

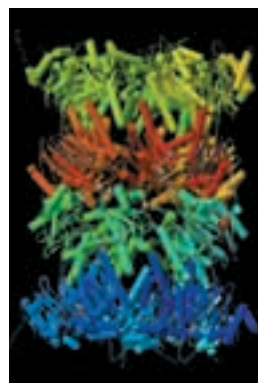
> Le protéasome est la principale machinerie protéolytique de la cellule. Il est impliqué dans toutes les grandes fonctions et décisions cellulaires. On a longtemps pensé que presque tous ses substrats devaient préalablement être ubiquitinylés. On a aussi longtemps considéré que l'ubiquitinylation et la dégradation étaient deux mécanismes découplés, et que le recrutement des conjugués ubiquitine s'effectuait directement par des sous-unités spécialisées du protéasome. La littérature récente remet en cause cette vue simplifiée. Elle suggère ainsi que la fraction des protéines hydrolysées par le protéasome, indépendamment de toute ubiquitinylation, a largement été sous-estimée, et que la reconnaissance des protéines ubiquitinylées fait intervenir des systèmes d'adressage complexes. Par ailleurs, elle indique un ordre d'organisation supérieur pour la voie ubiquitine/protéasome, une fraction du protéasome et des enzymes d'ubiquitinylation étant engagée dans des complexes supramoléculaires. Enfin, la dégradation protéasomique est altérée dans de nombreuses situations pathologiques. Elle constitue donc une cible thérapeutique dont les premières applications commencent à émerger. <

Le protéasome 20S est une protéinase multimérique possédant une chambre protéolytique interne autocompartimentée qui s'associe à des complexes régulateurs pour former des structures comme le protéasome 26S (Figure 1A et 1B). Retrouvé dans le cytoplasme et le noyau, il constitue la principale machinerie protéolytique intracellulaire. Il est responsable de l'élimination des protéines anormales, âgées ou en excès, dont l'accumulation serait toxique. Il assure aussi la production des peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH de classe I, la destruction contrôlée spatio-temporellement de nombreux régulateurs cellulaires ainsi que la maturation de différents précurseurs polypeptidiques.

La dégradation protéasomique

De l'adressage des protéines aux nouvelles perspectives thérapeutiques

Elisabetta Andermarcher, Guillaume Bossis, Rosa Farras, Isabelle Jariel-Encontre, Marc Piechaczyk



Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, IGMM, UMR 5535/IFR 22 CNRS, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 05, France.

marc.piechaczyk@igmm.cnrs.fr

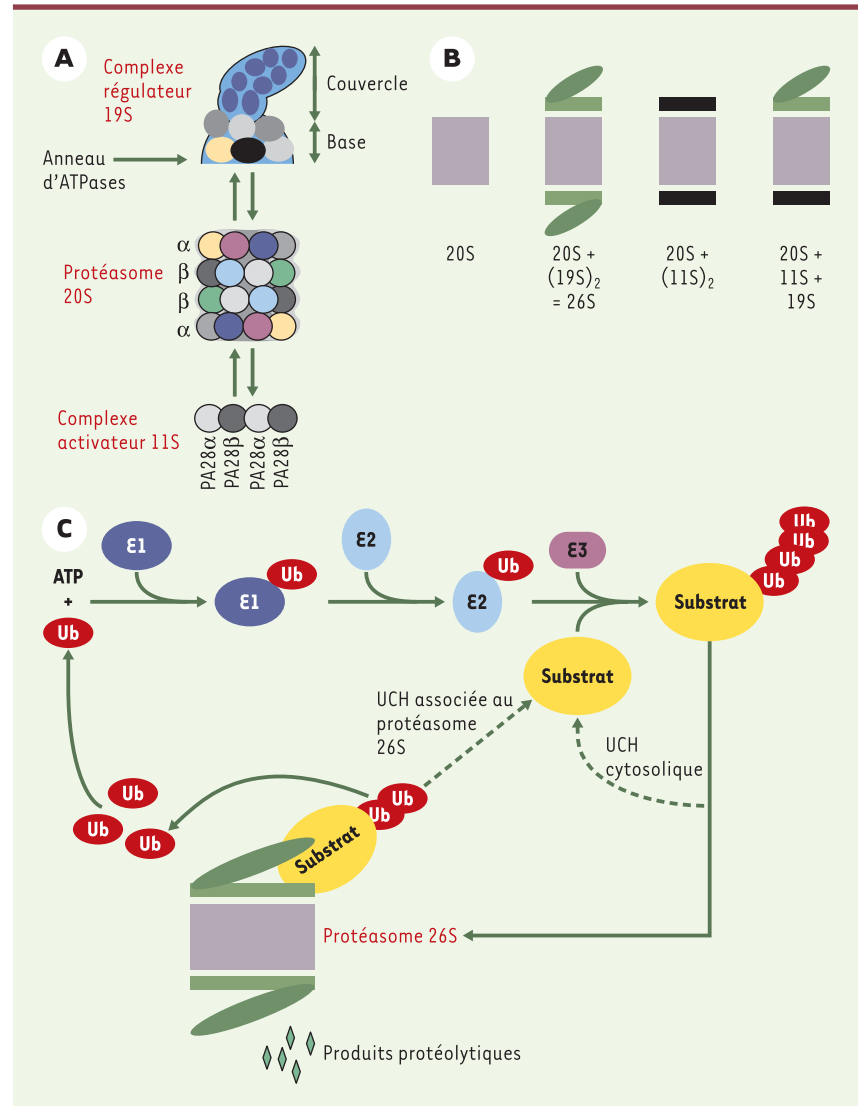
De ce fait, il est impliqué dans toutes les décisions cellulaires majeures comme la division, la différenciation, l'apoptose, l'intégration des signaux externes et la réponse immunitaire adaptative [1]. Il a longtemps été considéré que la dégradation protéasomique fonctionnait en deux temps disjoints. Dans une première phase, la plupart des substrats, sinon tous, devaient subir une modification post-traductionnelle particulière, la poly-ubiquitinylation. Celle-ci consiste en la conjugaison covalente de chaînes d'ubiquitine, une petite protéine conservée, ubiquitaire et abondante de 76 acides aminés (Figure 2). Cette importante découverte a d'ailleurs justifié l'attribution du prix Nobel 2004 de Chimie à Aaron Ciechanover, Avram Herschko et Irwin Rose (→). Ensuite, les protéines ubiquitinylées étaient reconnues par des sous-unités spécifiques du protéasome 26S, puis dés-ubiquitinylées, déstructurées et, enfin, hydrolysées. Cette vue s'est largement complexifiée ces dernières années. Il apparaît ainsi qu'une fraction des protéines, largement sous-estimée au départ, ne nécessite pas d'être ubiquitinylée pour être détruite par le protéasome [2-4]. Pour ce qui concerne les protéines ubiquitinylées, il est de plus en plus clair qu'elles

(→) m/s
2004, n° 12,
p. 1161

font intervenir des systèmes d'adressage parfois complexes. Par ailleurs, le protéasome n'est pas forcément une particule libre dans la cellule. Il peut être engagé dans des supercomplexes comprenant

aussi des enzymes d'ubiquitylation, des chaperons moléculaires et d'autres protéines ou structures nécessaires à la dégradation de substrats particuliers. Ajoutons à cela que, suivant les conditions, la même protéine peut être reconnue *via* des mécanismes différents. Un premier exemple est

Figure 1. Protéasomes et voie ubiquitine. **A.** Le protéasome 20S et ses complexes régulateurs. Le protéasome 20S est le cœur catalytique de la machinerie protéasomique. Il s'agit d'un cylindre creux formé de 4 anneaux : 2 anneaux identiques de 7 sous-unités de type α et 2 autres, également identiques entre eux, de 7 sous-unités de type β . Les activités protéolytiques sont situées à l'intérieur de la structure et sont portées par 3 des 7 sous-unités β . Les anneaux α assurent l'interaction avec les complexes régulateurs du protéasome 20S et permettent l'entrée des substrats dans la chambre catalytique grâce à leur orifice central. Le complexe activateur 19S participe à la dégradation des protéines ubiquitylées grâce à sa capacité à reconnaître les chaînes d'ubiquitine. Il possède un anneau d'ATPases chaperons participant à la déstructuration des substrats et, peut-être, à leur injection dans la cavité protéolytique, ainsi qu'une activité de dés-ubiquitylation (activité UCH, *ubiquitin C-terminal hydrolase*). Le complexe régulateur 11S est un anneau de 6 à 7 protéines de deux types différents : PA28 α (*proteasome activator*) et PA28 β . Il modifie les propriétés catalytiques du 20S, mais n'est pas capable de reconnaître des protéines ubiquitylées. **B.** Les différents types de protéasome. Le protéasome 20S, retrouvé en partie libre dans la cellule, peut également s'associer avec des complexes 19S et 11S à chacune de ses extrémités. La particule traditionnellement appelée protéasome 26S est composé



d'un 20S et de deux 19S. Les différentes particules sont présentes en quantités comparables dans les cellules mammifères. **C.** La voie ubiquitine/protéasome. L'ubiquitylation des protéines fait intervenir trois types d'enzyme. E1 (*ubiquitin-activating enzyme*) est unique. Elle active l'ubiquitine et la transfère sur des enzymes E2 (*ubiquitin-conjugating enzymes*), qui sont au nombre d'une trentaine chez les mammifères. Directement, ou avec l'aide de composants E3, elles transfèrent et polymérisent l'ubiquitine sur les substrats. Dans la majorité des cas, les facteurs E3, dont certains sont multimériques, forment un pont moléculaire entre E2 et le substrat. D'autres transfèrent eux-mêmes l'ubiquitine sur les protéines acceptrices. Les E3 assurent l'essentiel de la spécificité de la réaction grâce à leur grand nombre (plusieurs centaines de E3 différentes dans une cellule eucaryote), bien qu'il existe une certaine redondance dans le système. Ainsi, une même protéine peut être reconnue par différentes E3 et une même E3 peut reconnaître différents substrats. L'ubiquitylation est réglée par la signalisation intracellulaire *via* des modifications post-traductionnelles des substrats (phosphorylations, hydroxylation...) ou au travers de la modulation de l'activité des E3. Les protéines ubiquitylées peuvent être dés-ubiquitylées par des UCH cytosoliques et recyclées. Dans le cas contraire, elles sont reconnues par des protéasomes contenant un complexe régulateur 19S qui assure la dés-ubiquitylation, la déstructuration et l'acheminement vers la cavité protéolytique. Si elles sont insuffisamment ou improprement ubiquitylées, les protéines peuvent être recyclées grâce à une activité UCH portée par le complexe 19S lui-même. L'ubiquitine, qui est très stable, est réutilisée.

celui de la protéine oncosuppressive p53 qui peut être ubiquitinylée par différentes enzymes mais, parfois, être aussi reconnue par le protéasome indépendamment de toute ubiquitinylation [5].

L'ubiquitinylation des protéines a déjà été décrite dans ces colonnes [6, 7]. Notre vue des mécanismes impliqués n'a pas changé substantiellement depuis. Ces derniers (Figure 1C) ne seront donc pas redétaillés ici. Pour plus d'information, le lecteur pourra se reporter à des revues exhaustives [1, 8]. Nous ne considérons ci-dessous que les points qui ont le plus modifié notre perception de la dégradation protéasomique dans le passé le plus récent.

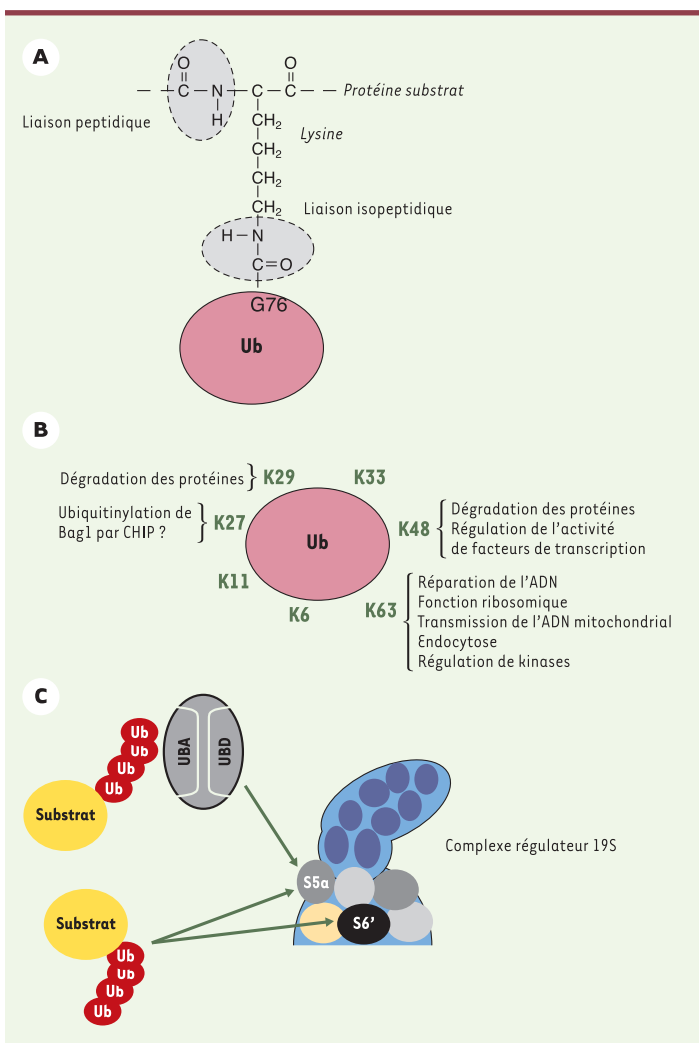
L'ubiquitine

Les différents types de chaînes d'ubiquitine

L'ubiquitine est conjuguée à ses substrats *via* une liaison isopeptidique (Figure 2A) entre son extrémité carboxyterminale et le ϵ -NH₂ de lysines acceptrices. Elle possède, elle-même, 7 lysines (K6, -11, -27,

-29, -33, -48, -63) qui, chacune, permettent son autopolymérisation (Figure 2B). Les différents types de branchement confèrent une très grande richesse topologique aux chaînes d'ubiquitine, ce qui, vraisemblablement, permet l'adaptation à une grande variété de structures interactives. De fait, les différentes chaînes ont été impliquées dans des processus divers, non nécessairement liés à la destruction protéique [9-11]. Les plus représentées dans la cellule sont, de loin, les chaînes K48. Ce sont essentiellement elles qui sont impliquées dans le marquage des protéines à dégrader. Les chaînes K29, et peut-être K63, y contribuent probablement aussi, mais à un degré moindre. Soulignant la complexité du système, notons que les chaînes K48 peuvent aussi régler des fonctions non protéolytiques. Par ailleurs, comme nous le verrons plus loin, des chaînes non-K48 peuvent contrôler indi-

Figure 2. Les différentes chaînes d'ubiquitine. **A.** La liaison isopeptidique. L'ubiquitine est conjuguée sur ses substrats *via* une liaison isopeptidique entre son extrémité carboxyterminale et le groupement ϵ -NH₂ des lysines acceptrices de ces derniers. Il s'agit d'une liaison amide, comme la liaison peptidique qui relie les acides aminés d'une même protéine entre eux. Dans certains cas, rares jusqu'à présent, l'ubiquitine peut se conjuguer *via* une liaison peptidique classique entre son extrémité carboxy-



terminale et le NH₂ terminal de la protéine acceptrice. **B.** Les chaînes d'ubiquitine. Les 7 lysines permettent la conjugaison de l'ubiquitine sur elle-même *in vivo*. Le rôle biologique des différentes chaînes n'est pas encore établi. Les chaînes K48 sont les plus mises en évidence, car elles servent à la dégradation des protéines. Elles sont toutefois également impliquées dans la régulation de l'activité de facteurs de transcription. L'existence de chaînes comportant des liaisons mixtes reste à caractériser. La longueur des chaînes est probablement un paramètre important pour leur action. Par exemple, des dimères d'ubiquitine couplés *via* la lysine 63 règlent l'endocytose de certains récepteurs membranaires, tandis que des chaînes plus longues modulent des activités kinases. **C.** Reconnaissance des substrats ubiquitinylés par le protéasome. Les substrats ubiquitinylés peuvent interagir directement ou indirectement avec le protéasome. Les chaînes d'ubiquitine peuvent ainsi reconnaître les sous-unités S5 α et S6' du complexe régulateur 19S. S6' est l'une des ATPases de l'anneau de chaperons au contact du 20S. S5 α occupe, quant à elle, une position intermédiaire entre la base et le couvercle du 19S. Cette protéine est reconnue par les protéines navettes à UBD (domaine ubiquitin-like) et UBA (domaine se liant à l'ubiquitine) comme Rad23. L'ensemble des interactions des protéines à domaines UBD et UBA avec le protéasome 26S doit encore être précisé. CHIP: *carboxy terminus of Hsp70-interacting protein*; Bag1: *Bcl2-associated athanogene*.

rectement la reconnaissance des substrats à dégrader par le protéasome. Un enjeu majeur est de comprendre, au niveau moléculaire, ce qui détermine la nature des chaînes d'ubiquitine polymérisées sur les différents substrats et les interactions des différents types de chaînes avec les protéines cellulaires effectrices.

L'ubiquitine : au centre d'un réseau d'interactions protéines/protéines

Une notion récente importante est que l'ubiquitine, comme d'autres motifs structurellement reliés, sont des pièces essentielles dans un réseau complexe et dynamique d'interactions protéines/protéines au sein de la cellule. Du fait de l'implication de l'ubiquitine dans de nombreuses voies de signalisation [1, 9-11], ce « maillage » moléculaire ne concerne pas seulement la dégradation des protéines. Deux types de domaines se liant à l'ubiquitine, UBA (*ubiquitin-associated domain*) et UIM (*ubiquitin-interacting motif*), et deux autres, *ubiquitin-like*, UBD (*ubiquitin domain*) et UBX [12], sont retrouvés dans de nombreux polypeptides (Tableau I). De façon intéressante, une même protéine peut posséder deux types de motifs différents, éventuellement en exemplaires multiples. Même s'ils présentent des homologies de structure importantes, les différents domaines UBA et UIM n'ont pas la même affinité pour la mono- et la poly-ubiquitine. De plus, ils ne sont pas obligatoirement fonctionnellement

équivalents, y compris au sein du même polypeptide. Si la base structurale de l'interaction entre UBA ou UIM, d'un côté, et ubiquitine, UBD ou UBX, de l'autre, commence à s'éclaircir, les mécanismes responsables de la dynamique des associations sont encore loin d'être compris.

Dégradation protéasomique des substrats ubiquitinylés

Reconnaissance directe ou adressage indirect des substrats ubiquitinylés au protéasome ?

De multiples mécanismes sont responsables de l'adressage des substrats au protéasome, même s'il n'existe pas encore d'accord général sur leur identité et leur nombre exact [12-14]. Cette variété reflète probablement la diversité des situations à laquelle les cellules doivent faire face. On peut, par exemple, facilement comprendre que la dégradation d'une protéine qui doit être extraite du réticulum endoplasmique pour être détruite n'obéisse pas aux mêmes contraintes que celle d'une protéine nucléaire.

Il est probable qu'une fraction des protéines ubiquitinylées soit reconnue directement par le protéasome. Ainsi, deux sous-unités du complexe régulateur 19S du protéasome (Figure 2C), S6' et S5a, peuvent se lier à des chaînes d'ubiquitine K48, pour peu que celles-ci soient suffisamment longues [15-17]. Au niveau de S5a, l'interaction fait intervenir des motifs UIM. Les positions spatiales de S6' et de S5a sont intéressantes à considérer. En effet, la première fait partie de l'anneau d'ATPases chaperons de la base du complexe régulateur 19S au contact direct du protéasome 20S, tandis que la seconde interagit avec cet anneau (Figure 2C). Cette organisation topologique favorise probablement la déstructuration des substrats et leur injection dans la chambre

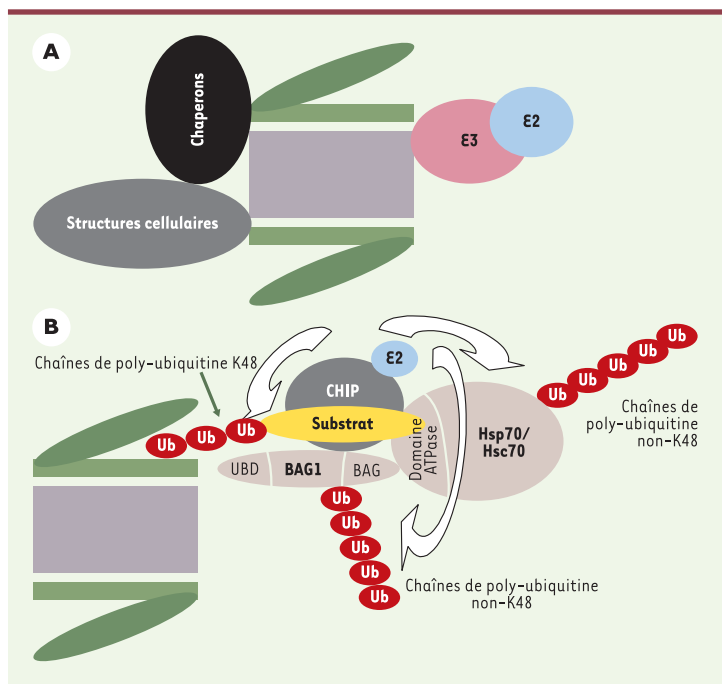
Nom	Localisation	Structure	Rôle*
UIM (<i>ubiquitin-interacting motif</i>) ou LALAAL	Sous-unité S5a du régulateur 19S du protéasome	Environ 20 acides aminés formant une hélice α	Interaction avec des chaînes d'ubiquitine et des domaines UBD
UBA (<i>ubiquitin-associated domain</i>)	Diverses E2 et E3 Protéines du système ubiquitine	Environ 40 acides aminés Très peu d'acides aminés conservés entre les différents UBA Forme un paquet de 3 hélices α	Interaction avec des mono- et des poly-ubiquitines Liaison de chaînes K48 et K29, mais aussi de motifs protéiques non reliés à l'ubiquitine
UBD (<i>ubiquitin domain</i>) ou UbL, type-2UbL, UBL, UBQ	Diverses protéines	45-80 acides aminés Homologie de séquence significative avec l'ubiquitine Structure tridimensionnelle proche de celle de l'ubiquitine	Liaison au protéasome 26S La plupart des protéines à UBD connues ont un rôle dans le système ubiquitine/protéasome
UBX	Protéines humaines Y33	Environ 80 acides aminés Pas d'homologie de séquence significative avec l'ubiquitine Structure tridimensionnelle proche de celle de l'ubiquitine	Liaison à VCP/Cdc48

Tableau I. Domaines se liant à l'ubiquitine et domaines ubiquitin-like. * Les rôles indiqués n'excluent pas que les motifs décrits puissent avoir d'autres rôles non encore identifiés. VCP: *valosin-containing protein* (homologue du régulateur du cycle cellulaire Cdc48).

catalytique du 20S après désubiquitinylation par une autre sous-unité du complexe 19S, Rpn11 [18, 19].

En fait, il est possible (bien que la démonstration formelle soit encore manquante) que la plupart des protéines ubiquitinylées soient adressées au protéasome grâce à des protéines navettes se liant d'un côté à des chaînes d'ubiquitine et, de l'autre, au complexe régulateur 19S [12-14]. Chez la levure, l'équivalent de S5a, dont une partie est soluble, semble capable d'assurer cette fonction, la liaison des chaînes d'ubiquitine à S5a étant

assurée par un motif UIM. Chez les mammifères, il se pourrait que ce mécanisme n'opère pas, S5a n'ayant pas encore été visualisée sous forme libre. Parmi les navettes moléculaires non protéasomiques, les protéines de la famille Rad23 (hHR23 α et β chez l'homme), initialement caractérisées pour leur implication dans la réparation de l'ADN, sont les mieux étudiées [12-14]. Elles possèdent un domaine UBD et deux domaines UBA. Ces derniers se lient aux chaînes d'ubiquitine, tandis que le domaine UBD interagit avec l'un des deux domaines UIM de S5a (Figure 2C). Si l'interaction avec l'UIM de S5a représente bien un premier point d'ancrage au protéasome, les données expérimentales suggèrent qu'il en existe au moins un autre dans le complexe régulateur 19S.



assurée par un motif UIM. Chez les mammifères, il se pourrait que ce mécanisme n'opère pas, S5a n'ayant pas encore été visualisée sous forme libre. Parmi les navettes moléculaires non protéasomiques, les protéines de la famille Rad23 (hHR23 α et β chez l'homme), initialement caractérisées pour leur implication dans la réparation de l'ADN, sont les mieux étudiées [12-14]. Elles possèdent un domaine UBD et deux domaines UBA. Ces derniers se lient aux chaînes d'ubiquitine, tandis que le domaine UBD interagit avec l'un des deux domaines UIM de S5a (Figure 2C). Si l'interaction avec l'UIM de S5a représente bien un premier point d'ancrage au protéasome, les données expérimentales suggèrent qu'il en existe au moins un autre dans le complexe régulateur 19S.

Association du protéasome avec les enzymes d'ubiquitinylation

Comme cela est expliqué dans la Figure 1C, le transfert de l'ubiquitine sur les substrats est assuré par deux classes d'enzymes spécialisées, E2 et E3 [1, 6, 7]. Des approches biochimiques, protéomiques et de criblage double hybride dans la levure ont permis de mettre en évidence l'inclusion du protéasome dans des supercomplexes contenant différentes E2 et E3. Cela a été observé chez la levure, les plantes comme *Arabidopsis thaliana*, les métazoaires inférieurs comme *Caenorhabditis elegans* ou les cellules de mammifères (Figure 3A). En fonction des situations, l'interaction est directe ou indirecte. Au moins dans certains cas, des protéines à UBD et UBA pourraient jouer le rôle de ponts moléculaires. Il semble en être ainsi de la protéine hPLIC-2 (*ubiquitin-like product chap1/Dsk2*). Pour associer la E3 E6-AP (*E6-associated protein*) au protéasome, elle se lierait à S5a via son domaine UBA, ainsi qu'à un autre site du complexe régulateur 19S via son domaine UBD [20]. Notons ici que hPLIC-2 pourrait ponter d'autres E3 au protéasome, d'une part, et que tous les UBA ne sont pas capables de se lier à S5a, d'autre part [20, 21]. Une interaction directe E3/protéasome particulière est intéressante à considérer ici. La parkine E3, qui est le produit du gène responsable de la maladie de Parkinson juvénile récessive, interagirait directement avec S5a via son domaine UBD. La mutation R42P trouvée chez certains patients induit un changement de conformation dans le domaine UBD, ce qui diminuerait l'interaction avec le protéasome et constituerait la cause structurale/biochimique de la maladie de Parkinson chez ces patients [22]. Pour terminer, mentionnons que des enzymes de désubiquitinylation

comme l'isopeptidase Ubp6 (*ubiquitin-specific protease 6*) peuvent aussi s'associer avec le protéasome, sans que la raison moléculaire de cette association n'ait encore été élucidée [23, 24].

Implications des chaperons moléculaires dans l'adressage au protéasome

Les chaperons moléculaires sont bien connus comme machines de remise en conformation des protéines agrégées ou dénaturées. Très tôt, ils ont été suspectés d'intervenir dans le contrôle de la dégradation de substrats divers [1, 25]. De fait, différents chaperons s'associent avec le protéasome (Figure 3A) [13]. Des arguments fonctionnels existent pour impliquer les chaperons Hsc70/Hsp70 (protéines de choc thermique constitutive/inductible), Hsp90 et VCP/Cdc48 (*valosin-containing protein*, homologue du régulateur du cycle cellulaire Cdc48) dans la dégradation de substrats tels que des récepteurs membranaires, des protéines cytosoliques, des facteurs de transcription... [13]. Une des idées prévalant actuellement pour VCP/Cdc48 est qu'elle interviendrait pour extraire des protéines ubiquitinylées de complexes multimériques de manière à faciliter leur reconnaissance par le protéasome. En ce qui concerne Hsp90, elle fait intervenir d'autres molécules comme son cochaperon CHIP, qui est une E3, et des molécules adaptatrices à domaine UBD, comme Bag-1 (voir Figure 3B et [13], pour exemples).

Dégradation protéasomique des protéines non ubiquitinylées

Les protéines ne nécessitant pas d'ubiquitylation pour être dégradées par le protéasome ont, jusqu'à récemment, été considérées

comme de rares exceptions. L'accumulation actuelle de nouveaux exemples (Tableau II) [2-4] suggère que cette catégorie de substrats a probablement été largement sous-estimée dans le passé. Renforçant cette idée, les banques de données indiquent qu'environ 1% des protéines mammifères sont dépourvues de lysines. Il a néanmoins été proposé que ces mêmes protéines pourraient être ubiquitinylées sur leur extrémité aminoterminal via la formation d'une liaison peptidique. La protéolyse doit être considérée avec le fait que n'importe quelle protéine dans la cellule constitue une population de molécules hétérogènes au niveau de la fonction, de la localisation, du partenariat et des modifications post-traductionnelles. Il s'ensuit qu'elles peuvent subir divers modes de dégradation en fonction de ces paramètres et des conditions physiologiques. Par exemple, p21^{CIP1/WAF1}, l'inhibiteur de kinase dépendante des cyclines - qui a été l'une des premières protéines identifiées pour être dégradée indépendamment de son ubiquitylation [26-28] - peut être déstabilisée par ubiquitylation dans certaines conditions [29-31]. Par ailleurs, si le substrat n'est pas ubiquitinylé lui-même, il est possible, dans certains cas, que des chaînes d'ubiquitine soient apportées en *trans* par un partenaire d'interaction. Enfin, si l'ubiquitine n'est pas requise dans les étapes finales de la reconnaissance de certains substrats par le protéasome, elle peut indirectement

Substrats	Remarques	Références
Ornithine décarboxylase	Dégradation induite par l'antizyme 1 Bonne connaissance de la biochimie impliquée	[44]
IκB	Dégradation basale La dégradation accélérée induite par différents types d'inducteurs implique l'ubiquitylation d'IκB	[45]
p21 ^{Cip1/Waf1}	Concerne probablement la forme libre du Cki Rôle possible pour le protéasome 20S Il existe aussi plusieurs mécanismes de dégradation de p21 dépendants de l'ubiquitine	[26-28] [29-31]
c-Fos	L'activité d'un effecteur en amont de la dégradation de c-Fos nécessite une voie ubiquitine active dans certaines conditions	[32]
Thymidylate synthase	Bonne connaissance des déterminants structuraux de la dégradation	[46]
p53	Dégradation de la protéine sous le contrôle de la NAD(P)H quinone oxydoréductase Plusieurs autres voies de dégradation de p53 dépendantes de l'ubiquitylation ont été décrites	[5]
Protéine NS2 du parvovirus minute de la souris		[47]
Rb/p105/p107	Dégradation induite par le cytomégalo virus humain Une dégradation dépendante de l'ubiquitylation des protéines a aussi été rapportée	[48]
Protéines âgées ou oxydées	Rôle possible pour le protéasome 26S, mais aussi 20S	[49]
α-synucléine	Rôle possible pour le protéasome 20S	[28]

Tableau II. Protéines dégradées sans ubiquitylation préalable. Seuls des substrats faisant l'objet, *in vivo*, d'une dégradation protéasomique indépendante de leur ubiquitylation propre sont mentionnés ici.

tement régler la dégradation d'effecteurs en amont de leur destruction, comme cela pourrait être le cas pour la proto-oncoprotéine c-Fos, au moins dans certaines situations [32]. Deux questions importantes se posent. La première est de savoir quelles sont la (ou les) forme(s) de protéasome impliquée(s) dans la dégradation des protéines non ubiquitinylées. La seconde est de déterminer s'il existe des systèmes d'adressage spécifiques, comme il en existe pour les substrats ubiquitinylés. Pour le second point, aucune information n'est disponible à l'heure actuelle. Pour le premier, en revanche, il semble que plusieurs formes de protéasome puissent participer à la destruction indépendante de l'ubiquitine. Ainsi, des expériences réalisées *in vitro* ont montré depuis longtemps que le protéasome 26S peut dégrader l'ornithine décarboxylase. Cependant, des particules hybrides 20S + 19S + 11S semblent plus actives [33]. Le point récent le plus surprenant est la suggestion selon laquelle le protéasome 20S seul pourrait aussi être un acteur majeur de la dégradation indépendante de l'ubiquitine [28]. Bien que ce soit la particule la plus abondante dans certaines cellules mammifères, on a longtemps pensé qu'il s'agissait simplement d'une forme latente, en attente d'interaction avec des complexes activateurs. Cette supposition reposait sur des analyses structurales montrant que les deux orifices apicaux du protéasome étaient obturés par les extrémités flexibles des sous-unités α en l'absence de complexes régulateurs [1]. En fait, des travaux récents montrent que certaines protéines faiblement structurées, comme p21 ou l' α -synucléine [28], sont capables de désorganiser cette obturation et de trouver, seules, leur chemin vers la chambre catalytique. Une question majeure à résoudre maintenant est l'identification des substrats cibles des différents types de complexes protéasomiques *in vivo*.

Perturbations du système ubiquitine/protéasome et perspectives thérapeutiques

Faisant partie intégrante des cascades de signalisation intracellulaire, il n'est pas étonnant que la dégradation protéasomique soit altérée dans de nombreuses situations pathologiques. Les mécanismes mis en évidence n'impliquent pour le moment que l'ubiquitinylation de régulateurs cellulaires clés. Le domaine évoluant rapidement, il est vraisemblable que des anomalies d'adressage au protéasome seront aussi découvertes dans un futur proche.

Les maladies étudiées incluent, entre autres, des neurodégénérescences, des maladies génétiques, des déficits immunitaires, des désordres hématopoïétiques et les cancers [1, 34, 35]. Dans ce dernier cas, il est intéressant de noter que certains des composants des systèmes d'ubiquitinylation sont soit des oncogènes (par exemple, Mdm2, *mouse double minute 2*), soit des suppresseurs de tumeurs (par exemple, pVHL, *von Hippel-Lindau disease tumor suppressor*) [36]. Soulignons, dans le cas des cancers, que les effets transformants ne concernent pas seule-

ment la division cellulaire [37]. D'autres processus peuvent être atteints: on peut citer des anomalies de différenciation ou l'acquisition de la résistance aux agents génotoxiques. Les cellules peuvent également acquérir la capacité de survivre dans des conditions acides ou hypoxiques, de manifester une activité invasive ou métastatique, de stimuler l'angiogenèse ou d'échapper au système immunitaire. Par ailleurs, certains virus tirent aussi profit du système ubiquitine/protéasome (Ub/Pr) pour exercer leurs effets délétères, se protéger des réponses interféron antivirale ou immune adaptatrice et asservir les cellules infectées à leurs besoins [38, 39].

Toutes ces observations font du système Ub/Pr une cible attractive pour le développement de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques [1, 34, 35]. Trois axes de travaux soulignent déjà la pertinence de cette dernière réflexion. La première est qu'un inhibiteur du protéasome (Velcade®), plus toxique pour beaucoup de cellules cancéreuses que pour les cellules non transformées, a déjà montré une efficacité importante dans le traitement du myélome multiple [40]. Il est actuellement en essai clinique de phase II pour d'autres cancers, bien que les conséquences moléculaires de son action ne soient pas encore précisément comprises. La seconde est que l'action de l'acide rétinoïque et du trioxyde d'arsenic, utilisés dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, s'explique, au moins en partie, par la déstabilisation de la protéine oncogénique PML-RAR α (*pro-myelocytic leukemia/retinoic acid receptor- α*) produite par translocation chromosomique [41]. Enfin, le 17-allylaminogeldanamycine, un inhibiteur du chaperon Hsp90, impliqué - comme nous l'avons déjà mentionné - dans le contrôle de la stabilité de nombreuses protéines, est en cours d'essais cliniques anticancer. Il pourrait aussi trouver des applications dans le cadre de maladies virales, neurologiques et auto-immunes [42, 43]. Gageons que ceci ne soit qu'un début à de nombreuses applications futures.

Conclusions

En résumé, on peut affirmer que notre perception du système ubiquitine/protéasome a fortement évolué ces dernières années. Les points les plus saillants concernent certainement l'inclusion des enzymes d'ubiquitinylation et du protéasome dans des complexes supramoléculaires, ainsi que la mise en évidence de processus complexes d'adressage des protéines à dégrader à la machinerie protéolytique. Caractériser les différents composants impliqués, comprendre leur dynamique, relier leur(s) activité(s) à la signalisation et à la compartimentalisation intracellulaire constituent aujourd'hui des enjeux majeurs du domaine. De façon intéressante, les premières substances affectant la dégradation des protéines ont commencé à montrer des effets bénéfiques dans le traitement de certains cancers. Considérant l'engagement de plus en plus

fort de l'industrie dans cette recherche, on peut raisonnablement espérer de nombreuses applications futures. Par ailleurs, il doit être souligné que la dissection du système ubiquitine/protéasome - au-delà du fait de permettre de mieux comprendre la protéolyse intracellulaire - a ouvert de nombreux autres champs disciplinaires: ces dernières années ont notamment montré que l'ubiquitine ne constitue pas un modificateur post-traductionnel peptidique unique, mais représente seulement le chef de file d'une famille de telles molécules réglant des mécanismes moléculaires et cellulaires très diversifiés. Il est aussi apparu que la nature modulaire du protéasome 26S permettait à certains de ses composants d'intervenir dans des fonctions non protéolytiques, comme la réplication de l'ADN ou la transcription. Souhaitons que les investigations à ces deux derniers niveaux soient aussi riches en développements fondamentaux qu'en termes de compréhension de nombreuses maladies et de leur traitement. ♦

SUMMARY

Proteasomal degradation: from addressing of substrates to therapeutical perspectives

The proteasome is the main intracellular proteolytic machinery. It is involved in all major cellular functions and decisions. It has long been thought that prior ubiquitinylation of almost all of its substrates was necessary for degradation. It has also long been considered that ubiquitinylation and degradation were two uncoupled mechanisms and that the recruitment of ubiquitinylated species was only performed by specialized subunits of the proteasome. The recent literature questions this simplified view. It also suggests that, on the one hand, the fraction of proteins hydrolyzed by the proteasome independently of their ubiquitinylation has largely been underestimated and, on the other hand, that the recognition of ubiquitinylated proteins involves complex addressing systems. Furthermore, it indicates a higher order structuration of the ubiquitin/proteasome pathway, a fraction of the proteasome and of ubiquitinylation enzymes being engaged in supramolecular complexes. Finally, proteasomal degradation is altered in a number of pathological situations. It, thus, constitutes a therapeutic target and the first applications are emerging. ♦

REMERCIEMENTS

Nos travaux ont été soutenus par l'ARC, la Ligue contre le cancer, HFSP, le programme Quality of Life de la Commission européenne, le CNRS et le programme ACI du Ministère de la Recherche.

RÉFÉRENCES

- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82: 373-428.
- Forster A, Hill CP. Proteasome degradation: enter the substrate. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 550-3.
- Orlowski M, Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 2003; 415: 1-5.
- Verma R, Deshaies RJ. A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* 2000; 101: 341-4.
- Asher G, Lotem J, Sachs L, et al. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13125-30.
- Ferrara P, Acquaviva C, Bossis G, et al. Protéolyse intracellulaire et tumorigenèse. *Med Sci (Paris)* 2001; 17: 5-13.
- Coux O, Piechaczyk M. Le système ubiquitine/protéasome: un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. *Med Sci (Paris)* 2000; 16: 623-9.
- Coux O. The 26S proteasome. *Prog Mol Subcell Biol* 2002; 29: 85-107.
- Sun L, Chen ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 119-26.
- Pickart CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell* 2001; 8: 499-504.
- Weissman AM. Themes and variations on ubiquitynation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 169-78.
- Buchberger A. From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 216-21.
- Farras R, Bossis G, Andermarcher E, et al. Mechanisms of delivery of ubiquitinated proteins to the proteasome: new targets for anti-cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005 (sous presse).
- Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 26-31.
- Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 1994; 269: 7059-61.
- Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, et al. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 2002; 416: 763-7.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 2000; 19: 94-102.
- Yao T, Cohen RE. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 2002; 419: 403-7.
- Verma R, Aravind L, Oania R, et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002; 298: 611-5.
- Kleijnen MF, Shih AH, Zhou P, et al. The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol Cell* 2000; 6: 409-19.
- Kleijnen MF, Alarcon RM, Howley PM. The ubiquitin-associated domain of hPLIC-2 interacts with the proteasome. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 3868-75.
- Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, et al. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep* 2003; 4: 301-6.
- Verma R, Chen S, Feldman R, et al. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 3425-39.
- Leggett DS, Hanna J, Borodovsky A, et al. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell* 2002; 10: 495-507.
- McClellan AJ, Frydman J. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E51-3.
- Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J et al. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* 2000; 5: 403-10.
- Toutou R, Richardson J, Bose S, et al. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J* 2001; 20: 2367-75.
- Liu CW, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 2003; 299: 408-11.
- Bloom J, Amador V, Bartolini F, et al. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell* 2003; 115: 71-82.
- Bornstein G, Bloom J, Sityr-Shevah D, et al. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* 2003; 278: 25752-7.

