

### 3. LE PROTEASOME DE *PHYSCOMITRELLA PATENS* ET LES CHAINES D'UBIQUITINE

#### 3.1 INTRODUCTION

L'inexistence du protéasome 26S chez la mousse *P. patens* pose la question de savoir si le protéasome 20S que nous avons isolé peut fonctionner en tant que particule libre dans la dégradation des conjugués ubiquitinés, puisque chez *P. patens* le complexe de protéines 19S généralement associé au 20S est absent? A l'heure actuelle, aucune publication ne fait état de cette possibilité.

Trois propriétés principales du 19S permettent au 26S de remplir sa fonction spécifique de dégradation des protéines ubiquitinées: la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine liées à la protéine ciblée, la dénaturation des protéines auxquelles ces chaînes sont rattachées avant de pouvoir être dégradées par le 20S, la dégradation ou l'élimination des chaînes d'ubiquitine de la protéine, qui seront recyclées. Peut-on attribuer ces mêmes propriétés à la structure que nous avons isolée chez la mousse *P. patens*?

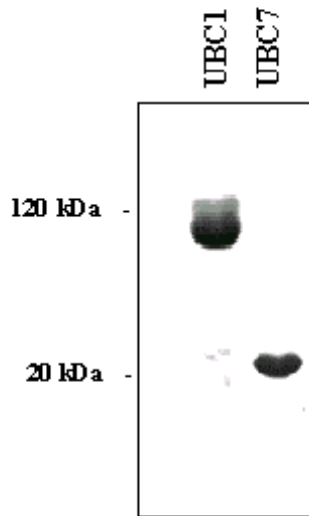
La fixation d'une ou de plusieurs chaînes d'ubiquitine à la protéine ciblée est nécessaire pour la dégradation sélective de certaines protéines intracellulaires (Wilkinson et al., 1995). Ces chaînes constituent donc le signal indispensable dans le processus de reconnaissance des protéines à dégrader (Johnsson et al., 1995; Jentsch et Schlenker, 1995). Comment cette information est-elle "lue" et "interprétée" ? Le protéasome de *P. patens* peut-il reconnaître les chaînes d'ubiquitine et quels en sont les mécanismes? Afin de tenter d'élucider ces mécanismes, nous nous sommes proposé d'étudier le comportement du protéasome 20S de *P. patens* en présence de chaînes d'ubiquitine branchées.

#### 3.2 ACTIVITE ISOPEPTIDASIQUE ASSOCIEE AU PROTEASOME DE *P. patens*

##### *Synthèse et purification des chaînes de polyubiquitine*

Dans les chaînes de polyubiquitine, l'extrémité carboxy-terminale de la glycine 76 de l'ubiquitine est lié par un pont isopeptidique au groupe  $\epsilon$ -amino de la lysine 48 de l'ubiquitine adjacente. Ce type de chaîne provoque un fort signal de dégradation de la protéine ciblée (Johnsson et al., 1995). La possibilité de synthétiser, in vitro, ce type de chaînes a été démontrée (van Nocker et al., 1996) à l'aide de deux enzymes qui interviennent dans les premières étapes de la conjugaison de l'ubiquitine; *l'ubiquitin-activating enzyme* TaUBA1 (E1) et *l'ubiquitin-conjugating enzyme* TaUBC7 (E2). Ces deux gènes clonés dans un vecteur d'expression Pet3a nous ont été fournis par R.D. Vierstra, (Université de Madison, Wisconsin). Ce système d'expression permet la production dans *E. coli* d'une grande quantité de protéine du gène cloné. Les étapes de purification de ces deux protéines exprimées dans *E. coli* ayant déjà été publiées (van Nocker et al., 1996), nous nous bornerons à présenter sur gel 14 % (fig. 3.1.) les deux protéines purifiées TaUBA1 (120 kDa) et TaUBC7 (20 kDa).

Fig. 3.1. Analyse des préparations d'UBA1 (E1) et UBC7 (E2) sur gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie.



Toutefois, la méthode de synthèse et de purification des chaînes de polyubiquitine branchées a subi une nouvelle mise au point. Les modifications que nous avons ainsi apportées nous ont permis d'obtenir des chaînes en grande quantité et à un très bon degré de pureté.

Dans le mélange réactionnel de synthèse, maintenu à une température de 37°C, on ajoute à l'ubiquitine (substrat de base), les enzymes TaUBA1 et TaUBC7, de l'ATP, un système de régénération de l'ATP et du PMSF (évite l'action de protéases).

Nous avons rajouté périodiquement et systématiquement par intervalles de 10h, les enzymes de conjugaison TaUBA1 et TaUBC7, ainsi que le système de régénération de l'ATP. Au cours de la réaction des échantillons sont prélevés et analysés sur gel SDS-PAGE, afin de suivre l'évolution de la réaction de synthèse (fig. 3.2). Sur ce gel, la cinétique de formation des chaînes montre nettement l'épuisement de l'ubiquitine au profit des chaînes plus longues. Après env. 100h, la concentration de l'ubiquitine ne diminue plus de façon notable. A ce stade, on peut obtenir des chaînes de plus de 10 molécules d'ubiquitine. La réaction de synthèse est stoppée à 120h. et chargée sur une colonne HPLC échangeuse d'anions (MonoQ) équilibrée dans un tampon pipérazine pH:10,0 permettant de fixer l'ensemble de la population des chaînes d'ubiquitine. L'élution de la colonne est effectuée au moyen d'un gradient de 0 à 500mM de NaCl (fig. 3.3.A). Nous avons procédé à plusieurs cycles de purification des fractions obtenues ci-dessus de façon éliminer les "contaminants" supérieurs et inférieurs à une longueur de chaîne donnée (fig. 3.3.C).

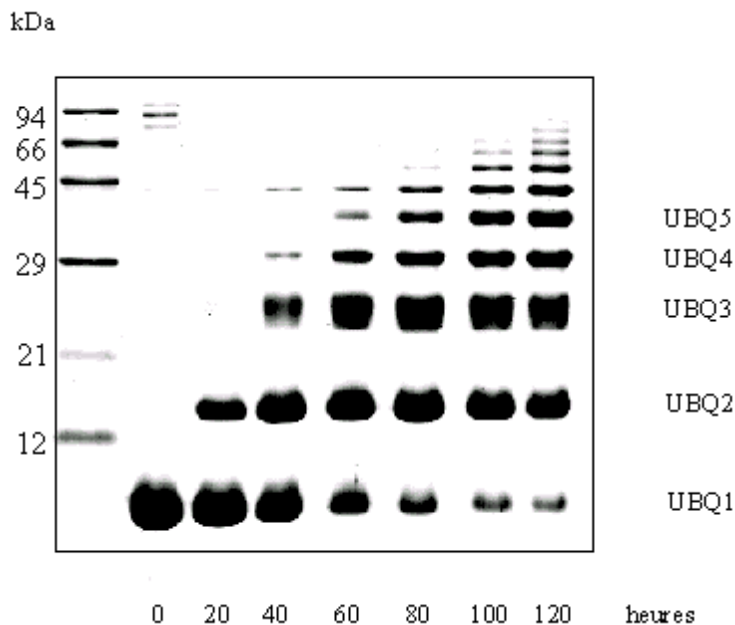


Fig. 3.2. **Cinétique de la synthèse des chaînes de polyubiquitine.** Un aliquot est prélevé à intervalles réguliers durant la synthèse et analysé sur gel SDS-PAGE 14% coloré au bleu de Coomassie. UBQn: chaîne d'ubiquitine composé de n monomères d'ubiquitine.

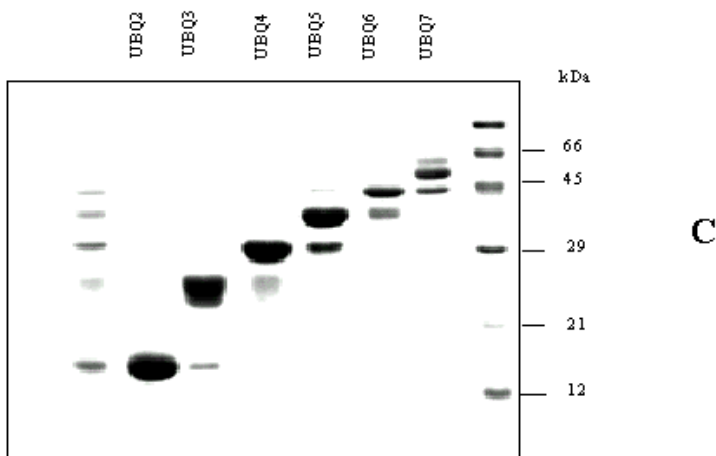
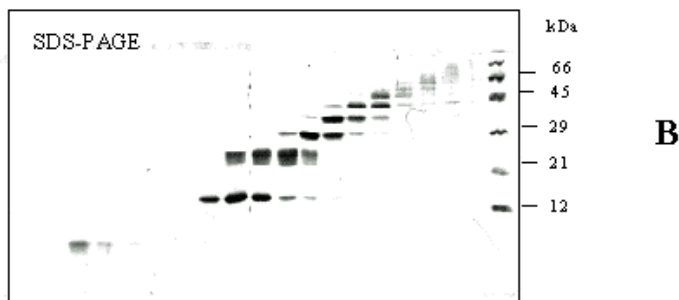
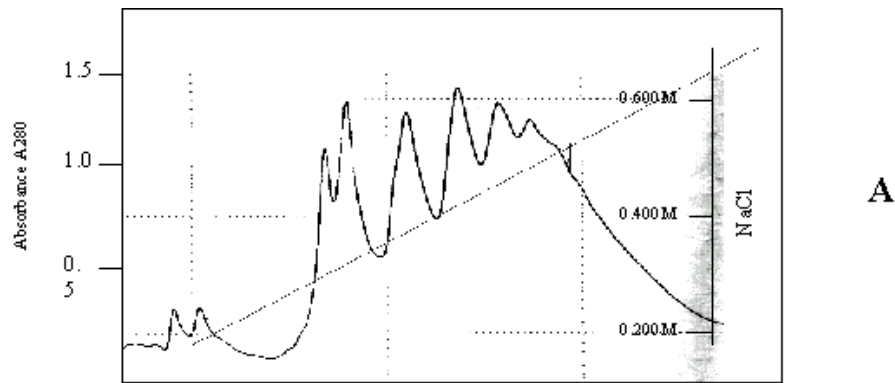
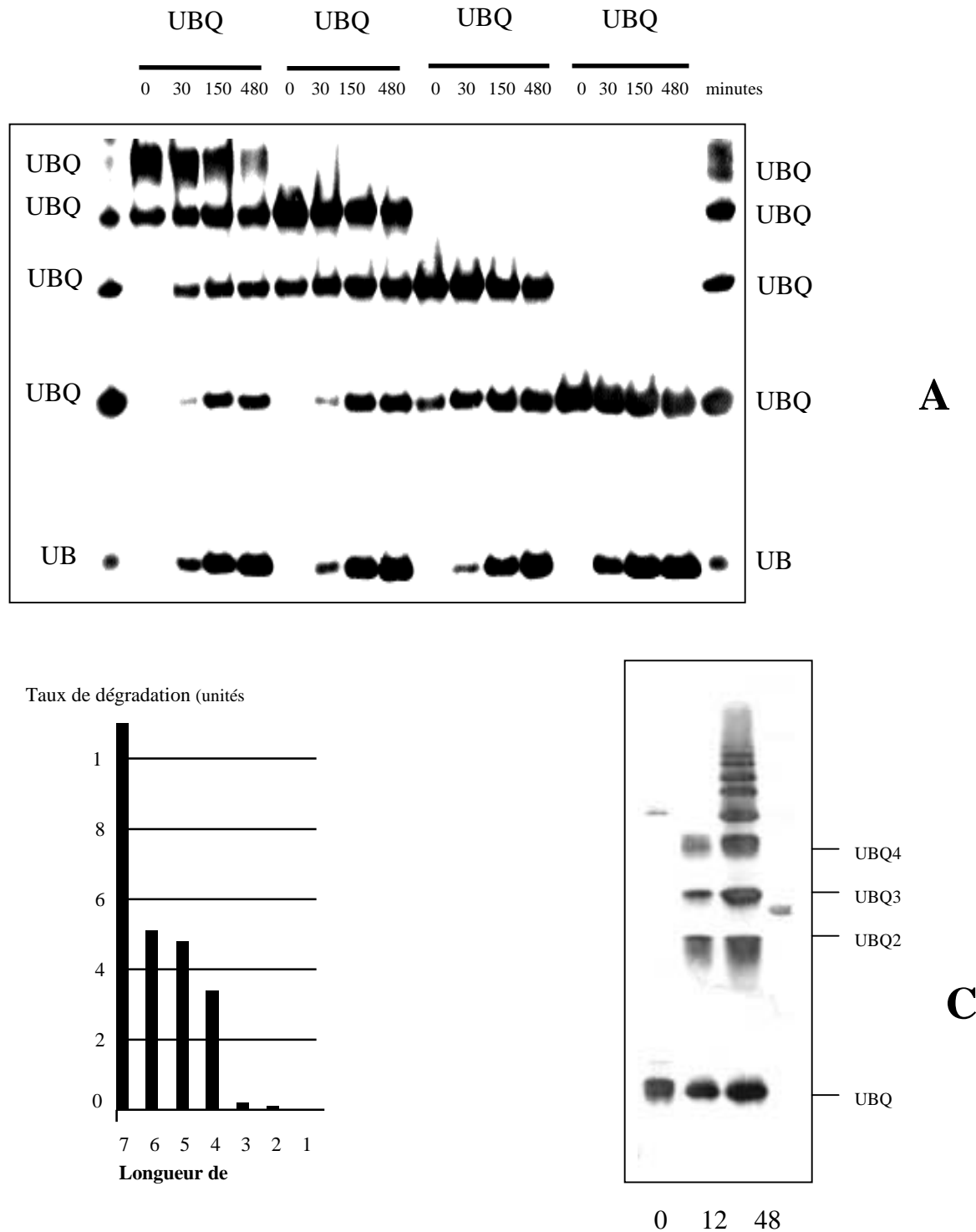


Fig. 3.3. **A)** chromatogramme de la séparation des chaînes de polyubiquitine sur colonne HPLC échangeuse d'anions MonoQ, par application d'un gradient de 0 à 700 mM de NaCl. **B)** Analyse sur gel SDS-PAGE 14% coloré au bleu de Coomassie des fractions séparées par HPLC MonoQ **C)** analyse sur gel SDS-PAGE 14 % coloré au bleu de Coomassie des chaînes de polyubiquitine après plusieurs cycles de purification sur colonne HPLC MonoQ

***Mise en évidence d'une activité isopeptidasique associée au protéasome***

La préparation de protéasome que nous avons isolée de la mousse peut-elle reconnaître et hydrolyser les chaînes de polyubiquitine branchées que nous avons synthétisées? Chez la mousse, nous n'avons pas pu mettre en évidence de structure 26S. Pourtant, la voie de l'ubiquitine est fonctionnelle chez cet organisme. On peut dès lors se demander si la préparation de protéasome que nous avons obtenue possède les propriétés fonctionnelles nécessaires à la métabolisation des chaînes de polyubiquitine.



**Fig. 3.4. Mise en évidence de l'activité isopeptidasique associée au protéasome de *P. patens*.**

**A)** Les différentes espèces de chaîne (comportant de une à cinq molécules d'ubiquitine) sont mises en présence de protéasome de mouche. La cinétique de dégradation est analysée sur gel d'électrophorèse 16 %, transféré sur membrane PVDF et révéler aux anticorps antiubiquitine.

**B)** Evaluation de l'affinité du protéasome de mouche (taux de dégradation de la chaîne initiale) pour les chaînes de polyubiquitine en fonction de leur longueur, par analyse densitométrique.

**C)** Fonctionnalité des molécules d'ubiquitine relâchées par l'activité isopeptidasique du protéasome de *P. patens*. La «resynthèse» des chaînes d'ubiquitine, à partir de molécules d'ubiquitine relâchées par le protéasome, est analysée sur gel d'électrophorèse 16%, transféré sur membrane PVDF et révéler aux anticorps antiubiquitine

Des chaînes d'ubiquitine de différentes tailles sont mises en présence de protéasome de mouche. La cinétique de dégradation est présentée à la figure 3.4.A. Les échantillons prélevés

au cours du temps sont analysés sur gel SDS-PAGE 16%, puis transférés sur membrane PVDF et révélés aux IgG antiubiquitine.

Trois informations peuvent être dégagées de cette expérience.

Premièrement, le protéasome 20S de la mousse dégrade les chaînes de polyubiquitine! Deuxièmement, la valeur de la constante d'affinité du substrat pour le protéasome ( $K_m$ ) est très difficile à déterminer. En effet, au cours du temps, le protéasome se trouve en présence de chaînes de longueurs et de concentrations variables. Toutefois, nous avons estimé cette affinité du substrat pour le protéasome, de manière simple, en mesurant au cours du temps la diminution de l'intensité du signal d'une espèce de chaîne donnée. Cette mesure a été réalisée par analyse densitométrique à l'aide d'un système de mesure informatique. Globalement, les résultats montrent que les chaînes contenant plus de trois molécules d'ubiquitine sont plus rapidement dégradées (fig. 3.4.B). Troisièmement, la dégradation des chaînes n'est pas aléatoire mais séquentielle. Le protéasome de mousse dégrade les chaînes de polyubiquitine en libérant de façon systématique des monomères d'ubiquitine quelle que soit la longueur du substrat.

Au vu de ces résultats, on peut se demander si les molécules d'ubiquitine relâchées sont fonctionnelles? Le protéasome de mousse a-t-il une véritable activité isopeptidasique? Peut-on également lui attribuer un rôle dans le recyclage des molécules d'ubiquitine tel qu'on le pense pour le protéasome 26S ?

L'ubiquitine obtenue lors des dégradations précédentes est purifiée, puis utilisée comme substrat dans un même type de réaction que celle réalisée pour la synthèse des chaînes de polyubiquitine. La formation de nouvelles chaînes d'ubiquitine branchées démontre la parfaite fonctionnalité des molécules d'ubiquitine libérées par le protéasome de *P. patens* (fig. 3.4.C). Nous pouvons donc attribuer au protéasome une activité isopeptidasique, clivant la liaison qui relie l'extrémité carboxy-terminale de la gly76 d'une molécule d'ubiquitine au groupe amino de la lys48 de l'ubiquitine voisine. Les molécules relâchées peuvent être recyclées! Ce résultat peut être surprenant puisque l'on montre, pour la première fois, qu'une activité isopeptidasique est associée à un protéasome 20S! Malgré une purification très poussée, on peut se demander si cette activité est due à la présence d'un contaminant dans notre préparation de protéasome?

#### ***Peut-on attribuer au protéasome 20S de mousse cette nouvelle activité enzymatique?***

Si cette nouvelle activité est due à un contaminant ou à des protéines qui n'interagissent pas directement avec la structure 20S, la dégradation des chaînes ne devrait en aucun cas perturber celle des peptides. Pour le savoir, nous avons mesuré les activités peptidasiques du protéasome de mousse que l'on a préalablement incubé avec des concentrations variables de chaînes d'ubiquitine (UBQ5).

Le fait qu'il y ait compétition entre ces deux familles de substrats démontre que ces différentes activités sont liées ou, du moins, placée dans la même structure. Au rapport équimolaire, la présence des chaînes provoque une forte inhibition des activités chymotrypsique et trypsique. Toutefois, au rapport de concentration UBQ5-protéasome inférieur à 0,5, les activités chymotrypsique et glutamylique augmentent légèrement, puis chutent. Lorsque la concentration en chaînes augmente (>1), l'activité chymotrypsique

diminue fortement, l'activité trypsique à tendance à augmenter légèrement, et l'activité glutamylque augmente régulièrement pour dépasser sa valeur initiale. Ainsi, les chaînes d'ubiquitine ne se comportent pas comme de simples inhibiteurs en bloquant, par exemple, mécaniquement les sites catalytiques responsables des activités peptidasiques (au rapport 1:1), mais semblent agir comme des effecteurs allostériques qui modulent différemment, suivant les concentrations, ces mêmes activités.

***Peut-on attribuer l'activité de dégradation des chaînes de polyubiquitine aux sites catalytiques situés au niveau des anneaux  $\beta$ ?***

Les sous-unités  $\beta$  sont responsables de l'activité de dégradation des peptides. Si ces mêmes sous-unités possédaient les sites catalysant l'hydrolyse des chaînes de polyubiquitine, celles-ci devraient donc pénétrer dans la structure 20S du protéasome pour y être dégradées. De ce fait, l'accès à d'autres molécules durant ce processus, notamment des peptides, ne serait pas possible mécaniquement parlant. Or, nous n'obtenons pas une inhibition complète des activités peptidasiques même avec un grand excès de chaînes d'ubiquitine. Toutefois, en admettant que la dégradation des chaînes d'ubiquitine n'ait pas lieu au niveau des sous-unités  $\beta$ , deux possibilités se présentent:

a) les chaînes sont dégradées par une ou plusieurs sous-unités  $\alpha$ . Bien qu'en général celles-ci ne manifestent aucune activité, cette possibilité est envisageable, puisque récemment, des chercheurs ont isolé une sous-unité  $\alpha$  du protéasome 20S humain, la zêta, qui aurait une activité RNAsique (Pouch et al., 1995) (Petit et al., 1997).

b) les chaînes sont dégradées par une ou des protéines associées spécifiquement au protéasome 20S.

**Il n'est pas possible de démontrer simplement la première possibilité car il faudrait connaître les séquences de ces sous-unités, procéder à des mutations, utiliser d'éventuels inhibiteurs spécifiques, etc. Toutefois, nous avons pu démontrer la seconde éventualité.**

Nous avons analysé les fractions obtenues lors des deux dernières étapes de purification, de façon à déterminer s'il y avait une corrélation parfaite entre l'activité de dégradation des chaînes et la présence de protéasome (fig. 3.5.). A l'avant-dernière étape, où les protéines sont séparées selon leur taille (fig. 3.6.A,B), on constate une parfaite corrélation entre le pic d'élution du protéasome à env. 700 kDa. et la dégradation des chaînes d'ubiquitine (UBQ3). Pourtant, à la dernière étape de purification, les résultats montrent que les protéines que nous avons séparées sur colonne échangeuse d'anions MonoQ (frac.A) confèrent au protéasome de *P. patens* son activité isopeptidasique. Celle-ci est présente dans les pics A et B (fig. 3.6.C,D,E).

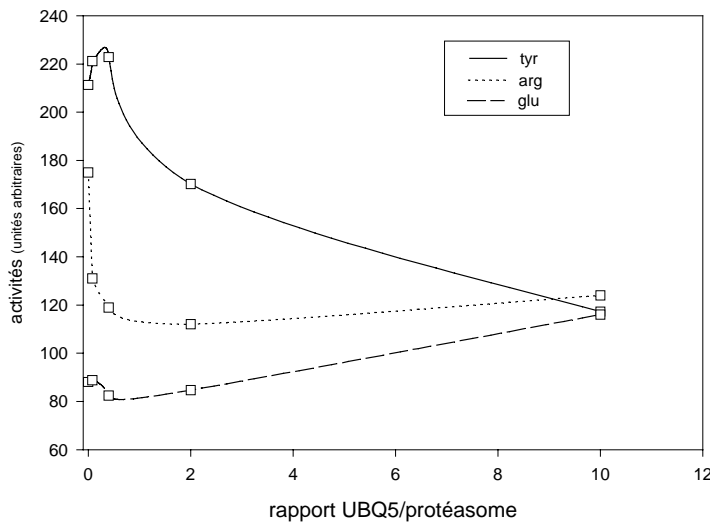


Fig. 3.5. Evolution des différentes activités spécifiques du protéasome sur les peptides en fonction du rapport chaînes d'ubiquitine/protéasome. Les valeurs de l'abscisse indique le rapport du nombre de molécules des deux espèces de protéine en présence.

De ces expériences, nous pouvons tirer trois conclusions.

- a) La dégradation des chaînes de polyubiquitine chez *P. patens* est catalysée par des protéines associées **spécifiquement** au protéasome de mousse. Si cela n'avait pas été le cas, celles-ci auraient été perdues lors de la séparation sur tamis moléculaire HPLC. Or, cette activité de dégradation ne se trouve localisée que dans les fractions du protéasome (haut poids moléculaire) et ne constitue pas un contaminant. Ce qui confirme l'expérience de compétition précédente.
- b) Le fait que des protéines associées au protéasome 20S de mousse soient responsables de ce type d'activité, peut expliquer la raison pour laquelle il n'y a pas d'inhibition complète de la dégradation des peptides puisque cette activité isopeptidasique n'intervient pas au centre de la structure. Celle-ci n'empêche pas par conséquent l'hydrolyse des peptides notamment lors d'un excès de chaînes d'ubiquitine.
- c) Ces protéines associées interviennent également dans la régulation de la dégradation des peptides par le protéasome, puisqu'elles modulent ces activités en fonction de la concentration des chaînes d'ubiquitine.

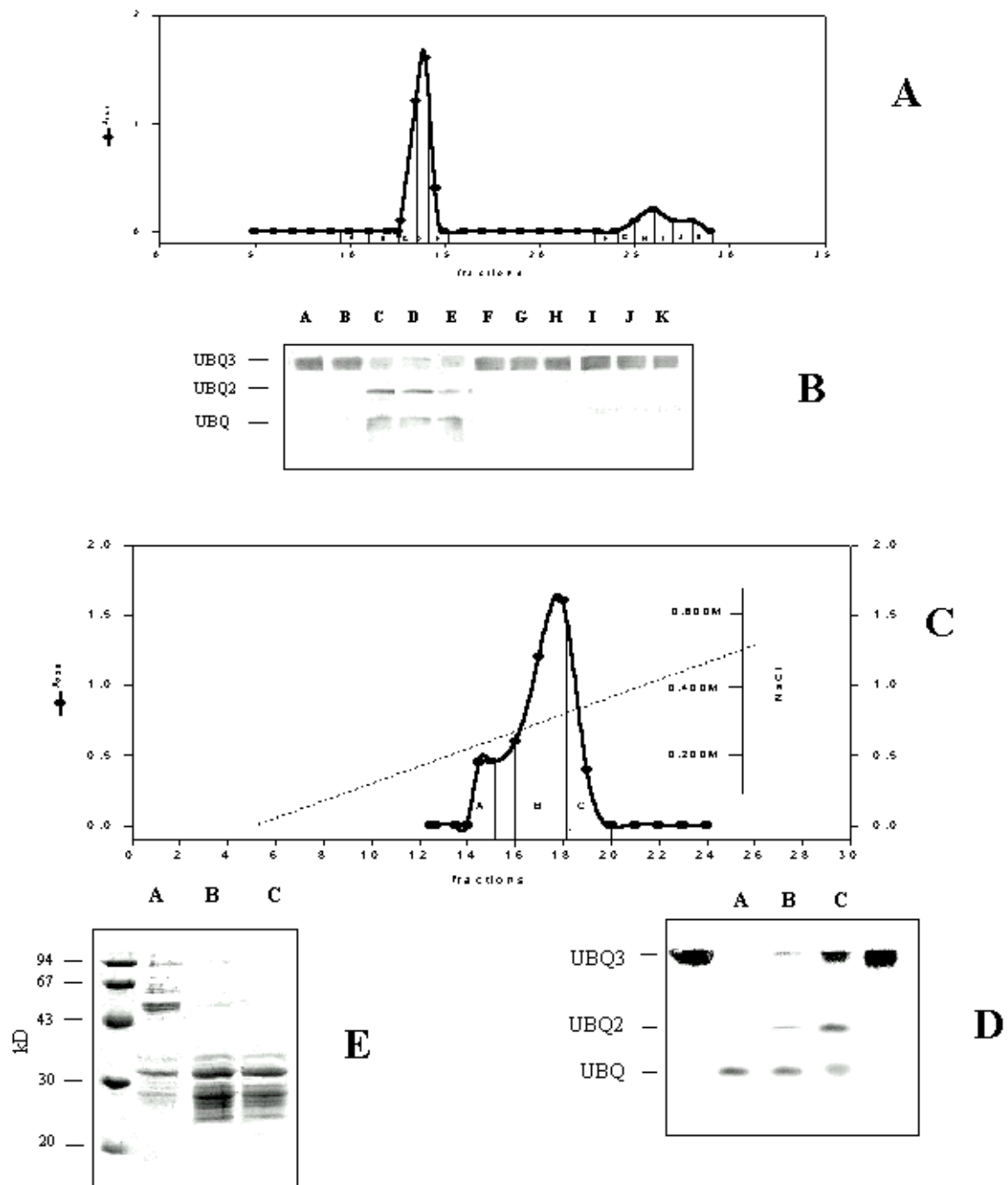


Fig. 3.6. **Isolation de l'activité isopeptidasique associée au protéasome de *P. patens*.** Chromatogrammes obtenus lors des deux dernières étapes de purification du protéasome **A**) tamis moléculaire **C**) colonne échangeuse d'anions MonoQ. Mesures des activités isopeptidasiques des fractions obtenues en **A**) et **C**) présentées respectivement en **B**) et **D**). Un aliquot de ces fractions est incubé avec des chaînes comportant trois molécules d'ubiquitine(UBQ3). Les réactions sont séparées sur gel d'électrophorèse 16%, transféré sur membrane PVDF et révélé aux anticorps antiubiquitine. **E**) analyse, sur gel d'électrophorèse 14% coloré au bleu de Coomassie, des fractions A,B et C de l'échangeuse d'anion MonoQ. UBQ $n$ : chaînes d'ubiquitine comportant  $n$  monomères d'ubiquitine.



### 3.3 ASSOCIATION DES CHAÎNES DE POLYUBIQUITINE AVEC LE PROTÉASOME.

Cette nouvelle propriété du protéasome de mousse pose la question de savoir s'il existe un complexe protéasome-chaînes d'ubiquitine durant le processus de dégradation?

Nous avons une preuve biochimique de l'existence d'une interaction entre notre préparation de protéasome purifié de mousse et des chaînes d'ubiquitine. De ce fait, la possibilité d'obtenir un complexe protéasome-chaîne d'ubiquitine nous fournirait la preuve biophysique d'une relation directe entre ces deux protéines. L'étude plus fine de ce complexe peut nous donner des informations sur le mécanisme du processus de reconnaissance et de dégradation des chaînes. Pour démontrer une telle association, il s'agit en quelque sorte, de figer et de visualiser le complexe. Nous avons porté un effort particulier sur l'utilisation de *cross-linker* permettant de fixer l'association de deux ou de plusieurs protéines interagissant entre elles. Les *cross-linker* sont des molécules chimiques de longueur variable, possédant à leurs extrémités des groupements fonctionnels réactifs leur permettant de se lier à des groupements fonctionnels libres (-NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH) dans des conditions de réactions bien précises (température, pH). Il s'agit donc, dans leur utilisation de satisfaire à trois critères principaux:

- a) obtenir des conditions de réactions qui permettent non seulement au *cross-linker* de se lier aux protéines, mais également au complexe de se stabiliser.
- b) que les groupements fonctionnels libres des protéines à associer soient spécifiques au *cross-linker* utilisé.
- c) que ces mêmes groupements soient disponibles aux distances correspondant à la longueur du *cross-linker* utilisé.

Nous avons constaté que l'utilisation de tels réactifs reste empirique même si les protéines mises en jeu sont parfois bien caractérisées.

Les *cross-linker* que nous avons utilisés offraient la possibilité, une fois liés de façon covalente aux protéines, de pouvoir être clivés. Le but étant d'identifier les protéines interagissant avec les chaînes de polyubiquitine. Aucun résultat significatif n'a pu être obtenu avec un certain nombre de *cross-linker* du commerce. Certes, nous ne les avons pas tous essayés. Seule la glutaraldéhyde, utilisée couramment dans la fixation des cellules ou des tissus, a donné de bons résultats (Azem et al., 1995). En effet, la structure du protéasome fixé à la glutaraldéhyde, reste intacte après traitement au SDS 1%. Cela s'est vérifié après analyse sur gel non dénaturant.

Dans un premier temps, nous avons incubé (1h) du protéasome (fraction D, fig.3.6.A) en présence de chaînes d'ubiquitine (UBQ5) dans des conditions de réaction identiques à celles utilisées lors de la dégradation. Le complexe est fixé de manière covalente avec de la glutaraldéhyde. Les complexes sont ensuite analysés sur gel non dénaturant, transférés sur membrane PVDF et finalement révélés aux anticorps antiubiquitine (fig.3.7.A). Dans ces conditions de réaction, il n'y a pas d'agrégation de protéasomes entre eux, ni de chaînes entre elles; les associations non-spécifiques sont évitées. Les anticorps antiubiquitine nous révèlent la présence d'ubiquitine au niveau du protéasome de mousse (flèche). Il s'établit donc un complexe protéasome-chaînes d'ubiquitine durant le processus de dégradation des chaînes. A ce stade, nous ne pouvons pas identifier les protéines interagissant avec les chaînes, puisque la glutaraldéhyde fixe de manière irréversible les polypeptides entre eux. Cette préparation

est visualisée en microscopie électronique (fig.3.7.B) où l'on distingue (flèches) des protéasomes vus de dessus bouchés, parmi d'autres qui ne le sont pas (centre clair). Toutefois, nous avons tenté de répéter les expériences de van Nocker et Deveraux qui ont permis de mettre en évidence la sous-unité MCB1 ou S5a du protéasome humain, qui possède la propriété de s'associer avec les chaînes de polyubiquitine (van Nocker et al., 1996) (Deveraux et al., 1994).

Pour ce faire, nous avons également séparé une préparation de protéasome 20S de mousse sur gel en deux dimensions, puis transféré (sans SDS) celui-ci sur membrane de nitrocellulose que l'on incube avec un mélange de chaînes d'ubiquitine. Celles-ci sont ensuite éliminées, sans lavage. La glutaraldéhyde est ajoutée comme fixateur. Le *western blot* est révélé aux anticorps antiubiquitine (fig. 3.7.D). En parallèle et comme contrôle, la même expérience est effectuée, sans les chaînes. Après avoir répété l'expérience plusieurs fois, nous n'obtenons qu'un signal faible malgré un temps de développement très long (30 minutes). La sous-unité révélée (Pp1) est un  $\alpha$  si l'on se réfère à l'expérience de dissociation effectuée dans le chapitre 2 (fig.2.18.) Le signal que nous obtenons est faible. Cela est peut-être dû, soit au transfert sur nitrocellulose où la renaturation des protéines est incomplète et empêche une interaction optimale, soit à un problème de reconnaissance en lui-même qui nécessite la coopération de plusieurs sous-unités, contexte obtenu uniquement dans l'expérience d'association *in vitro* réalisée plus haut.

On ne peut pas non plus affirmer que cette association a lieu *in vivo*. Les domaines engagés dans cette reconnaissance peuvent être, une fois la sous-unité placée dans la structure 20S, soit masqués, soit inaccessibles pour les chaînes de polyubiquitine

L'acidité relative de cette sous-unité (pI:5,0), face à la basicité des chaînes, pourrait expliquer une éventuelle interaction non-spécifique. Seule une caractérisation plus poussée de cette sous-unité nous permettra de préciser son rôle *in vivo*, s'il existe, dans le processus de dégradation des chaînes de polyubiquitine. A la différence des expériences de Van Nocker et Vierstra, nous ne pouvons pas déterminer quelles sont les chaînes qui se lient préférentiellement à la sous-unité  $\alpha$  puisqu'on ne peut les éluer de la membrane une fois fixées.

### 3.4 DISCUSSION

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, une activité isopeptidasique envers des chaînes de polyubiquitine, étroitement associée avec un protéasome 20S eucaryotique. Cette activité libre des molécules d'ubiquitine fonctionnelles.

#### ***Dans quels mécanismes est impliquée cette activité de dégradation des chaînes de polyubiquitine associée au protéasome 20S de P. patens?***

Nous avons tenté de purifier les protéines responsables de l'activité isopeptidasique, en déposant la fraction A de l'échangeuse d'anion (fig. 3.6.E), où l'activité de dégradation des chaînes est maximale, sur colonne d'affinité. Celle-ci comporte des molécules d'ubiquitine fixées de manière covalente sur sa matrice (Affigel). Cette méthode de purification est utilisée dans l'isolation d'autres isopeptidasases (l'isopeptidase T à partir de la fraction II de réticulocytes de lapin) (Falquet et al., 1995; Wilkinson et al., 1995). Nous n'avons jamais pu récupérer l'activité à la sortie de la colonne! Ces résultats nous incitent à croire que ces protéines, une fois dissociées du protéasome 20S, perdent leur activité spécifique. Le protéasome stabilise probablement cette activité. Cette stabilité éviterait qu'une hydrolyse des

chaînes d'ubiquitine n'intervienne hors du processus de dégradation des protéines ubiquitinées. Autrement dit, elle interdirait la désubiquitination avant la dégradation des conjugués. La plupart des isopeptidases connues jusqu'ici possèdent dans leur site catalytique une cystéine (Wilkinson, 1997). Nous avons tenté de bloquer cette activité au moyen de N-méthylmaléimide (un réactif se liant par une liaison covalente au groupe sulfhydryle de la cystéine). L'activité n'a pas été inhibée. Ce qui indique que cette ou ces isopeptidases sont atypiques par rapport à celles qui sont déjà isolées. Cette atypie se retrouve au niveau des activités peptidasiques propres au protéasome 20S (trypsique, chymotrypsique, V8-protéase), puisqu'on ne peut les bloquer avec des inhibiteurs classiques agissant sur des catégories de protéases ayant la même fonction.

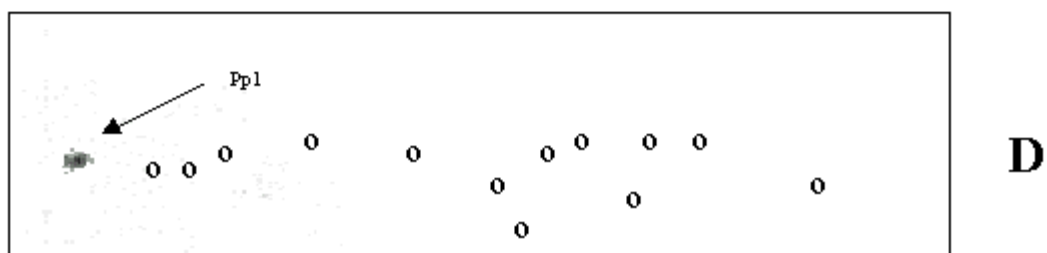
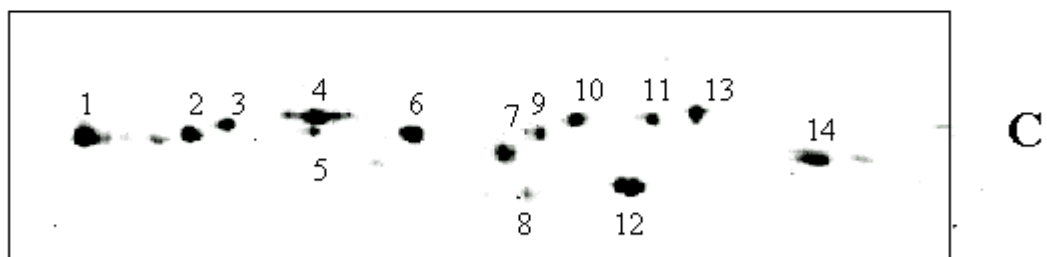
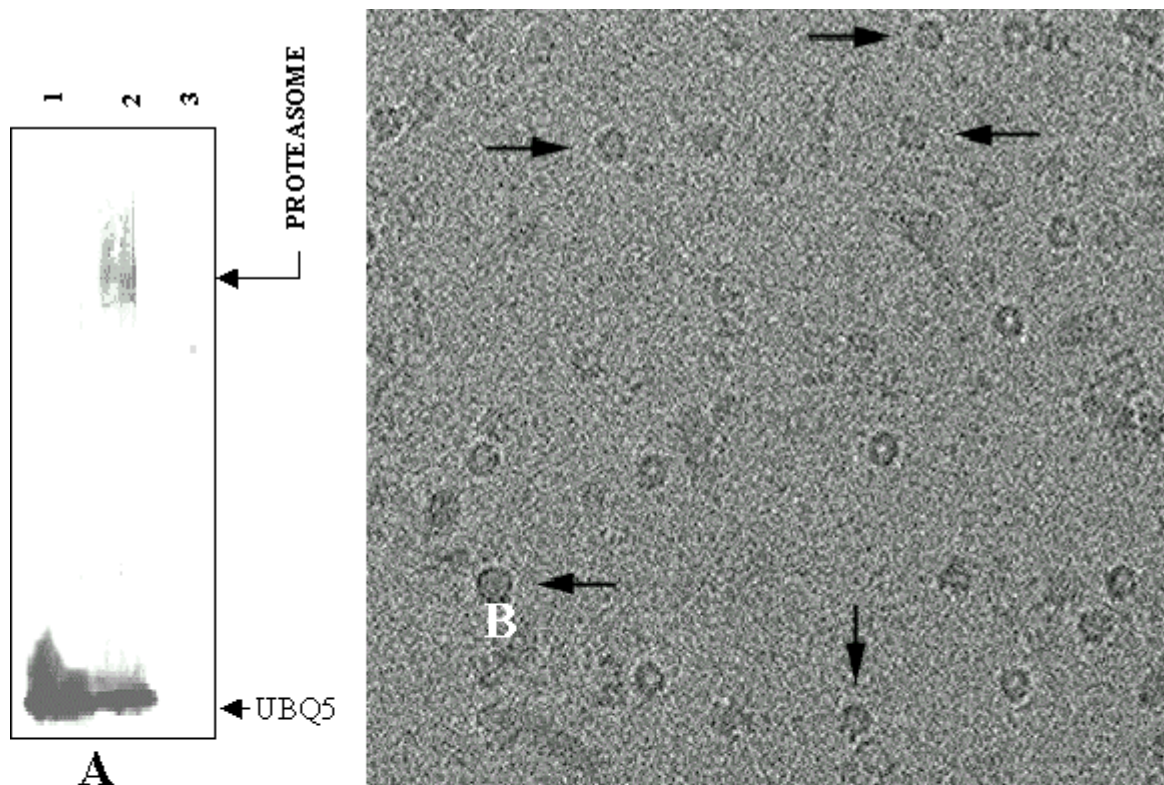


Fig. 3.7 **A) Mise en évidence d'un complexe protéasome-chaînes d'ubiquitine (UBQ5).** Différentes préparations sont fixées à la glutaraldéhyde et séparées sur gel non dénaturant 4%, 1) chaînes d'ubiquitine seules (UBQ5), 2) protéasome + chaînes d'ubiquitine (UBQ5), 3) protéasome seul. Le gel est ensuite transféré sur membrane PVDF et révéillé aux anticorps antiubiquitine. Les positions du protéasome seul et des chaînes de polyubiquitine (UBQ5) sont indiquées.

**B) Micrographie** d'une préparation de protéasomes de *P. patens* contenant des complexes protéasome-chaîne d'ubiquitine fixés à la glutaraldéhyde. Les flèches indiquent les protéasomes associés avec des chaînes d'ubiquitine.

**D) Association de la sous-unité Pp1 de *P. patens* avec des chaînes de polyubiquitine.** Western blot d'un gel 2D de protéasome de mousse transféré sur nitrocellulose puis incubé avec un mélange de chaînes de polyubiquitine, fixé à la glutaraldéhyde et révéillé aux anticorps antiubiquitine.

C) gel 2D de protéasome de *P. patens* coloré au bleu de Coomassie.

Du point de vue de la structure, le protéasome que nous avons purifié présente en microscopie électronique une structure quaternaire semblable à celles des protéasomes d'autres eucaryotes (Schliephacke et al., 1991; Groll et al., 1997; Kopp et al., 1997)). Les protéines associées au protéasome 20S et responsables de l'activité isopeptidasique ne sont pourtant pas visibles. Probablement, parce que les protéines encore associées aux protéasomes sont dissociées lors de la préparation de l'échantillon, du fait de leur instabilité relative.

Ces protéines associées ne peuvent pas non plus constituer un complexe de grande taille tel un complexe PA700 puisque la masse moléculaire relative de la préparation de protéasome sur tamis moléculaire ne dépasse pas les 700 kDa. Le gradient de glycérol nous a également confirmé qu'il n'y a pas de structure à haut poids moléculaire associé au protéasome. En effet, une préparation de protéasome pur migre à la même position que le protéasome séparé d'un extrait brut de *P. patens*. Les protéines associées au protéasome 20S de *P. patens* ne constituent donc pas une structure 26S. Toutefois, elles confèrent au protéasome de *P. patens* la capacité de reconnaître des chaînes de polyubiquitine et de les dégrader. Le fait de ne pas disposer de substrats ubiquitinés non artificiels, ne nous permet pas de savoir si notre préparation de protéasome peut dégrader ces conjugués.

Plusieurs isopeptidases impliquées dans l'élimination et/ou le recyclage des chaînes de polyubiquitine ont été caractérisées.

a) Les isopeptidases T et Ubp14, deux protéines homologues, qui désassemblent les chaînes d'ubiquitine libres en libérant des monomères d'ubiquitine à partir de l'extrémité proximale (extrémité C-terminale) (Wilkinson et al., 1995; Amerik et al., 1997). Ubp14, en éliminant ces chaînes libres, éviterait qu'elles n'entrent en compétition avec les substrats ubiquitinés destinés à être dégradés par le protéasome 26S. Alors que les mutants du gène *ubp14* provoquent une accumulation de chaînes d'ubiquitine libres, la surexpression de celui-ci inhibe la dégradation de certains conjugués ubiquitinés! Cela peut sembler contradictoire, mais peut nous suggérer la façon dont les chaînes de polyubiquitine sont conjuguées sur la protéine cible. En effet, ce résultat indique que les chaînes d'ubiquitine pourraient être transférées directement sur le substrat plutôt que d'être assemblées par addition séquentielle de molécules d'ubiquitine. Si celles-ci sont assemblées avant d'être liées au substrat, on peut comprendre que ce dernier ne puisse être dégradé puisque la surexpression de l'isopeptidase hydrolyserait les chaînes présynthétisées.

b) L'enzyme DOA4, qui libère les peptides des chaînes auxquelles ils sont liés (activité de débranchement) (Papa et Hochstrasser, 1993). Cette hydrolase semble fonctionner en

coordination avec le protéasome 26S, sans que l'on ait démontré une véritable association avec celui-ci.

c) Une isopeptidase, associée spécifiquement au PA700, hydrolyse la liaison isopeptidique reliant deux molécules d'ubiquitine depuis l'extrémité distale de la chaîne (extrémité N-terminale) (Lam et al., 1997). Son rôle serait de sauver sélectivement de la dégradation des protéines faiblement ubiquitinées ou dégradées lentement.

A ce stade, si l'on veut définir le rôle exact de l'isopeptidase liée au protéasome de *P. patens*, par rapport à celles que nous venons de citer, plusieurs expériences sont à effectuer en plus de celle de la dégradation des conjugués ubiquitinés.

Nous savons que cette isopeptidase est probablement de taille moyenne, et qu'elle dégrade de manière séquentielle les chaînes de polyubiquitine en libérant des monomères d'ubiquitine actifs. Ce processus opère-t-il à partir de l'extrémité distale (extrémité N-terminale) ou proximale (extrémité C-terminale) de la chaîne? La réponse à cette question nous permettrait de savoir si cette activité agit sur des chaînes libres, liées, ou les deux. Pour répondre cette question, il s'agirait, par exemple, de synthétiser des chaînes de polyubiquitine comportant à leurs extrémités proximales une ubiquitine marquée au  $^{125}\text{I}$ , puis d'étudier la cinétique de dégradation par séparation sur HPLC MonoQ des molécules d'ubiquitine relâchées. L'apparition de la radioactivité au cours de cette cinétique permettra de déterminer le sens de dégradation des chaînes de polyubiquitine (Lam et al., 1997). L'utilisation de lysozyme multi-ubiquitiné et marqué au  $^{125}\text{I}$  nous fournirait l'information clé, à savoir si notre préparation de protéasome peut dégrader un conjugué ubiquitiné artificiel!

De même, nous n'avons pas encore isolé ni identifié spécifiquement les protéines responsables de la reconnaissance ou de la dégradation des chaînes de polyubiquitine lors nos essais de *cross-linking*. Il nous reste, entre autres, la possibilité de séquencer les protéines majeures de taille supérieure à 30 kDa isolées dans la fraction A de la colonne échangeuse d'anions, puis de les caractériser individuellement. Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques marqués au  $^{125}\text{I}$ , dérivés de l'ubiquitine, et se liant de manière covalente à l'isopeptidase serait une alternative élégante. En effet, une fois l'inhibiteur lié à la protéine, une analyse par gel en deux dimensions nous permettrait une identification des protéines impliquées dans le processus de dégradation.

***Suffit-il, pour une isopeptidase, de reconnaître les extrémités distales ou proximales des chaînes pour les dégrader de manière séquentielle? Peut-on imaginer un autre scénario?***

Comment une protéine de petite taille, associée à un complexe, peut-elle se positionner sur la chaîne d'ubiquitine de façon à ne pas hydrolyser aléatoirement cette même chaîne? Y a-t-il un système de mesure en quelque sorte, qui permette un ajustement du site catalytique sur la première liaison branchée de la chaîne de polyubiquitine? En fait, la seule "règle" moléculaire de grande taille est constituée par le protéasome lui-même.

Peut-on imaginer que les molécules d'ubiquitine entrent dans le trou central du protéasome, par une force d'entraînement, en quelque sorte, puis sont clivées à leur sortie au fur et à mesure que la liaison peptidique se présente? Cette solution serait élégante parce qu'elle pourrait expliquer cette dégradation séquentielle; l'hydrolyse ne pouvant intervenir aléatoirement. Les protéines ou peptides seraient quant à eux entraînés par ces mêmes chaînes dans le protéasome 20S et clivés à leur tour. De plus, curieusement, nous avons constaté que

les chaînes de polyubiquitine de plus de trois molécules d'ubiquitine étaient plus rapidement dégradées. Une chaîne linéaire de 4 molécules d'ubiquitine mesure environ 100 Å (résultat obtenu avec le programme de modélisation SYBYL), ce qui correspond approximativement à la longueur du protéasome 20S. Y a-t-il une relation fonctionnelle entre les dimensions des chaînes et celles du protéasome?

Comment se fait-il alors que les chaînes d'ubiquitine n'aient pas bloqué toutes les activités peptidasiques du protéasome lors de l'expérience de compétition? C'est sans doute, que nous avons effectué ces essais sur des préparations de protéasomes partiellement débarrassées des protéines responsables de la dégradation des chaînes.

Au chapitre 2 (discussion), nous avons déclaré qu'à notre sens, le protéasome possédait une polarité fonctionnelle, il n'est donc pas exclu que les protéines que nous avons séparées sur colonne échangeuse d'anions (fig.3.6.E) se distribuent aux deux extrémités du protéasome. Elles interviendraient dans un processus d'entraînement unidirectionnel empêchant, par ailleurs, un conflit mécanique de substrats pénétrant par les deux pôles du protéasome.

Bien entendu, quelques expériences importantes sont nécessaires pour étayer une telle théorie. Notamment, il s'agirait de démontrer que la conformation d'une molécule de polyubiquitine rendra possible son passage au travers de la structure du protéasome 20S. Toutefois, si les chaînes de polyubiquitine devaient traverser la structure pour être hydrolysées lors de notre expérience de compétition protéasome-chaînes d'ubiquitine, on imagine difficilement de quelle façon les peptides pourraient être clivés. Cette hypothèse n'est donc pas en accord avec nos résultats expérimentaux (voir page 63; expérience de compétition chaînes-protéasome) et doit être abandonnée.

Quelques expériences troublantes exécutées par Chen et Hochstrasser (1995) laissent croire que le protéasome 20S participerait activement à la dégradation des conjugués ubiquitinés, sans parler, bien entendu, de son rôle dans la dégradation des peptides.

En effet, Chen et al. (1995) ont procédé à la mutation d'une sous-unité  $\beta$  du protéasome de la levure appelée Doa3, en remplaçant l'acide aminé ASP par ASN dans la "boîte GD". Cette mutation n'a pas perturbé la structure du protéasome 20S, seule l'activité chymotrypsique a fortement diminué. Le fait le plus marquant, et qui apparemment est laissée de côté par les auteurs, est que cette mutation provoque une accumulation des conjugués ubiquitinés, bien que la sous-unité Doa3 ( $\beta$ ) n'ait pas de relation de voisinage directe avec le 19S! Comment cela est-il possible? De même, la double mutation Ubp 14 et Doa3 provoque une accumulation plus élevée de conjugués que la mutation simple de Ubp 14 (Amerik et al., 1997). Que les protéines destinées à être dégradées ne le soient pas, du fait d'un blocage du substrat dans la structure 20S, nous pouvons le comprendre, mais que cela affecte les activités isopeptidasique ou *carboxy terminal hydrolase* impliquées dans le recyclage des chaînes, cela nous semble plus étonnant. En effet, ce dernier processus doit intervenir avant la pénétration du substrat dans la structure 20S. De plus, il ne doit pas y avoir de blocage du substrat dans le protéasome puisqu'il a été démontré que les autres activités ne sont que peu perturbées. En fait, seules les espèces de peptides générés par la protéolyse diffèrent.

Nos expériences de *cross-linking* ont mis en évidence l'existence d'un complexe protéasome-chaînes d'ubiquitine (UBQ5) (fig.3.7), confirmée par un essai de compétition chaînes-peptides. Plus spécifiquement, une sous-unité  $\alpha$  serait impliquée dans la fixation des chaînes de polyubiquitine.

***Peut-on concevoir qu'une sous-unité  $\alpha$  soit responsable de la fixation des chaînes de polyubiquitine? Y a-t-il d'autres protéines non impliquées dans la structure 19S qui pourraient s'associer spécifiquement à une ou plusieurs sous-unités  $\alpha$ ?***

Jusqu'ici, on considère que le rôle des sous-unités  $\alpha$  est de diriger l'assemblage de la structure 20S. Elles s'associent donc spécifiquement aux sous-unités  $\beta$  ainsi qu'à certaines sous-unités du 19S, notamment aux ATPases. Ces associations sont inhérentes au complexe dont elles font parties. Seule une de ces sous-unités possède un rôle actif dans la dégradation: la sous-unité ZETA, qui manifesterait une activité RNAsique (Petit et al., 1997). Il n'est donc pas exclu que d'autres sous-unités  $\alpha$  aient un rôle plus spécifique et plus actif dans la dégradation des conjugués ubiquitinés.

Deux protéines s'associant avec des sous-unités  $\alpha$  du protéasome 20S ont été isolées et caractérisées. Ces associations ont été mises en évidence par système double hybride, dans la levure.

a) La protéine virale Tax, qui est produite par les cellules T infectées par le virus leucémique HTLV-I, active, notamment, la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B12/R1. Elle se lie spécifiquement à deux sous-unités  $\alpha$  du protéasome 20S humain, HsN3 et HC9 (Rousset et al., 1996).

b) La protéine HBX, ou protéine X du virus de l'hépatite B, interagit avec la sous-unité  $\alpha$ , XAPC7, du protéasome humain (Huang et al., 1996).

Nous prétendons que le 26S est un artefact de préparation, ce que nous justifions notamment par la présence, inexplicable dans le complexe 19S, de protéines impliquées dans d'autres voies biochimiques. Le fait que d'autres protéines puissent interagir directement avec le protéasome 20S démontre sa plasticité et sa facilité, relative certes, à s'associer avec d'autres protéines essentielles. Ces constatations fortifient notre doute quant à l'existence d'une structure 26S telle que la plupart des chercheurs la conçoivent aujourd'hui.

***Qu'en est-il de la sous-unité Pp1 de *P. patens*?***

A ce stade, nous ne pouvons pas affirmer que cette sous-unité soit responsable de la fixation des chaînes. Il se peut que l'association que nous avons mise en évidence soit un artefact, mais elle peut aussi s'inscrire dans un processus cohérent de dégradation des conjugués ubiquitinés. Notamment, parce qu'il n'y pas chez la mousse de complexe tel le 19S qui masque les sous-unités  $\alpha$ , les empêchant ainsi d'interagir avec d'autres protéines. L'isolation et la caractérisation du gène codant pour cette sous-unité nous renseigneront sur sa fonction. Ce travail fait l'objet du chapitre suivant.

A ce jour, MCB1 (van Nocker et al., 1996) est la seule protéine connue possédant la propriété de se lier avec des chaînes d'ubiquitine et qui soit associée étroitement avec le complexe 19S de la levure, de la drosophile (P54) (Haracska et Udvardy, 1997) et de l'homme (S5a) (Deveraux et al., 1994). Cette protéine est présente en grande quantité chez la plupart des eucaryotes. La découverte de cette protéine semble pouvoir résoudre les problèmes posés par l'association et la sélectivité des substrats ubiquitinés, fonctions attribuées au 19S; certaines

observations récentes jettent un doute sur la validité du modèle actuel. En effet, la rupture du gène (*knock-out*) *mcb1* n'est pas létale chez la levure (van Nocker et al., 1997) ni chez *P. patens* comme le montrent les travaux effectués récemment Girod et al. (1998). Chez *P. patens*, la rupture du gène a provoqué une altération développementale: la disparition des gamétophores. De plus, on observe une accumulation de conjugués ubiquitinés aussi bien chez *P. patens* que chez la levure. Si MCB1 est une protéine clé dans la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine, son absence dans la cellule devrait conduire à la mort de l'organisme! Tel n'est pourtant pas le cas. Cette protéine possède un domaine (III) qui contient des résidus hydrophobes conservés et qui lui confère les propriétés de reconnaissance (Beal et al., 1996) ou d'association des chaînes de multi-ubiquitine (Fu et al., 1998). Si l'on substitue les résidus leucine et valine de ce domaine par des acides aminés glycine, on constate que les chaînes ne s'associent plus avec MCB1 alors que la dégradation des conjugués a toujours lieu.

Afin de caractériser cette protéine, une nouvelle expérience d'association chaînes d'ubiquitine-MCB1 (Deveraux et al., 1994) peut être tentée. Il s'agit de fixer séparément, cette fois-ci, de l'ubiquitine et des chaînes de longueurs différentes sur la membrane nitrocellulose, puis de l'incuber avec la protéine MCB1. Le but de ces essais étant de bien vérifier la sélectivité de reconnaissance de MCB1 envers les chaînes de longueurs variables. L'expérience originale de Deveraux et al. consistait à fixer MCB1 sur la membrane, puis à incuber un mélange de chaînes de tailles différentes. L'analyse des chaînes après élution de la membrane montre que MCB1 se lie efficacement avec des chaînes formées de plus de 3 molécules d'ubiquitine. Beal et al. (1996, 1998) démontreront plus tard que plus les chaînes sont longues, plus leur affinité pour MCB1 est forte. Les auteurs prétendent qu'il faut quatre molécules d'ubiquitine pour former ce qu'ils appellent un élément de reconnaissance. Pourtant, le fait de n'avoir qu'un seul site dominant de fixation (domaine III) (Fu et al., 1998) dans MCB1 ne correspond pas avec un modèle où la fixation implique des sites multiples dans MCB1, qui interagiraient avec des sites complémentaires formés par la répétition de monomère d'ubiquitine à l'intérieur de chaînes. On peut supposer que, si seules des chaînes formées de plus de trois molécules d'ubiquitine peuvent s'attacher à MCB1 lorsque celui-ci est fixé en premier sur la membrane (expérience de Deveraux et al.), cela n'est dû qu'au fait que la distance qui sépare une molécule de MCB1 d'une autre sur la membrane est de l'ordre d'une longueur de chaîne à quatre molécules d'ubiquitine. Les molécules les plus courtes ne pouvant se lier plus fortement. Il se pourrait donc que ce soit un effet de juxtaposition des sites de fixation de MCB1 qui détermine la longueur minimale des chaînes pouvant se fixer sur la membrane.

L'expérience que nous proposons plus haut permettrait d'infirmer ou de confirmer cette notion d'élément de reconnaissance. Si la protéine MCB1 n'a qu'un seul site d'attachement et que cette liaison est faible (domaine III) envers une chaîne de polyubiquitine, il est fort probable alors que nous constatons qu'il n'y a pas d'attachement spécifique de MCB1 envers des chaînes quelles que soient leurs longueurs (pas d'effet de juxtaposition). De plus, on constate que l'affinité du lysozyme ubiquitiné (substrat artificiel) est très forte envers la protéine S5a ou MCB1 isolée, alors qu'elle n'est que très faible pour le protéasome 26S (Deveraux et al., 1994), ce qui signifie que les sites de fixation de MCB1 pour les conjugués ubiquitinés sont masqués par la structure!

Au vu des arguments précédents, il n'y a pas corrélation entre la fonction que l'on attribue à MCB1 *in vitro* et celle qu'elle possède *in vivo*. Le rôle de MCB1 dans la cellule eucaryotique doit être éclairci!



Pour conclure, nous pouvons dire que les réactions responsables du métabolisme des chaînes de polyubiquitine ont pour rôle d'éviter que ces chaînes ne s'accumulent dans la cellule. Les isopeptidases, citées plus haut, ne peuvent éliminer les chaînes avant l'association du substrat avec le protéasome. L'activité isopeptidasique associée au protéasome 20S et stabilisée par ce dernier chez *P. patens* peut répondre à ces exigences. De même, s'il existe d'autres isopeptidases libres qui ont la possibilité de raccourcir ou d'enlever des chaînes sur des protéines conjuguées, on doit s'attendre à ce qu'elles subissent une régulation précise de sorte qu'une perte du signal de dégradation précédant l'élimination de la protéine cible soit évitée (Wilkinson et al., 1997).