxième la classe des Adultes (39 – 54 ans) la dernière classe est celle des sujets âgés (60-75) figure 6.

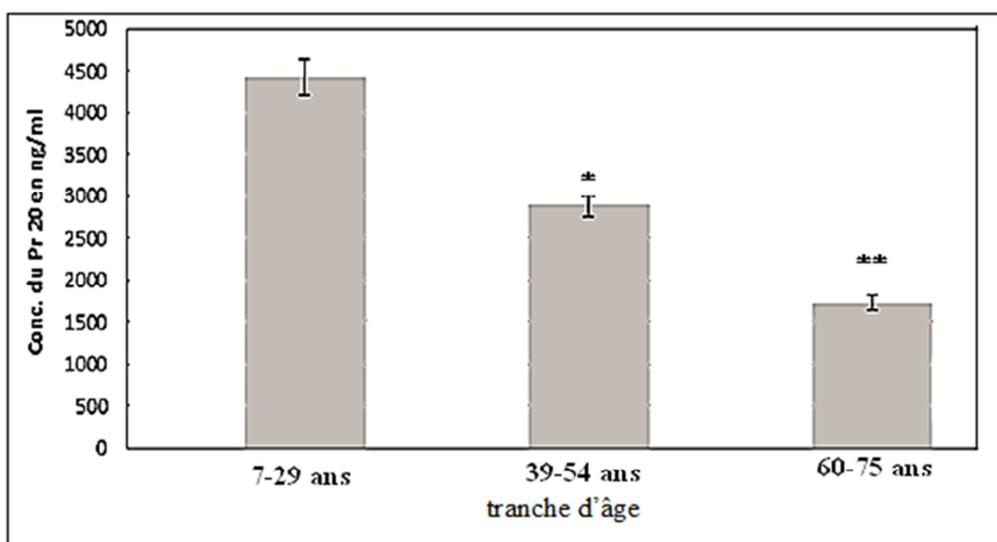


Fig. 6. Evolution de la Concentration Intracellulaire du Protéasome selon la tranche d'âge

* : $p < 0.005$ en comparaison aux sujets jeunes (7 à 29 ans).

** : $p < 0.001$ en comparaison aux sujets jeunes (7 à 29 ans).

On remarque une différence très significative au niveau du taux intracellulaire du protéasome affichée par les différentes catégories d'âges.

La concentration intracellulaire du Protéasome 20S, est significativement faible chez les adultes 2896 ± 200 ng/ml ($P < 0,001$) et chez les sujets âgés (1721 ± 173 ng/ml ; $P < 0,001$) en comparaison aux sujets jeunes (4425 ± 566 ng/ml).

3.3 QUANTIFICATION DU NIVEAU DU PR. 20S SÉRIQUE ET INTRACELLULAIRE CHEZ LES MÊMES PATIENTS

Pour suivre la cinétique du protéasome 20s, nous avons analysé chez les mêmes sujets (20 patients) à la fois le dosage sérique et intracellulaire (figure 7).

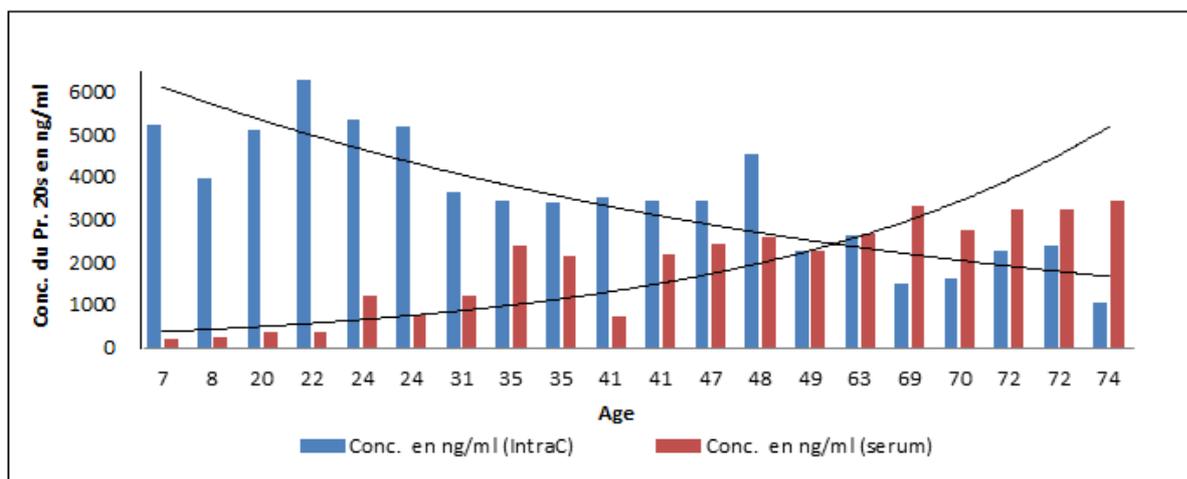


Fig.7. Evolution de la concentration du protéasome à la fois sérique et intracellulaire en fonction de l'âge

D'après la figure ci-dessus, on constate que jusqu'à l'âge de 48 ans, la concentration du protéasome intracellulaire, est nettement plus importante que celle quantifiée dans le sérum. Toutefois, entre 49 et 63 ans, on remarque une équivalence entre le taux du protéasome 20S sérique et intracellulaire. Chez les personnes âgées de 69 ans et plus, la courbe s'inverse, la concentration cytoplasmique du protéasome devient moins importante que la concentration sérique libre.

Par ailleurs, une corrélation inverse entre l'évolution simultanée du taux intra et extracellulaire du protéasome et l'âge, est bien marqué au niveau de la figure 8 :

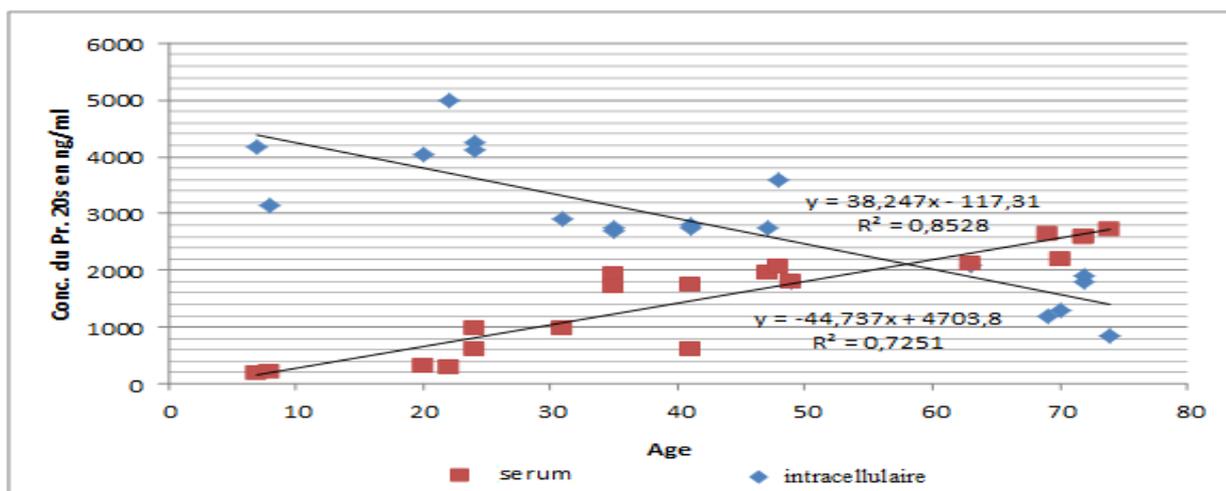


Fig. 8. Corrélation linéaire entre Concentration du Protéasome Sérique et intracellulaire et l'âge

3.4 ETUDE COMPARATIVE DE L'ÉVOLUTION DU TAUX DU PROTÉASOME CIRCULANT DANS LE SANG PÉRIPHÉRIQUE CHEZ L'HOMME ET LA FEMME :

L'analyse sérique de la concentration du protéasome 20S incluant 29 hommes et 33 femmes, n'a montré aucune différence significative au niveau des moyennes : 920.78 ± 260 ng/ml pour les femmes et un taux de 917.05 ± 287 ng/ml chez les hommes (figure 9).

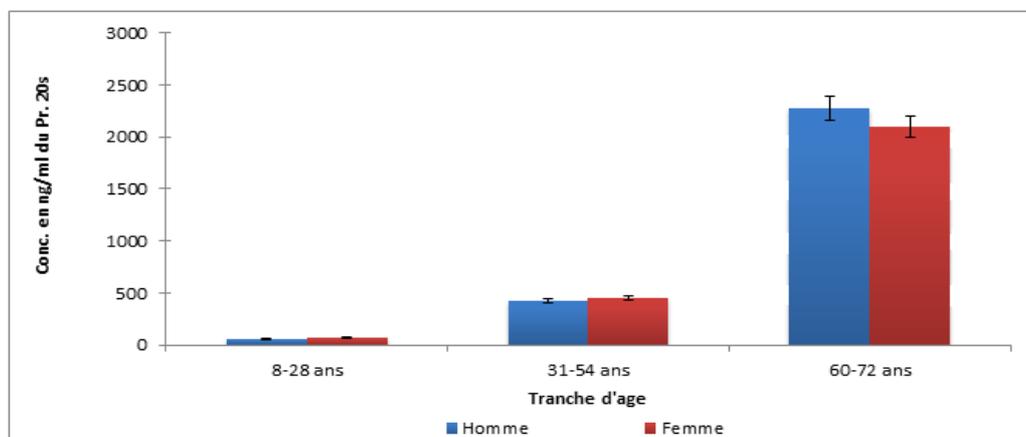


Fig. 9. Evolution de la concentration du Protéasome 20S sérique selon la tranche d'âge et le sexe

Cependant, les résultats regroupés sous forme de tranche d'âge, montre une augmentation significative ($p < 0.0001$) de la concentration du protéasome sérique en fonction de l'âge à la fois chez l'homme et chez la femme.

4 CONCLUSION ET DISCUSSION

L'accumulation des protéines endommagées au cours du vieillissement peut être imputée soit à une production accrue de protéines modifiées par les radicaux libres, soit à une baisse d'activité des enzymes (ou protéases) assurant leur dégradation, soit encore à la combinaison de ces deux mécanismes. L'élimination par le protéasome de l'excès de protéines altérées est donc cruciale pour le bon fonctionnement de la cellule [19].

Nous avons projeté à travers cette étude, de comparer et de quantifier le protéasome 20S, à la fois au niveau sérique et intracellulaire, chez une population Marocaine saine et ne présentant aucun signe clinique, en prenant en considération un paramètre qui s'avère être de vigueur : l'âge et le sexe.

Nos résultats confirment bien la présence du protéasome 20S au niveau sérique chez tous les sujets bien qu'il soit principalement localisé dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules eucaryotes.

Cependant le taux du protéasome 20S circulant rapporté dans la littérature chez les sujets sains varie sur une large échelle. En effet, l'étude menée par Jacob C. et al 2007 [20], affiche un dosage sérique de 224,05 ng/ml. Alors que d'autres travaux parlent d'un dosage plasmatique du protéasome 20S nettement plus important atteignant : 2319 ± 237 ng/ml [13] et 2534 ± 187 ng/ml [14].

Néanmoins, notre résultat (concentration moyenne sérique : 1264 ± 601 ng/ml) est similaire à la moyenne sérique (1500 ng/ml) rapportée par les travaux récents de M de Martino et al. 2012 [15].

La différence du niveau du protéasome 20S circulant, peut être due à plusieurs facteurs, notamment, la nature de la sous unité ciblée $\alpha 2$ ou $\alpha 6$, à la nature de l'échantillon Plasmatique ou Sérique, sans oublier la longueur d'onde de détection qui varie selon les protocoles (416 nm [11], 450 nm [20], 492 nm [13,17]).

Nos résultats expriment une augmentation très prononcée de la concentration sérique chez des sujets avancés dans l'âge (de 60ng/ml chez un enfant de 7ans à 2730 ng/ml à 74 ans). Il serait donc judicieux de respecter et de comparer des valeurs obtenues chez des sujets ayant une tranche d'âge très rapprochée. Cependant certains auteurs n'affirment aucune dépendance du niveau du proteasome circulant en fonction de l'âge des individus [20].

Par ailleurs, d'après nos résultats, nous constatons que la concentration moyenne intracellulaire du Protéasome ($2948,7 \pm 223$ ng/ml) est supérieure à la moyenne sérique (1264 ± 601 ng/ml). Ce qui confirme bien une possible relation entre le taux

intra et extracellulaire du Protéasome. En effet, les travaux de Bureau et al, 1997 [22], décrivent le processus d'externalisation ou excrétion hors de la cellule des sous unités prosomales, d'abord à la surface des cellules puis dans le milieu extracellulaire. Expliquant ainsi, la présence significative du protéasome 20 circulant dans le sang périphérique des sujets control. Néanmoins les sous unités prosomales externalisées hors de la cellule, ne peuvent être fonctionnels, en effet l'activité catalytique du protéasome exige une entité 26S (Complexes régulateurs 19S + protéasome 20S) [8].

L'explication la plus probable à cette différence au niveau des valeurs sériques chez les personnes cliniquement saines peut être attribuée au fait que le protéasome extracellulaire est inactivé et défectueux [23].

Le dosage intracellulaire, s'avère intéressant car il permet un dosage à la source et certainement un protéasome fonctionnel et donc intact au niveau moléculaire.

Nos résultats affichent chez les sujets jeunes (de 7 à 24 ans) la concentration cytoplasmique en protéasome représentant le quadruple de celle exprimée au niveau sérique.

Concrètement, dans les cellules jeunes, le contrôle qualité des protéines est très strict et le taux des protéines endommagées est maintenu à un niveau très bas, ce qui reflète l'efficacité des systèmes Ubiquitine- Protéasome, responsables de leur élimination [24], expliquant ainsi les faibles taux du protéasome libéré dans le sang périphérique et la grande teneur en protéasome intracellulaire.

Bertrand Friguet et ses collaborateurs [25], travaillant sur du protéasome purifié à partir de foie de rats jeunes et de rats âgés, ont montré que les activités de ce complexe multienzymatique diminuaient d'environ 50% chez les animaux les plus vieux.

La baisse d'activité catalytique est due en partie, à une inactivation du protéasome[24], mais aussi à la diminution de la quantité de protéasome [25].

Dans le même sens, chez les sujets âgés, on assiste à une chute de la concentration du protéasome intracellulaire au profit d'une augmentation sérique. Des études portant sur la compréhension de l'effet du processus du vieillissement sur l'activité du protéasome au niveau des cellules musculaires squelettiques du rat, et au niveau des fibroblastes Humains [26], suggèrent que cette défaillance de l'activité protéasomique est due à une modification de certaines protéines à rôle très important notamment la diminution de l'expression, et le changement des sous-unités du protéasome, la réduction de l'expression des complexes régulateurs(PA28, PA700) et l'effet inhibiteur des substrats à dégrader [27].

L'activité accrue du protéasome dans les cellules tumorales semble, en particulier, participer à la résistance à l'apoptose, qui est une caractéristique commune à la plupart des tumeurs malignes. Il est bien établi actuellement que le traitement par des inhibiteurs de protéasome apporte des résultats favorables dans le traitement de certaines tumeurs liquides particulièrement les myélomes [28].

Afin de faciliter la recherche de la dose optimale d'un inhibiteur de protéasome dans les études de phases I et II, d'un Myélome l'activité du protéasome est mesurée dans les globules blancs et/ou les échantillons tumoraux [29], [30].

Le dosage intracellulaire du protéasome permet d'estimer le score prédictif du risque de toxicité. En effet, la toxicité gastro-intestinale observée après traitement par inhibiteurs de protéasome (PS341) est dose-dépendante. Un traitement est bien toléré si l'inhibition du protéasome n'excède pas 80 % de l'état basal ; au-delà, apparaissent des modifications de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque [31], [32].

L'étude de la cinétique évolutive de la concentration sérique du Protéasome et intracellulaire, chez les mêmes individus a confirmé encore une fois l'effet incontestable que joue l'âge sur le niveau du Protéasome.

En conclusion, nous rejoignons la réflexion de certains auteurs [33] sur le lien établi entre la défaillance du protéasome avec l'âge et l'apparition de certaines pathologies notamment les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson,..) et auto-immunes et certains cancers.

Une étude portant sur une cohorte plus importante de personne âgée, avec un suivi de leur état de santé pourrait apporter plus d'information sur l'utilisation du protéasome comme indicateur de forte prédisposition à développer certaines maladies.

RÉFÉRENCES

- [1] M. Martinez-Vicente, G. Sovak , AM. Cuervo, “Protein degradation and aging”, *Experimental Gerontology*, vol. 40, pp. 622–633, 2005.
- [2] C. Kraft, M. Peter, K. Hofmann. “Selective autophagy: Ubiquitin-mediated recognition and beyond”, *Nature Cell Biology*, vol. 12, no.9, pp. 836-4, 2010.
- [3] AL. Bulteau, I. Petropoulos, B. Friguet. “Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis”. *Experimental Gerontology*, vol. 35, pp. 767-77, 2000.
- [4] JG. Delcros, Y. Arlot-Bonnemains. “Ubiquitine, protéasome et cancer”, *Bulletin du Cancer*, vol .93, pp. 54-60, 2006.
- [5] J. Adams. “The proteasome: structure, function, and role in the cell”, *Cancer Treatment Reviews*, vol 29, pp. 3-9, 2003.
- [6] O. Coux , “The 26S proteasome”, *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, vol. 29, pp. 85-107, 2002
- [7] O. Coux & M. Piechaczyk, “Le système ubiquitine / protéasome: un ensemble (de)complexe(s) pour dégrader les protéines”, *Medicine sciences*, vol. 16, pp. 623-629, 2000.
- [8] T. Ravid, M. Hochstrasser, “Diversity of degradation signals in the ubiquitin–proteasome system”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol.9, pp. 679-690, 2008.
- [9] Y. Yang, J. Kitagaki, Wang H, et al, “Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy”, *Cancer Science*, vol. 100, pp. 24-28, 2009.
- [10] BM. Riederer, G. Leuba, A. Vernay, IM. Riederer, “The role of the ubiquitine proteasome system in Alzheimer's disease”, *Experimental Biology and Medicine* , vol. 236, pp. 268-76, 2011
- [11] K. Egerer , U. Kuckelkorn , PE. Rudolph , et al, Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *The Journal of Rheumatology*, vol.29, pp.2045-2052, 2002.
- [12] L. Henry, T. Lavabre-Bertrand, T. Douche, et al., “Diagnostic value and prognostic significance of plasmatic proteasome level in patients with melanoma”. *Experimental Dermatology*, vol. 19, pp. 1054–1059, 2010.
- [13] PE. Stoebner, T. Lavabre-Bertrand, L. Henry , et al., “High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma”, *British Journal of Dermatology*, vol. 152, pp. 948-953, 2005.
- [14] Lavabre-Bertrand T, Henry L, Carillo S, et al., “Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies”, *Cancer*, vol.92, pp. 2493-2500, 2001.
- [15] M. De Martino, K. Hoetzenecker, HJ. AnkersmitJ, et al., “Serum 20S proteasome is elevated in patients with renal cell carcinoma and associated with poor prognosis”, *British Journal of Cancer*, vol. 106, pp. 904–908, 2012.
- [16] M. Heubner, P. Wimberger, B. Dahlmann, et al., “The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer”, *Gynecologic Oncology*, vol. 120, pp.233–238, 2011.
- [17] D. Dutaud, L. Aubry, L. Henry , et al.” Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma”, *Journal of Immunological Methods* , vol. 260, pp. 183-193, 2002.
- [18] M. Matondo, MP. Bousquet-Dubouch, N. Gally, et al., “Proteasome inhibitor-induced apoptosis in acute myeloid leukemia: a correlation with the proteasome status”, *Leukemia Research*, vol. 34, pp. 498-506, 2010.
- [19] JY. Le Gall, R. Ardaillou, “Biologie du vieillissement”, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* , vol. 193, pp. 365-404, 2009.
- [20] C. Jakob, K. Egerer, P. Liebisch , et al., “Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma”. *Blood* , vol. 109, pp.2100-2105, 2007.
- [21] T. Lavabre-Bertrand, L. Henry, S. Carillo, et al., “Plasma Proteasome Level as a Marker of Neoplastic Diseases: Biological Statement and Clinical Relevance”, *Austral-Asian Journal of Cancer*, vol. 6, pp. 77-82, 2007.
- [22] JP. Bureau, M. Olink-Coux, N. Brouard, et al., “Characterization of prosomes in human lymphocyte subpopulations and their presence as surface antigens”, *Experimental Cell Research*, vol. 231, pp. 50–60, 1997.
- [23] SU. Sixt, B. Dahlman, “Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin – incidence and relevance”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1782, pp. 817–823, 2008.
- [24] I. Petropoulos, M. Conconi, X. Wang, et al, “Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells” , *the journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, vol. 55, pp.B220-7, 2000.
- [25] B. Friguet, AL. Bulteau, N. Chondrogianni, et al., “Protein degradation by the proteasome and its implications in aging” , *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 908, pp. 143-54, 2000.
- [26] DH. Ly , DJ. Lockhart, RA. Lener, PG. Schulz, “Mitotic misregulation and human aging”, *Science*, vol. 287, pp. 2486-92, 2000.
- [27] M.H. Glickman & A. Ciechanover, “The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction”, *Physiological Reviews* , vol. 82, pp. 373-428, 2002.

- [28] J. B. Almond & G. M. Cohen, "The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy", *Leukemia*, vol.16, pp.433-43,2002.
- [29] J. Adams, " Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer", *Current Opinion in Chemical Biology* , vol, 6, pp. 493-500, 2002.
- [30] A. McBride, PY. Ryan, "Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma" *Expert Review of Anticancer Therapy*, vol. 13, pp. 339-58, 2013.
- [31] JP. Spano, JO Bay, JY Blay,et al., "L'inhibition du protéasome : une nouvelle approche thérapeutique en oncologie". *Bulletin du Cancer*, vol. 92, pp. 945-52, 2005.
- [32] J. Alexander, "Les Inhibiteurs de proteasome", *La Revue de Médecine Interne*, vol. 26, pp.812–815, 2005.
- [33] L. Henry , T. Lavabre-Bertrand, L. Vercambre et al., "Plasma proteasome level is a reliable early marker of malignant transformation of liver cirrhosis" . *Gut* ,vol. 58, pp. 833–838,2009.