



Le protéasome de *Physcomitrella patens*

Thèse de doctorat

présentée à la

Faculté des Sciences de
l'Université de Lausanne

par

Christian Richard

Licencié en Biologie
Université de Lausanne

Jury

Prof. Dieter Schwarzenbach, Président
Prof. Jean-Pierre Zryd, Directeur de thèse
Prof. Jacques Mauël, Expert
Dr Pascal Genschik, Expert

LAUSANNE
1999

Le protéasome de
Physcomitrella patens



Table des matières

Résumé	4
Abstract	5
1. INTRODUCTION GENERALE	
1.1 Fonctions de la protéolyse	6
1.2 Mécanismes de la protéolyse	9
1.3 Dégradation des protéines dans les organelles	14
1.4 Structures et fonctions des protéasomes 20S et 26S	15
1.5 Intérêt de la recherche sur la voie de l'ubiquitine	23
1.6 But du travail de thèse	23
2. PURIFICATION ET CARACTERISATION DU PROTEASOME DE <i>P. PATENS</i>	
2.1 Purification	27
2.2 Recherche du protéasome 26S	39
2.3 Analyse comparative	42
2.4 Dissociation et reconstitution du protéasome de <i>P. patens</i>	45
2.5 Immunologie du protéasome de <i>P. patens</i>	47
2.6 Discussion	50
3. LE PROTEASOME DE <i>P. PATENS</i> ET LES CHAINES DE POLYUBIQUITINE	
3.1 Introduction	57
3.2 Activité isopeptidasique associée au protéasome	57
3.3 Association des chaînes de polyubiquitine avec le protéasome de <i>P. PATENS</i>	67
3.4 Discussion	70
4. LA SOUS-UNITE ZETA DU PROTEASOME DE <i>P. PATENS</i>	
4.1 Introduction	76
4.2 Isolation et clonage du cDNA codant pour la sous-unité Pp1 (PPZETA)	76
4.3 Etude fonctionnelle partielle de la sous-unité PPZETA	89
4.4 Discussion	99
5. MODELISATION DU PROTEASOME DE <i>P. PATENS</i>	102
6. DISCUSSION GENERALE	117
7. MATERIEL ET METHODES	125
8. BIBLIOGRAPHIE	134

Résumé

La voie de dégradation dépendant de l'ubiquitine est la voie principale de dégradation des protéines non lysosomales dans les cellules eucaryotiques. Deux événements séquentiels de reconnaissance déterminent la spécificité de cette voie. Le premier sélectionne les substrats destinés à être ubiquitinés par l'intermédiaire d'une cascade de réactions biochimiques impliquant des protéines E2 (protéines de conjugaison de l'ubiquitine) et des E3 (protéines de ligation de l'ubiquitine) dépendant de l'ATP. Le second événement est la reconnaissance puis la dégradation des conjugués ubiquitinés par le protéasome 26S. Le "corps" du complexe 26S, appelé protéasome 20S, dégrade des protéines dénaturées et des peptides. Il n'a pas été démontré, jusqu'ici, que le protéasome 20S seul soit directement impliqué dans la deuxième étape de cette voie.

Nous avons purifié et caractérisé le protéasome de la mousse (bryophyte) *Physcomitrella patens*. Cette plante est remarquable en ce qu'elle intègre essentiellement l'ADN exogène dans l'ADN nucléaire par recombinaison homologue. Il est ainsi possible d'envisager une approche par le biais de la génomique fonctionnelle semblable à celle qui a été utilisée chez la levure.

Le complexe isolé de *P. patens* possède des caractéristiques structurales semblables à celles des protéasomes 20S d'autres eucaryotes. Cependant, nos recherches n'ont pas permis de mettre en évidence un protéasome 26S. L'application d'une nouvelle méthode de microscopie électronique de coloration négative d'éléments vitrifiés (*cryo-negative staining*) sur des préparations très pures de protéasomes 20S de *P. patens*, a permis de modéliser la structure du complexe 20S ainsi que celle de l'un de ses anneaux alpha.

Nous avons étudié les propriétés biochimiques de la préparation de protéasome sur des chaînes de polyubiquitine branchées. Nous démontrons, pour la première fois, qu'une activité isopeptidasique, libérant des monomères d'ubiquitine actifs, est associée avec un protéasome 20S. L'association des chaînes de polyubiquitine avec le protéasome a été confirmée par immunolocalisation et microscopie électronique. Plus précisément, nous avons identifié une sous-unité alpha (PPZETA) du protéasome qui serait impliquée dans la reconnaissance des chaînes de polyubiquitine. Cette sous-unité possède de fortes homologies avec une sous-unité alpha issue d'autres protéasomes eucaryotiques. Cette sous-famille de sous-unités alpha possède la propriété remarquable d'avoir une séquence en acides aminés supplémentaire, absente de toutes les autres sous-unités alpha. Chez la levure, cette séquence forme une boucle positionnée à l'intérieur du canal central du protéasome. Sa fonction exacte dans la structure du protéasome 20S reste à définir.

Ce travail suggère, en opposition avec le modèle habituellement accepté, que le protéasome 20S joue un nouveau rôle dans la voie de dégradation des protéines par l'ubiquitine.

Abstract

The ubiquitin-conjugate degradation pathway appears to be the major extralysosomal degradation pathway of proteins in eucaryotic cells. This pathway consists of two distinct sequential recognition steps. The first selects the substrates to be degraded through a cascade of ATP-dependent biochemical reactions involving E2 proteins (ubiquitin conjugating enzyme) and E3 proteins (ubiquitin ligating enzyme). The second step involves the recognition and the degradation of these ubiquitinated conjugates by a multiprotein complex, the proteasome 26S. The core of the 26S complex, called the 20S proteasome, degrades unfolded proteins and peptides but it has not yet been shown that this 20S proteasome alone is able to complete the second step of this pathway.

We have purified and characterized the proteasome of the moss (bryophyte) *Physcomitrella patens*. This plant is an organism of choice for its remarkable ability to integrate DNA preferentially by homologous recombination thus allowing the use of reverse genetic approaches similar to those used in yeast.

The isolated multiprotein complex has structural characteristics similar to other 20S eucaryotic proteasomes. No 26S proteasome structure has been identified during our investigations. The application of a new electron microscopy method, called cryo-negative staining, on pure 20S proteasome preparations, allowed the modelisation of its structure and of one of its alpha rings.

We have studied the biochemical properties of this proteasome preparation on the branched polyubiquitin chains. We show here for the first time that an isopeptidasic activity, releasing functional ubiquitin monomers, is associated with a 20S eucaryotic proteasome. The association of the polyubiquitin chains to the 20S proteasome was confirmed by immunolocalization and electron microscopy. Furthermore, we have identified an alpha subunit of the proteasome (PPZETA) which seems to be involved in this recognition of polyubiquitinated chains. This subunit shares strong homology with one of the alpha subunit of eucaryotic proteasomes. This subfamily of alpha subunits shares the unique property of having an additional amino acid sequence that is absent from all other alpha subunits. In yeast, this sequence forms a loop positioned in the interior of the central hole of the proteasome. The exact function of this loop remains to be elucidated.

The work presented here suggests that in contrast to the current accepted model, the moss 20S proteasome may play a new role in the ubiquitin dependent pathway.

1. INTRODUCTION GENERALE

1.1 FONCTIONS DE LA PROTEOLYSE

1.1.1 Introduction

La protéolyse est impliquée dans l'ultime contrôle post-transcriptionnel de l'expression d'un gène, la protéine codée est démantelée en ses acides aminés. Ici, la dégradation de la protéine représente non seulement un important système de recyclage pour les acides aminés, mais également l'étape finale d'une cascade d'événements complexes de régulation contrôlant la fonction d'un gène (Capecchi, 1989; Callis, 1995). Ainsi, la capacité des cellules de passer d'un stade de développement à un autre ou de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales exige souvent le démantèlement de voies biochimiques déjà existantes, processus dépendant fréquemment de la protéolyse. Sa rapidité et son irréversibilité offrent des avantages à la régulation cellulaire que d'autres mécanismes ne peuvent fournir. En comparaison, aucun des différents processus de régulation post-traductionnels n'influence davantage la concentration finale des protéines actives que leur dégradation (Egner et al., 1993).

La protéolyse est donc une composante essentielle dans plusieurs aspects de la physiologie et du développement des plantes. Elle est responsable du ménage cellulaire et des réponses au stress (en éliminant les protéines anormales), de la fourniture en acides aminés nécessaires à la synthèse de nouvelles protéines, de la maturation de précurseurs d'enzymes protéolytiques par clivages limités, du contrôle du métabolisme et du développement (en réduisant l'abondance d'enzymes clés et de protéines régulatrices) et, enfin, de la mort cellulaire programmée d'organes ou de cellules spécifiques de plantes. Les résultats de l'étude de quelques voies protéolytiques déjà identifiées chez les plantes montrent que le niveau de complexité exigé pour la dégradation d'une protéine peut rivaliser avec celui initialement requis pour la synthèse de cette même protéine (Callis et al., 1995). Par exemple, on estime que la voie protéolytique dépendant de l'ubiquitine peut impliquer à elle seule plus de 100 gènes chez *Arabidopsis Thaliana* (ou 0,5% des régions codantes): plus de 45 de ceux-ci ont été identifiés jusqu'ici (Vierstra, 1993). Etant donné que plus de 10'000 gènes peuvent coexister dans une cellule végétale donnée, il n'est donc pas surprenant que les cellules aient

développé des mécanismes sophistiqués permettant une reconnaissance sélective des protéines ciblées, ce qui évite ainsi une dégradation sans discrimination d'autres protéines.

1.1.2 Elimination des protéines anormales

De nombreux mécanismes provoquent l'apparition de protéines anormales tels que mutations, erreurs biosynthétiques, dénaturations spontanées et dommages causés par des radicaux libres. Ces mécanismes peuvent être accélérés par des stress environnementaux tels que chocs thermiques, dessiccation, maladies, privation de nutriments, etc. (Genschik et al., 1992; Vierstra, 1993; Gatenby et al., 1994). L'accumulation de protéines anormales, non seulement gaspille d'importantes réserves d'azote, mais peut également rompre l'intégrité des compartiments cellulaires. Dans un certain nombre de situations, les protéines endommagées sont réparées ou renaturées dans leur conformation native avec l'aide de molécules chaperonnes (Gatenby et al., 1994). Toutefois, pour certaines protéines ou dans certaines situations, où la quantité de protéines anormales est trop élevée (ex.: *heat shock*), la protéolyse est la solution principale. Chez la plante, chaque compartiment cellulaire doit avoir un mécanisme qui assure la dégradation des protéines anormales. Dans le cytoplasme et le noyau, la voie de l'ubiquitine est très importante.

1.1.3 Voie dépendant de l'extrémité N-terminale (*N-end rule*)

Parmi les protéines anormales, certaines sont synthétisées improprement ou se trouvent localisées dans le mauvais compartiment cellulaire. Dans de nombreux cas, ces erreurs produisent des polypeptides portant des extrémités N-terminales atypiques par rapport aux protéines normalement localisées dans ce compartiment. Par exemple, si les extrémités N-terminales des protéines cytoplasmiques et nucléaires sont Met, Gly, Ala, Ser, Thr ou Val et /ou sont N-acétylées (Atrin et al., 1988; Varshavsky, 1992), alors celles qui sont traitées incorrectement au cours du processus ou qui proviennent du réticulum endoplasmique (RE) ainsi que d'autres organelles n'auront vraisemblablement pas ces mêmes extrémités N-terminales (Bachmair et al., 1986). Varshavsky et al., (1992) ont découvert que, dans la levure, dans les cellules animales et chez *E. coli*, ces extrémités N-terminales étrangères sont exploitées de manière universelle comme des sites de reconnaissance dans la voie dépendant de l'extrémité N-terminale (*N-end rule*) qui élimine ces protéines indésirables (Bachmair et al., 1986). Toutefois, ce schéma de dégradation n'est pas limité à la seule élimination de protéines aberrantes, mais intervient également dans la régulation de plusieurs protéines normales. Dans le cytoplasme et le noyau, la voie de la *N-end rule* est étroitement liée à la dégradation des protéines par la voie de l'ubiquitine.

1.1.4 Fourniture en acides aminés

Bien que les plantes puissent synthétiser tous les acides aminés "de novo", une part substantielle de nouvelles protéines sont dérivées du recyclage d'acides aminés (Vierstra, 1993). Ces acides aminés peuvent provenir de l'élimination de protéines anormales,

indésirées ou dérivées de versions spécialisées de protéines normales dont la seule fonction est de stocker des acides aminés. Dans ce groupe, on trouve les protéines de stockage des graines (Staswick, 1994) et les protéines de stockage végétatif. La dégradation de ces dernières, et probablement d'autres, est accélérée lors de la privation d'azote, ce qui laisse à penser que les plantes ont des voies de signalisation reliant la fourniture en acides aminés libres au taux de protéolyse intracellulaire (Vierstra, 1993).

1.1.5 Contrôle de voies enzymatiques

Une des fonctions principales de la protéolyse est de permettre la régulation du métabolisme par un contrôle direct de la concentration d'enzymes clés. Cette stratégie a été mise en évidence lors de l'examen de certaines enzymes responsables de la catalyse de la première étape ou de l'étape limitante de différentes cascades métaboliques: toutes avaient des demi-vies courtes (Goldberg et al., 1976). Dans certains cas, cette demi-vie courte est constitutive, alors que, dans d'autres, elle est contrôlée de manière développementale ou environnementale, ou induite par une quantité limitée de substrat ou excessive de produit. Cette instabilité permet aux cellules de contrôler le flux à travers une voie métabolique simplement en atténuant la synthèse d'une enzyme cruciale, cette dernière voit ainsi rapidement diminuer sa concentration dans la cellule grâce à la protéolyse (Goldberg et al., 1976). La dégradation de protéines a, sur d'autres méthodes de régulation métabolique, l'avantage de la vitesse; de plus, elle empêche la réactivation inadéquate d'une protéine.

1.1.6 Chronométrage du cycle cellulaire

La progression correcte de la mitose et de la méiose est assurée par des mécanismes de "chronométrage" et de contrôle très élaborés que les cellules ont adoptés, lesquels coordonnent la réplication du DNA (Jacobs, 1995), l'appariement et la ségrégation des chromosomes, et la division cellulaire. La protéolyse contrôle un nombre important de points stratégiques comprenant l'entrée de la phase G1 en phase S (réplication de l'ADN), la progression pendant la phase S, l'entrée en phase M (la mitose), l'achèvement de l'anaphase et la sortie de la mitose (Amsterdam et al., 1993; Murray, 1995; Prendergast et al., 1995; Seufert et al., 1995; Pagano, 1997).

1.1.7 Mort cellulaire programmée

La mort de certaines cellules au cours du temps est l'une des conséquences naturelles du développement des organismes multicellulaires (Ellis et al., 1991; Ameisen, 1996; Jones et al., 1996). Ce phénomène peut se limiter à quelques cellules isolées, à une petite région, ou se produire à une échelle massive et toucher un organe entier. La sénescence des feuilles et des fleurs, la maturation des fruits, la maturation du xylème et du périderme, l'abscission du pétiole, la réponse hypersensible durant l'invasion de pathogènes, sont des exemples classiques que l'on peut trouver chez les plantes. Un grand nombre d'études génétiques et pharmacologiques (Vierstra, 1993) ont montré que la mort cellulaire est un processus

complexe contrôlé par des signaux intrinsèques et extrinsèques. La mort cellulaire programmée implique généralement l'activation de nucléases et de protéases qui dégradent efficacement les acides nucléiques et les protéines (Ellis et al., 1991; Jones et al., 1996). On présume que ce catabolisme diminue la perte en azote et en carbone en exportant ces protéines dans des zones de croissance ou de stockage. Ce recyclage est évident lors de la sénescence de la feuille où plus de 70% des protéines totales peuvent être réutilisés (Thomas et Stoddart, 1980; Belknap et al., 1996).

1.1.8 Autres fonctions de la protéolyse

Les protéines à demi-vie très courte jouent également un rôle crucial dans divers processus de régulation, comme la réception et la transduction d'un signal, l'homéostasie, la transcription, la croissance et la division cellulaires (Vierstra, 1993). Chez les animaux et la levure, ces régulateurs paraissent être spécifiquement dégradés par la voie de l'ubiquitine. Parmi ces exemples, on trouve des facteurs de transcription tels que cJUN, cFOS, MOS, GCN4, le suppresseur de tumeur p53, RAG2, des composants du complexe NFκB, MATα2, etc. (Varshavsky, 1992; Chen et al., 1993, 1995). En plus de ces protéines de régulation, on peut prédire qu'un ensemble d'autres protéines de régulation auront une demi-vie très courte; ceci, en se fondant sur les conséquences phénotypiques provoquées par des dysfonctions protéolytiques spécifiques.

Dans plusieurs situations, la chaîne des événements responsables de la dégradation de protéines régulatrices par la voie de l'ubiquitine a été partiellement déchiffrée, et les domaines responsables de la demi-vie courte des protéines cibles ont été définis. La dégradation du répresseur Matα2, par exemple, exige plusieurs E2 (enzyme de conjugaison de l'ubiquitine) et implique au moins deux domaines de reconnaissance dans la protéine.

1.2 MÉCANISMES DE LA PROTÉOLYSE

1.2.1 Introduction

A première vue, la dégradation de protéines n'impliquerait qu'une protéase. Le processus n'est pourtant pas aussi simple (Goldberg et al., 1976).

1) In vivo, la plupart des systèmes de protéolyse nécessitent de l'énergie. Puisque l'hydrolyse d'une liaison peptidique est une réaction exergonique, et que la plus grande partie des protéases purifiées ne requièrent aucune énergie, on peut supposer qu'il existe, dans ces processus de dégradation, des étapes qui nécessitent de l'énergie et qui contrôlent la protéolyse.

2) La dégradation, en elle-même, est rapide. Si rapide, qu'il est en fait souvent difficile de

détecter les produits de dégradation intermédiaires. Ce problème constitue une des difficultés majeures dans la compréhension du catabolisme des protéines et dans l'identification des protéases qui en sont responsables (Vierstra, 1993).

3) La protéolyse est très sélective. Dans un même milieu cellulaire, les temps de demi-vie des protéines peuvent se situer entre quelques minutes et plusieurs semaines (Goldberg et al., 1976; Vierstra, 1993). Mieux encore, le *turnover* d'une même protéine peut varier fortement suivant la localisation et l'état de conformation de celle-ci, ou l'état physiologique de la cellule (ex: le phytochrome). Quoique l'on sache que l'ensemble des propriétés physico-chimiques (masse moléculaire, pI, stabilité thermique, etc.) gouverne le temps de demi-vie d'une protéine, on sait également que des déterminants essentiels sont souvent contenus dans de petits domaines de la protéine (Goldberg et al., 1976). Certains domaines, souvent conservés, conférant une demi-vie très courte sont fonctionnellement transférables à d'autres protéines. Ceci permet de supposer que le temps de demi-vie d'une protéine peut être remodelé.

On peut tout de même relever que toutes les protéines ne sont pas continuellement susceptibles d'être dégradées. En fait, seul un petit pourcentage (< 10%) subit une dégradation rapide, ces protéines sont souvent responsables d'étapes limitantes clés de certaines voies métaboliques ou agissent en tant que régulateurs critiques. La dégradation des protéines dans les plantes est un processus complexe impliquant une multitude de voies protéolytiques localisées dans un ou plusieurs compartiments cellulaires.

1.2.2 La voie protéolytique dépendant de l'ubiquitine

Les premières observations sur la dégradation des protéines dans le noyau et le cytoplasme ont mis en évidence l'existence d'une voie protéolytique importante, mettant en jeu une petite protéine: l'ubiquitine. Dans cette voie, les protéines ayant des demi-vies très brèves, sur lesquelles sont conjuguées de multiples molécules d'ubiquitine, sont dégradées par une protéase comportant plusieurs sous-unités: le protéasome (Ciechanover, 1994; Hochstrasser, 1995).

Cette voie a été caractérisée pour la première fois dans des extraits de réticulocytes de lapin, puis dans d'autres organismes tels que l'homme, la levure, la drosophile et *Arabidopsis thaliana* (Wolf, 1993; Deshaies et al., 1995). La plupart des étapes principales, si ce n'est l'ensemble, ont été élucidées à partir de l'étude de ces organismes, et sont illustrées à la fig. 1.1. Jusqu'ici, l'ubiquitine est la protéine identifiée la plus conservée. Sa séquence de 76 acides aminés est identique chez toutes les plantes étudiées jusqu'à présent, et ne diffère que par deux résidus dans la séquence de la levure, par trois résidus dans les séquences invariables trouvées chez les animaux. On a également trouvé des séquences homologues chez les archéobactéries et les eubactéries. L'ubiquitine est codée par une famille multigénique complexe synthétisant l'ubiquitine comme une protéine de fusion naturelle (fig.1.1) (Jentsch, 1992). Chez les plantes, un certain nombre de gènes de fusion d'ubiquitine ont été décrits. La famille la mieux caractérisée est celle d'*A. thaliana* où l'on trouve 14 gènes différents pour l'ubiquitine (AtUB1-14). Dans chaque cas, les monomères fonctionnels d'ubiquitine sont libérés de la protéine de fusion grâce à un groupe unique de protéases désignées comme des *ubiquitin C-terminal hydrolases*. Celles-ci clivent de manière spécifique la liaison α -amino

peptidique qui suit l'extrémité C-terminale de la glycine 76 de chaque molécule d'ubiquitine (Hochstrasser, 1995). Chez les plantes, ce processus est rapide. Pour que l'activité de ces α -amino hydrolases s'exprime, le site de clivage doit comporter une molécule d'ubiquitine du côté de l'extrémité N-terminale; elle n'est pas affectée par la séquence de l'extrémité C-terminale du site de clivage. La spécificité peu commune de ces hydrolases a permis l'expression de protéines in vivo comportant des extrémités N-terminales autres que la méthionine. Chez *A. thaliana*, les gènes de polyubiquitine peuvent contenir de 3 à 6 répétitions d'ubiquitine. On trouve d'autres types de fusion de gènes où des régions codantes uniques de molécules d'ubiquitine sont fusionnées du côté 5' avec des régions codant pour des sous-unités de ribosomes (peptides de 52 acides aminés ou de 79 à 82 acides aminés). Une fois l'ubiquitine libérée de la protéine de fusion, ces polypeptides s'associent avec le ribosome.

La ligature covalente de l'ubiquitine avec les protéines destinées à être dégradées est la première étape de la voie protéolytique dépendant de l'ubiquitine, (Goldberg et al., 1995; Johnsson et al., 1995). Cette modification post-traductionnelle est accomplie par une cascade enzymatique impliquant des enzymes d'activation de l'ubiquitine (ou E1), des enzymes de conjugaison (ou E2) et des ligases protéine-ubiquitine (ou E3) (Jentsch et al., 1992; Ciechanover et al., 1994). Dans la première étape, une E1 dirige la formation, nécessitant de l'ATP, d'un intermédiaire à haute énergie par une liaison thiol-ester. Celle-ci lie l'extrémité C-terminale de la Gly-76 de l'ubiquitine à l'un de ses groupes cystéine. L'ubiquitine ainsi activée est transférée, via une trans-estérification, de l'E1 à une cystéine spécifique d'une E2. Finalement, l'E2 soit lie directement l'ubiquitine à la protéine cible, soit transfère l'ubiquitine activée à une E3 associée, via une nouvelle étape de trans-estérification. Par la suite, l'E3 transfère l'ubiquitine à la protéine cible. On a montré sur un certain nombre d'eucaryotes que la conjugaison est hiérarchisée. Chez la levure et *A. thaliana* par exemple, seules une à deux E1 exécutent l'activation de l'ubiquitine, alors qu'il y a une multitude d'E2 et d'E3 qui permettent le transfert de l'ubiquitine d'E1 aux différentes protéines cibles (Jentsch et al., 1992).

Une liaison isopeptidique lie l'extrémité C-terminale de la Gly-76 de l'ubiquitine et des groupes ϵ -amino lysyle libres se trouvant sur la protéine cible. Dans quelques cas, une seule molécule d'ubiquitine se trouve liée à la protéine. Ces protéines mono-ubiquitinées se montrent métaboliquement stables, ce qui suggère que l'addition d'une molécule d'ubiquitine ne dirige pas la protéine vers une dégradation mais sert probablement à modifier sa structure ou sa fonction comme le ferait de manière analogue une réaction de phosphorylation. Toutefois dans la plupart des cas, la cascade de conjugaison modifie la protéine cible en lui attachant de multiples molécules d'ubiquitine (Jentsch et al., 1992). Quoique cette modification puisse se produire par fixation de molécules d'ubiquitine uniques sur différents résidus lysine d'une même protéine, on constate que le plus souvent, elle se produit par fixation d'une ou de plusieurs chaînes de monomères d'ubiquitine. Ces mêmes chaînes constituent un signal très important dans le processus de dégradation de la protéine cible. Les chaînes de polyubiquitine sont faites de molécules d'ubiquitine liées les unes aux autres par des liaisons ϵ -amino isopeptidiques entre l'extrémité C-terminale de la Gly 76 d'une molécule d'ubiquitine et le résidu lysine de l'ubiquitine adjacente. La Lys-48 est le résidu le plus souvent impliqué dans ce type de liaison. La façon dont les chaînes d'ubiquitine se forment sur les protéines n'est pas éclaircie. Mais deux mécanismes sont possibles: les chaînes peuvent être assemblées directement sur la protéine cible par des cycles répétés d'ubiquitination, ou elles peuvent être préassemblées comme des chaînes libres et, par la suite, attachées en une seule étape à la cible. Plusieurs évidences étayent la deuxième

hypothèse. Premièrement, plusieurs E2 identifiées chez les plantes et les mammifères peuvent assembler *in vitro* des chaînes de polyubiquitine (van Nocker, 1996). Une famille d'E2, codées par les gènes du blé *TaUBC7* et d'*A. thaliana AtUBC7/13/14*, peut former des chaînes en utilisant exclusivement la Lys-48 dans la liaison isopeptidique. Deuxièmement, des chaînes de polyubiquitine libres peuvent être détectées chez divers eucaryotes comprenant notamment plusieurs espèces de plantes. Ce sont souvent les conjugués d'ubiquitine les plus abondants dans les extraits cellulaires. Troisièmement, ces chaînes libres sont aussi compétentes que des monomères d'ubiquitine dans des réactions de conjugaison de l'ubiquitine.

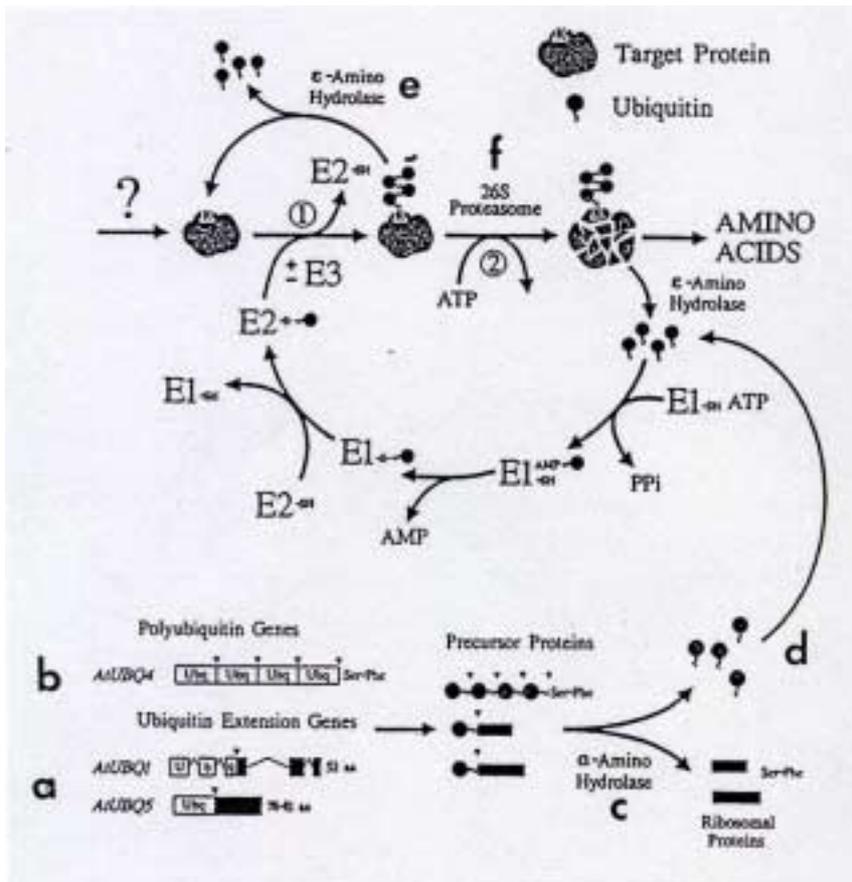


Fig. 1.1. Voie protéolytique dépendant de l'ubiquitine (Vierstra, 1996). La voie débute avec la synthèse des protéines de fusion soit **a**) avec une molécule d'ubiquitine ou **b**) avec une extension de polyubiquitine, suivie par l'action d'hydrolases C-terminales **c**) qui libèrent des monomères d'ubiquitine **d**). Un certain nombre de ceux-ci sont liés à une protéine destinée à la dégradation par un processus dépendant de l'ATP et impliquant des E1, E2, et parfois des E3. Les protéines ubiquitinées sont soit **e**) désassemblées par des *ε-amino ubiquitin C-terminal hydrolases* soit **f**) dégradées en acides aminés et peptides par le protéasome 26S dépendant de l'ATP avec, dans la libération d'ubiquitine libre. Les gènes d'ubiquitine présentés comme exemples sont AtUBQ1, 4 et 5 isolés d'*A. thaliana*. **K**: lysine impliquée dans la fixation des molécules d'ubiquitine à la protéine cible. **Ubq**: ubiquitine.

Une fois que la protéine a été conjuguée avec une ou plusieurs chaînes de polyubiquitine, on peut observer deux événements possibles:

a) Les conjugués ubiquitinés peuvent être dégradés, en présence d'ATP, par le protéasome 26S (Hochstrasser et al., 1995), un complexe protéolytique de 1500 kDa. Le protéasome 26S

dégrade les protéines en acides aminés et en peptides courts tout en libérant des molécules d'ubiquitine fonctionnelles. Dans ce sens, l'ubiquitine sert de signal réutilisable dans la voie de dégradation des protéines.

b) Les molécules d'ubiquitine peuvent être enlevées par un groupe d'enzymes nommées *ubiquitin C-terminal hydrolases*. Celles-ci clivent de manière spécifique les molécules d'ubiquitine liées par une liaison isopeptidique (Hochstrasser et al., 1995). Ces ϵ -amino hydrolases sont potentiellement distinctes des α -amino peptidases responsables du clivage des molécules de fusion d'ubiquitine (voir plus haut). Certaines ϵ -amino hydrolases permettraient de recycler les molécules d'ubiquitine fonctionnelles durant la dégradation des protéines ciblées; ceci en détachant les molécules d'ubiquitine de l'extrémité C-terminale du peptide résiduel. D'autres peuvent désubiquitiner des protéines intactes. De récentes observations montrent que des hydrolases spécifiques sont impliquées dans la division cellulaire et dans certains aspects du développement. De plus, on trouve plus de 15 hydrolases distinctes chez la levure (Hochstrasser et al., 1995). La désubiquitination doit donc avoir des fonctions de régulation importantes.

Les *ubiquitin C-terminal hydrolases* sont rangées en 2 classes; la première comprend des petites protéines (~20 kDa) qui ôtent de petites molécules (peptides, lysines,...) de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et la deuxième, des hydrolases (~50 à 300 kDa) qui détachent l'ubiquitine de toutes sortes de protéines. Certaines préfèrent l'ubiquitine liée via une liaison soit ϵ -amino soit α -amino, ou peuvent s'accommoder des deux; celles qui préfèrent les liaisons ϵ -amino, telle la DOA4 de la levure, débranchent les chaînes de polyubiquitine des peptides (Papa et al., 1993) ou l'isopeptidase T (Falquet et al., 1995) des mammifères qui désassemble les chaînes de polyubiquitine. En plus de leur grande taille, les hydrolases de la seconde classe sont définies par la présence de deux motifs conservés, l'un contenant une cystéine essentielle, et l'autre, deux histidines essentielles à la catalyse (Huang et al., 1995). On connaît peu de choses sur les hydrolases C-terminales chez les plantes. Dans le blé, on a détecté des activités correspondant aux α -amino- et ϵ -amino hydrolases. Récemment, des gènes d'*A. thaliana* codant pour des protéines structurellement apparentées à la deuxième classe d'hydrolases, contenant les résidus Cys et His essentiels, ont été identifiés.

1.2.3 Spécificité de la voie de l'ubiquitine

Deux événements de reconnaissance successifs déterminent la spécificité de la voie dépendant de l'ubiquitine, (Haas et al., 1997). Le premier sélectionne les substrats appropriés destinés à être ubiquitinés (Kampen et al., 1996) et le second identifie les conjugués ubiquitinés en vue de leur dégradation par le protéasome 26S. Le premier événement de reconnaissance passe par une cascade de réactions biochimiques impliquant les E2 et/ou E3. Le second implique l'association des protéines multi-ubiquitinées avec le protéasome 26S. Une des protéines indispensables dans la fixation des chaînes d'ubiquitine est la protéine MBP1, récemment découverte et identifiée comme un composant du complexe 19S (van Nocker et al., 1996).

1.2.4 Voies de dégradation indépendantes de l'ubiquitine

Outre la voie dépendant de l'ubiquitine, les compartiments cytoplasmique et nucléaire possèdent d'autres voies protéolytiques. Deux voies impliquent les protéasomes 20S et 26S en eux-mêmes. Par exemple chez l'animal, la dégradation de l'ornithine décarboxylase (ODC) (Murakami et al., 1992; Mamroud-Kidron et al., 1994; Elias et al., 1995) est dépendante du

protéasome 26S, mais indépendante de l'ubiquitine. C'est en fait une petite protéine qui semble faciliter l'arrimage de l'ODC sur le protéasome 26S, ce qui démontre que le protéasome peut reconnaître des protéines à demi-vies très courtes par des signaux autres que l'ubiquitine. Les mécanismes de reconnaissance indépendants de l'ubiquitine pourraient donc avoir lieu par interactions directes des substrats avec le protéasome, ou indirectes, au travers d'autres facteurs (ex. l'antizyme), ou par interaction avec des substrats au cours d'un mécanisme plus général, tel que la phosphorylation et la méthylation.

Un autre système protéolytique comporterait une protéase dépendant du calcium, la *Calpain*, présente dans une grande variété de vertébrés, d'invertébrés et de champignons (Croall et al., 1991). Bien que sa présence n'ait pas été démontrée de façon approfondie chez les plantes, on a pu détecter la présence de protéases activées par le calcium.

1.3 DEGRADATION DES PROTEINES DANS LES ORGANELLES.

1.3.1 Les vacuoles

Chez les plantes, les vacuoles sont les organelles les plus grandes. Elles occupent plus des 90% du volume de la cellule. Telles les vacuoles des levures, elles sont le lieu de nombreuses activités hydrolytiques impliquant diverses protéases (Davies et al., 1982). En réalité, ces protéases vacuolaires sont responsables de la plus grande partie de l'activité protéolytique mesurée dans des extraits bruts de plantes. Ainsi, elles causent l'un des principaux problèmes techniques associés aux tentatives de purification de protéines intactes chez les plantes. Diverses protéases y ont été détectées notamment des endo-exoprotéases, des amino- et carboxylpeptidases, des cystéines et des métalloprotéases, et d'autres qui ont une importance commerciale, comme la papaine, la ficine et la bromélaïne. La plupart des protéases vacuolaires ont leur activité maximale aux pH acides de 3 à 6.

1.3.2 Les chloroplastes

Chez les plantes, les chloroplastes constituent un compartiment riche en protéines, contenant jusqu'à 50 % des protéines cellulaires totales du tissu photosynthétique. De ce fait, on a accordé une grande importance à la compréhension des systèmes de dégradation des protéines chloroplastiques, notamment durant la sénescence (Dalling et al., 1986), où la majeure partie des protéines éliminées sont d'origine chloroplastique. Au départ, on pensait que les protéines étaient dégradées par les vacuoles et, plus récemment, par la voie de l'ubiquitine. Toutefois, il apparaît maintenant que les chloroplastes possèdent diverses protéases internes dont quelques-unes exigent de l'ATP.

Une protéase chloroplastique importante est apparentée à une protéase bactérienne dépendant de l'ATP, la Clp (fig.1.2) (Maurizi et al., 1994). La Clp bactérienne est composée de deux types de sous-unités ClpP et ClpA. La ClpA est une ATPase qui hydrolyse de l'ATP pour activer ClpP et dénaturer les substrats protéïniques. A côté des ClpP et ClpA, les chloroplastes renferment d'autres protéases, telles que les neutraloprotéases, les prolylendopeptidases, et une métalloprotéase qui pourrait être impliquée dans la dégradation de la Rubisco.

1.3.3 Autres organelles

A l'heure actuelle, on ne connaît que peu de choses sur la façon dont les organelles des plantes dégradent les protéines. Dans les cellules animales, les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE) ont des voies protéolytiques associées à la maturation et à la maintenance de chacun de ces compartiments. Ainsi, après traduction, de nombreuses protéines entrent dans le RE où elles sont modifiées, assemblées en complexes et dirigées vers le Golgi (Klausner, 1990), vers les vacuoles, puis vers certaines membranes ou dans l'espace apoplastique. La protéolyse joue trois rôles principaux dans le RE, l'un est d'écarter des protéines normales mais indésirées, l'autre est d'éliminer des protéines anormales et de les dégrader par des protéases internes, le troisième rôle protéolytique du RE est d'intervenir dans la maturation des protéines à partir de précurseurs. La protéolyse est aussi nécessaire dans le fonctionnement des peroxysomes, en particulier lorsqu'ils se différencient en formes spécialisées durant le développement des plantes (ex. passage glyoxysomes-peroxysomes).

1.4 STRUCTURES ET FONCTIONS DES PROTÉASOMES 20S ET 26S

1.4.1 Introduction

Le protéasome eucaryotique est le site de dégradation cytosolique et nucléaire des protéines de la plupart des cellules et il est indispensable à la viabilité de la cellule (Corey et al., 1993). La concentration de protéasome varie considérablement d'un type cellulaire à un autre, elle est supérieure dans les organes où le taux de dégradation des protéines est plus élevé. Les protéasomes sont présents dans le noyau et le cytosol des cellules eucaryotiques, où ils se trouvent parfois associés au cytosquelette et au réticulum endoplasmique (Chasan, 1993).

Le protéasome est donc un composant indispensable de la voie protéolytique dépendant de l'ubiquitine (Goldberg, 1995). Il catalyse la dégradation rapide d'un grand nombre d'enzymes, notamment de facteurs de transcription (ex: I κ B), de protéines de régulation critiques (ex. cyclines). Il est indispensable à la dégradation des protéines anormales qui peuvent survenir par mutations ou par altérations post-synthétiques. Il joue un rôle important dans l'accélération du processus de dégradation d'un ensemble de protéines du muscle lors d'états pathologiques, ainsi que du recyclage de protéines membranaires. Le protéasome dégrade les protéines en peptides courts qui sont à leur tour rapidement hydrolysés par des exopeptidases cytoplasmiques. Toutefois, chez les vertébrés supérieurs, certains peptides produits sont délivrés à la surface des cellules pour la présentation de l'antigène par le MHC-I (classe I du complexe d'histocompatibilité majeur) (Michalek et al., 1993; Realini et al., 1994). Quoique la forme du protéasome la plus souvent isolée et étudiée soit la particule 20S, il se trouve que la structure qui fonctionne dans la voie dépendant de l'ubiquitine est un complexe de plus grande taille, le protéasome 26S.

En fait, ces deux structures protéolytiques coexistent dans la cellule. La plus petite est le protéasome 20S et la plus grande, le protéasome 26S, qui a été considéré initialement comme une enzyme distincte; il dégrade sélectivement les protéines ubiquitinées par un processus dépendant de l'ATP (fig.1.1 et fig.1.2). Par la suite, des études ont démontré clairement que la particule 20S constituait le corps protéolytique du protéasome 26S. Celui-ci contient, en plus de la particule 20S, quelque 20 polypeptides additionnels formant un complexe distinct, appelé activateur PA 700 du protéasome, complexe régulateur 19S ou régulateur 22S. Ceux-ci

déterminent la spécificité du substrat et fournissent de multiples fonctions enzymatiques nécessaires à la protéolyse.

1.4.2 Le protéasome 20S

Les études en microscopie électronique du protéasome 20S, purifié à partir de différents tissus, révèlent une particule de forme cylindrique composée de quatre anneaux empilés (Tanaka et al., 1988; Udvardy et al., 1993; Ugai et al., 1993) (fig.1.1 et 1.2). Ce complexe contient de multiples sous-unités de taille variant de 20 kDa à 35 kDa, il a une masse moléculaire d'environ 750 kDa, un diamètre apparent de ~12 nm et une longueur de 17 nm et il possède une cavité centrale d'environ 3 nm. La compréhension actuelle de cette structure a grandement bénéficié des études faites sur le protéasome de l'archéobactérie *Thermoplasma acidophilum*; ce dernier est composé de deux sous-unités uniques et distinctes appelées α et β (Zwickl et al., 1992). La composition des protéasomes 20S eucaryotiques est plus complexe que celle de l'archéobactérie puisque le nombre de sous-unités distinctes α et β a augmenté au cours de l'évolution: 14 sous-unités sont présentes chez la levure et plus encore chez les eucaryotes supérieurs bien qu'il ne puisse y avoir plus de 14 sous-unités distinctes dans un complexe 20S. L'analyse de leur séquence permet de les classer en deux familles α et β , et indique que chaque anneau contient 7 sous-unités différentes. De plus, les observations en microscopie électronique, et l'utilisation d'anticorps, montrent que les deux anneaux qui se trouvent à l'extérieur contiennent uniquement les sous-unités α alors que les anneaux internes contiennent les sous-unités β . Ainsi, chaque sous-unité est présente deux fois dans le complexe dans chacun des deux anneaux. Chez les eucaryotes supérieurs, la composition en sous-unités du protéasome 20S peut varier dans une espèce donnée. Par exemple, le traitement des cellules au gamma interféron induit le remplacement de 3 sous-unités β par des sous-unités nouvelles et différentes: les sous-unités LMP qui altèrent les activités du protéasome et qui favorisent la présentation antigénique (Sibille et al., 1995). L'expression des sous-unités varie selon le tissu, et suivant les différents stades de développement. Ces modifications peuvent aussi avoir des conséquences physiologiques importantes.

1.4.3 Les composants du protéasome 20S

Dans cette structure, les sous-unités α ont des fonctions très claires.

- 1) Elles ont, en soi, la capacité de former spontanément des anneaux, à la différence des sous-unités β (Zwickl et al., 1992). Par ailleurs, l'assemblage des anneaux α est nécessaire à la formation des anneaux β .
- 2) Elles constituent une barrière physique qui limite l'accès de protéines cytosoliques à l'intérieur de la cavité protéolytique du complexe.
- 3) Elles constituent le site de fixation des complexes régulateurs 19S (PA700) et 11S (PA28) qui modulent l'activité protéolytique du protéasome (Chu-Ping et al., 1992).

Les sous-unités β montrent un plus haut degré de diversité dans leurs séquences que les sous-unités α . Elles possèdent initialement une proséquence N-terminale éliminée durant la formation de la particule. Cette étape permet d'exposer sur la plupart des sous-unités β un résidu thréonine terminal qui est nécessaire à leur activité. Ceci indique que les sous-unités β sont responsables des activités protéolytiques.

- 1) Toutes les substitutions d'acides aminés qui affectent l'hydrolyse des peptides sont situées sur les sous-unités β .
- 2) A la différence de la sous-unité α , la sous-unité β mature de *Thermoplasma acidophilum* montre, lorsqu'elle est exprimée chez *E. coli*, une activité peptidasique (Zwickl et al., 1992).
- 3) La présence de sites protéolytiques sur les sous-unités β a été confirmée par cristallographie R-X et par la découverte de certains inhibiteurs qui bloquent l'activité de celles-ci par modification covalente de leurs sites (Löwe et al., 1995).

1.4.4 Les activités peptidasiques de la particule eucaryotique

Le protéasome 20S possède de multiples activités peptidasiques. Notamment: une activité chymotrypsique qui hydrolyse après les résidus hydrophobes, une activité trypsique qui hydrolyse après les résidus basiques, et une activité "V8-protéase" qui hydrolyse après un résidu acide. Toutefois dans certaines conditions, on a pu mettre en évidence d'autres activités endopeptidasiques, notamment après des résidus neutres (Orlowski et al., 1993; Jentsch et al., 1995). Ces activités sont catalysées par des sites actifs distincts, puisque des mutations des sous-unités β , des inhibiteurs ou des changements en composition de sous-unités les altèrent différemment (Hilt et al., 1995). Lors de la mutagenisation de différents sites de sous-unités β , on a pu démontrer que les activités chymotrypsique et "V8-protéase" sont assignées à des sous-unités distinctes alors que l'activité trypsique est due à de multiples sites actifs. On ne sait pas, à l'heure actuelle, comment ces multiples peptidasases fonctionnent en commun.

Le mécanisme hydrolytique du protéasome a longtemps été un mystère. En grande partie, parce que les sous-unités ne montrent aucune homologie de séquence avec celles d'autres protéases et parce que leurs sensibilités aux inhibiteurs standards diffèrent de celles des familles classiques de protéases. Bien que le protéasome de *T. acidophilum* ne possède qu'un seul type de site actif, manifestant principalement une activité chymotrypsique, il peut également cliver après des résidus basiques, acides ou neutres suivant les conditions (Wenzel et al., 1994, 1993).

1.4.5 Les régulateurs de l'activité du protéasome 20S

Pour qu'une protéase puisse exister dans le cytosol et le noyau, des mécanismes de régulation précis ont dû évoluer de façon à permettre une dégradation sélective des protéines, laquelle évite dans la cellule une dégradation généralisée des protéines. Deux caractéristiques structurales du protéasome, l'isolement de ses sites actifs à l'intérieur de sa cavité et la petite ouverture des anneaux α , réduisent clairement les chances d'hydrolyse des constituants

cellulaires.

Chez les eucaryotes, l'ubiquitination des substrats et la machinerie du complexe 19S a probablement évolué de façon à assurer une haute sélectivité de l'entrée de polypeptides. On connaît plusieurs traitements activant la particule 20S (SDS, température) qui perturbent sa conformation. Ainsi, son activation implique certainement soit un changement de conformation des sous-unités β qui a pour effet d'augmenter leurs activités catalytiques soit une altération des anneaux α facilitant l'entrée du substrat. Toutefois, ces activations sont réversibles et mènent à des états distincts et interconvertibles. Des régulateurs physiologiques tels que PA28 ou PA700 (Adams et al., 1997), qui stimulent fortement l'hydrolyse des peptides, miment, en quelque sorte, les changements de conformation induits par ces traitements.

Plusieurs protéines cytosoliques ont montré leur action inhibitrice sur le protéasome 20S, elles servent probablement à le maintenir dans une forme inactive *in vivo*. Guo et al. (1994) sont les premiers à avoir démontré qu'un inhibiteur de 240 kDa (un hexamère ayant 6 sous-unités de 40 kDa) réduit l'activité de la particule. Cet inhibiteur est identique à l'acide δ -aminolévulinique déhydratase, un enzyme clé dans la voie de biosynthèse du noyau hème (Guo et al., 1994). D'autres facteurs, les protéines PI131 (Chu-Ping et al., 1992), et Hsp 90, ont démontré leur faculté d'inhiber certaines activités du protéasome.

1.4.6 L'activateur PA28

Deux complexes s'associent avec le protéasome 20S et activent fortement son activité dans les cellules eucaryotiques. L'un, le PA700 ou complexe régulateur 19S (fig.1.2), se combine avec le protéasome 20S de façon à former le protéasome 26S, dans une réaction dépendant de l'ATP. L'autre, le PA28 (fig.1.3.A), (Mott et al., 1994) est le régulateur 11S, qui peut s'associer avec le 20S, en absence d'ATP. Cet activateur provoque une forte augmentation du V_{max} et diminue le K_m de multiples peptides sans pour autant affecter l'hydrolyse des protéines. Dans des extraits bruts, PA 28 existe sous la forme d'une structure soit libre ou soit associée au 20S, mais n'a pas été trouvé dans des particules de 26S purifiées. L'activateur est un complexe composé de deux sous-unités $PA\alpha$ et $PA\beta$, arrangées en alternance sous la forme d'un anneau de 6 sous-unités, ajusté aux deux extrémités du 20S (fig.1.3.A) (Song et al., 1997).

1.4.7 Le protéasome 26S

Dans les cellules eucaryotiques, la dégradation d'un grand nombre de protéines implique leur modification initiale par conjugaison avec l'ubiquitine. Ces protéines ubiquitinées sont alors rapidement dégradées par le protéasome 26S (fig.1.2), bien qu'elles puissent être désubiquitinées par des isopeptidases, ou dégradées soit dans les lysosomes soit dans les vacuoles (Hicke et al., 1996). Ce complexe, aussi bien présent dans le noyau et le cytosol, est malheureusement une structure instable, ce qui explique qu'il n'ait pas été découvert plus tôt et

que plusieurs aspects de sa biochimie soient difficiles à étudier. Depuis que l'on a découvert que le glycérol et l'ATP le stabilisent, on a pu le purifier, avec une relative homogénéité, à partir de plusieurs sources telles que réticulocytes de lapin (Hough et al., 1987), épinard (Fujinami et al., 1994), oocytes de xénope (Peters et al., 1993), drosophile (Udvardy et al., 1993), levure. En microscopie électronique, le protéasome 26S se présente comme une structure symétrique (fig.1.2 et 1.3), formée de deux grands complexes, ajustés à chacune des extrémités de la particule 20S.

Ces complexes, qui correspondent à l'activateur PA700, possèdent une grande invagination en forme de V qui peut être considérée comme le site d'entrée des substrats. Ils sont liés au 20S dans des orientations opposées. Toutefois, un certain nombre de préparations contiennent une grande part de structures en forme de champignon associées au 20S, à une seule de ses extrémités. On ne sait pas si ces complexes en forme de champignon correspondent *in vivo* à des particules distinctes qui auraient d'autres propriétés encore inconnues.

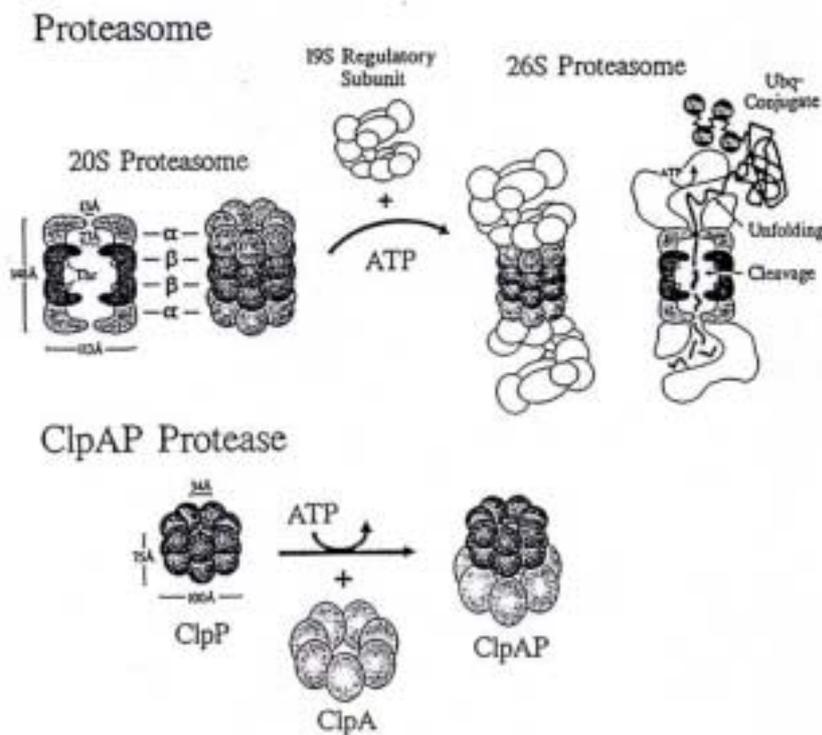


Fig. 1.2. Structures des protéasomes 20S et 26S impliqués dans la voie dépendant de l'ubiquitine, et de la ClpAP protéase. Les structures du protéasome 20S et 26S ont été déterminées par cristallographie R-X pour le 20S sur des préparations de protéasome isolé de *Thermoplasma acidophilum* (Löwe et al., 1995) et de la levure (Groll et al., 1997) et par microscopie électronique (coloration négative) pour le 26S sur des préparations de protéasome isolé de la drosophile pour le 26S (Walz et al., 1998). La protéase Clp a été modélisée à partir d'images obtenues en microscopie électronique (Maurizi et al., 1994). **Thr**: site actif des sous-unités bêta. **Ubq**: ubiquitine.

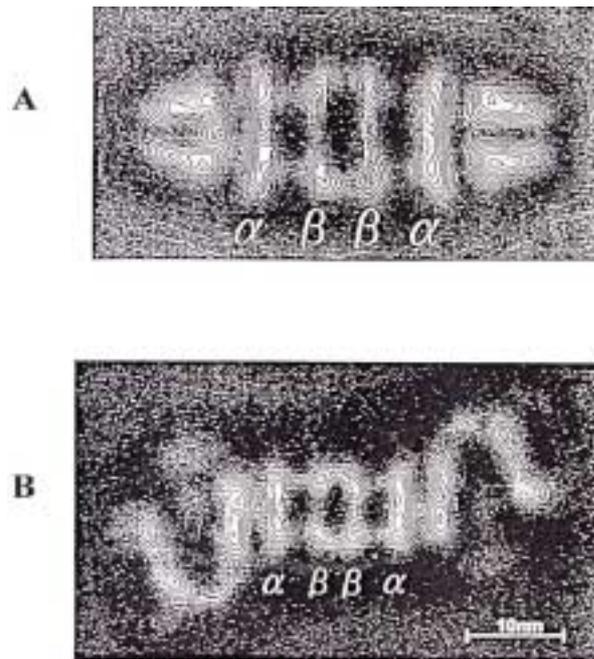


Fig.1.3. Carte des contours ou "image moyenne" basée sur des micrographies A) du complexe PA28 (11S) B) du complexe 26S (Vierstra, 1996). Les anneaux α et β sont indiqués.

1.4.8 Le complexe PA700 ou 19/22S

Le protéasome 26S peut se former *in vitro*, en présence d'ATP, du protéasome 20S associé à un autre complexe composé d'au moins 20 protéines de masse moléculaire variant de 25 à 110 kDa (Adams et al., 1997). Ce complexe semble fonctionner comme une bouche pour la machinerie digestive du 20S. Il possède les fonctions nécessaires à la dégradation sélective des protéines ubiquitinées comprenant un site fixation pour les chaînes d'ubiquitine (van Nocker et al., 1995), une activité isopeptidasique, des activités ATPasiques, ainsi que la capacité d'activer les activités peptidasiques du 20S. Différents laboratoires ont isolé plusieurs variantes du complexe 26S, aux propriétés différentes, auxquels ils ont donné divers noms tels que "*19S cap complex*", particule " μ " (Udvardy et al., 1993), "PA 700" (Peters et al., 1994), ou encore "*22S complex*". Ces complexes sont similaires dans leur taille et dans leur composition en protéines, mais ils varient quelque peu par leur contenu en sous-unités et leurs propriétés fonctionnelles. Au début, PA700 a été isolé comme un activateur du protéasome 20S dépendant de l'ATP. Il est clairement distinct de l'activateur PA28 et, en présence d'ATP, le PA700 pur s'associe avec le protéasome 20S pour former le complexe 26S qui est très actif dans l'hydrolyse des peptides et la dégradation de protéines ubiquitinées. Dans des extraits bruts contenant de l'ATP, le *19S cap* et la particule μ sont aussi capables de former un complexe avec le protéasome 20S, sauf s'ils sont purifiés (Udvardy et al., 1993; Sawada et al., 1997)! Ainsi, ces propriétés divergentes sont le reflet des différents modes de purification d'une structure unique que l'on trouve dans toutes les cellules eucaryotiques. Par ailleurs, ces différents complexes pourraient aussi représenter des isoformes d'un complexe simple présent dans différentes cellules. Toutefois, il est difficile de savoir quelles formes sont normalement présentes *in vivo* et lesquelles sont des artefacts de purification! Un grand nombre de sous-unités du complexe 19S et/ou PA 700 ont été séquencées et se sont révélées homologues à d'autres protéines fonctionnant dans des voies biochimiques distinctes (Aravin et Ponting,

1998). On a beaucoup de peine à définir leur rôle et leur fonction exacte dans la structure 26S. D'autant plus qu'en face d'une telle richesse de protéines différentes associées à une même structure, on est en droit de se demander si toutes les sous-unités isolées et analysées ont bien leur place dans ce type de complexe.

1.4.9 Les sous-unités du protéasome 26S

1.4.9.1 Les ATPases

Plusieurs groupes de chercheurs ont analysé systématiquement les polypeptides composant le complexe PA700. Des analyses de séquences ont révélé qu'au moins 8 de ces sous-unités sont des ATPases hypothétiques. Ceci confirme le fait que de fortes activités ATPasiques sont mises en évidence dans des préparations de particules 26S obtenues de différentes sources (plante, mammifère, levure) (Fujinami et al., 1994).

L'assemblage et les propriétés protéolytiques dépendant de l'ATP du protéasome 26S sont liés directement à la fonctionnalité de ses sous-unités ATPasiques. Ces sous-unités font partie d'une nouvelle famille d'*ATP binding protein* comprise dans un plus grand groupe d'ATPases impliquées dans une grande variété de processus (Patel et al., 1998). On ne comprend pas encore pourquoi il y a autant d'ATPases dans le 26S, et on ignore si celles-ci se trouvent toutes dans la même structure. En fait, au moins une de ces sous-unités doit être responsable de l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à l'association du 20S avec le PA 700 pour former le 26S. Dans celui-ci, la dégradation des protéines ubiquitinées exige l'hydrolyse de l'ATP, mais la protéolyse à la différence de l'assemblage peut également utiliser du CTP, UTP, GTP (Armon et al., 1990). Des analogues d'ATP non hydrolysables ou l'action d'inhibiteurs d'ATPases, peuvent bloquer la dégradation de conjugués ubiquitinés. Les ATPases pourraient aussi avoir pour fonction d'aider à injecter les substrats dans le 20S, ce qui faciliterait leur dégradation (Menon et al., 1987).

L'énergie requise pour le fonctionnement du protéasome 26S et de grandes protéases multimériques, comme celles que l'on a isolées chez *E. coli*, est inattendue d'un point de vue thermodynamique puisqu'un grand nombre de protéases catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique indépendamment de l'ATP. Quoique les recherches sur les mécanismes du complexe 26S soient difficiles, notamment à cause de son instabilité ainsi que des quantités limitées de ce complexe et des substrats conjugués à l'ubiquitine, les études sur les protéases dépendant de l'ATP *La* (ION) (Menon et al. 1987) et la *ClpAP* (Maurizi et al., 1994) ont démontré que l'hydrolyse d'ATP pouvait servir à d'autres fonctions. L'une de ces fonctions est connue, il s'agit de contrôler l'activité protéolytique de façon à prévenir la digestion excessive de constituants cellulaires. Par exemple, dans la protéase *ClpAP*, la liaison de l'ATP avec des composants de la *ClpAP* élargit le site peptidasique sur *ClpP*, permettant ainsi la dégradation de peptides de plus grandes tailles. Le protéasome 20S de l'archéobactérie *T. acidophilum* dégrade par lui-même des protéines dénaturées (Wenzel et Baumeister, 1993). Toutefois, la dégradation des substrats ubiquitinés, qui peuvent être sous forme globulaires ou partiellement dénaturés, exige des réactions de dénaturation supplémentaires. Le rôle

important des ATPases pourrait être de provoquer la dénaturation de substrats en fonctionnant de la même façon qu'une molécule chaperonne.

1.4.9.2 Les sous-unités non ATPasiques

Le complexe 19 S (PA700) contient également 15 à 18 polypeptides qui semblent ne pas avoir la capacité de lier de l'ATP. On ne connaît encore que peu de choses sur leurs fonctions, mais ils pourraient servir à associer ou activer la particule 20S, à capturer des substrats, à libérer et à désassembler des chaînes de polyubiquitine ainsi qu'à mettre à disposition des substrats pour la particule 20S.

1.4.9.3 Le récepteur à l'ubiquitine S5a ou MCB1

Deveraux et al. (1994) ont démontré qu'un composant de 50 kDa du complexe 26S humain, la protéine Sa5, lie avec une forte affinité les chaînes de polyubiquitine contenant au moins 4 molécules d'ubiquitine. Un cDNA homologue chez *A. thaliana*, MBP1, code pour une protéine acide de 41 kDa ayant une affinité similaire pour des chaînes de polyubiquitine (Fu et al., 1998). Des gènes homologues existent dans plusieurs organismes (van Nocker et al., 1996). Il est intéressant de constater que la protéine MBP1 recombinante inhibe, par compétition, la dégradation de protéines ubiquitinées par le protéasome 26S purifié, et cela sans affecter la dégradation des peptides (Deveraux et al., 1995). Ainsi, MBP1 fonctionne dans le protéasome comme un récepteur pour les polypeptides multi-ubiquitinés (van Nocker et al., 1995). Toutefois, il est surprenant de constater que, chez la levure, le gène *Mbp1* n'est pas indispensable (van Nocker et al., 1996). On peut imaginer que le protéasome 26S peut lier efficacement la plupart des substrats dans les cellules déficientes en MBP1 grâce à d'autres mécanismes de reconnaissance (notamment pour lier le complexe ODC/AZ ainsi que d'autres substrats qui ne sont pas ubiquitinés).

1.4.9.4 Cofacteurs du protéasome 26 S: les isopeptidases

Avant la dégradation, de multiples molécules d'ubiquitine sont conjuguées aux substrats par des liaisons isopeptidiques liant le résidu C-terminal de l'ubiquitine au résidu du groupe ϵ -amino de la lysine du substrat ou d'une autre molécule d'ubiquitine. La dégradation des protéines ubiquitinées implique la suppression des chaînes de polyubiquitine et leur dépolymérisation par des isopeptidases, libérant ainsi des molécules libres d'ubiquitine. Des familles d'isopeptidases appelées *ubiquitin C-terminal hydrolases* ont été isolées et ont la capacité d'hydrolyser des liaisons isopeptidiques. On en a trouvé plus de 15 chez la levure (Hochstrasser et al., 1995), mais on ne connaît pas leur fonction précise puisque certaines entrent en compétition avec le 26S pour la dégradation de conjugués. La plupart d'entre elles libèrent les molécules d'ubiquitine durant la dégradation des protéines.

L'enzyme, la mieux caractérisée est l'isopeptidase-T, qui a été à l'origine isolée par Wilkinson et al. (1995). Celle-ci convertit les grandes chaînes de polyubiquitine en fragments plus petits, en libérant ainsi des molécules d'ubiquitine libres, et attaque préférentiellement les chaînes de polyubiquitine ayant un groupe carboxy-terminal libre: autrement dit, les chaînes libérées par le protéasome 26S (Wilkinson et al., 1995). Cette enzyme stimule la dégradation

des protéines multi-ubiquitinées. De la même manière, la mutation d'une telle enzyme, ou de son homologue Ubp14 chez la levure, provoque une diminution de la protéolyse et une accumulation des protéines multi-ubiquitinées (Amerik et al., 1997).

La DOA4, une isopeptidase de 105 kDa, est nécessaire à la dégradation rapide du répresseur MAT α 2 (Papa et al., 1993). Dans les mutants de DOA4, de petites molécules ubiquitinées apparaissent, de tailles légèrement plus élevée qu'une molécule d'ubiquitine. Ceci laisse à penser que de petits peptides restent liés à une ou quelques molécules d'ubiquitine. L'inhibition de la dégradation des protéines dans ces cellules est probablement due à l'accumulation de ces peptides ubiquitinés qui restent associés avec le protéasome 26S et limitent ainsi sa capacité de dégrader de nouveaux substrats. L'association de DOA4 avec le protéasome 26S n'a pas été démontrée, probablement parce que cette enzyme n'est que faiblement liée à la structure et, de ce fait, perdue durant la purification.

Récemment, un groupe de recherche a mis en évidence une activité exopeptidasique associée au complexe PA700. Celle-ci catalyse l'hydrolyse des chaînes de polyubiquitine à partir de leur extrémité distale (Lam et al., 1997). De cette manière, cette enzyme pourrait donc sauver de la protéolyse des conjugués faiblement ubiquitinés ou dégradés très lentement.

1.5 INTERETS DE LA RECHERCHE SUR LA VOIE DE L'UBIQUITINE

La voie protéolytique de dégradation des protéines par l'ubiquitine est impliquée, nous l'avons vu, dans une multitude d'événements cellulaires (Hochstrasser, 1995). Dès lors, il est clair que des perturbations ou dysfonctionnements dans la voie de l'ubiquitine peuvent avoir des conséquences dévastatrices pour un organisme (Muller et Schwartz, 1995). C'est pourquoi, un grand nombre de chercheurs intéressés par un large éventail de domaines, par exemple, la protéolyse, le développement, l'immunologie, le cycle cellulaire (Seufert et al., 1995) et l'oncologie, mènent des recherches convergentes et cherchent à comprendre comment une molécule aussi simple que l'ubiquitine peut participer à la régulation d'une telle diversité de processus importants (Kampen et al., 1996; Lord, 1996; Pagano, 1997).

Dans la cellule, le protéasome constitue le passage obligé des protéines ubiquitinées destinées à être dégradées (Orlowski, 1993). Malgré les efforts intenses des recherches actuelles sur ce complexe, qui ont abouti aux caractérisations biochimiques, fonctionnelles et structurales du protéasome 20S, il reste des zones d'ombre sur les propriétés du complexe 26S. Bien que l'on ait démontré son rôle dans la dégradation des conjugués ubiquitinés, le mécanisme du processus que subissent ces derniers n'est pas éclairci. En effet, les processus fondamentaux de reconnaissance, d'élimination des chaînes de polyubiquitine et de dénaturation des substrats par les ATPases du 26S ne sont pas éclaircis. La protéine MCB1 du protéasome 26S, qui reconnaît les chaînes de polyubiquitine, ne satisfait pas au modèle puisqu'elle n'est pas indispensable à la survie de la cellule. La sous-unité responsable de la dégradation ou de l'élimination des chaînes de polyubiquitine n'a pas été isolée. Et l'action soi-disant dénaturante des ATPases du complexe régulateur 19S n'a pas été démontrée. Plus généralement, on peut se demander quel peut être le sens de l'ubiquitination lorsque l'on sait qu'elle ne destine pas obligatoirement la protéine à la dégradation (Pickart, 1997).

1.6 BUT DU TRAVAIL DE THESE

Le but de ce travail est de tenter de comprendre le mécanisme par lequel les protéines ubiquitinées sont dégradées par le protéasome. Ce travail implique dans un premier temps l'isolation et la caractérisation du protéasome de la bryophyte *Physcomitrella patens*, la synthèse des chaînes de polyubiquitine et l'étude du comportement du protéasome de *P. patens* en présence de ces chaînes. Cette étude a été envisagée dans une perspective à long terme et en particulier avec l'idée de pouvoir étudier la fonction des différents composants du protéasome par des techniques de *knock-out* (rupture de gène).

L'étude de la rupture d'un gène ou le remplacement d'un allèle par recombinaison homologue peuvent être des outils puissants dans l'étude de la fonction de gènes nouveaux. Dans notre laboratoire, des mécanismes très efficaces de recombinaison homologue ont été découverts chez la bryophyte *Physcomitrella patens* (Schaefer et Zrýd, 1997).

Jusqu'ici, les techniques de recombinaison homologue ne semblaient possibles que chez la levure ou chez des eucaryotes inférieurs et n'étaient pas réalisables chez les plantes. Schaefer et Zrýd (1997) ont démontré que l'intégration directe de DNA dans le génome de la mousse *Physcomitrella patens* par recombinaison homologue était possible et prédictible. De plus, la recombinaison homologue chez *P. patens* est aussi efficace que chez la levure (Schaefer et Zrýd 1997; Reski, 1998), ce qui n'est pas le cas chez les plantes supérieures. La

recombinaison homologue est un excellent moyen d'étudier directement et efficacement la fonction d'un gène grâce à son silençage via sa rupture ciblée ou grâce à sa mutation *in vitro* (Puchta et Hohn, 1996). La mousse *P. patens* peut donc être considérée comme un organisme modèle (Cove et al., 1997; Reski, 1997) dans la recherche du fonctionnement des gènes dans les plantes supérieures. D'une part, parce que c'est un organisme pluricellulaire haploïde, d'autre part, parce que *P. patens* a en commun avec les plantes supérieures un grand nombre de voies physiologiques similaires. L'analyse des *expressed sequence tags* (EST) révèle un haut degré de conservation au niveau des nucléotides entre *P. patens* et *A. thaliana*, l'autre modèle biologique le plus étudié chez les plantes (Puchta, 1998), (Liljegren et Yanofski, 1998). Aucune différence majeure n'a été mise en évidence dans l'usage des codons.

Récemment, dans notre laboratoire, Girod et al., (1998) ont appliqué avec succès la technique de la recombinaison homologue dans le but de provoquer un *knock-out* sur la mousse *P. patens*. La rupture du gène *Mcb1* a abouti à une altération développementale. L'étude du phénotype qui s'est manifesté, en particulier la disparition des gamétophores, permettra de mieux définir le rôle de la protéine MCB1 dans la cellule.