

## **4. LA SOUS-UNITE PPZETA DU PROTEASOME DE *PHYSCOMITRELLA PATENS***

### **4.1. INTRODUCTION**

Nous avons démontré, précédemment, une interaction protéasome-chaîne de polyubiquitine. Cette association est possible en présence de la structure native du protéasome, et plus spécifiquement avec l'une de ses sous-unités, que nous supposons être une alpha. Dans un premier temps, nous ne remettons pas en cause la reconnaissance par la préparation de protéasome de *P. patens* des chaînes de polyubiquitine. En effet, il n'y a aucune raison de douter de l'existence de la voie de dégradation des protéines par l'ubiquitine, ni de la présence d'une seule forme ou structure de protéasome chez *P. patens*, qui diffère de celles qu'on a isolé chez d'autres eucaryotes. A partir de là, il est logique de considérer que l'interaction protéasome-conjugués ubiquitinés est inévitable. Les expériences précédentes le démontrent. Toutefois, dans un second temps, nous ne pouvons pas affirmer que la sous-unité alpha Pp1 soit responsable de la fixation des conjugués ubiquitinés ou éventuellement de l'activité isopeptidasique dans le complexe. Nous savons également que ces propriétés ne s'expriment qu'en présence d'autres protéines associées au protéasome. Nos essais de *cross-linking* sur la structure native du protéasome n'ont pas permis d'isoler spécifiquement la ou les sous-unités responsables du processus de dégradation des chaînes et cela pour des raisons techniques. On constate également, sur la base de l'intensité des signaux obtenus lors de la révélation aux anticorps, que l'association des chaînes avec le protéasome intact est plus forte qu'avec une sous-unité isolée. Il est fort probable qu'il doit y avoir une forme de coopération entre différentes sous-unités du protéasome, que l'on ne peut satisfaire que dans un contexte structural donné.

Il s'agit donc de caractériser moléculairement cette sous-unité alpha de façon à préciser son rôle dans la structure du protéasome de *P. patens*. Nous nous proposons d'isoler le cDNA codant pour cette sous-unité. D'une part, nous pourrions l'identifier, puis l'exprimer dans *E. coli* afin d'obtenir une quantité suffisante de protéine nécessaire à sa caractérisation biochimique, fonctionnelle, ou à la production d'anticorps spécifiques. D'autre part, nous pourrions exploiter *P. patens* en tant qu'organisme modèle dans l'étude de la fonction d'un gène, notamment, en observant et en analysant les phénotypes obtenus par rupture (*knock-out*), surexpression, expressions d'antisens ou mutations du gène d'intérêt.

### **4.2. ISOLATION ET CLONAGE DU cDNA CODANT POUR LA SOUS-UNITE PP1 DU PROTEASOME DE *P. patens***

Nous l'avons vu, le criblage d'une banque d'expression au moyen d'anticorps n'a pas permis d'isoler un seul clone cDNA codant pour une sous-unité de protéasome de *P. patens*. Il aurait été possible d'identifier la sous-unité que nous recherchons sur la base soit de la séquence nucléotidique des cDNA ou de la séquence en acides aminés, en recherchant les séquences homologues identifiées dans une base de données, telle que SWISSPROT. L'identification et l'isolation du cDNA correspondant à la sous-unité alpha Pp1 auraient été facilitées.

La première étape incontournable dans l'identification de la protéine passe par son séquençage. Pour ce faire, nous avons purifié une grande quantité de protéasome de *P. patens* (700 µg). Celui-ci a été séparé sur un gel en deux dimensions (masse moléculaire et gradient de pI), de grande taille. Après séparation, le gel est coloré au chlorure de cuivre, de façon à

repérer les protéines dans le gel en évitant de les fixer. Les sous-unités sont excisées du gel au moyen d'un scalpel, électro-éluées dans un sac de dialyse et enfin concentrées sur filtre Centricon-10. La protéine est récupérée par la suite dans un volume de 10 µl. Un aliquot est analysé sur gel SDS-PAGE (fig. 4.1). Nous avons estimé la quantité de protéine récupérée à env. 10 µg soit approximativement 300 picomoles.

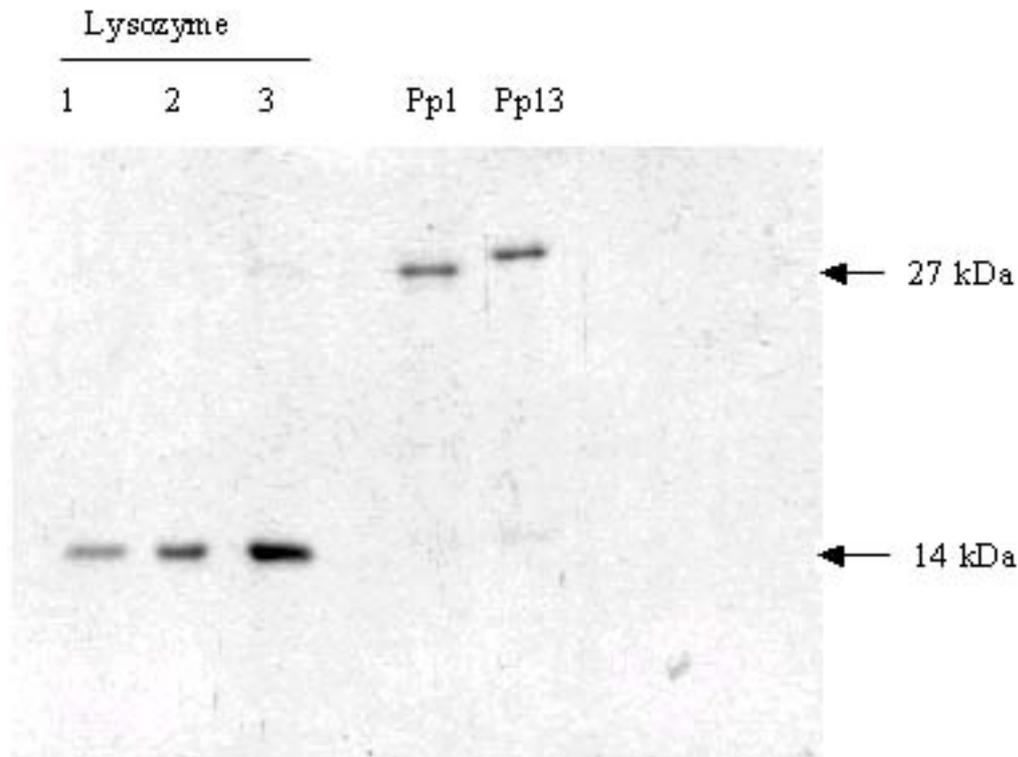


Fig.4.1. Analyse sur gel SDS-PAGE 14 % et coloré au bleu de Coomassie d'un aliquot (10 %) des sous-unités Pp1 et Pp13 purifiées. Sur le gel, des quantités de 1, 2, 3 µg de lysozyme sont analysées pour la quantification.

### ***Séquençage de la sous-unité Pp1***

La digestion à l'endolysine-C, la séparation sur *reverse phase* C-18, et le séquençage des peptides obtenus ont été confiés au Dr Eckerskorn du Max Planck Institut, Martinsreid. Quatre séquences de peptides ont pu être obtenues (fig.4.2)

ppz11:5'**LGSTAVGLK3'**  
 ppz12:5'**EGVVLAVEK3'**  
 ppz13:5'**AIGSGSEGADTSLQ3'**  
 ppz14:5'**RITSVLLEPTSVEK3'**

Fig. 4.2 Séquences en acides aminés des peptides obtenus après séparations HPLC sur C-18 *reverse phase* et digestion à l'endolysine C de la sous-unité Pp1.

Le clivage à l'endolysine-C se produit après une lysine que nous pouvons ajouter (K) du côté de l'extrémité N-terminale du peptide.

Dans le but d'identifier la sous-unité Pp1, nous avons soumis ces séquences peptidiques à la banque de données SWISSPROT. Nous avons constaté que toutes possédaient une homologie avec des sous-unités alpha de protéasomes eucaryotiques, dont trois (ppz11, ppz12, ppz13) avec PUP2 ou DOA5 de la levure, ZETA de l'homme et du rat (Chen et Hochstrasser, 1995; Zaiss et Belote, 1997). Seule, la séquence ppz14 possède une homologie plus forte avec la sous-unité alpha PROSOM 28 de la drosophile. Malgré le fait que le peptide ppz14 ne possède pas la plus forte homologie avec ces sous-unités, il est fort probable que la sous-unité Pp1 soit homologue aux sous-unités ZETA de l'homme et DOA5 de la levure. Ces deux sous-unités alpha ont, entre elles, 68 % d'identité du point de vue leurs acides aminés.

### ***Isolation du clone cDNA Pp1***

Plusieurs méthodes peuvent être envisagées pour isoler un clone cDNA à partir de la séquence de peptides. Nous avons choisi celle qui nous permet, à partir de la séquence en acides aminés des peptides, de synthétiser un oligonucléotide correspondant, puis de l'utiliser en tant qu'amorce pour une réaction de polymérisation en chaîne. Plusieurs couples d'amorces ont été synthétisés à partir des séquences peptidiques et ont été utilisés afin d'amplifier des fragments sur du cDNA de *P. patens*. Le positionnement des peptides (ppz11,12,13) sur les séquences DOA5 ou ZETA nous a permis d'estimer la longueur des amplicons à obtenir. Nous avons amplifié un grand nombre de bandes possédant les tailles attendues. Une fois clonées et séquencées, celles-ci n'ont pas présenté d'homologie avec une quelconque sous-unité connue de protéasome eucaryotique. Comment pouvons-nous expliquer cela?

Le problème majeur dans l'application de cette méthode vient de la séquence des amorces. En effet le code génétique étant dégénéré, il y a souvent plusieurs possibilités de codon pour un seul acide aminé. Ceci n'est pas dramatique si le peptide ne contient qu'un ou deux acides aminés codés par plusieurs triplets différents, car le nombre de combinaisons possibles d'un oligonucléotide est réduit. Toutefois, nous n'avons pu éviter les dégénérescences de nos amorces qui ont sans doute causé des problèmes d'appariement amorce-matrice de DNA. Un autre problème important est lié à la PCR en elle-même. En effet, pour tous couples d'amorces, il convient de réunir les bonnes conditions d'appariement (température, temps, MgCl<sub>2</sub>). Dans le cas d'oligonucléotides dégénérés, la température d'appariement est souvent basse et il n'y a donc pas une "stringence" suffisamment élevée pour éviter l'amplification de fragments "parasites". Les dégénérescences augmentent le nombre de combinaisons possibles d'appariement non seulement pour la séquence que l'on recherche, mais offre une possibilité élevée d'appariement non-spécifique pour d'autres séquences. Suivant la séquence nucléotidique, il arrive également que ces amorces s'apparient avec elles-mêmes ou entre elles. Dans ce cas, il n'est plus possible d'amplifier la séquence recherchée. Il est à noter que certains des événements décrits peuvent parfois se produire quand bien même la séquence de l'amorce est parfaitement complémentaire de la matrice. De plus, des domaines riches en guanidine ou cytosine dans la matrice peuvent poser des problèmes d'amplification dus à la formation de structures secondaires.

Ces contraintes en font une méthode empirique, qui peut parfaitement fonctionner dans certaines conditions, réunies parfois un peu par hasard, mais qui, dans notre cas, n'a pas donné les résultats escomptés.

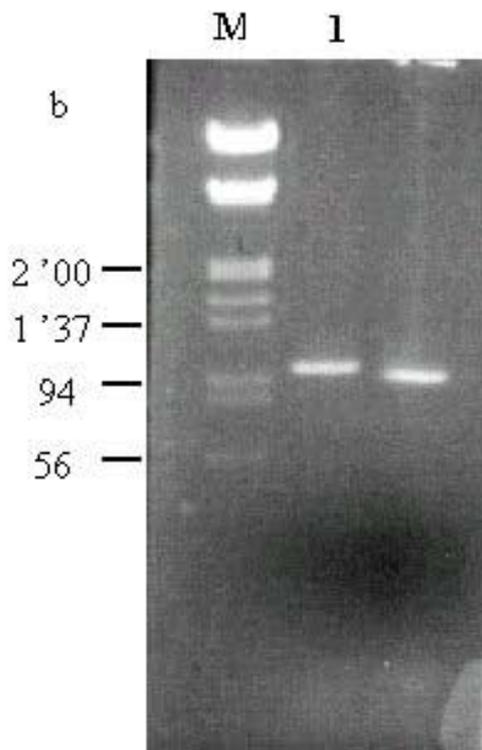
Quelques tentatives d'amplification de fragments par méthode RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) n'ont pas abouti. Cette méthode permet d'amplifier la région d'un cDNA particulier à partir d'une séquence connue de ce cDNA jusqu'à l'extrémité 5' ou 3' du clone. L'avantage de cette méthode est d'obtenir la séquence complète du clone recherché, surtout lorsque celui-ci est rare. Nous avons, pour notre part, utilisé les oligonucléotides dégénérés ainsi que des séquences complémentaires, soit à l'adaptateur fixé en 5' soit au polyA+ en 3', comme couple d'amorces. En général, la séquence interne utilisée doit être parfaitement connue pour remplir les conditions nécessaires à une amplification spécifique. Il n'y a que peu de séquences EST (*expressed sequence tags*) ou gènes qui ont été isolés chez la mousse *P. patens* (Reski et al., 1997). Aucune de ces séquences ne possède une homologie significative avec des séquences parfaitement identifiées de sous-unités de protéasome d'autres organismes.

Nous avons eu recours à l'utilisation de sondes hétérologues. Cette solution n'est pas la plus simple puisque les méthodes d'hybridation dépendent de la capacité du DNA dénaturé à s'associer lorsque des brins complémentaires ou fragments d'ADN sont mis en présence dans des conditions de température voisines, mais juste inférieure au  $T_m$  (température de fusion). Or, l'utilisation d'une sonde *hétérologue* ne remplit pas, par définition, les conditions requises pour un appariement optimal à la séquence recherchée. L'utilisation d'une sonde hétérologue pose des problèmes de stringence qui peuvent se traduire par des interactions avec des séquences peu ou non homologues et/ou des interactions non-spécifiques. Il y a également plusieurs difficultés techniques qui sont apparues lors de ces criblages que l'on ne rencontre pas sur *Southern blot*. Il faut notamment optimiser le transfert du DNA des plaques de lyses sur la membrane de façon à éviter l'accrochage d'agarose ou de bactéries dont il est difficile de se débarrasser par la suite. La quantité de DNA fixée sur la membrane doit être suffisante pour produire un signal exploitable. L'obtention de faux positifs est donc très facile dans ce contexte. Ainsi, nous avons investi beaucoup de temps dans la mise au point de ce criblage. En fait, ces essais ont démontré qu'il s'agit de trouver empiriquement, à partir des données obtenues par *Southern blot*, les conditions idéales pour que nous puissions extraire une information d'une expérience d'hybridation. La qualité de l'information est fonction du rapport signal-bruit de fond. Un bruit de fond élevé ou un signal spécifique faible peuvent tous deux donner un résultat inexploitable.

En effet, nos séquences peptidiques ont une bonne homologie avec une sous-unité alpha de deux organismes différents (ZETA de l'homme et DOA5 de la levure) (Chen et Hochstrasser, 1995; Zaiss et Belote, 1997). Nous ne pouvons raisonnablement extrapoler le taux d'homologie de la sous-unité de la mousse avec celui de ces deux organismes sur la base des quatre peptides séquencés. D'autant plus que l'usage des codons d'un organisme à un autre diffère: ce qui se peut se traduire par une divergence plus forte sur la séquence nucléotidique. Il n'y a donc aucun critère qui permette, objectivement, d'utiliser comme sonde le cDNA codant pour la sous-unité ZETA plutôt que celui codant pour DOA5.

Hochstrasser (University of Chicago, Illinois) nous a fourni le cDNA codant pour DOA5 de la levure cloné dans le vecteur pBluescript KS+. L'insert a été amplifié par culture de *E. coli*, extraction DNA plasmidique, libéré par digestion et purifié sur gel d'agarose.

Concernant la sous-unité ZETA de l'homme, nous avons amplifié un fragment PCR, équivalent à toute la partie codante du gène, sur une banque cDNA humaine, sur la base de la séquence publiée (Zaiss et Belote, 1997). Le fragment a été purifié sur gel d'agarose. En dernier lieu, nous avons produit une sonde DNA à partir d'une séquence EST d'*A. thaliana* (numéro d'accèsion AC: R90613) qui possède 71 % de similarité sur ses 528 premières paires de base avec la séquence ZETA humaine. Le clone cDNA 190I18T/ correspondant à cette EST nous a été fourni par l'"*Arabidopsis Biological Center, Columbus USA*". Nous avons amplifié, par PCR, sur cet EST d'*A. thaliana* clonée dans le vecteur  $\lambda$ ziplox, le fragment Atz1-Sp6, qui comprend la séquence codante complète du clone soit de l'ATG en 5' jusqu'au promoteur Sp6 placé en 3' (env. 950 bp) (fig. 4.3.). Pour la sonde, nous avons éliminé par digestion BamH1 la séquence contenant les sites de restriction résiduels qui suivent l'insert en 3' jusqu'au promoteur Sp6. Deux oligonucléotides ont été synthétisés (atz2, atz3) dans le but de séquencer cette sous-unité. La séquence est analysée au moyen de la Séquénase version 2.0 (USB) par la méthode de séquençage du DNA par termination de chaînes (*chain-termination DNA*). Cette séquence correspond à la sous-unité PAE1, confirmée récemment dans la publication de Fu et al. (1998).



. 4.3. Amplification du fragment Atz1-SP6 par PCR. Atz1 est l'amorce, en 5', synthétisée sur la base de la séquence de L'EST d'*A. thaliana*. SP6 est le promoteur situé en 3' de la séquence de l'EST sur le vecteur ziplox **Pos.1** le fragment est amplifié du codon start (ATG) au promoteur SP6 (env. 950pb). **Pos.2** même fragment mais dont on a éliminé par digestion BamH1 la séquence contenant les sites de restriction résiduels qui suivent l'insert en 3' jusqu'au promoteur sp6 (~50bp).

Afin d'évaluer les conditions optimales d'hybridation de ces sondes, nous avons digéré du DNA génomique de la mousse *Physcomyrella patens* et d'*Arabidopsis thaliana* avec les enzymes de restriction EcoR1, EcoRV, BglIII, XbaI, que nous avons utilisé pour la préparation d'un *Southern blot* (fig.4.4.A).

Tous les clones cDNA des séquences citées plus haut (ZETA, DOA5, EST d'*Arabidopsis thaliana*) ont été utilisés comme sonde d'hybridation. Celles-ci ont été marquées

radioactivement au ( $\alpha^{32}\text{P}$ )dCTP par *random priming*. Nous avons optimisé l'association de la sonde avec la séquence de DNA voulue en ajustant la concentration en sel et la température du tampon, de façon à obtenir un rapport signal-bruit de fond exploitable.

La sonde DOA5 de la levure n'a pas donné de bons résultats. Les signaux étaient trop faibles par rapport au bruit de fond. La sonde ZETA humaine hybridait plus fortement avec le DNA d'*A. thaliana* qu'avec celui de la mousse. La sonde d'*A. thaliana* a donné le meilleur résultat (fig. 4.4.B). Les conditions optimales pour le criblage de la banque cDNA de mousse avec la sonde d'*A. thaliana* ont été fixées à 45 °C, 6x SSC. pour l'hybridation, puis à 3 lavages successifs à 50 °C de 3X SSPE.

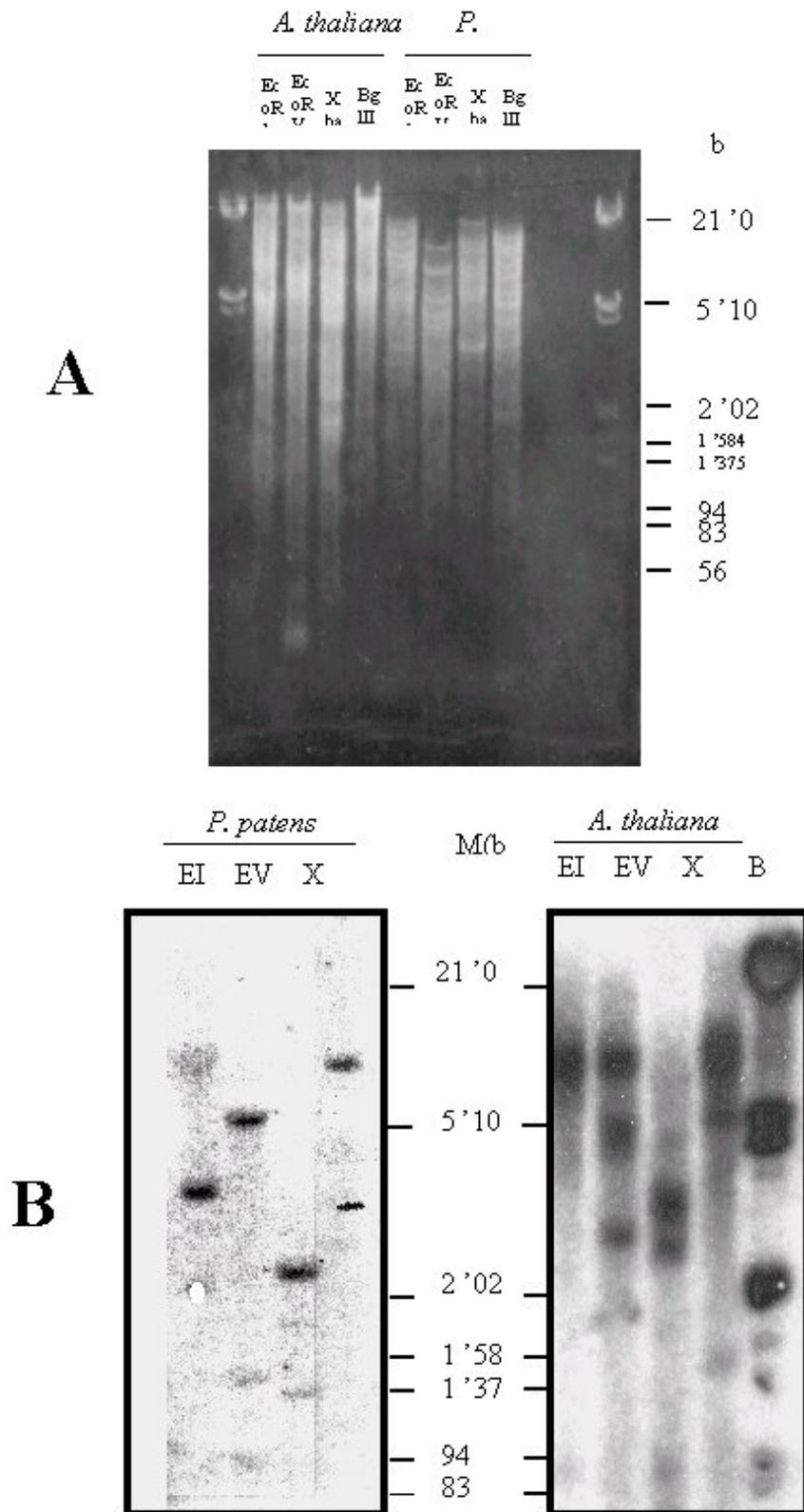


Fig. 4.4.A) Digestions de DNA génomique d'*A. thaliana* et *P. patens* avec EcoRI, BglII, EcoRV, XbaI, séparés sur gel d'agarose 0,8% et colorés au bromure d'éthidium. B) Southern blots de DNA génomique d'*A. thaliana* et *P. patens*, digérés avec EcoRI (EI), BglII(B), EcoRV(EV), XbaI(X), et hybridés avec la sonde obtenue par amplification du cDNA de l'EST 190I18T d'*A. thaliana*. M: marqueurs de taille.

Nous disposons au laboratoire d'une banque de cDNA de *P. patens* clonée dans le vecteur  $\lambda$ gt11, que nous avons criblée avec la sonde Atzeta. La sonde est préparée par marquage au  $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP par *random priming*. Sur les 200 000 phages étalés au premier criblage (lyse confluente), une vingtaine de clones ont été isolés, puis réétalés pour un second criblage à une densité plus faible de plaque de lyse, 7 clones se sont avérés positifs. Un troisième étalement d'env. 10 plaques de lyse par boîte Pétri (diam. 90mm) a été effectué de façon à purifier les clones positifs.

**Clonage et analyse du clone cDNA**

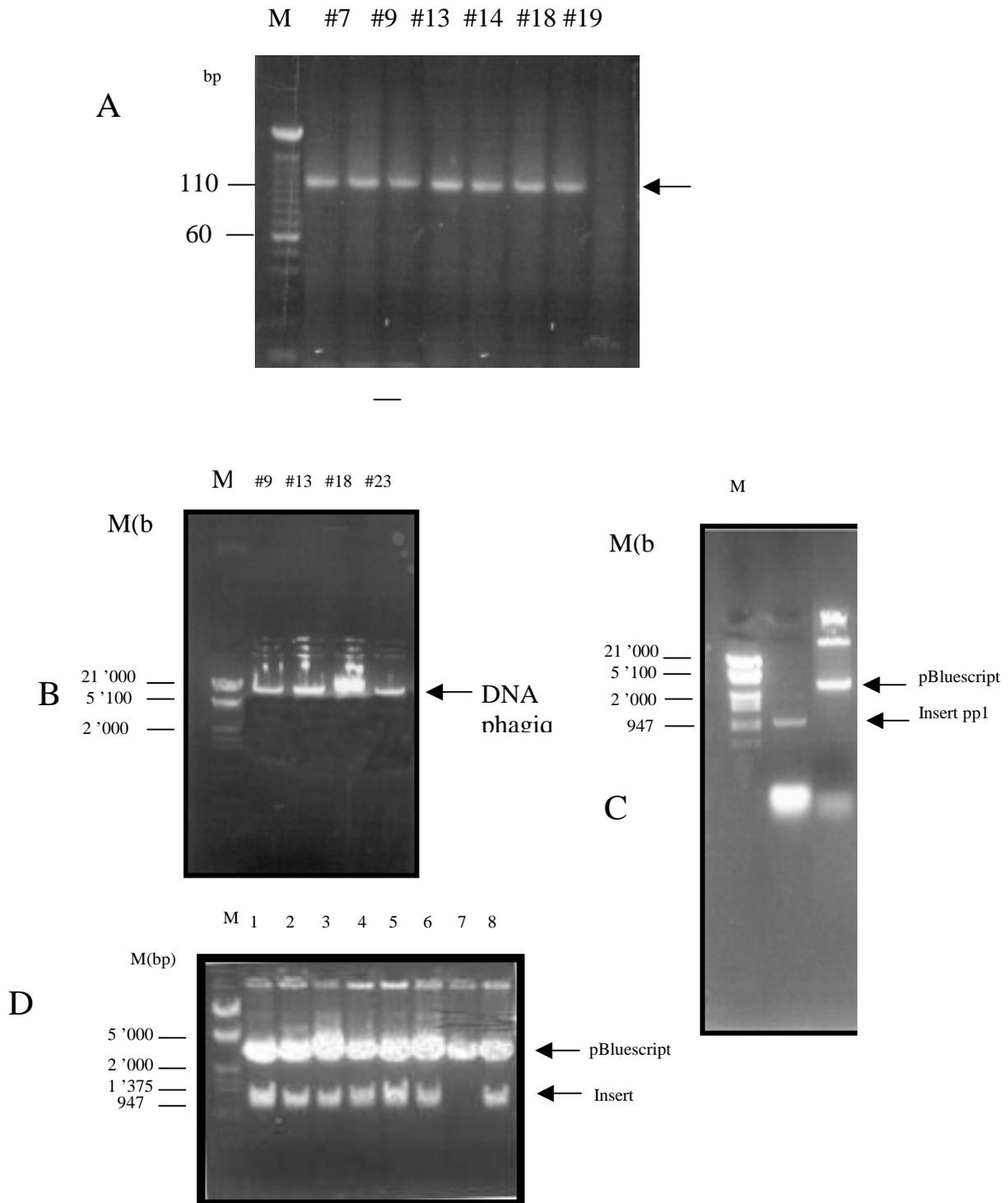


Fig. 4.5. **A**) Détermination de la taille des inserts (flèche : env. 1000 bp) des phages positifs obtenus lors du criblage, par amplification PCR au moyen des amorces  $\lambda$ gt11R et  $\lambda$ gt11F, séparés sur 1,2% d'agarose et coloré au bromure d'éthidium. C-: contrôle négatif. M: marqueurs de taille.

**Analyses sur gel d'agarose B)** du DNA phagique des clones positifs (après extraction et purification) **C)** de l'insert codant pour la sous-unité Pp1 après digestion NotI du DNA phagique purifié. Sur ce même gel, le vecteur pBluescript est analysé pour le clonage. **D)** de la digestion NotI des plasmides extraits des clones positifs après clonage de l'insert Pp1 dans le vecteur pBluescript. (7 sur 8 contiennent l'insert à la bonne taille)

Les sept clones isolés sont analysés par PCR, de façon à déterminer la taille de l'insert dans les phages. Pour cela, on utilise des amorces  $\lambda$ gt11R et  $\lambda$ gt11F situées de part et d'autre du

site d'insertion (EcoR1) de clonage. On constate que tous les clones donnent un signal à la même taille, aux environs de 1100 bp. Les clones ont une taille identique qui semble être correcte (fig.4.5.A) compte tenu de la partie codante moyenne pour une sous-unité  $\alpha$ , soit ~750 bp, et des parties non codantes en 5', ~100 bp, et en 3' ~200 bp.

Les phages des clones positifs sont amplifiés sur boîtes Pétri. Le DNA phagique est extrait et analysé sur gel (fig.4.5.B.). Celui-ci est digéré avec l'enzyme de restriction Not1 pour libérer l'insert que l'on clone dans le site Not1 du vecteur pBluescript KS+ (fig.4.5.C.). Des cellules *E. coli* sont transformées avec le vecteur PbluescriptPp1, puis étalées sur milieu sélectif. Les plasmides sont extraits des colonies résistantes et analysés par restriction avec l'enzyme NotI, de façon à vérifier la présence et la taille de l'insert (fig. 4.5.D). La séquence de l'insert est obtenue à l'aide du kit Séquenase version 2.0 de USB. Les premières informations sur la séquence sont obtenues au moyen des amorces correspondant aux promoteurs T3 et T7. Puis

par l'utilisation successive d'amorces se situant plus avant dans la séquence (fig.4.6.flèches).

```

1 GGGAGGCACAGATTGCTGCGACATAGAGAGCGAGAGAGAGATTTC
48 TCTTCTTCATTTCCCAAACCTTCTATCTTATACATGTTCTCCTCACCAG
                                     M F L T R
95 GAGTGAGTATGATAGAGGTTTCAATACGTTTTCTCCCGAGGGGCGCC
   S E Y D R G F N T F S P E G R L
142 TCTTTCAAGTGGAGTACGCCATTGAAGCTATTAAGCTTGGTTCCAGC
    F Q V E Y A I E A I K L G S T
189 GCAGTGGGATTGAAGACCAAGGAGGGAGTTGTTTTGGCCGTCGAGAA
   A V G L K T K E G V V L A V E K
236 GCGAATAACCTCAGTTTTGTTGGAACCCACCAGTGTGCGAGAAGATCA
   R I T S V L L E P T S V E K I M
283 TGGAAATCGATGAACATATTGGGTGTGCCATGAGTGGTCTCACTGCG
    E I D E H I G C A M S G L T A
330 GATGCTCGCACACTTGTGAACTGGCCGTGTGGAACCTCAGAATCA
   D A R T L V E H G R V E T Q N H
377 TAGGTTCTCGTATAATGAGCCTATGAGTGTGGAGTCTACTACACAAG
    R F S Y N E P M S V E S T T Q A
424 CCCTGTGTGATCTGGCTTTACGTTTTGGGGAAGGCGACGAAGAATCA
    L C D L A L R F G E G D E E S
471 ATGTCACGTCCTTTTCGGAGTTTCTCTGCTCATTGCTGGCCATGATGA
    M S R P F G V S L L I A G H D E
518 GAGTGGACCATGCTTGTACCACACAGATCCATCTGGAACATTTTGGC
    S G P C L Y H T D P S G T F W Q
565 AATGTGATGCTAAGGCAATTGGTTCAGGATCAGAAGGTGCCGATACT
    C D A K A I G S G S E G A D T
612 TCCCTTCAGGAACATTTCAACAAGAACATGACGCTGGAGGAAGCCGA
   S L Q E H F N K N H T I E E A E
659 GACATTGGCGTGTGTCTACCTTGAAGCAAGTCATGGAAGAAAAGGTAA
    T L A L S T L K Q V M E E K V T
706 CTTCTGTAATGTGGATATTGCTAAGGTGGCTCCCAAGTATCATTTG
    S C N V D I A K V A P K Y H L
753 TACACACCCGAAGAAGTTGAGGTTGTTATACAACGATTGTAATTATC
   Y T P E E V E V V I Q R L *
800 TTATCTGGGTAGTTGAATACTCGAGAATGCCGTTTTTCGATTCATGAG
847 CTAATCCATTCAAATATTGGTTTAAATTTAGTAGCGAATGTGTTTCATTT
894 CTATGGTATAACTTGAACCTTCTGCACCTTTTTTAAATTAATAAAAAA
941 AAAAAAAAAAAAA

```

Fig.4.6 Séquence nucléotidique et séquence en acides aminés correspondante du clone cDNA codant pour la sous-unité 1 (Pp1) du protéasome de la mousse *Physcomitrella patens*. Les flèches indiquent la position des amorces utilisées lors du séquençage. Le surlignage en trait fort indique les sites de phosphorylations possibles. Les encadrés mettent en évidence la position des peptides séquencés. La position du site de glycosylation possible est hachurée.

Les sites de phosphorylation et de glycosylation possibles sont indiqués sur la séquence. Nous avons isolé un cDNA complet de 952 nucléotides terminé par un poly(A)+ de 21 nucléotides. Les régions 5' et 3' non codantes sont constituées respectivement de 80 et de 161 nucléotides dévolues à un signal de polyadénylation (Joshi, 1997) qui est indispensable chez les plantes. La partie codante est constituée de 711 bp codant pour une

protéine de 237 acides aminés.

L'insert de ce clone cDNA est utilisé comme sonde sur un *Southern blot* de DNA génomique de *P. patens* (fig. 4.7). A forte stringence, on constate que *P. patens* ne possède qu'une seule copie du gène codant pour cette sous-unité à la différence d'*A. thaliana* qui en possède deux (fig. 4.4.B) (Fu et al., 1998).

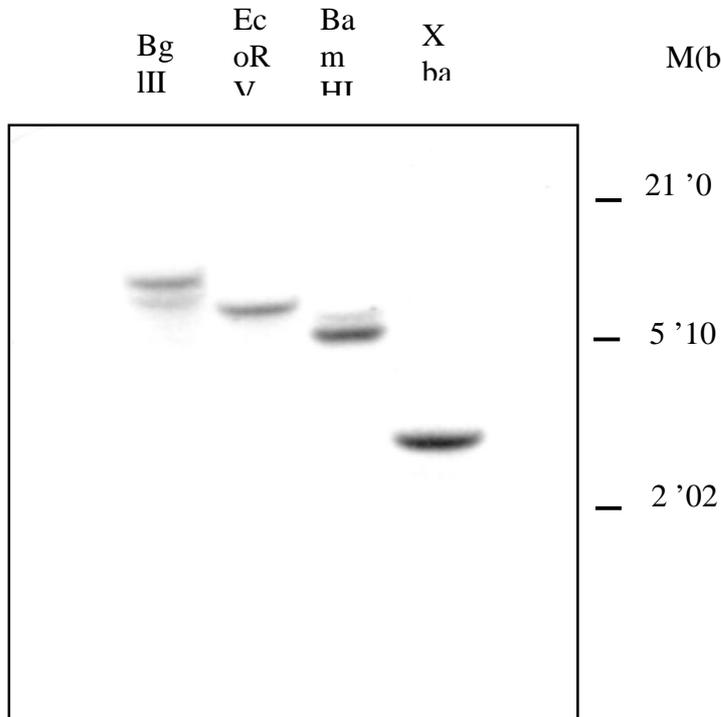


Fig. 4.7. *Southern blot* du DNA génomique de la mousse *Physcomitrella patens* et digéré par BamHI, EcoRV, BglII, XbaI, et hybridé avec l'insert codant pour la sous-unité 1 (Pp1) de *P. patens*

**Analyse comparative des sous-unités homologues à Pp1.**

Une fois introduite dans la banque de données SWISSPROT, la séquence que nous avons obtenue s'avère avoir de fortes homologies avec les sous-unités ZETA de l'homme et du rat, DOA5 de la levure (Chen et Hochstrasser, 1995) et dernièrement avec la PROSMA5 (Belote, 1997) de la drosophile ainsi qu'avec la sous-unité PAE1 d'*A. thaliana* que nous avons séquencée (fig. 4.8 et 4.9) (Fu et al., 1998). Les séquences sont comparées par empilement (fig. 4.10.) avec le programme DNASTAR.

		Percent Similarity						
Percent Divergence		1	2	3	4	5		
	1	█	87.8	67.3	62.0	60.8	1	ppzeta
	2	13.5	█	68.6	61.6	61.2	2	PAE1
	3	32.1	31.6	█	70.2	60.0	3	HSZETA
	4	35.2	34.7	28.3	█	53.4	4	PROSMA5
	5	39.0	39.5	40.1	43.0	█	5	Doa5
		1	2	3	4	5		

Fig. 4.8 Tableau des divergences et des similarités des protéines homologues à Pp1

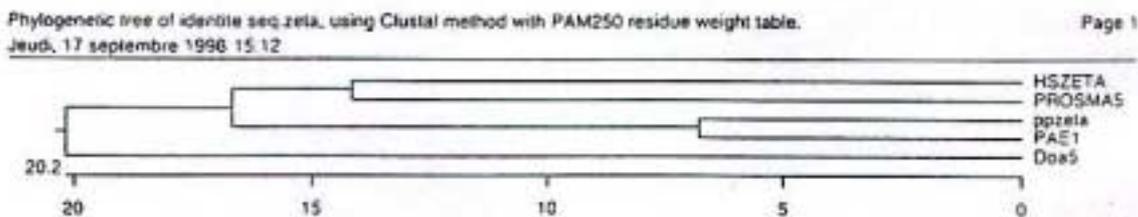


Fig. 4.9. Phylogramme impliquant les sous-unités homologues à PPZETA

Désormais, nous baptiserons la sous-unité 1 (Pp1) du protéasome de *P. patens*: sous-unité zêta (PPZETA)

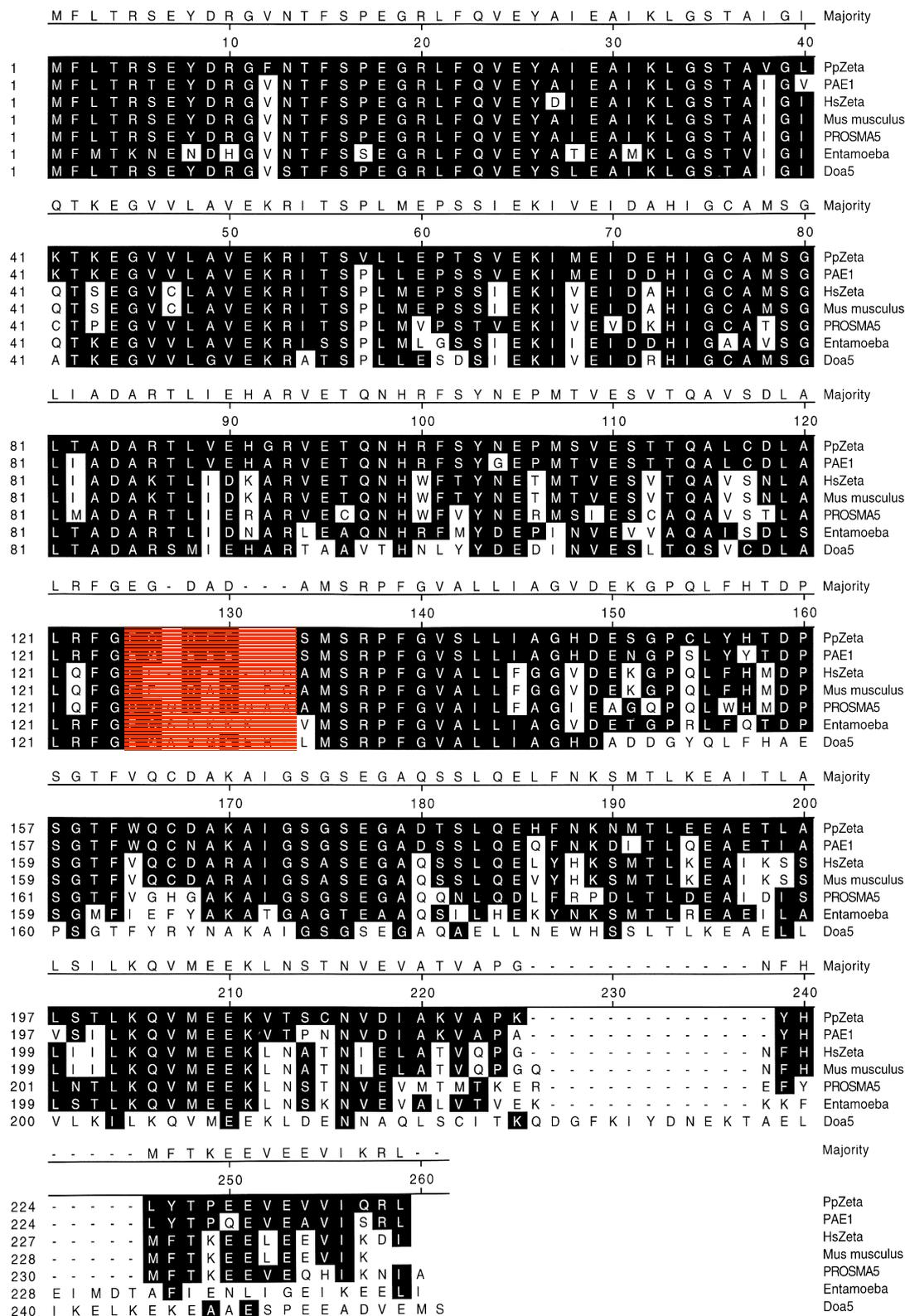


Fig.4.10 Les séquences des sous-unités homologues à la sous-unité PPZETA sont comparées par empilement soit PAE1 d'*A. thaliana*, PROSMA5 de la drosophile, ZETA de l'homme, DOA5 de la levure. La séquence supplémentaire (domaine Z) commune à cette sous-famille de sous-unités est soulignée.