

2. PURIFICATION ET CARACTERISATION DU PROTEASOME DE *PHYSCOMITRELLA PATENS*

2.1 PURIFICATION

Matériel végétal

La mousse *Physcomitrella patens* est cultivée au laboratoire, en conditions stériles sur boîtes Pétri, et est récoltée après 6 à 7 jours de croissance (fig.2.1) (Cove, 1997). A ce stade de développement, la mousse se présente sous la forme d'un réseau filamenteux colonisant la surface de la boîte Pétri. En général, le matériel que nous avons récolté ne contenait aucune structure secondaire (feuilles ou gamétophores). La culture de 1 kg de mousse, à raison de 1g par boîte de Pétri, nous permet d'extraire environ 500 µg de protéasome pur.

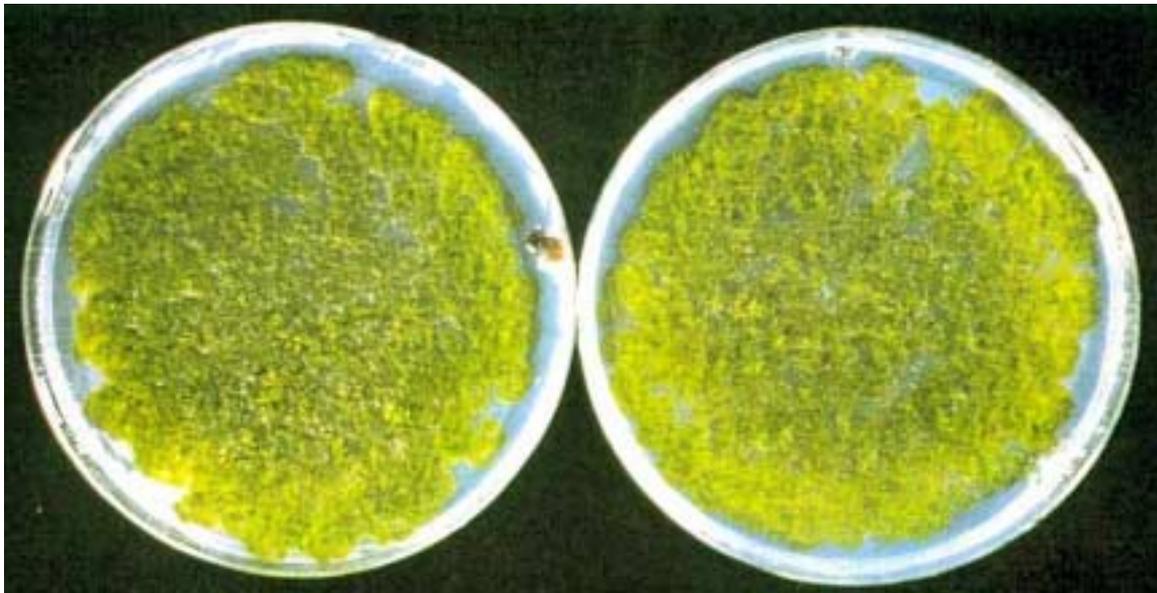


Fig.2.1. Culture de mousse in vitro sur boîte de Pétri, âgée de 7 jours.

Activités du protéasome

Pour mettre en évidence les activités protéolytiques multiples du protéasome, nous avons utilisé des substrats fluorogéniques composés d'un peptide synthétique lié à un fluorochrome (fig.2.2). Le peptide est libéré et fluoresce, sous excitation, lorsque l'activité protéasique spécifique, clivant le peptide après le dernier acide aminé, se manifeste (Yang et Malek, 1991).

Peptides synthétiques	activités	symboles
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	Chymotrypsique	—○—
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	Trypsique	—△—
Cbz-Leu-Leu-Glu-β-NA	V8-protéase	—□—

Fig. 2.2. Peptides synthétiques utilisés pour la mise en évidence des activités du protéasome. Les symboles utilisés sur les chromatogrammes correspondant aux activités mises en évidence sont indiqués. Types de fluorochrome: β-NA (naphtylamide), MCA (7-amino-méthyl-coumarine).

Solubilisation du protéasome

Une fois récolté, le matériel végétal est broyé au mortier et au pilon, dans de l'azote liquide. En fin de broyage, on ajoute 2,5 % de Polyclar AT, afin d'inhiber les polyphénols oxydases libérées par la vacuole. Sans ce composant, l'activité du protéasome est perdue durant la purification! On ajoute ensuite le tampon d'extraction MCP contenant 50mM Tris HCl pH: 7.5, 1mM DTT, et 20 % de glycérol afin de stabiliser le protéasome. Le surnageant, récupéré après centrifugation, constituera l'extrait brut. Nous n'avons pas procédé à un fractionnement cellulaire, sur gradient de saccharose par exemple, puisque le protéasome se trouve présent, en majeure partie, dans le cytosol et le noyau (Tanaka et al., 1986; Olink-Coux et al., 1991) (Orlowski, 1993; Vallon et Kull, 1994). Il n'a pas été démontré qu'il soit associé spécifiquement à des membranes cellulaires.

Colonne échangeuse d'anions

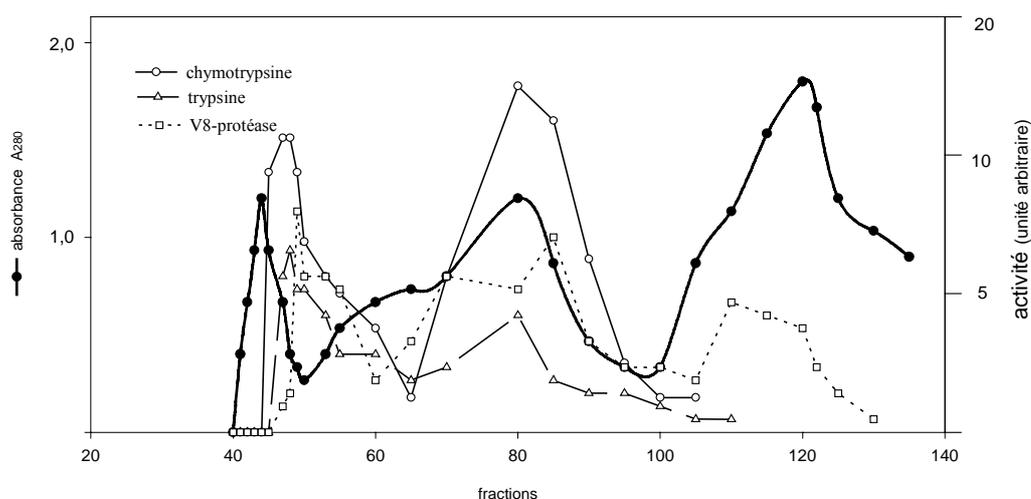


Fig. 2.3. 1^{ère} colonne échangeuse d'anions. L'extrait brut est chargé sur la colonne échangeuse d'anions. Les protéines sont éluées de la colonne par application d'un gradient de 0 à 500 mM de NaCl. Les activités sont analysées sur 10 µl de fraction collectée.

Une première purification grossière est effectuée sur une colonne échangeuse d'anions de type "Macroprep-Q" de Biorad. Les protéines sont éluées de la colonne par application d'un gradient de 0 à 500mM de NaCl (fig. 2.3).

Le tracé des différentes activités mesurées présente plusieurs pics à différentes concentrations de sel. La colonne a donc fixé d'autres protéases dont les activités se superposent à celles du protéasome. Ce qui, on le voit ici, ne permet pas encore de faire coïncider parfaitement les trois activités spécifiques du protéasome. Toutefois, ces activités se chevauchent des fractions 32 à 45 et on peut donc en déduire que le protéasome est élué de la colonne avec environ 250 mM de NaCl.

Colonne à tamis moléculaire

Les fractions 32 à 45 de l'échangeuse d'anions sont collectées, puis chargées sur une colonne à tamis moléculaire contenant un gel d'agarose de type Biogel A1.5 (Biorad) séparant les protéines de masse moléculaire relative de 1500 kDa à 10 kDa. Le tampon d'éluion contient dans cette étape 150 mM de NaCl de façon à réduire l'interaction des protéines avec la matrice. Les fractions 42 et 120 correspondent respectivement au volume mort (V_0) et au volume total (V_t) de la colonne (fig.2.4). A ce stade de la purification, on observe que les trois activités coïncident à des tailles approximatives de 1000 kDa (pic A) et de 400 kDa (pic B). L'analyse des fractions sur gel non dénaturant coloré au bleu Coomassie démontre l'efficacité de ce type de colonne sur la séparation des protéines selon leur taille (fig. 2.5).

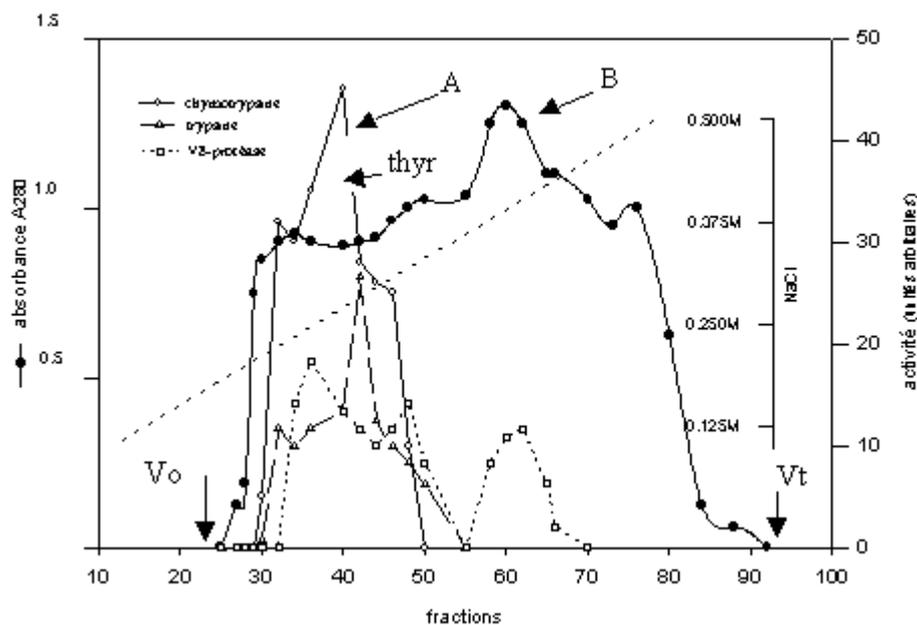


Fig. 2.4. **Colonne à tamis moléculaire Biogel A1.5.** Les fractions 32 à 45 de l'échangeuse d'anions précédente sont rassemblées, puis appliquées sur la colonne à tamis moléculaire. V_0 : volume mort (1500 kDa). V_t : volume total (10 kDa). **A**: pic contenant le protéasome 20S. **B**: deuxième pic contenant de multiples activités protéolytiques. **Thyr**: position du marqueur de la thyroglobuline (669 kDa).

On constate en premier lieu que le pic A d'activités ne coïncide pas avec le pic de concentration du protéasome observé sur le gel: l'activité maximale se situant dans la fraction 47, et la concentration la plus élevée de protéasome dans les fractions 49 à 51. La taille du protéasome (~700 kDa) de la mousse est proche de celle de la thyroglobuline. Ce décalage peut être la conséquence du rôle inhibiteur joué par les contaminants concentrés dans les fractions 50 à 60, qui peuvent entrer en compétition en tant que substrat avec les peptides synthétiques. A noter que la Rubisco constitue ici l'un des contaminants majeur de grande taille. Le pic B d'activités, très étendu, est sans doute constitué par la superposition de plusieurs activités de différentes protéases qui contaminaient les fractions collectées de l'échangeuse d'anions. Pourtant, il n'est pas exclu que certaines de ces activités soient également dues à des structures intermédiaires existantes lors de l'assemblage du protéasome (pic B).

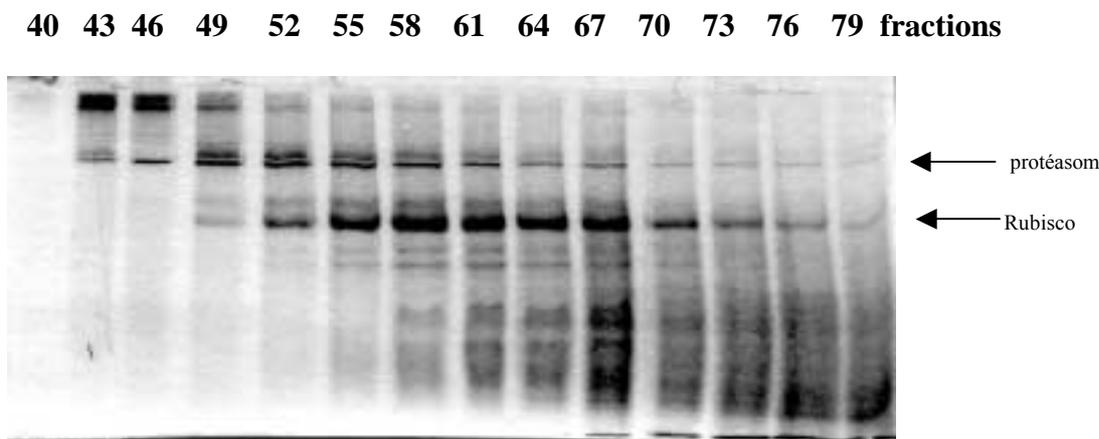


Fig. 2.5. Analyse des fractions collectées de la colonne à tamis moléculaire sur gel non dénaturant, puis coloré au bleu de Coomassie R250. Les flèches indiquent les positions du protéasome et de la RUBISCO.

2^{ème} colonne échangeuse d'anions

Cette étape a été introduite non seulement dans le but d'éliminer les contaminants résiduels de la première échangeuse d'anions mais également dans le but de concentrer les protéines dans un volume minimum de manière à pouvoir les charger sur une nouvelle colonne à tamis moléculaire. Pour ce faire, les fractions 47 à 61 sont rassemblées, puis diluées de façon à réduire la concentration en sel. Le tout est chargé sur la colonne échangeuse d'anions de type Macrorep Q (fig. 2.6). Les protéines sont éluées de la colonne par application d'un gradient de NaCl de 0 à 0,5 M.

2^{ème} colonne à tamis moléculaire.

Les fractions 20 à 31 de l'échangeuse d'anions sont collectées et chargées sur une nouvelle colonne à tamis moléculaire de type Biogel A5.0 (Biorad) contenant un gel d'agarose séparant les protéines de masse moléculaire relative de 5'000 kDa à 10 kDa (fig. 2.7). Les pics d'activités coïncident des fractions 67 à 86. Sur cette colonne, on élimine une forte proportion de contaminants de taille inférieure à celle du protéasome.

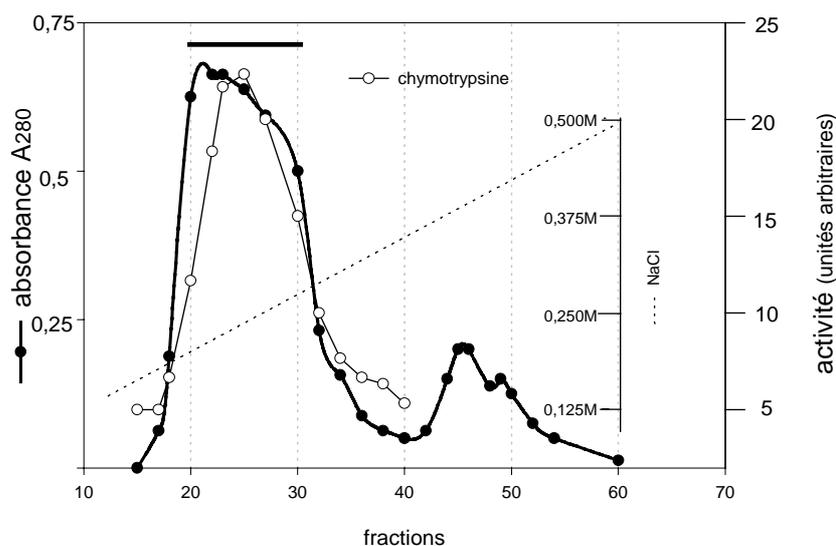


Fig. 2.6. 2^{ème} colonne échangeuse d'anions de type "macroPrep-Q". Les fractions 47 à 61 du tamis moléculaire Biogel A1.5 sont rassemblées, diluées, puis chargées sur une nouvelle colonne échangeuse d'anions. Les protéines sont éluées de la colonne par application d'un gradient de 0 à 500 mM NaCl.

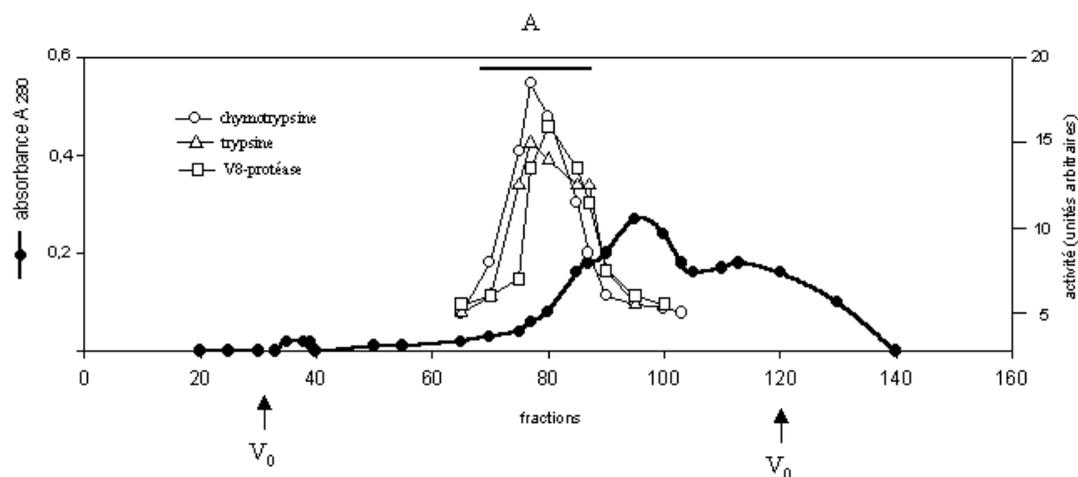


Fig. 2.7. 2^{ème} colonne à tamis moléculaire Biogel A 5.0. Les fractions 20 à 31 de l'échangeuse d'anions sont rassemblées, puis appliquées sur une colonne à tamis moléculaire Biogel A5.0 V₀: volume mort (5'000 kDa). V_t: volume total (10 kDa). A: pic contenant le protéasome 20S.

Colonne hydroxyapatite.

Les fractions actives 67 à 87 de la colonne précédente sont chargées sur une colonne hydroxyapatite contenant des cristaux de phosphate de calcium (fig. 2.8). Les protéines sont éluées au moyen d'un gradient de 0 à 300 mM de phosphate de sodium pH:8,0. Le protéasome est élué à une concentration de 165 mM NaPO₄ pH:8,0.

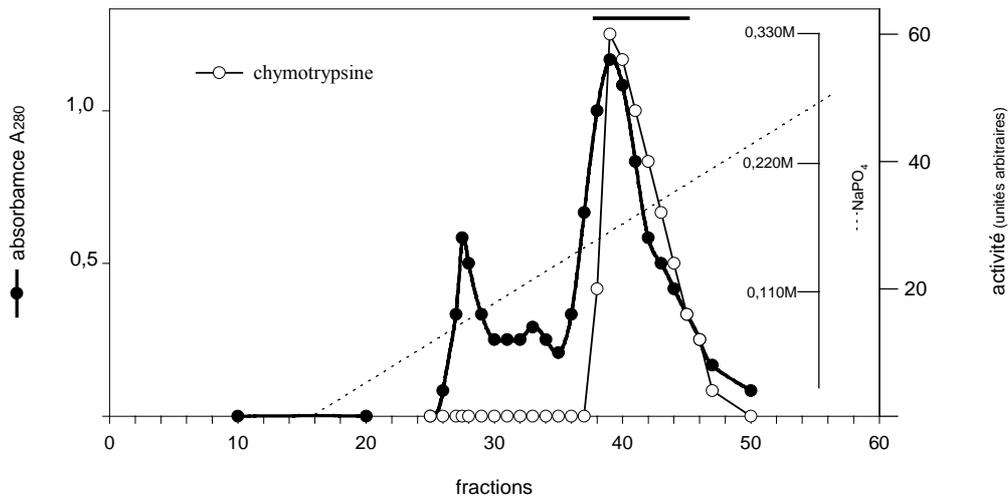


Fig. 2.8. **Colonne hydroxyapatite.** Les fractions actives du tamis moléculaire Biogel A5.0 sont rassemblées et appliquées sur la colonne hydroxyapatite. Les protéines sont éluées par application d'un gradient de 0 à 330 mM NaPO₄ pH:8,0.

3^{ème} colonne à tamis moléculaire.

Les fractions actives de l'hydroxyapatite (fract.38 à 46) sont concentrées par filtration, puis chargées sur une colonne HPLC à tamis moléculaire. Celle-ci sépare les protéines ayant des masses moléculaires relatives situées 1000 kDa à 10 kDa. Ce type de colonne possède un pouvoir de résolution très élevé et permet de séparer des protéines de taille très proche (10 kDa). La masse moléculaire relative du protéasome est ici de 700 kDa (fig.2.9). Des contaminants de faible masse moléculaire sont encore éliminés.

3^{ème} colonne HPLC échangeuse d'anions

Les fractions contenant plus de 50 % de l'activité maximale de la colonne précédente (fract. 13 à 15) sont chargées sur une colonne HPLC échangeuse d'anions contenant une matrice portant des groupes d'ammonium quaternaire. La combinaison des propriétés mécaniques et physico-chimiques du support chromatographique de ce type de colonne offre des performances très élevées dans la résolution des pics lors de l'éluion des protéines (fig.2.10). On le constate ici par la séparation de protéines plus faiblement liées à la matrice de la colonne. Le protéasome élue à 310 mM de NaCl.

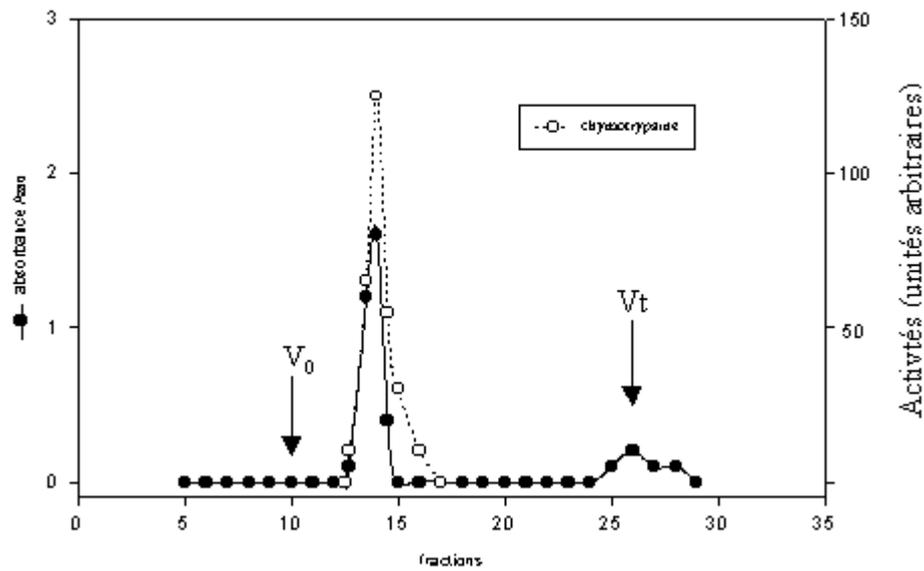


Fig. 2.9. 3^{ème} Colonne à tamis moléculaire HPLC TDSK 4000. Les fractions 38 à 46 de la colonne hydroxyapatite sont chargées et séparées sur la colonne HPLC. V_0 : volume mort (1'000 kDa). V_t : volume total (10 kDa).

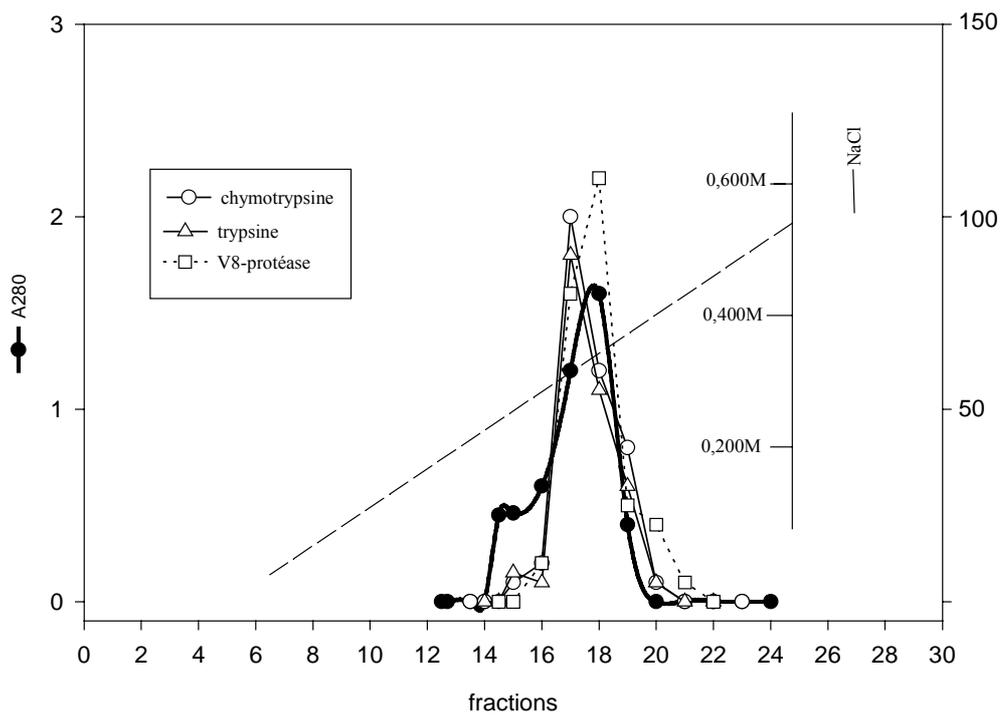


Fig. 2.10. Colonne HPLC échangeuse d'anions MONO Q. Les fractions 13 à 15 du tamis moléculaire précédent sont rassemblées, puis chargées sur l'échangeuse d'anions MonoQ. Les protéines sont éluées par application d'un gradient de 0 à 700 mM de NaCl.

Analyses chromatographiques

Un aliquot des différents pics d'activité collectés à chaque étape de la purification est analysé sur gel SDS-PAGE 16 %. (fig.2.11.A). La protéine pure présente une dizaine de bandes de masse moléculaire relative de 25 kDa à 31 kDa. Ce profil de séparation reste identique en présence ou en absence d'agent réducteur. Ce qui indique qu'aucune liaison disulfide n'est impliquée dans la structure du protéasome. L'analyse de la protéine sur gel non dénaturant révèle une bande unique à une taille relative de ~700 kDa (fig.2.11.B). Aucune autre protéine n'est visible sur le gel. Les étapes de purification effectuées permettent donc d'obtenir une préparation très pure de protéasome 20S de mousse.

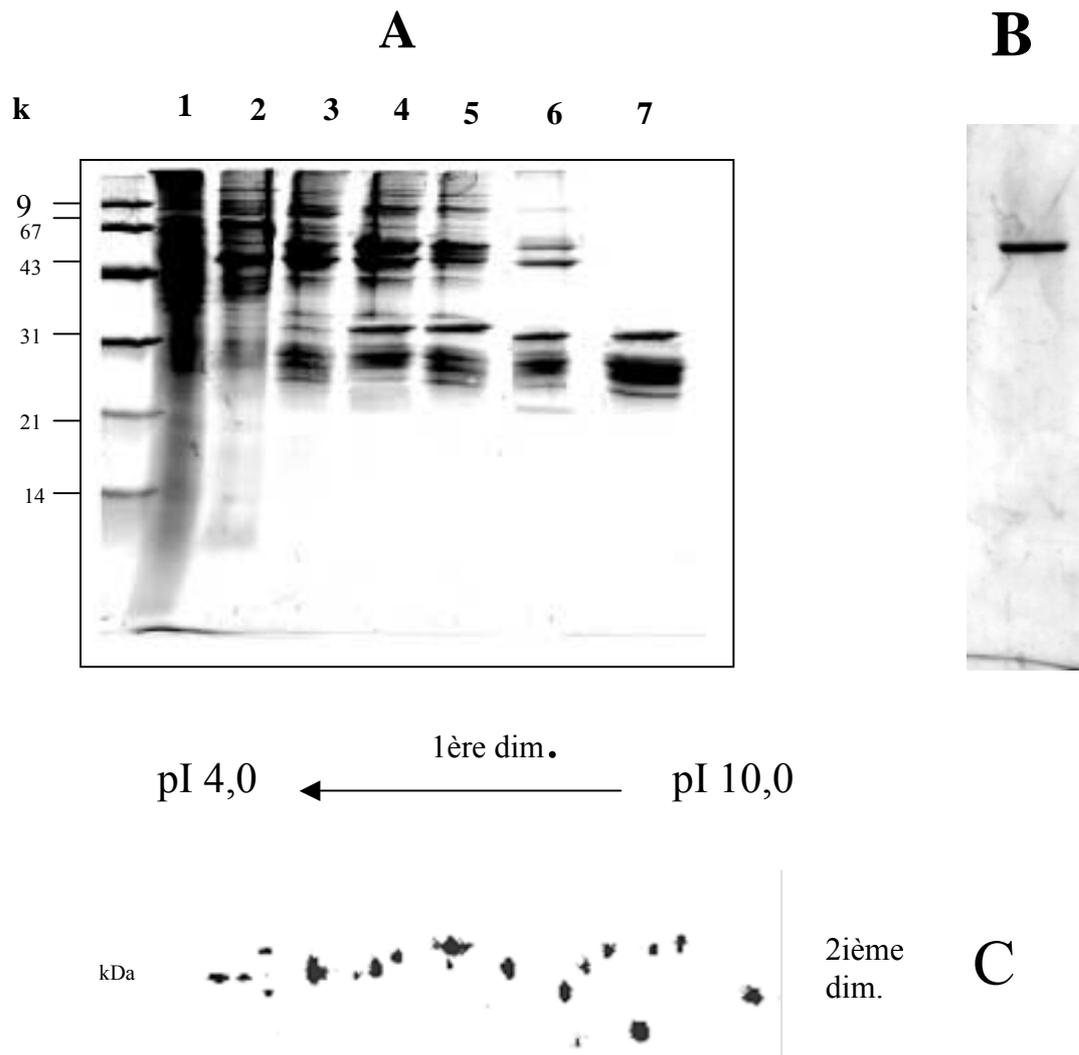


Fig. 2.11 A) Purification du protéasome de la mousse *Physcomitrella patens*. L'analyse des fractions réunies après les différentes étapes de purification sur gel SDS-PAGE 14%, coloré au bleu de Coomassie R250. 1) extrait brut, 2) échangeuse d'anions, 3) biogel A1.5, 4) biogel 5.0, 5) hydroxyapatite, 6) tamis moléculaire HPLC, 7) échangeuse d'anions MonoQ.

B) analyse sur gel non dénaturant du protéasome de mousse purifié.

C) analyse sur gel en deux dimensions du protéasome de mousse purifié (première dimension selon le pI (IEF), deuxième dimension selon la taille).

La composition en sous-unités du protéasome de mousse est analysée par électrophorèse à deux dimensions. La première sépare les protéines selon leur charge propre (pI), la deuxième selon leur taille. Le gel (fig.2.11.C) présente 16 spots distinctement séparés d'un pI de 4,0 à 10,0. Le protéasome est donc un hétéro-oligomère.

Mesures d'activités

Des mesures d'activités spécifiques sur du protéasome **A**: fraîchement purifié, **B**: stocké 3 mois à -80°C ont été effectuées. Les peptides synthétiques utilisés lors de la purification du protéasome de mousse ont servi de substrat.

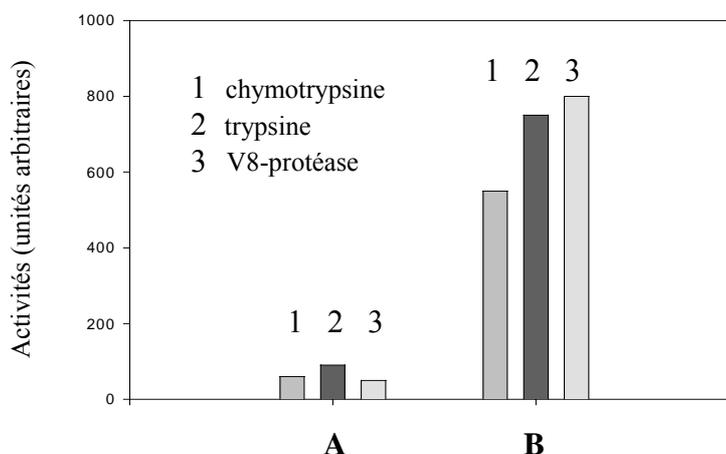


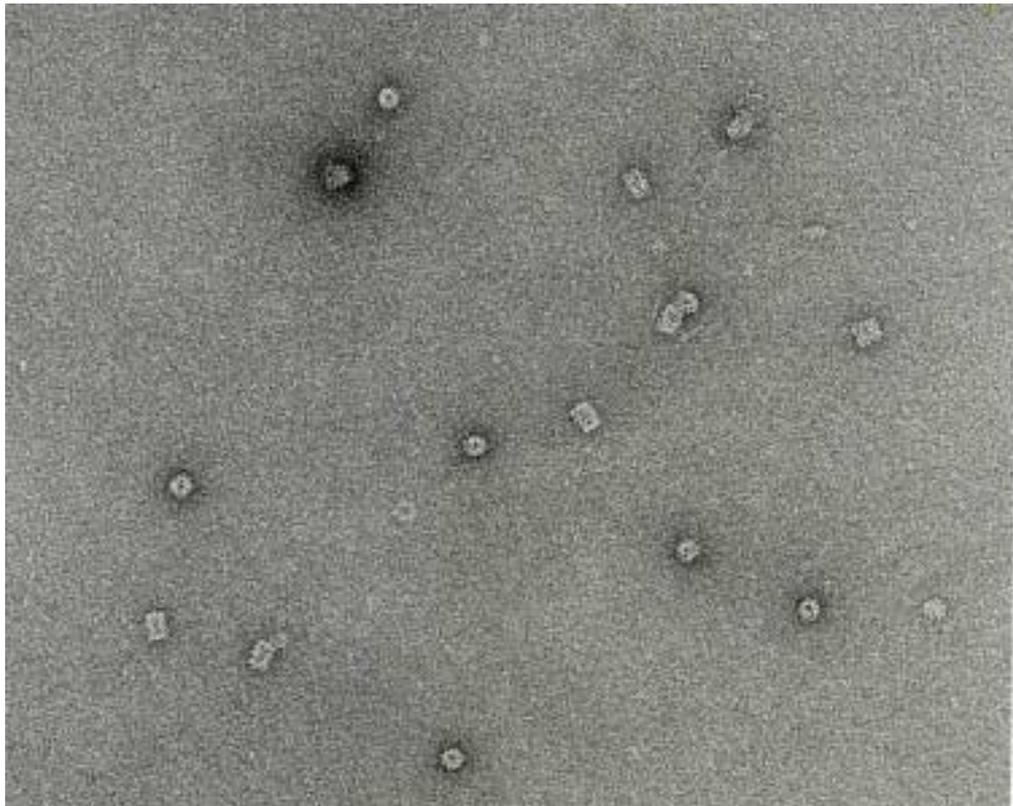
Fig. 2.12. **Mesures des activités du protéasome.** Comparaison des différentes activités **A**) fraîchement purifié **B**) après 3 mois de stockage à -80°C

Les activités spécifiques du protéasome fraîchement purifié sont globalement 10 fois inférieures à celles du protéasome stocké 3 mois à -80°C et le rapport entre ses activités spécifiques change après quelques mois de stockage (fig. 2.12. B).

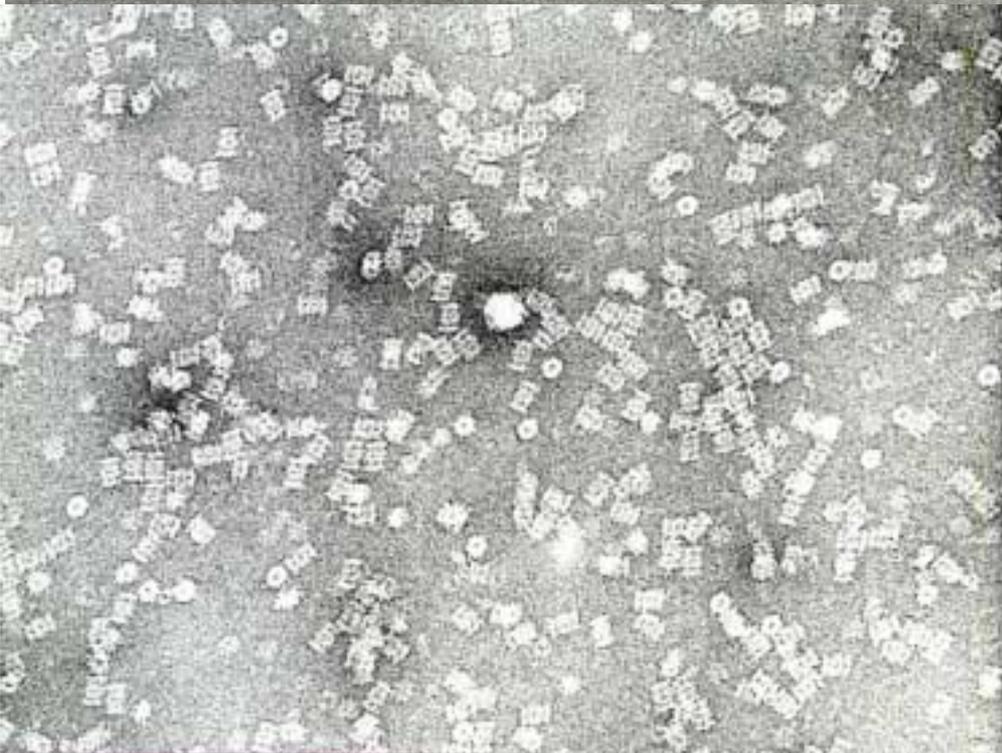
On peut expliquer ces résultats en supposant que le protéasome de mousse fraîchement purifié possède une activité protéolytique latente qui pourrait être activée, dans notre cas, par un traitement au froid; celui-ci provoquerait un léger changement de conformation du complexe qui rendrait ses sites actifs plus accessibles. Cette activation n'est apparemment pas due à l'élimination d'un inhibiteur potentiel lié à la protéine puisque nous avons effectué une nouvelle séparation, après stockage au froid, sur colonne à tamis moléculaire et que nous n'avons obtenu qu'un seul et unique pic correspondant à la taille du protéasome. Aucune protéine n'a été éluée dans d'autres fractions de la colonne.

Microscopie électronique

Des photographies en microscopie électronique de notre préparation de protéasome sont présentées à la figure 2.13,A et B. Deux techniques différentes ont été utilisées: la coloration négative (negative staining) et la vitrification de l'échantillon dans de la glace amorphe avec coloration négative (Adrian et al., 1998). Cette dernière technique nous offre des images ayant un contraste et une résolution très élevés. Ces méthodes sont décrites au chapitre 5. Ces micrographies nous montrent une structure symétrique composée de 4 anneaux empilés formés chacun de 7 sous-unités; elle mesure approximativement 11 nm de diamètre et 14 nm de



A



B

Fig.2.13 Photographies de microscopie électronique d'une préparation de protéasome de *P. patens* par les techniques A) de coloration négative B) de vitrification en milieu aqueux (*cryo-negative staining*).

longueur avec un trou central de 3 nm diamètre. Ce complexe possède des caractéristiques structurales semblables à la plupart des protéasomes eucaryotiques isolés jusqu'ici (Tanaka et al., 1988; Schliephacke et al., 1991; Yang et Malek, 1991; Morimoto et al., 1995; Kopp et al., 1997; Ozaki et al., 1992; Sanchez et al., 1995)

2.2 RECHERCHE DU PROTEASOME 26S: PURIFICATION SUR GRADIENT DE GLYCÉROL

Chez un certain nombre d'eucaryotes étudiés jusqu'ici (levure, drosophile, réticulocyte de lapin) (Hough et al., 1987; Ikai et al., 1991; Udvardy, 1993; Chen, 1995), le protéasome 20S constitue le "corps" d'un complexe de plus grande taille, le protéasome 26S, auquel il se trouverait systématiquement associé. Cette nouvelle structure, née de l'association, sous certaines conditions, du protéasome 20S et de protéines additionnelles (19S), possède la particularité unique de dégrader des conjugués ubiquitinés. Il semblerait, à ce jour, que seule cette structure posséderait cette propriété.

Dans les procédures de purification du protéasome 26S appliqués aux organismes eucaryotiques, tels que la levure, la drosophile, oocytes de xénope et le rat, quelques conditions sont à satisfaire si l'on veut éviter sa dissociation. En effet, tous les tampons utilisés lors de la purification du 26S doivent contenir 5 mM Mg^{2+} , 2 mM ATP, un système de régénération de l'ATP et 20 % de glycérol afin d'assurer la stabilisation du complexe. De plus, dans ces mêmes procédures, une étape de purification sur gradient de glycérol de 10 à 40 % est prévue (Hough et al., 1987; Peters et al., 1993; Udvardy et al., 1993).

La question est donc de savoir si le protéasome 20 S de *P. patens* que nous avons isolé, existe en tant que particule libre ou fait partie intégrante d'un complexe de plus grande taille tel que le 26 S ?

Pour y répondre, un extrait brut de mousse contenant de l'ATP, du magnésium et un système de régénération de l'ATP est séparé sur un gradient de glycérol de 10 à 40 %. Parallèlement, un extrait brut de mousse sans ATP ni magnésium et du protéasome purifié sont séparés sur un même type gradient. Dans le même temps, nous mettons en évidence la capacité du protéasome de la mousse à dégrader la caséine dénaturée.

On constate que les profils de dégradation de la caséine (fig.2.14.), après séparation des deux extraits bruts traités ou non avec de l'ATP, sont identiques. Un pic principal d'activité, fractions 14 à 24, met en évidence l'activité très forte des protéases de faible masse moléculaire (sans doute vacuolaires) qui n'ont que peu ou pas pénétré dans le gradient. Un deuxième pic d'activité nettement plus faible (fractions 9 à 12), situant les protéases à haute masse moléculaire, se superpose parfaitement à l'activité du protéasome purifié (flèche P).

De plus, les *immunoblots*, développés avec des anticorps antiprotéasome de *P. patens*, des trois gradients (figures 2.14.A) extrait brut, B) extrait brut + ATP et C) protéasome purifié), séparés sur gel non dénaturant, se superposent également. Ils situent le protéasome de mousse au niveau de ce deuxième pic d'activité (flèche P, fig.2.14). L'analyse, sur gel non dénaturant, des fractions du gradient de glycérol nous donne le profil de séparation des protéines d'un extrait brut de mousse (fig. 2.15). On observe notamment que les fractions contenant la Rubisco, la protéine majeure, chevauchent celles qui contiennent le protéasome.

Ainsi l'addition d'ATP et de magnésium ne provoque pas l'apparition d'un nouveau complexe de masse moléculaire plus élevée, tel que le 26S, puisque l'on n'observe pas de décalage ni l'apparition d'un nouveau pic d'activité à proximité du protéasome purifié.

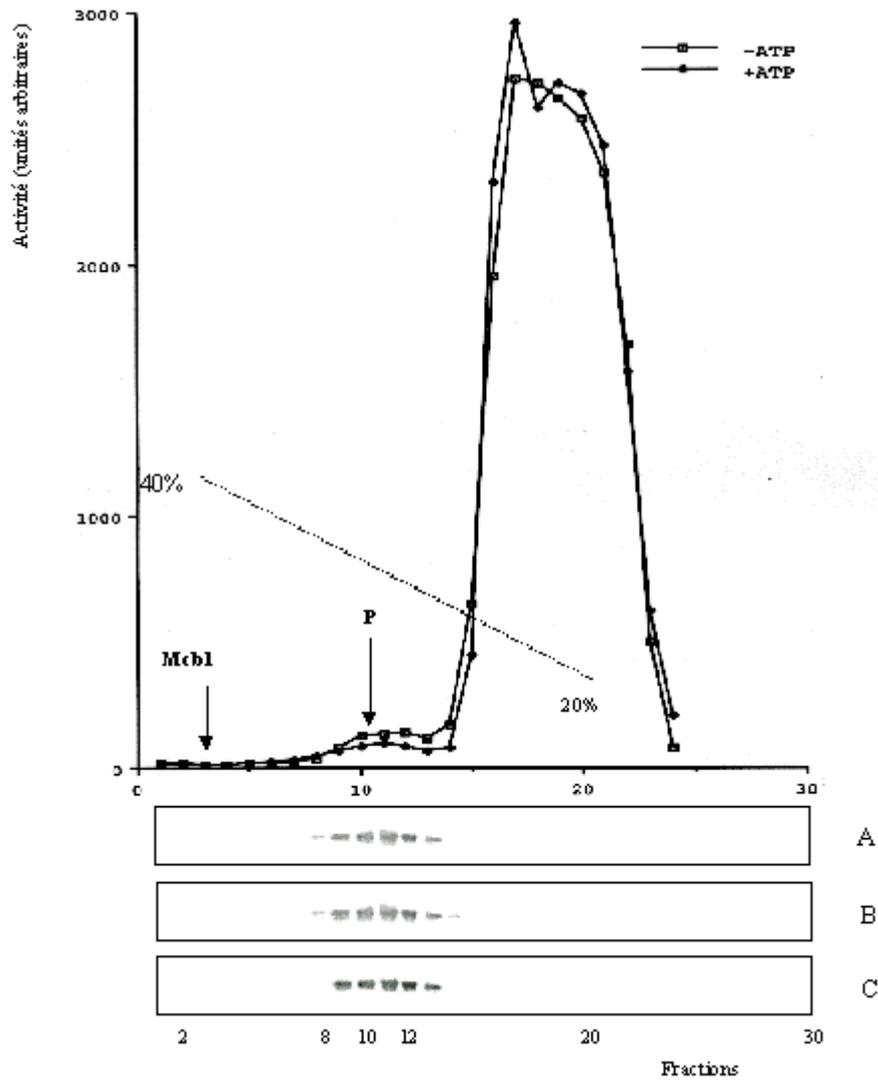


Fig. 2.14. Mise en évidence des activités de dégradation de la caséine sur des extraits bruts de mousse *P. patens* traités ou non avec de l'ATP et séparés sur un gradient de 20 à 40% de glycérol ().

Encadrés: *Western blots* des fractions des gradients de glycérol séparés sur gel non dénaturant et révélés aux anticorps antiprotéasome de mousse. **A)** extrait brut sans ATP, **B)** extrait brut avec ATP, **C)** protéasome purifié.

Mcb1) position de la protéine révélée aux anticorps antiMcb1(frac.3).

P) position du protéasome

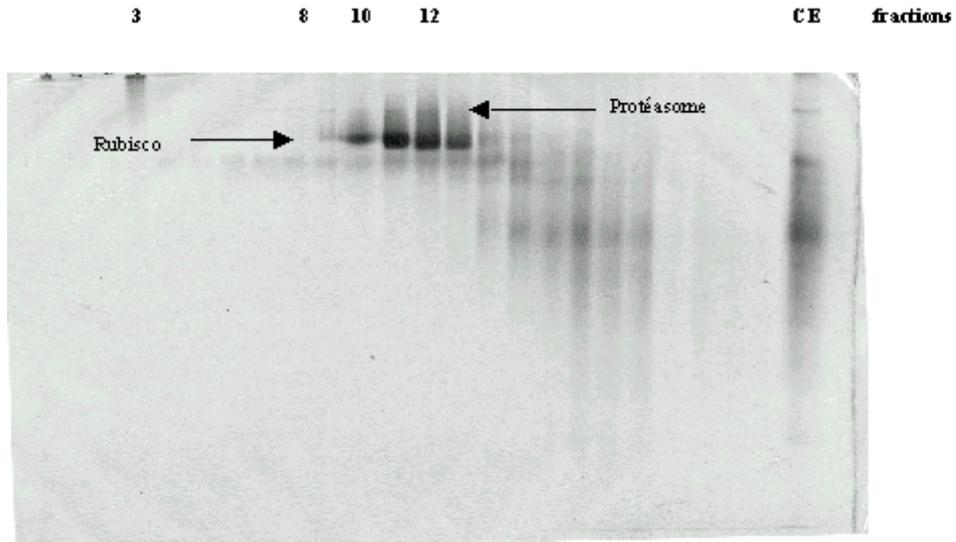


Fig. 2.15. Analyse des fractions d'un extrait brut de mousse séparé sur gradient de 20 à 40% de glycérol sur gel non dénaturant et coloré au bleu de Coomassie. Les positions de la Rubisco (fr. 10 à 13) et du protéasome (fr. 9 à 12) sont indiquées. La fraction 3 contient sans doute des fragments de membranes. CE: extrait brut de mousse

Bien que nous ne trouvions pas de protéasome 26S, existe-t-il un complexe régulateur 19S ou PA700 chez la mousse?

Deux types d'anticorps ont été utilisés contre les *western blots* des gradients de glycérol précédents. Les anticorps antiparticule μ (l'homologue du PA700 ou 19S chez la drosophile) (Udvardy, 1993) nous ont été fournis par A. Udvardy (*Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences*, Hongrie) qui a isolé cette particule de la drosophile (Udvardy, 1993) et les anticorps antiMcb1, par R. Vierstra, (Université du Wisconsin, Madison), qui a produit et utilisé ses anticorps sur les *western blots* que nous lui avons soumis. La protéine MCB1 est une sous-unité du 19S qui possède la propriété de se lier aux chaînes de polyubiquitine; elle est universellement représentée chez les eucaryotes (Deveraux et al., 1994; van Nocker et al., 1996; Girod et al., 1998). Les anticorps antiMCB1 nous ont révélé un signal dans la fraction 3 soit à 40 % de glycérol (fig.2.14). La forte agrégation de MCB1 ou l'association de celle-ci à des débris de membranes encore présents dans l'échantillon brut peut expliquer sa présence dans des fractions à hautes concentrations de glycérol. Les anticorps antiparticule μ n'ont pas révélé la présence de protéines spécifiques. Si une structure 19S existait – structure stable (Sawada et al., 1997) puisque certains chercheurs ont pu la purifier sans ATP – mais non associée au protéasome 20S, sa position dans le gradient devrait se situer près de celle du protéasome 20S (leur taille étant semblable)!

La dégradation de la caséine par le protéasome de mousse est faible en comparaison de celle qu'effectuent les protéases libres séparées sur ce même gradient. L'accessibilité de ce substrat aux sites catalytiques est plus difficile dans le cas du complexe 20S, mais, on l'a vu, pourrait être activée lors d'un changement de conformation obtenu par traitements thermiques (ex. le froid).

2.3 ANALYSE COMPARATIVE

Pour comparer la structure quaternaire du protéasome de *P. patens* à d'autres protéasomes eucaryotiques, nous avons procédé à l'extraction du protéasome 20S sur de petites quantités de matériels provenant de sources différentes (*Arabidopsis thaliana*, levure, placenta humain, foie de bœuf, *T. acidophilum*). Nous avons utilisé la même méthode de purification que celle que nous avons appliquée à la mousse *P. patens*.

Les profils de séparation sur gel dénaturant des protéasomes 20S de ces différents organismes sont très semblables (fig. 2.16.B). Les tailles de leurs sous-unités se situent entre 20 et 35 kDa. Sur gel non dénaturant (fig. 2.16.A), les tailles apparentes des complexes sont identiques entre *A. thaliana* et *P. patens*, l'homme et le bœuf; la levure se trouve dans une position intermédiaire alors que *T. acidophilum* se détache des organismes plus évolués. La plus grande hétérogénéité (fig. 2.17.) se constate sur les gels IEF en deux dimensions où la distribution des sous-unités, suivant la charge et la taille, diffère fortement d'un organisme à un autre.

Les activités spécifiques des protéasomes (fig. 2.16.C) varient sensiblement entre organismes. De plus, les rapports entre les activités spécifiques des différents protéasomes ne sont pas conservés d'un organisme à un autre, sans doute parce que ces activités sont fonction du rôle physiologique des protéasomes dans leur tissu respectif

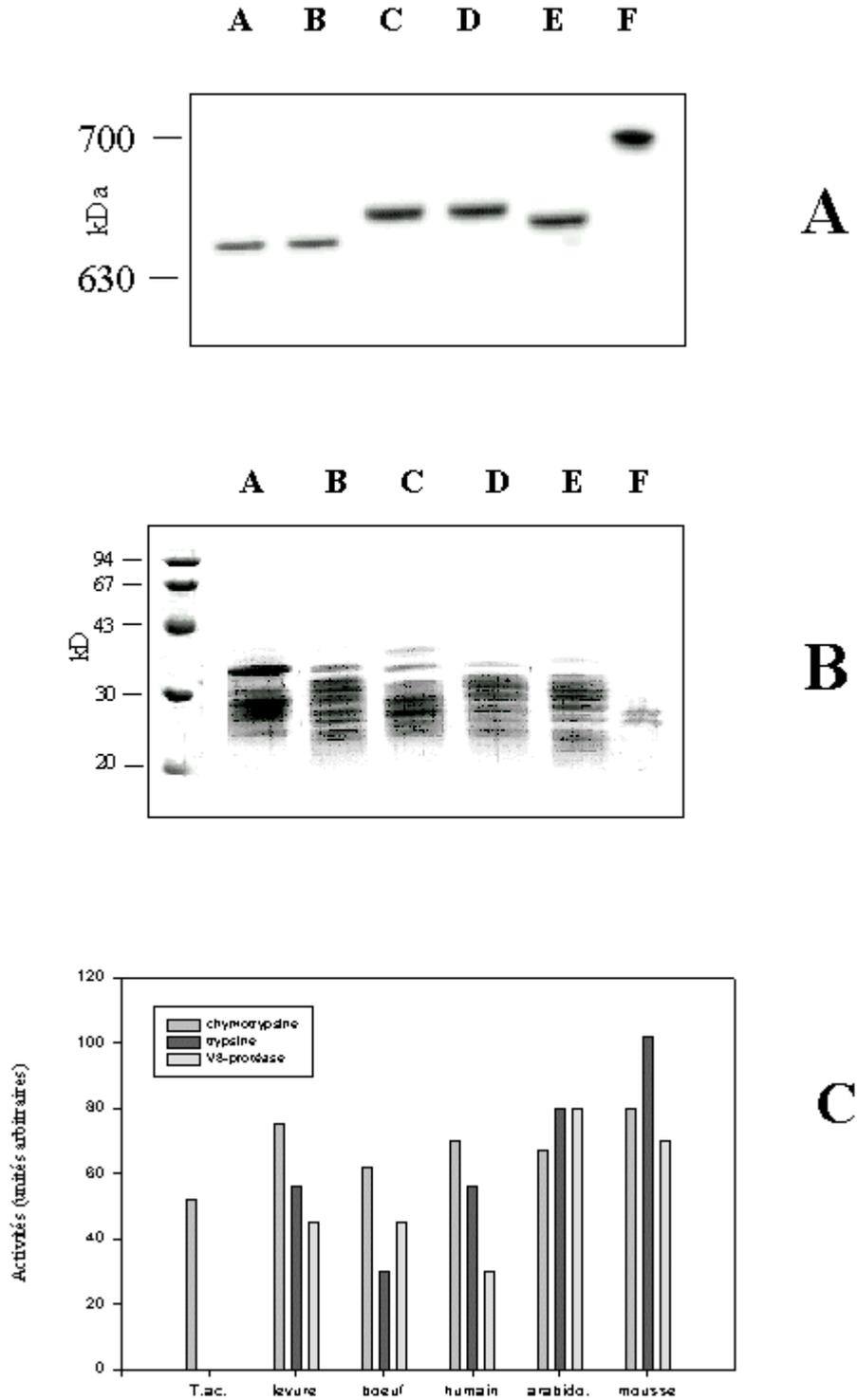


Fig.2.16 **Analyses électrophorétiques** **A)** ND-PAGE **B)** SDS-PAGE 14% des protéasomes purifiés de A) *P. patens* B) *A. thaliana* C) bœuf D) humain E) levure F) *T. acidophilum*. **C)** comparaison des différentes activités peptidasiques des protéasomes purifiés. La mesure de l'activité est effectuée sur 1 mg de protéine durant une heure à 37 °C.

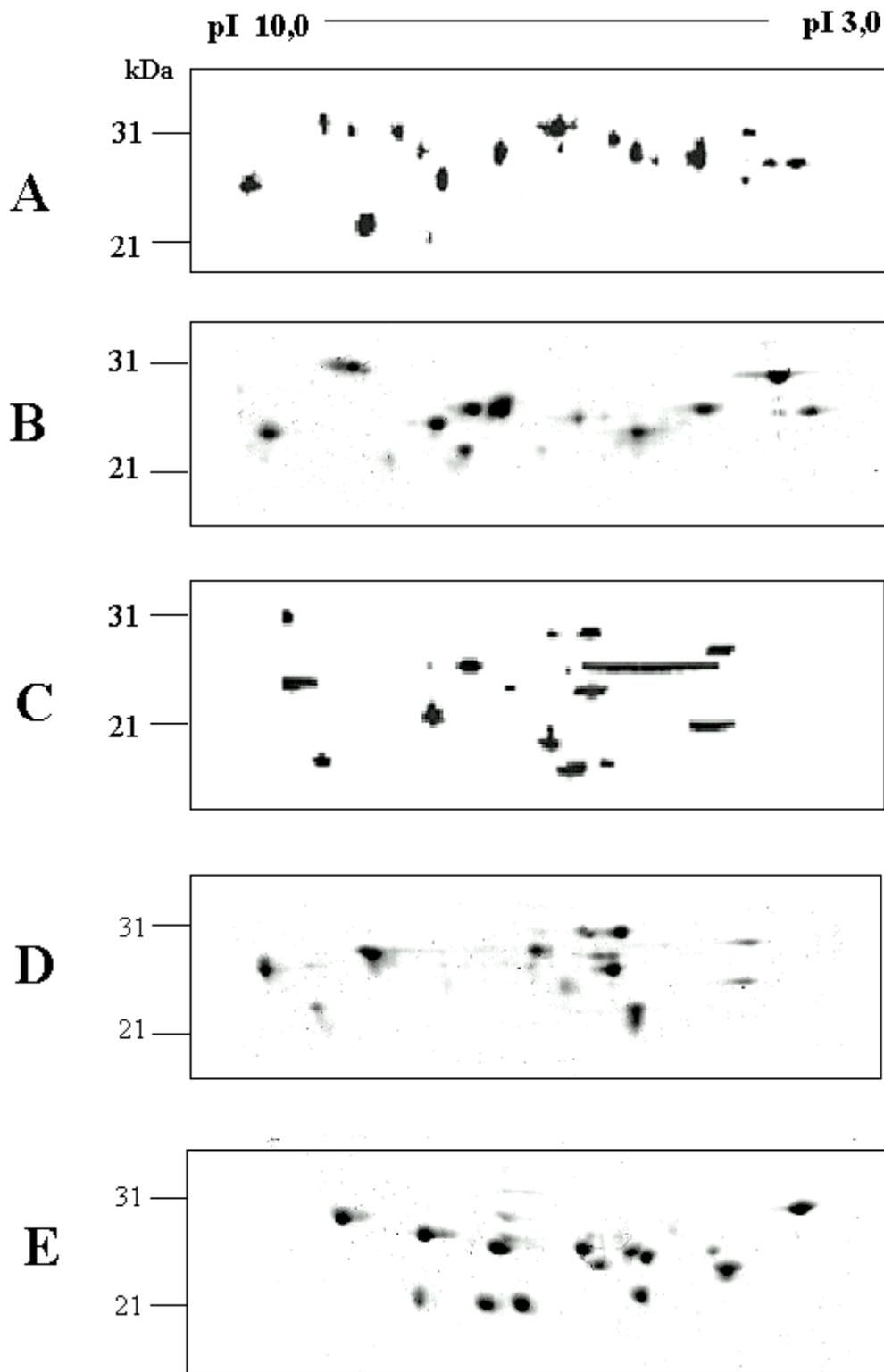


Fig. 2.17. Gels en deux dimensions (IEF, SDS-Page 14%), colorés au bleu de Coomassie, de divers protéasomes; A) mousse *P. Patens*, B) *A. thaliana* C) humain, D) bœuf, E) levure.

2.4 DISSOCIATION ET RECONSTITUTION DU PROTÉASOME DE LA BRYOPHYTE *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Des expériences de dissociation et reconstitution ont déjà été entreprises sur le protéasome de l'archéobactérie *T. acidophilum* (Grziwa et al., 1994). Celles-ci ont démontré la possibilité de reconstituer, après dissociation totale au moyen de magnésium, la structure quaternaire du protéasome de l'archéobactérie (composée de deux seuls types de sous-unités α et β). Sur la base des expériences de Grziwa et al., nous avons voulu démontrer ici la possibilité de dissocier les anneaux α et β d'un protéasome eucaryotique, de *P. patens*, dans le but d'étudier leur structure et leurs composants respectifs

A cette fin, du protéasome de mousse est traité au moyen d'urée (4M final). Cette concentration a été choisie sur la base d'expériences de dissociation que nous avons effectuées en traitant des préparations de protéasome à différentes concentrations d'urée, que l'on a séparées sur gel non dénaturant. A partir de 4 M d'urée, des bandes de tailles inférieures à celles du protéasome apparaissent, ce qui indique la présence de nouvelles structures (résultats non montrés).

Après traitement à l'urée, la préparation est séparée sur colonne HPLC à tamis moléculaire. Les fractions contenant les pics obtenus sont analysés par gel IEF en deux dimensions (fig.2.18.B). Par la suite, toutes les fractions récoltées de la chromatographie sur tamis moléculaire sont rassemblées, puis dialysées progressivement, de façon à éliminer l'urée et à renaturer les protéines. Le tout est ensuite analysé sur gel non dénaturant, transféré sur membrane PVDF et révélé aux anticorps antiprotéasome. (fig.2.18.C.)

La dissociation partielle a permis de séparer trois populations distinctes de protéines. Deux d'entre elles, contenues dans les pics α et β , sont composées de sous-unités ayant des charges nettes et des tailles différentes (fig. 2.18.B). La superposition des gels en deux dimensions permet de reconstituer approximativement le profil 2D du protéasome de mousse malgré la perte de quelques sous-unités se trouvant dans le pic 3. Il est donc possible de dissocier un protéasome eucaryotique en structures intermédiaires ayant des propriétés bien distinctes

.Toutefois, l'expérience de reconstitution n'a pas donné les résultats escomptés (fig.2.18.C2) puisque l'on obtient une population non homogène de structures faites d'assemblages ou d'agrégations aléatoires de sous-unités. De plus, toutes les activités protéolytiques ont été perdues, seule l'activité chymotrypsique persiste faiblement. L'assemblage du protéasome chez les eucaryotes est donc régi par des processus plus complexes que chez l'archéobactérie *T. acidophilum* (Zühl et al., 1997) (Zwickl et al., 1994).

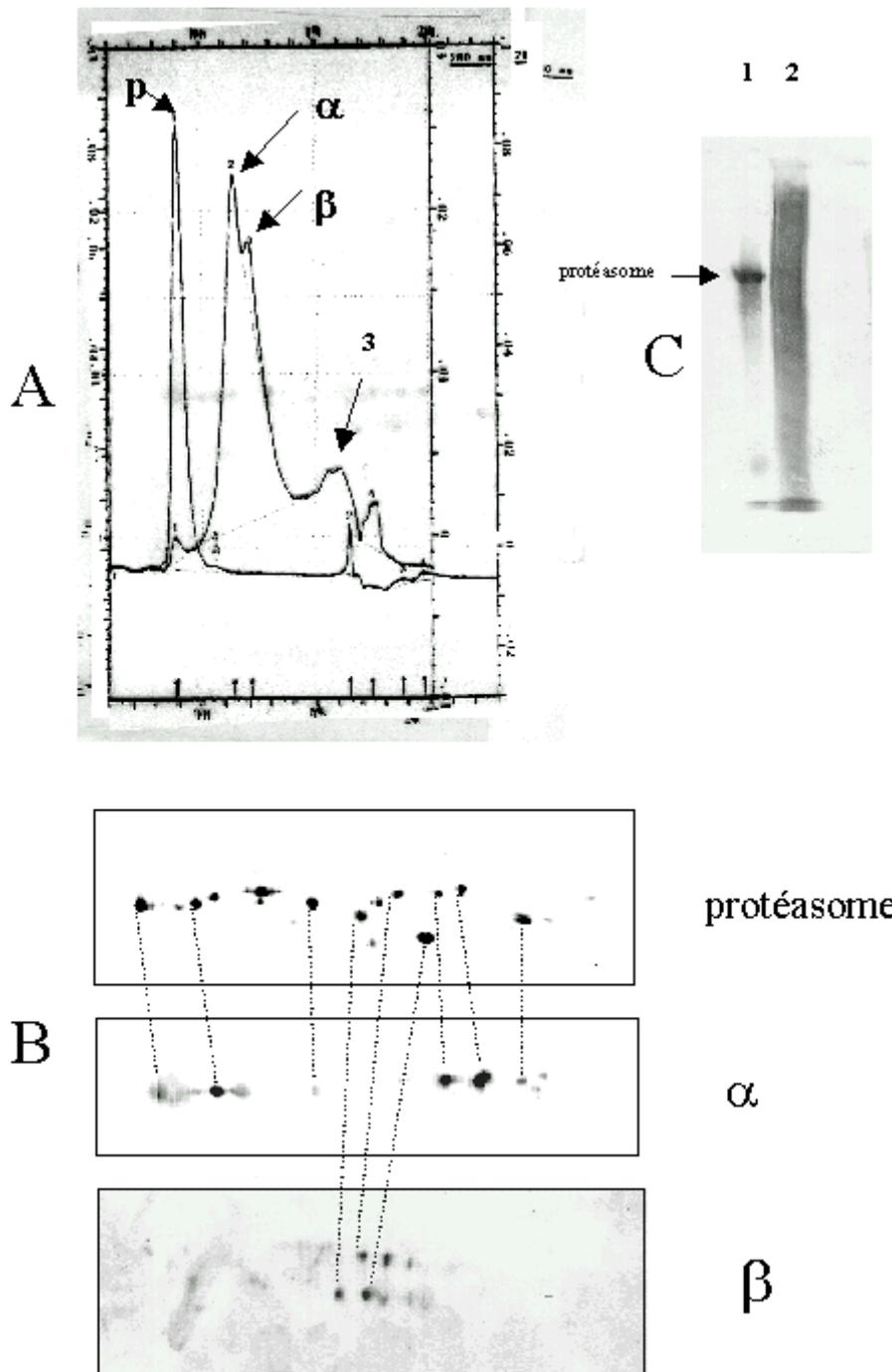


Fig. 2.18 **Expérience de dissociation et reconstitution.** A) chromatogramme de la séparation sur HPLC à tamis moléculaire de la préparation de protéasome traitée à l'urée. a: position présumée de l'anneau alpha. b: position présumée de l'anneau bêta. P: position du protéasome pur non traité à l'urée B) Analyses des pics obtenus en (A) sur gels en 2D, colorés à l'argent. a: sous-unités présumées de l'anneau alpha. b: sous-unités présumées de l'anneau bêta. C) expérience de reconstitution: *western blot*, révélé aux anticorps antiprotéasome, de gels non dénaturant, de préparations de protéasome 1) avant dissociation 2) après dissociation puis reconstitution.

2.5 IMMUNOLOGIE DU PROTEASOME DE *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Introduction

La possibilité d'obtenir des anticorps antiprotéasome de *P. patens* permet d'envisager plusieurs expériences. Ces anticorps, fixés sur un support chromatographique, permettraient une purification rapide et sélective du protéasome de mousse à partir d'un extrait brut. L'immunoprécipitation permettrait d'isoler et de caractériser des protéines interagissant avec le protéasome; les conditions de ces interactions et la stabilisation devront être définies si l'on désire obtenir une coprécipitation, protéasome-protéines, efficace. L'immunocytochimie permettrait de localiser, et donc d'étudier, la distribution du protéasome de façon à préciser son rôle dans différents événements cellulaires. Le criblage d'une banque d'expression par anticorps est l'une des techniques classiques pour isoler des gènes codant pour l'antigène recherché. L'étude de l'immunoréactivité des anticorps antiprotéasome de mousse dirigés contre des protéasomes d'autres organismes pourrait mettre en évidence les caractéristiques évolutives interspécifiques des différentes sous-unités du protéasome.

*Préparation des anticorps antiprotéasome de *P. patens**

Un lapin (*New Zealand White*) a été immunisé une première fois avec 700 µg de protéasome purifié sur gel non dénaturant. Après trois semaines, deux rappels ont été effectués, à deux semaines d'intervalle, au moyen de 300 µg de protéasome de mousse purifié sur gel dénaturant SDS-PAGE.

Immunoréactivité

L'immunoréactivité des anticorps antiprotéasome de mousse est analysée sur *western blot* de gels d'électrophorèse SDS-PAGE et IEF en deux dimensions de protéasome purifié de mousse (fig. 2.19.A)

La réactivité croisée de ces mêmes anticorps est mise en évidence sur les *western blots* d'un gel en deux dimensions de protéasome humain (fig. 2.19.B) et d'un gel non dénaturant de différents extraits bruts de cellules eucaryotiques (fig. 2.19.F).

L'antisérum antiprotéasome de mousse obtenu dans le lapin réagit fortement contre toutes les sous-unités du protéasome de mousse séparé par SDS-PAGE (fig. 2.19.E). Toutefois, on constate une hétérogénéité au niveau de la réponse antigénique des différentes sous-unités (fig.2.19.A). En effet, certaines d'entre elles réagissent très fortement aux anticorps alors qu'elles sont présentes en quantité très faible ou non décelable sur gel coloré au bleu de Coomassie, à la différence des autres, qui, fortement représentées, ne sont cependant pas reconnues par ces mêmes anticorps.

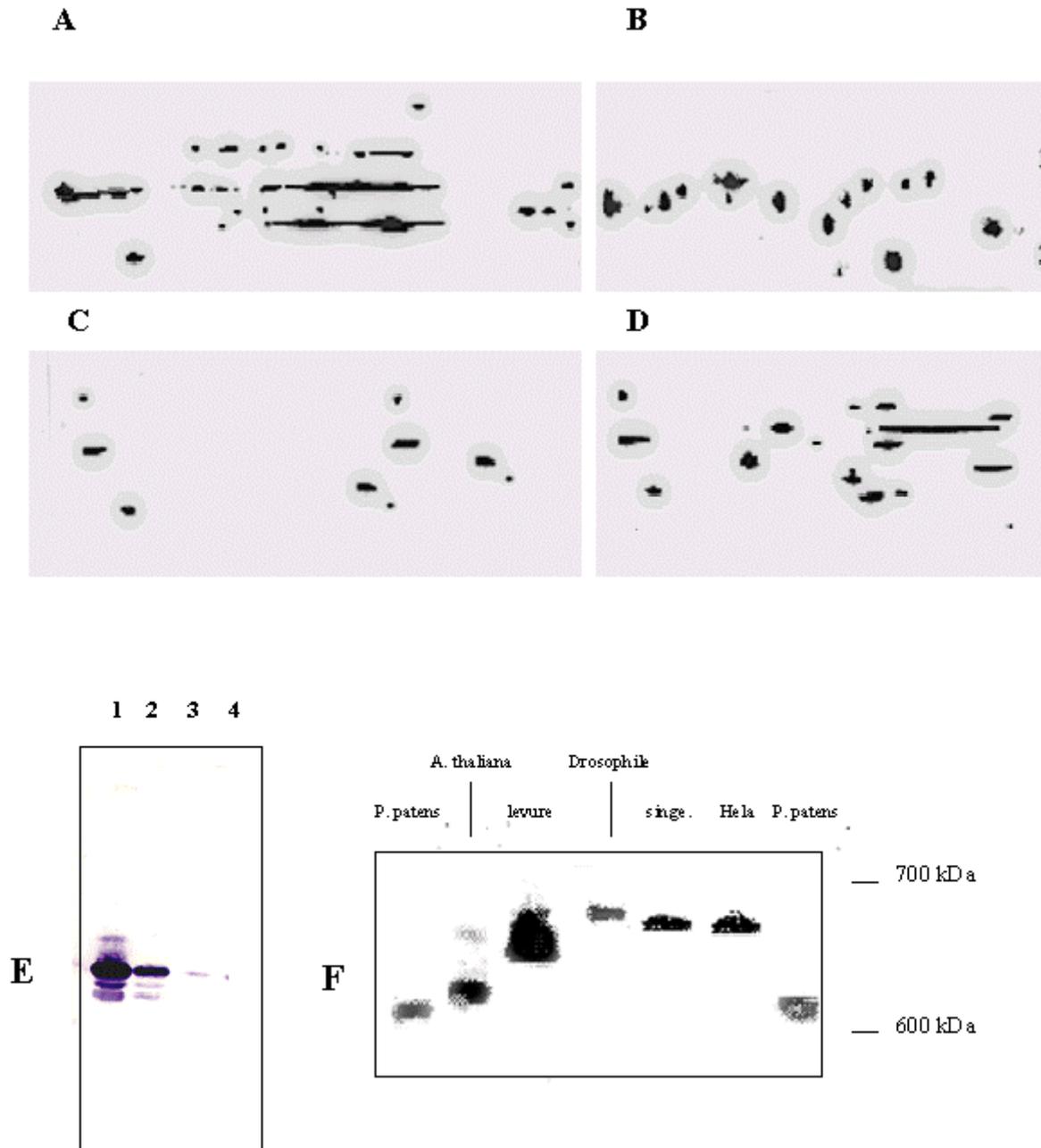


Fig. 2.19 **Analyses immunologiques de l'antisérum de lapin antiprotéasome de *P. patens*.** *Western blots* des gels en deux dimensions de protéasomes **(A)** de *P. patens*, **(C)** humain, et révélés avec l'antisérum antiprotéasome de *P. patens*. Gels en deux dimensions coloré au bleu de Coomassie, du protéasome **(B)** de souris, **(D)** humain. *Western blots*, révélés avec l'antisérum antiprotéasome de *P. patens*, de différents extraits bruts de cellules eucaryotiques **(F)** analysés sur gel non dénaturant, et de protéasome de souris **(E)** (dilution sérielle: piste 1,2,3 de 100-10-1 hg) analysé sur gel SDS-PAGE 14%, (E/ piste 4: 1mg de protéasome analysé avec le sérum préimmun)

Le rapport signal-bruit de fond est excellent. La réactivité croisée des anticorps antiprotéasome de *P. patens* avec certaines sous-unités du protéasome humain (fig.2.19.C) met en évidence la reconnaissance commune d'épitopes de sous-unités qui auraient été conservées durant l'évolution. Cet antisérum montre une excellente spécificité de

reconnaissance des protéasomes eucaryotiques (fig.2.19.F). Dans ces conditions de travail, aucune autre structure ou protéine séparée sur ce gel non dénaturant n'est révélée. Enfin, les anticorps antiprotéasome de mousse n'ont pas de réaction croisée avec une préparation pure du protéasome de l'archéobactérie *T. acidophilum*.

Criblage d'une banque de cDNA au moyen d'anticorps antiprotéasome de P. patens

Le criblage d'une librairie d'expression de DNA recombinant au moyen d'anticorps spécifiques s'utilise couramment pour isoler et identifier des clones. Les criblages ont été effectués à l'aide d'anticorps polyclonaux antiprotéasome de mousse. Alors que l'on aurait pu s'attendre à une multitude de séquences identifiant des sous-unités du protéasome, nous n'avons obtenu qu'une seule et unique séquence. En effet, tous les clones que nous avons séquencés se sont avérés être identiques si ce n'est par leur longueur! Cette séquence n'a aucune homologie significative avec des sous-unités de protéasome d'autres organismes ni avec des séquences contenues dans les différentes banques de données (SWISSPROT, EMBL).

Dans un premier temps, ce résultat nous a surpris, mais après avoir répété plusieurs fois le criblage, nous nous sommes rendu compte que les signaux obtenus se distinguaient malgré tout très difficilement du bruit de fond généré lors du développement des *immunoblots*. De plus, les désensibilisations ou purifications d'anticorps antiprotéasome n'ont pas permis d'isoler un seul clone codant pour une sous-unité du protéasome de *P. patens*. Nous avons donc abandonné l'idée d'un criblage par anticorps.

2.6 DISCUSSION

Les étapes et la séquence de purification que nous avons appliquées à la mousse *P. patens*, nous ont permis d'obtenir une préparation de protéasome 20S très pure. En effet la technique de *cryo-negative staining* en microscopie électronique, développée récemment en collaboration avec Adrian M. et Larquet E. du laboratoire d'analyse ultrastructurale de notre Université, nous montre pour la première fois une résolution et un contraste d'images de protéasomes des plus élevés (Adrian et al., 1998). La définition exceptionnelle de ces micrographies offre la possibilité, par numérisation de l'image et traitement informatique des données, de modéliser fidèlement le protéasome 20S de *P. patens* (voir chap. 5).

Les caractéristiques biochimiques et biophysiques du protéasome de *P. patens* sont semblables à celles de protéasomes isolés à partir d'autres eucaryotes. Ces derniers présentent en particulier les mêmes fonctions enzymatiques, sauf le protéasome de *T. acidophilum*. En effet, la multiplicité des sites catalytiques de ces enzymes eucaryotiques se présente comme une de leur principale propriété. Aucune information réellement exploitable ne peut malheureusement être dégagée de la comparaison entre les activités spécifiques des protéasomes issus d'organismes différents. Les peptides synthétiques que nous avons utilisés ne reflètent pas les substrats auxquels se trouve confronté le protéasome *in vivo*. Un certain nombre de publications affirment que l'activité spécifique est variable suivant la longueur, la séquence du peptide utilisé, et les conditions de réaction (pH, concentration, température) (Hough et al., 1986; Tanaka et al., 1986). Pourtant, une telle étude peut s'avérer utile lorsque l'on désire mettre en évidence les propriétés enzymatiques de protéasomes isolés d'un même

organisme mais extraits de tissus différents, ceci dans le but de mieux cerner le rôle physiologique de ces complexes (Cardozo et al., 1995).

La latence de la fonction protéolytique du protéasome de *P. patens* est démontrée puisque l'on observe une forte augmentation des activités spécifiques lors de chocs thermiques. Ces résultats sont en accord avec ceux que Tanaka et al. (1986) a publiés. La structure moléculaire est sans doute responsable de cette latence puisque les changements de conformation peuvent facilement affecter les activités catalytiques du complexe. Cette latence peut avoir une importance physiologique dans la régulation de la protéolyse. Sur gel non dénaturant, la position relative des protéasomes est dictée par leur charge globale et non par leur taille puisque les temps de rétention que nous avons obtenus, lors de la purification de ces complexes sur colonne à tamis moléculaire, sont semblables! Chez ces différentes espèces, les sous-unités sont de tailles similaires (20 à 30 kDa) mais présentent de fortes différences dans leur point isoélectrique (pI: 3 à 10). Cette similitude de taille des sous-unités est sans doute importante dans la construction d'un complexe symétrique. L'hétérogénéité des charges nettes de ces sous-unités est vraisemblablement liée à l'assemblage du complexe. En effet, l'interaction complémentaire des charges peut-être importante dans l'organisation moléculaire de l'enzyme. Il est intéressant de noter ici que malgré une distribution différente des sous-unités sur gel 2-D (fig. 2.17), on constate une mobilité électrophorétique identique sur gel non dénaturant (fig. 2.16.A) entre les protéasomes d' *A. thaliana* et *P. patens* ainsi qu'entre les protéasomes de l'homme et du bœuf.

Les analyses immunologiques montrent que les anticorps antiprotéasome de *P. patens* réagissent plus ou moins fortement avec tous les protéasomes isolés, excepté celui de l'archéobactérie *T. acidophilum*. Plus loin, on constate que seules quelques sous-unités du protéasome humain sont reconnues par ces anticorps. Ceci laisse à penser que certaines fonctions ou certains domaines de ces sous-unités ont été conservés durant l'évolution (Udvardy, 1993).

Les conditions de dissociation que nous avons établies nous permettent de séparer, en fonction de la taille, deux populations distinctes de sous-unités correspondant sans doute aux familles des sous-unités α et β . Zwickl et al., (1992) ont cloné, puis exprimé séparément, les sous-unités α et β de *T. acidophilum* dans *E. coli* (Zwickl et al., 1994) (Zwickl et al., 1992). Dans cette expérience, la sous-unité α s'organise en deux anneaux associés, comportant chacun sept sous-unités, alors que les sous-unités β (leur masse moléculaire est plus petite que celle des α) s'agrègent en structures désordonnées ayant des tailles variant de 200 à 400 kDa. Il semble donc que, lors de nos expériences, ce soient ces deux structures que nous avons séparées sur colonne à tamis moléculaire. En effet, leur comportement sur ce type de colonne est différent; les structures formées des sous-unités β , plus ramassées et compactes, présenteront un encombrement réduit et donc une taille relative plus petite que celles formées des sous-unités α présentant une symétrie radiale et occupant de ce fait un espace relatif plus conséquent. Dans ces conditions de dénaturation, les sous-unités de l'anneau α sont très stables, à la différence des sous-unités β , qui s'agrègent en structures de tailles non définies. Cette stabilité doit sans doute être essentielle lors de l'assemblage de la structure 20S. Elle confirme que l'anneau α doit se former en premier lieu, puis qu'il dirige l'assemblage ordonné des sous-unités β sur lui-même (Pühler et al., 1992; Chen et al., 1996; Schmidt et Kloetzel, 1997; Zühl et al., 1997). L'identification des sous-unités du protéasome de *P. patens*, par séquençage, nous permettrait de confirmer ce résultat.

Les tentatives de reconstitution du protéasome de *P. patens*, consécutives à sa dissociation totale au moyen d'urée, n'ont pas permis de restaurer la structure native du complexe. Une multitude de structures complexes intermédiaires constituées par la combinaison aléatoire des sous-unités α et β ont été obtenues. Ceci suggère que l'assemblage du protéasome passe par un processus d'agencement précis, tenant compte de la taille et des charges nettes de chacun des composants et, sans doute, d'une régulation contrôlée de l'expression des gènes codant pour ces sous-unités (Schmidt et Kloetzel, 1997). Le fait que *T. acidophilum* ne soit constitué que d'un seul type de sous-unités α et β doit donc permettre une plus grande souplesse dans l'agencement de la structure du complexe (Grziwa et al., 1993).

On peut ainsi comprendre que les sous-unités qui sont responsables des activités perdues consécutivement à la renaturation doivent sans doute se retrouver dans un contexte spatial précis. Ceci laisse entendre que plusieurs sous-unités β du protéasome participent à un type d'activité protéolytique. Toutefois, seule l'activité chymotrypsique persiste sans doute parce qu'une seule sous-unité β suffit à catalyser cette activité. Cette propriété est partagée par l'archéobactérie *T. acidophilum* (Zwickl et al., 1994; Seemüller et al., 1995). On peut donc penser que l'agencement des sous-unités du protéasome sera d'autant plus rigide que sa fonction protéolytique sera complexe, complexité que les différents organismes ont acquise au cours de l'évolution.

Il a été démontré que la coexpression dans *E. coli* des sous-unités α et β de *T. acidophilum* permettait de reconstituer un protéasome totalement assemblé et fonctionnel (Zwickl et al., 1992; Zwickl et al., 1994). A partir de là, nous nous sommes demandé s'il était possible de reconstituer un protéasome hybride à partir d'une sous-unité α de *T. acidophilum* et d'une sous-unité β de protéasome eucaryotique humain. L'idée sous-jacente à cette expérience serait de pouvoir caractériser individuellement chacune des sous-unités d'un organisme dans un protéasome primitif constitué d'un seul type de sous-unités, α et β . Un effort particulier a été fait dans ce sens. Nous avons pu obtenir de W. Baumeister, (Max Planck Institut, Martiensried) la construction Pet7-5- α - β qui permet l'expression des sous-unités α et β de *T. acidophilum* dans *E. coli*. Celles-ci s'associent spontanément pour former la structure 20S de *T. acidophilum*. Nous avons cloné individuellement les sous-unités ZETA et DELTA, à savoir respectivement des sous-unités α et β humaines, obtenues par PCR sur une banque cDNA humaine, à la place de l'une ou de l'autre des séquences des sous-unités α et β du *T. acidophilum* sur le vecteur d'expression Pet7-5- α - β . L'expression de ces constructions hybrides chez *E. coli* n'a pas pu être démontrée et nous n'avons pas obtenu de complexes ou de protéasomes hybrides. Soit parce qu'il n'y avait pas d'expression correcte des constructions, soit parce qu'il n'y avait pas d'assemblage in vivo des sous-unités provenant d'organismes différents. Toutes les tentatives de reconstitution ont échoué. Récemment, des travaux semblables ont été entrepris par Gerards et al., (1997, 1998), qui ont coexprimé deux sous-unités α et β humaines dans *E. coli*. Ces expériences n'ont pas donné de résultats positifs.

Ainsi, l'arrimage des sous-unités β à l'anneau α du protéasome eucaryotique exige des éléments ou des domaines de structures secondaires spécifiques qui ne peuvent être fournis que par la présence de sous-unités α et/ou β voisines correctes. A l'heure actuelle, les informations sur le voisinage des sous-unités dans le complexe sont connues, la production de protéasomes eucaryotiques chimériques semble être possible dans le futur (Schmidt et Kloetzel, 1997). Toutes nos tentatives de mise en évidence d'une structure 26S, ou tout au moins d'un complexe 20S associé avec un ensemble de protéines distinct, ont échoué.

Pouvons-nous véritablement affirmer qu'un complexe de régulation tel le 19S, le PA 700 ou la particule μ n'existe pas chez *P. patens*?

Le gradient de glycérol est très souvent utilisé comme étape de purification pour la séparation des deux complexes 20S et 26S (Udvardy et al., 1993; Hough et al., 1987). Lors de ces purifications, en présence de magnésium et d'ATP, on peut observer deux pics d'activité côte à côte correspondant aux complexes 20S et 26S. Dans nos expériences, le traitement à l'ATP n'a pas fait apparaître de nouvelles structures dans le gradient de glycérol, distinctes du protéasome purifié. L'utilisation des anticorps antiprotéasome, antiparticule μ , ainsi que les mesures de l'activité de dégradation de la caséine, n'ont pas mis en évidence la présence de ces deux complexes. De plus, on ne constate pas une augmentation, ni une diminution d'activité due à un quelconque effecteur allostérique interagissant avec le protéasome. Sans ATP, on peut facilement imaginer que le complexe régulateur de 600 à 800 kDa migre dans le gradient de glycérol au niveau du complexe 20S puisque le pouvoir de résolution d'un tel gradient est faible. Nous avons utilisé deux types d'anticorps: des anticorps spécifiques envers la particule μ qui réagissent avec la plupart des structures 26S eucaryotiques et des anticorps spécifiques envers la protéine MCB1. Cette protéine, responsable de la fixation des chaînes de polyubiquitine, est présente dans la structure 26S du protéasome humain et de levure ainsi que chez *A. thaliana* et *P. patens*, mais il n'y a pas encore de preuve qu'elle fasse partie intégrante d'un complexe 26S chez ces deux organismes. Sur les gradients de glycérol, aucun antigène spécifique n'a été détecté au niveau du protéasome de *P. patens* ou dans son voisinage. Nous n'avons obtenu qu'un signal avec les anticorps anti-MCB1, situé à l'une des extrémités du gradient de glycérol (frac. 3).

Devant l'existence d'une forme apparemment unique de protéasome chez *P. patens*, le 20S, on est en droit de se demander si cet organisme est un cas isolé chez les eucaryotes?

Récemment, To et al. (1997) ont identifié et caractérisé le protéasome 20S de *Trypanosoma brucei*, un protozoaire parasite. Dans cet organisme, aucun complexe 26S n'a pu être isolé sur gradient de glycérol avec traitement à l'ATP, si ce n'est une protéine de 26 kDa qui interagirait avec le 20S de façon à moduler l'activité de dégradation des peptides. Sur ce constat, les auteurs proposent deux explications, soit le 26S de *Trypanosoma brucei* est dissocié durant la purification soit il n'y a pas de protéasome 26S! Nos expériences sur gradient de glycérol, nous permettent de rejeter la première explication dans le cas de *P. patens*. La deuxième explication qui consiste à affirmer qu'il n'y a pas de 26S chez *P. patens*, nous paraît la plus plausible.

L'hypothèse prédominante d'un protéasome 26S indispensable à la dégradation des conjugués ubiquitinés, nous amène à nous demander s'il existe tout de même chez *P. patens* une voie de dégradation dépendant de l'ubiquitine?

Le fait que nous ayons mis en évidence, par *Southern blot*, un gène homologue à *UBC8* d'*A. thaliana* codant pour une E2 (enzyme de conjugaison de la voie de l'ubiquitine) ainsi que la présence de conjugués ubiquitinés de haut poids moléculaire dans des extraits bruts de *P. patens*, nous permet de dire que la voie de dégradation dépendant de l'ubiquitine est fonctionnelle dans cet organisme.

Une question incontournable se pose donc à nous: le protéasome 26S existe-t-il ou est-il un artefact?

Peut-on mettre en doute le fait que le complexe 26S existe, puisque l'on possède des micrographies de sa structure, et qu'il est fonctionnel, puisqu'il est le seul à posséder la propriété de dégrader les conjugués ubiquitinés (Orlowski, 1993; Fujinami et al., 1994; Goldberg, 1995; Haas et al., 1997). Tant que l'on n'a pas démontré l'implication soit d'une autre structure soit d'un nouveau processus de dégradation des conjugués ubiquitinés, on se satisfera du protéasome 26S. Pourtant, un certain nombre de réflexions peuvent nous faire objectivement douter de l'existence du complexe 26S ou plus précisément de la structure 19S, dont les fonctions et les mécanismes exacts n'ont aujourd'hui pas encore été élucidés.

La première de ces réflexions a trait aux fonctions du 19S, du PA 700 ou de la particule μ . Les propriétés principales que l'on attribue à ces structures sont de reconnaître les conjugués ubiquitinés, d'éliminer ou de recycler les chaînes d'ubiquitine attachées aux protéines cibles, de dénaturer les protéines et de les injecter dans le protéasome 20S.

Que sait-on, au juste, sur ces fonctions?

La seule protéine de reconnaissance isolée du protéasome 26S humain et de la levure, MCB1 (Deveraux et al., 1994), lie des chaînes de polyubiquitine mais n'est pas essentielle à la survie de la levure. Les isopeptidases que l'on a caractérisées jusqu'ici, telle DOA4 chez la levure (Papa et al., 1993), sont soit libres soit faiblement associées, ou lorsqu'elles semblent l'être fortement, elles ne sont pas impliquées dans le processus principal d'élimination des chaînes (Lam et al., 1997). La dénaturation des protéines attribuées aux ATPases n'est pas démontrée. Un seul fait est réel, seule une *préparation* de protéasome 26S dégrade des conjugués ubiquitinés. En résumé, les véritables mécanismes impliqués dans la dégradation des conjugués sont inconnus! D'autres faits sont troublants. Plusieurs groupes de recherche ont isolé des protéines ayant de fortes homologies avec des sous-unités du complexe 19S. Par exemple, six sous-unités du complexe COP9/signalosome ont de grandes similitudes avec des sous-unités non ATPasiques du complexe régulateur 19S (Wei et al., 1998). Ces sous-unités (19S) partageraient également des propriétés structurales remarquables avec le complexe eIF3 (facteur d'initiation de la traduction) (Glickman et al., 1998). La parenté évidente entre ces particules peut-elle s'expliquer uniquement par le fait que celles-ci auraient évolué à partir d'un ancêtre commun? Peut-être, mais il est tout de même troublant de constater le grand nombre de protéines qui sont impliquées dans des voies biochimiques étrangères à la protéolyse et qui ont des homologies avec des sous-unités du complexe 19S. De plus, ces dernières joueraient des rôles multiples dans la cellule. Non seulement elles seraient engagées dans la structure du 26S mais elles participeraient à d'autres activités biochimiques. Ainsi, la protéine SUG-1, une sous-unité ATPasique du complexe 26S, serait également associée avec d'autres complexes protéiques, et aurait notamment une activité "DNA hélicase" (Fraser et al., 1997). SUG-1 serait également impliquée dans le métabolisme des RNA messagers (Makino et al., 1997). Finalement, la sous-unité MCB1 (S5a chez l'homme) est homologue de la sous-unité p44 du facteur de transcription (TFIIH) (Aravind et Ponting, 1998).

Au vu de ce qui précède, il n'est donc pas surprenant de constater que si des mutations ou des délétions sur l'une ou l'autre des sous-unités du 19S n'affectent pas l'organisme entier, c'est probablement parce qu'elles ne sont pas associées spécifiquement au protéasome 26S, mais sont plutôt impliquées dans d'autres voies biochimiques de la cellule. C'est en réalité ce qui se passe pour MCB1, dont la mutation ou la délétion n'est pas létale, alors qu'il s'agit d'une protéine tenue pour indispensable dans la reconnaissance des chaînes de polyubiquitine. De plus, la protéine MCB1 ou S5a interagit fortement avec la protéine Id1 qui module la

transcription de nombreux gènes contrôlant notamment des processus de différenciation et de prolifération cellulaires (Anand et al., 1997).

Comment expliquer le fait que, si des sous-unités sont spécifiques du protéasome 26S, elles trouvent leurs homologues dans d'autres voies biochimiques (Aravind et Ponting, 1998), que parfois elles s'associent avec des protéines qui ont des fonctions distinctes de la protéolyse (Barhite et al., 1998) (Zhu et al., 1998) et que parfois elles ont des activités enzymatiques distinctes de celles que l'on rencontre dans la voie de dégradation des protéines par l'ubiquitine (Katayama et al., 1996; Fraser et al., 1997).

L'association non-spécifique de protéines entre elles peut fournir une explication rationnelle à ces questions. Comment peut-on imaginer cette éventualité?

Seule la méthodologie de purification peut être mise en cause. Ainsi, les méthodes de purification du protéasome 26S comportent un nombre réduit d'étapes (3 à 4) incluant l'utilisation de gradients de saccharose et de glycérol. Or, ce type de gradient permet la stabilisation des complexes et possède un faible pouvoir de résolution. De plus, les fortes concentrations de glycérol (20%) et d'ATP que doivent contenir les solutions lors de ces purifications peuvent conduire à des associations non-spécifiques (Hough et al., 1987; Udvardy, 1993; Fujinami et al., 1994). Les analyses électrophorétiques de préparations de protéasome 26S, nous montrent qu'il y a une très grande variabilité dans la composition en protéines du complexe 19S. Ainsi le nombre (de 8 à 20) et la taille (de 35 kDa à plus de 200 kDa) des sous-unités d'une préparation de 26S peuvent considérablement varier d'un organisme à un autre. On constate également que les sous-unités du 19S ne se trouvent pas toujours dans un rapport stœchiométrique avec les sous-unités du 20S! Autre fait surprenant, en microscopie électronique, les protéasomes 26S, ou plus précisément les complexes régulateurs 19S, semblent identiques. Comment cela est-il possible alors que les profils de séparation sur gel SDS-PAGE des protéasomes extraits de la drosophile et de l'épinard par exemple sont totalement différents! En effet, il y a environ trois fois moins de "bandes de protéines" qui constituent le 19S de la drosophile que celui de l'épinard bien qu'il s'agisse d'assembler une même structure aux fonctions identiques (Udvardy, 1993; Fujinami et al., 1994). Les préparations de protéasome 26S observées en microscopie électronique nous montrent effectivement des protéasomes 26S, mais également des protéasomes 20S libres ou associés avec un seul 19S, ainsi qu'un bruit de fond très élevé dû à des agrégats de protéines. La structure du 26S est fragile sans doute parce qu'elle est constituée de protéines faiblement associées qui n'ont probablement pas leur place dans ce complexe. Le fait que la purification du protéasome 26S n'ait pas été poussée plus loin, trahit en quelque sorte la fragilité de la méthodologie. Bien que l'on mette en évidence l'activité d'une protéine, ou qu'on la mesure, dans des conditions de réactions différentes de celles qui existent dans la cellule, on est en droit de se demander si les conditions de purification sont réalistes. Est-il réaliste d'utiliser 2mM d'ATP et 5mM de magnésium et de surcroît 20 % de glycérol pour stabiliser une protéine relativement abondante et répartie aussi bien dans le cytosol que dans le noyau de la cellule? Sommes-nous alors proches des conditions qui existent in vivo? Nous ne savons pas encore ce qui se passe in vivo, mais les réflexions précédentes nous poussent à affirmer que l'on ne peut pas réduire le problème de la dégradation des conjugués ubiquitinés à la seule structure du protéasome 26S puisqu'à notre avis, cette dernière est probablement le reflet d'un artefact.

Plusieurs groupes de chercheurs ont isolé et caractérisé d'autres protéines ou des structures de

haut poids moléculaire pouvant s'associer avec le protéasome 20S (Li et al., 1991; Hoffmann et al., 1994; Mott et al., 1994). Nous n'en citerons que deux.

a) Le complexe PA28 ou régulateur 11S obtenu à partir des mêmes extraits cellulaires contenant le protéasome 26S (Chu-Ping et al., 1992; Kania et al., 1996). Ce complexe s'associe spontanément avec le protéasome 20S sans ATP. On ne connaît pas son rôle exact, mais il active fortement la dégradation des peptides (Song et al., 1997).

b) Le complexe CF-2, un inhibiteur du protéasome, de 240 kDa, présent également dans le cytosol de la cellule, composé de sous-unités identiques à l'acide δ -aminolévulinique déshydratase, impliqué dans la voie de biosynthèse des noyaux hèmes (Guo et al., 1994).

Au moins trois structures peuvent donc prétendre s'associer avec le protéasome 20S, à savoir le 19S ou PA700, le PA28 et le CF-2. Celles-ci peuvent former des complexes qui ont des structures et des fonctions distinctes. Le protéasome 26S, né de l'association protéasome "20S + 19S", manifeste une grande instabilité, à laquelle on peut parer moyennant de fortes concentrations de glycérol ainsi que de l'ATP. Il cohabite, *in vivo* avec un complexe tel que PA28, qui s'associe spontanément au protéasome 20S sans exigence biochimique particulière. Y-a-t-il une forme de compétition entre ces structures? Comment se règle leur cohabitation dans une même cellule? Si le protéasome 26S n'est pas un artefact, l'expression des protéines du PA28 ou CF-2 doit être contrôlée de manière à ne pas saturer toutes les structures 20S. Cette question doit être éclaircie!

Que peut-on penser de la structure 26S?

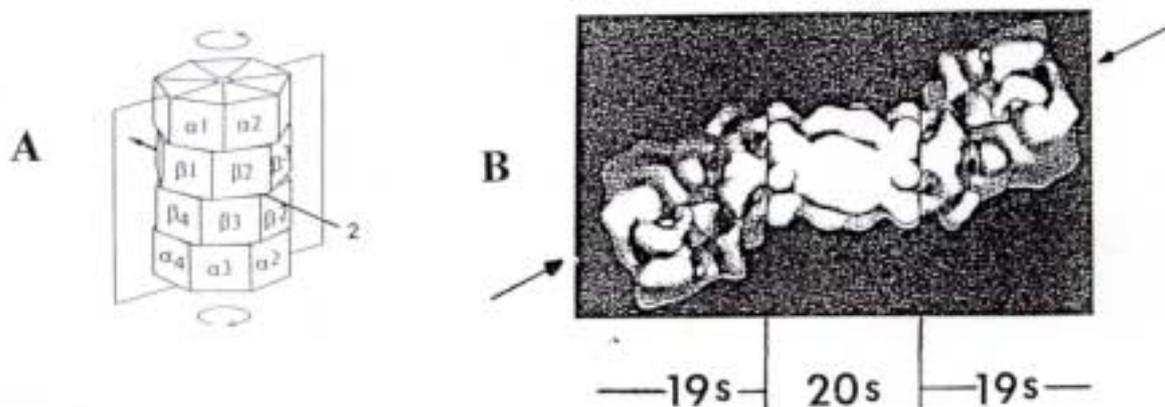


Fig. 2.20 A) Positionnement des sous-unités du protéasome 20S obtenu par immunolocalisation (Kopp et al., 1997). B) Modélisation du protéasome 26S obtenu par Walz et al. (1998). Les flèches indiquent les deux possibilités d'accès des substrats au complexe.

La figure 2.20 nous montre le protéasome 26S tel qu'il a été modélisé récemment par Walz et al. (1998). Il est à relever ici que les préparations de protéasome 26S qui ont servi à cette modélisation, observées en microscopie électronique, n'ont de loin pas l'homogénéité attendue (agrégats, fort bruit de fond). Elles révèlent, à nouveau, une instabilité de la structure. Cette instabilité thermodynamique a posé de sérieux problèmes techniques, puisque Walz et al. ont dû modéliser séparément la structure 19S et la rajouter à celle du protéasome 20S.

Le 26S possède à chacune de ses deux extrémités un complexe régulateur 19S ou PA700 en orientation opposée. N'y a-t-il pas là un non-sens avec le fait que des substrats ont la possibilité de s'engouffrer par les deux extrémités du protéasome 26S pour atteindre les mêmes sites catalytiques? Ne doit-il pas y avoir une sorte de polarité dans la structure pour éviter ce genre de conflit?

Kopp et al. (1997) ont cartographié le protéasome 20S humain du point de vue de ses sous-unités. Sur la figure 2.20.A, on constate que les sous-unités d'un anneau alpha ne se trouvent pas en face de leur sous-unité homologue située sur l'autre anneau alpha du complexe. Cela si on se réfère à l'axe de symétrie principal du protéasome (fig.2.20.A). On peut donc dire qu'il y a une polarité dans la structure du 20S, mais qu'elle n'est plus respectée dans le cas du 26S modélisé par Walz et al, (1998). En effet, les complexes PA700 ou 19S sont entre eux dans un même plan de symétrie, si ce n'est en orientation opposée, alors que le protéasome 20S ou plus précisément les sous-unités des disques alpha, ne sont pas dans ce même plan de symétrie. Il y a un décalage! Les protéines du PA700 ne sont donc pas en contact avec les mêmes domaines des sous-unités alpha à chacune des extrémités du 20S. Le modèle du protéasome 26S n'est pas donc cohérent.