**Système ubiquitine protéasome**

**I- Présentation générale**

**Le système Ubiquitine-Protéasome (UbPr) est au cœur de la plupart des processus biologiques, comme le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation musculaire ou encore la réponse immune, notamment du fait de son rôle central dans la dégradation contrôlée des protéines régulatrices de ces processus.**

**Ainsi, le rôle de la protéolyse intracellulaire ne se cantonne pas à éliminer les protéines anormales ou endommagées, mais intervient dans la régulation fine des taux de protéines clés pour la cellule. Au vu de la multitude de substrats et des processus impliqués, il n'est pas surprenant que des dysfonctionnements de ce système soient impliqués dans de nombreuses pathologies, comme les cancers, les maladies neurodégénératives et les maladies auto-immunes.**

**La dégradation d'une protéine via le système UbPr implique généralement deux grandes étapes successives, qui nécessitent toutes deux l'hydrolyse de l'ATP (voir Fig.1).**

**Dans un premier temps, l'ubiquitylation consiste en la conjugaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (Ub), sur un ou plusieurs résidus lysine de la protéine, via une cascade enzymatique impliquant 3 types de facteurs, l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et l'ubiquitine-ligase (E3).**

**Dans un deuxième temps, le substrat ubiquitylé est ensuite adressé au protéasome 26S où il est dégradé.**

**Le protéasome 26S est un complexe protéolytique d'environ 2500 kDa formé par l'association du protéasome 20S (le cœur protéolytique de l'enzyme) au complexe régulateur 19S (voir Fig.1).**

**Au cours de cette deuxième étape, le substrat est déubiquitylé, ce qui permet le recyclage de l'ubiquitine, et il est dégradé en peptides qui seront par la suite digérés par des peptidases cytosoliques pour donner des acides-aminés qui seront réutilisés, soit pour la synthèse de nouvelles protéines, soit pour la production d'énergie pour l'organisme.**

 **Certains peptides générés par le protéasome sont pris en charge par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I, dans le cadre de la présentation des antigènes.**

 **Enfin, certaines protéines ne sont que partiellement dégradées par le protéasome qui est donc impliqué dans la maturation protéolytique de précurseurs protéiques (comme par exemple le précurseur p105 de la sous-unité p50 du facteur de transcription NFkB ou Nuclear Factor-kappa B).**

****

**Figure 1 : Le système Ubiquitine-Protéasome. D'après (Coux et al, 1996)**

**Ce schéma en deux grandes étapes du système ubiquitine-protéasome n'est qu'une vue simplifiée de ce système qui est en fait bien plus complexe. De fait, si certains substrats ne nécessitent pas une ubiquitylation préalable avant d'être dégradés, l'ubiquitylation ne mène pas toujours à la dégradation. Elle est en effet impliquée dans des fonctions indépendantes de la protéolyse comme l'endocytose, l'import nucléaire, ou l'activation de kinases par exemple.**

 **En outre, le protéasome 26S et, plus particulièrement, les sous-unités ATPases du complexe régulateur 19S sont associées à des fonctions non-protéolytiques. Par ailleurs, le protéasome 20S peut également être associé à d'autres régulateurs (activateurs ou inhibiteurs) que le complexe 19S, ce qui lui confère des fonctions particulières. Ces variations autour du modèle général présenté dans la Fig.1 illustrent la complexité du fonctionnement et de la spécificité du système UbPr et explique qu'il existe encore un grand nombre de "boîtes noires" dans notre connaissance de ce système.**

**Historique**

**Jusqu'au début des années 80, l'intérêt scientifique dans le domaine du contrôle de l'expression des gènes a porté essentiellement sur l'étude des acides nucléiques et la traduction des ARN messagers. La dégradation des protéines était peu étudiée car elle était considérée comme étant non spécifique et non régulée. Bien qu'il était connu que les protéines devaient être renouvelées, l'ampleur et la spécificité de ce processus, par lequel différentes protéines ont des demi-vie qui vont de quelques minutes à quelques jours, n'étaient pas appréciées. La découverte du lysosome par Christian De Duve en 1953 n'a pas significativement changé cette idée car il était clair que ces protéases n'étaient pas spécifiques des substrats. Aussi, la découverte d'un mécanisme de protéolyse intracellulaire nécessitant de l'énergie a été accueillie avec scepticisme car les protéases connues jusqu'alors fonctionnaient sans ATP (Simpson, 1953).**

**Pourtant, en 1977 Etlinger et Goldberg ont mis en évidence un système protéolytique non lysosomal dépendant de l'ATP en travaillant sur des lysats de réticulocytes qui ne contiennent pas de lysosome. En 1978, Hershko et Ciechanover en fractionnant ces extraits sur des colonnes de DEAE pour éliminer l'hémoglobine ont observé que la fraction 1, constituée des protéines non retenues par la colonne, contenait un facteur nécessaire à l'activité protéolytique dépendante de l'ATP. Ils ont purifié ce facteur et l'ont identifié comme étant une petite protéine très stable d'environ 8,5 kDa, qu'ils ont appelée APF-1 pour ATP-dépendent Proteolysis Factor 1. Rapidement, ils se sont aperçus que cette petite protéine, en présence d'ATP, se liait covalemment à des protéines de haut poids moléculaire et que cette réaction était réversible. Ils ont alors imaginé un modèle où la liaison de APF-1 sur des substrats pouvait servir de signal de reconnaissance pour la protéase retenue sur la DEAE (Fig. 2). Ce modèle permettait d'expliquer à la fois la dépendance énergétique et la sélectivité du système. Il est frappant de constater le remarquable parallèle entre ce modèle initial (Fig. 2) et le modèle actuel (Fig. 1).**

****

**Figure 2 : Modèle original proposé pour la séquence des évènements aboutissant à la dégradation protéique. D'après (Hershko et al, 1980).**

**En 1980, APF-1 a été identifié comme étant l'ubiquitine et les années 1980-1990 ont vu la caractérisation de la cascade enzymatique d'ubiquitylation, avec l'identification des enzymes E1, E2 et E3, ainsi que la compréhension du mécanisme d'activation et de transfert de l'ubiquitine, puis la purification et la caractérisation par plusieurs laboratoires du protéasome 26S (responsable de la dégradation des substrats ubiquitylés) et enfin du protéasome 20S (le corps catalytique du 26S). C'est bien la découverte de l'ubiquitylation comme signal d'adressage des protéines pour la dégradation qui a révolutionné ce domaine. Par la suite, le début des années 90 a vu naître un intérêt pour la biologie du système UbPr, avec des études de génétique chez la levure en particulier qui ont montré que l'ubiquitylation et le protéasome étaient essentiels. Dans le même temps a eu lieu l'identification des premiers substrats du système UbPr chez les mammifères, tels que les cyclines, la protéine p53 et IkBa (IkappaB-alpha) qui est l'inhibiteur de la voie NFkB. Ces exemples sont d'ailleurs souvent cités comme substrats de référence. Depuis, la recherche dans le domaine a connu un essor exponentiel et, aujourd'hui, il est clair que la dégradation des protéines cellulaires est un mécanisme très complexe, contrôlé dans le temps et dans l'espace, d'une grande importance biologique.**

**Malgré ces très nombreuses avancées, qui ont justifié l'attribution en**[**2004 du prix Nobel de chimie**](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/)**aux découvreurs de l'ubiquitylation des protéines (Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose), de nombreuses "boîtes noires" existent encore dans notre compréhension du fonctionnement du système UbPr. En particulier, des questions centrales comme comment s'effectue l'allongement de la chaîne de poly-ubiquitine, ou comment fonctionne exactement le protéasome 26S, restent encore largement sans réponse précise.**

 **II- L'ubiquitylation des proteines :**

**L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés, très stable, présente dans toutes les cellules eucaryotes. Elle est très conservée au cours de l'évolution parmi les différentes espèces eucaryotes : l'ubiquitine humaine et celle de levure partage 96% d'identité pour leur séquence protéique.**

**Elle est toujours exprimée sous forme de précurseurs protéiques, soit en fusion N-terminale avec une autre protéine (souvent des protéines ribosomales), soit en une succession de plusieurs molécules d'ubiquitine fusionnées les unes aux autres. Pour rendre disponible l'ubiquitine, ses précurseurs doivent donc être clivés, ce qui est assuré par des enzymes de déubiquitylation ou DUB (pour DeUBiquitinating enzymes). Dans ce mode d'expression, l'existence de précurseurs de l'ubiquitine et leur clivage subséquent permettent probablement d'établir un "contrôle qualité" afin d'éviter la production d'ubiquitine monomérique mal traduite ou mal conformée. Par ailleurs, les fusions ubiquitine-protéines ribosomales semblent aussi jouer un rôle important dans la biogénèse des ribosomes.**

**La conjugaison de l'ubiquitine aux substrats se fait par une cascade enzymatique impliquant au moins trois types de facteurs :**

* **le premier est l'enzyme d'activation de l'ubiquitine ou E1 qui effectue l'activation ATP-dépendante de l'ubiquitine en formant une liaison thiol-ester à haute énergie entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine (via le COOH porté par son carbone α) et le groupement thiol (SH) d'une cystéine de l'E1;**
* **le second est une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine ou E2, sur lequel l'ubiquitine activée est transférée au niveau du groupement thiol de sa cystéine active;**
* **enfin le troisième, l'E3, est un facteur habituellement, mais souvent incorrectement, appelé ubiquitine-ligase. Il favorise le transfert de l'ubiquitine de l'E2 vers le substrat par formation d'une liaison amide entre le groupement COOH de la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupement ε-amine (amine portée sur la chaîne latérale de l'acide aminé et non par le carbone α, voir l'article "**[**Les acides aminés**](http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/acideamine/acideamine.htm)**") d'une lysine du substrat, formant ainsi une liaison isopeptidique (Fig. 3).**

**Cependant, il a également été décrit que la conjugaison de l'ubiquitine sur le substrat pouvait se faire sur le groupement thiol d'un résidu cystéine ou sur le groupe hydroxyl (OH) d'une sérine ou d'une thréonine, et que, dans certains cas, l'ubiquitine peut être conjuguée non pas à une lysine interne de la protéine, mais au groupement α-amine du résidu N-terminal de la protéine via une liaison peptidique.**

**Dans une réaction d'ubiquitylation, l'E3 est un facteur clé puisqu'il est impliqué dans la reconnaissance spécifique du substrat et est donc responsable de l'essentiel de la spécificité de la réaction. Ceci explique qu'il existe une très grande quantité d'E3s différentes, probablement des centaines chez les mammifères, alors que l'on ne compte qu'une trentaine d'E2s et que deux E1s. Dans certains cas, la poly-ubiquitylation du substrat nécessite l'intervention d'un quatrième facteur appelé E4 dont le mécanisme et le rôle exact ne sont pas encore bien compris (pour revue, voir Hoppe, 2005). Dans un cas décrit, ce facteur permet d'allonger et de modifier le type de chaînes (de K29 à K48) présent sur le substrat, permettant ainsi sa dégradation efficace par le protéasome.**

**Par ailleurs, l'ubiquitylation est un processus dynamique et réversible, du fait de l'existence de nombreuses enzymes de déubiquitylation ou DUB (Fig. 3) qui, en plus de permettre la maturation de l'ubiquitine à partir de ses précurseurs, clivent l'ubiquitine de ses substrats (protéines ou peptides associés au protéasome) et désassemblent les chaînes de poly-ubiquitine.**

****

**Figure 3 : La cascade d'ubiquitylation. D'après (Ravid & Hochstrasser, 2008).**

**II- Les différentes familles d'ubiquitine-ligase**

**Les E3s forment un groupe vaste et varié de protéines qui sont généralement classées en 2 grandes familles : la famille des E3s à domaine HECT (pour Homologous to E6-associated protein C-Terminus) comporant une vingtaine de membres connus chez l'Homme, et celle des E3s à domaine RING (pour Really Interesting New Gene) comportant des centaines de membres. (pour revue, voir Ardley & Robinson, 2005). Signalons qu'il existe également quelques E3 décrites dans la littérature qui ne rentrent pas dans ces deux familles.**

**Dans le cas des E3s à domaine HECT, le terme d'Ubiquitine-ligase est approprié car elles jouent un rôle direct dans la conjugaison de l'ubiquitine au substrat. De fait, l'ubiquitine activée est transférée de l'E2 sur un résidu cystéine de l'E3 avant d'être conjuguée au substrat (Fig. 3). Par contre, l'appellation d'Ubiquitine-ligase semble impropre pour les E3s à domaine RING qui, en l'état actuel des connaissances, sont des molécules d'échafaudage, mais pas de véritables enzymes. En effet, ces E3s servent de molécules adaptatrices entre l'E2 et le substrat pour faciliter l'ubiquitylation du substrat, en rapprochant celui-ci de l'E2 . D'ailleurs, le motif "RING finger" qui les caractérise forme des boucles stabilisées par coordination d'ions Zinc et permet le recrutement des E2s.**

**III- Les différents types d'ubiquitylation**

**Les protéines peuvent être modifiées soit par une seule ubiquitine (mono-ubiquitylation) soit par des chaînes de poly-ubiquitine (poly-ubiquitylation), sur un ou plusieurs résidus du substrat, au niveau d'une lysine le plus souvent; on parle alors de multi-mono-ubiquitylation et de multi-poly-ubiquitylation, respectivement (Fig. 4). Dans le cas de la poly-ubiquitylation, la première molécule d'ubiquitine est conjuguée à une lysine du substrat, puis l'élongation de la chaîne de poly-ubiquitine se fait par la formation d'une liaison isopeptidique entre la glycine C-terminale d'une nouvelle ubiquitine et une lysine de la molécule d'ubiquitine précédemment conjuguée. Comme toutes les lysines de l'ubiquitine sont exposées à sa surface, accessibles et disponibles, il peut se former différentes chaînes, de type et de topologie variés. Il faut noter, à ce niveau, que la poly-ubiquitylation peut être impliquée dans d'autres voies que la protéolyse cellulaire, comme par exemple l'endocytose ou la réponse inflammatoire (pour revue, voir Mukhopadhyay & Riezman, 2007). En plus de la poly-ubiquitylation, la mono-ubiquitylation joue également un rôle important dans des fonctions très variées, comme l'internalisation des récepteurs membranaires et le trafic des protéines ou encore comme le remodelage de la chromatine via la modification des histones.**

****

**Figure 4 : Structure de l’ubiquitine, et différents types d’ubiquitylation. (a) Deux faces opposées de l’ubiquitine sont présentées; les 7 lysines sont représentées en blanc, avec l’atome d’azote du groupement ε-amine en bleu; l’isoleucine 44 est représentée en rouge : ce résidu est impliqué dans les surfaces d’interaction entre l’ubiquitine et les UBD. D'après (Hicke et al, 2005).(b) Représentation schématique de différents types de modifications désignés sous le nom générique "ubiquitylation" (notons que toutes les lysines de l’ubiquitine peuvent être utilisées dans la formation de chaînes de poly-ubiquitine).**

**Le protéasome 20S**

**Le protéasome 20S est le cœur protéolytique des différentes formes de protéasome. Cependant, bien que le protéasome 20S seul peut hydrolyser de petits peptides et certaines protéines dépliées, il ne peut pas dégrader de véritables substrats poly-ubiquitylés, pour lesquels il a besoin d'être associé à son régulateur 19S.**

**A- Composition et structure**

**Le protéasome 20S est un complexe multi-protéique d'environ 700 kDa. Sa structure a été déterminée par microscopie électronique puis par cristallographie, ce qui a révélé un cylindre creux, de 15 nm de long et de 11 nm de diamètre, composé de 28 sous-unités assemblées en 4 anneaux heptamériques distincts, identiques 2 à 2, empilés dans une symétrie C2. Les 2 anneaux externes sont formés de 7 sous-unités α et les 2 anneaux internes de 7 sous-unités β, qui portent les activités catalytiques (Fig. 7). Chez l'archaebactérie Thermophila acidophilum, le protéasome 20S se compose de 14 copies de chacune des 2 sous-unités α et β (α7β7β7α7), alors que chez les eucaryotes, il est construit à partir de 2 copies de 7 sous-unités α et 7 sous-unités β différentes mais présentant de fortes homologies de séquences (α1-7β1-7β1-7α1-7). Les 2 anneaux bêta délimitent la cavité interne, tandis que les cavités externes (appelées "antichambres") sont délimitées par un anneau alpha et un anneau bêta. Cette structure favoriserait la rétention des substrats à l'intérieur du cylindre et jouerait de ce fait un rôle déterminant dans la processivité du protéasome. Même si la composition du protéasome 20S des eucaryotes est plus complexe que celui des archaebactéries, en raison de l'augmentation du nombre des différentes sous-unités au cours de l'évolution, la structure quaternaire de ces complexes est très similaire**

****

**Figure 7 : Structure du protéasome 20S.
(a) Vue schématique latérale (Rechsteiner & Hill, 2005).
(b) Vue en coupe, montrant les sites actifs β1, β2 et β5 en jaune et le potentiel site actif β7 en rouge (Unno et al, 2002). Concernant ce dernier, une analyse structurale aux rayons X du protéasome bovin suggère qu'il présente une nouvelle activité nucléophile hydrolase N-terminale. Ce site catalytique pourrait avoir une activité SNAAP (pour Small Neutral Amino Acid-Preferring). Contrairement aux autres sites catalytiques, il n'est pas dans la cavité interne formée par les anneaux bêta, mais au niveau de l'antichambre formée par les anneaux alpha et bêta.**

**Chez les eucaryotes, seules 3 des 7 sous-unités β (β1, β2 et β5) possèdent une activité protéolytique, ce qui signifie que chaque protéasome possède 6 sites catalytiques (Fig. 7b, représentés en jaune). Le site actif est toujours caractérisé par un résidu thréonine dont le groupement amine sert de nucléophile dans le cycle catalytique. Cependant, les sites catalytiques présentent des spécificité distinctes, définies par la nature physico-chimique de l'environnement des sites actifs. Ainsi, les sous-unités β2 qui présentent un environnement acide où vont se loger des résidus basiques, possèdent une activité trypsin-like qui coupe après les résidus basiques. Les sous-unités β5 possèdent une activité chymotrypsin-like qui coupe après les résidus hydrophobes. Les sous-unités β1 possèdent une activité caspase-like qui coupe après les résidus acides.**

**Chez les mammifères, un traitement à l'interféron γ stimule l'expression de 3 sous-unités β actives supplémentaires, appelées les sous-unités β induites, βi, ou LMP. Chacune d'elles va remplacer une sous-unité β constitutive spécifique qui lui est génétiquement homologue et être incorporée à la position correspondante à l'intérieur de l'anneau β du nouveau protéasome assemblé. β1i/LMP2 remplace son homologue exprimé constitutivement β1, β5i/LMP7 remplace β5 et β2i/LMP10 (MECL1) remplace β2. Le protéasome ainsi formé, suite à un signal à l'interféron γ, est appelé "immuno-protéasome": il génère des peptides dont la taille est mieux appropriée pour la présentation des antigènes (en moyenne 8 à 11 acides aminés au lieu de 6 à 8 en moyenne) par les molécules du CMH de classe I.**

**Pour aller plus loin**

**B- Ouverture du pore**

**Chez les eucaryotes, les extrémités N-terminales des sous-unités α forment un réseau d'interactions entre elles et constituent ainsi une barrière physique qui obstrue l'entrée du canal et limite l'accès des protéines cytosoliques à l'intérieur de la chambre protéolytique en imposant une conformation fermée au protéasome. La sous-unité α3 semble être particulièrement impliquée dans la fermeture du pore. En effet, son extrémité N-terminale forme une sorte de pont qui traverse le pore, et elle est en contact avec toutes les autres extrémités N-terminales. De plus, des analyses cristallographiques du protéasome 20S de S. cerevisiae ont montré que la délétion de l'extrémité N-terminale de la sous-unité α3 ouvre un canal vers la cavité catalytique interne du protéasome 20S, levant ainsi la répression de l'hydrolyse peptidique.**

**Figure 8 : Représentation en coupe de la structure du complexe 20S-11S. Complexe chimérique constitué du 20S de levure et du 11S de Trypanosoma brucei. Les extrémités N-terminales des sous-unités alpha sont représentées en vert et les extrémités C-terminales du 11S sont représentées en rouge. D'après (Groll & Clausen, 2003).**

**L'activation du protéasome 20S nécessite donc un réarrangement de ces extrémités. Effectivement, in vitro, il est possible d'activer artificiellement le 20S par différents traitements, comme une incubation prolongée à 37°C, un chauffage à 55°C, une incubation avec des faibles concentrations de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, un détergent) ou avec des acides gras. Ces traitements induisent probablement des changements de conformation des protéines qui altèrent les anneaux alpha et facilitent l'entrée des substrats. Par ailleurs, Il a également été montré que certaines protéines non repliées étaient capables d'ouvrir l'accès à la chambre protéolytique en absence d'activateurs, probablement via des interactions non-spécifiques avec des motifs hydrophobes de leurs séquences.**

**Les extrémités N-terminales des sous-unités α correspondent également aux sites de liaisons avec les complexes régulateurs qui modulent l'activité protéolytique du protéasome en rendant accessible l'intérieur du complexe et en levant ainsi l'inhibition due à ces extrémités N-terminales. Il existe en effet plusieurs régulateurs du protéasome 20S capables de s'associer à ce complexe et de modifier ses activités catalytiques, notamment les régulateurs PA28/11S et le complexe 19S (voir ci-dessous).**

**La structure cristallographique du complexe 20S-11S a permis de montrer que l'association du corps protéolytique avec son activateur engendre un réarrangement des extrémités N-terminales des sous-unités α qui, ainsi, n'obstruent plus le pore, mais sont dressés à l'intérieur de l'activateur, ce qui ménage un accès au canal du 20S (Fig. 8).**

**C- Les différents régulateurs**

**Comme évoqué précédemment, il existe des activateurs du protéasome 20S, en absence desquels les extrémités du 20S sont fermées et l'activité du protéasome est réprimée. Ces régulateurs positifs sont les complexes 19S (ou PA700), 11S (ou PA28), et PA200 (où PA signifie Proteasome Activator) qui, en s'associant aux extrémités du 20S, au niveau de l'anneau des sous-unités alpha du 20S, vont permettre l'ouverture des canaux et donc permettre l'activation du 20S (Fig.9).**

****

 **Fig 9 :Protéasome 20S associé à ses différents activateurs. Reconstitutions tridimensionnelles des structures obtenues en microscopie électronique (a, b et c, d’après (Baumeister et al, 1998), d et e d’après (Ortega et al, 2005)).**

**Les données structurales obtenues pour ces régulateurs du protéasome montrent qu'ils sont traversés par un pore ou un canal qui va se positionner dans le prolongement du canal du 20S. Pour PA28 (ou 11S), les données cristallographiques le montrent très clairement (Fig. 8 et 9b). En ce qui concerne PA200, des données de microscopie électronique prédisent un agencement en solénoïde dont le pore pourrait se positionner dans le prolongement du canal du 20S (Fig. 9e). Pour le 19S (ou PA700), cet agencement semble concerner au moins le sous complexe appelé "base".**

**Ces données de structure sont en faveur d'un rôle de ces activateurs dans la régulation du 20S. Néanmoins, seul le complexe 19S, associé au 20S, formant ainsi le protéasome 26S, est considéré comme étant impliqué dans la dégradation de substrats ubiquitylés ou non. Les autres régulateurs, PA28 et PA200, semblent jouer d'autres rôles puisqu'ils sont décrits comme étant uniquement capables d'activer la dégradation de peptides par le protéasome 20S, mais pas celle de protéines. Mais certains résultats laissent entrevoir d'autres rôles possibles.**

**Localisation des protéasomes**

**Le rôle majeur de la dégradation dépendante du système UbPr nécessite que ce système soit très finement régulé. Cette régulation se fait en partie par l'étiquetage des protéines avec des chaînes particulières d'ubiquitine et par l'association du protéasome avec ses différents régulateurs, mais la localisation cellulaire du protéasome semble aussi être un point majeur de sa régulation. Aussi, si le protéasome est ubiquitaire et abondant, de nombreuses études ont montré qu'il pouvait avoir des localisations particulières, importantes pour ses fonctions. Ces études ont montré que le protéasome a une localisation nucléo-cytoplasmique, essentiellement diffuse, avec exclusion vacuolaire et nucléolaire, à certaines exceptions près.**

**Distribution nucléaire**

**Il existe des structures subnucléaires, appelés clastosomes, où on trouve du protéasome 20S, son complexe régulateur 19S, de l'ubiquitine et un certain nombre de substrats du système UbPr. Le nombre de ces structures, faible en conditions normales, est augmenté lorsque la protéolyse dépendante du protéasome est activée. Par contre, ces structures disparaissent suite au traitement des cellules avec des inhibiteurs du protéasome. Par ailleurs, des complexes 20S-PA28 γ sont présents au niveau des speckles nucléaires (structures subnucléaires enrichies en facteurs d'épissage des ARN), où ils semblent impliqués dans l'organisation de ces structures nucléaires.**

**Distribution cytoplasmique**

**Au niveau du cytoplasme, on trouve du protéasome et des substrats du protéasome concentrés dans une région entourant le centrosome. Cette région a même été proposée comme étant un lieu préférentiel de la dégradation protéasomale et, de ce fait, a été appelée "centre protéolytique". Par la suite, il a été montré que des agrégats de protéasomes et de substrats ubiquitylés du protéasome, appelés "aggrésomes", se formaient à ce niveau, suite à une inhibition du protéasome ou à une surexpression de substrats du protéasome. Cet aggrésome permettrait de regrouper les protéines délétères afin de limiter leurs effets toxiques dans la cellule. Toutefois, l'activité du protéasome au niveau de cette structure semble inhibée et la concentration de protéasome à ce niveau ne serait que la conséquence du fait que ces protéines sont des substrats du système UbPr. Chez la levure, il a été montré que, lorsque les cellules entrent en quiescence, les sous-unités du protéasome se relocalisent massivement du noyau dans des structures cytoplasmiques mobiles, qui servent de réservoirs cytoplasmiques de protéasomes, qui peuvent être rapidement mobilisés lorsque les cellules sortent de quiescence.**

**Le protéasome semble s'accumuler dans des régions particulières : une fraction du protéasome cytoplasmique est étroitement associée à différents éléments du cytosquelette, en particulier aux filaments intermédiaires. Une fraction du protéasome est également associée au niveau de la surface externe du réticulum endoplasmique, où il est probablement impliqué dans le système ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation), qui consiste en un processus d'export rétrograde de protéines du réticulum endoplasmique mal conformées ou anormales vers le cytosol, couplé à leur ubiquitylation et leur dégradation par le protéasome. De manière intéressante, la fraction de protéasome associée à ce niveau est enrichie en immuno-protéasome, ce qui est cohérent avec le modèle de prise en charge directe des peptides délivrés par l'immuno-protéasome par le transporteur TAP, qui transporte les peptides dans la lumière du réticulum endoplasmique, où ils s'associent avec les molécules du CMH de classe I.**

**C- Le cas particulier de la mitose**

**Au cours de la mitose, on a vu que le protéasome se redistribue suite à la rupture de l'enveloppe nucléaire, mais il occupe également des localisations particulières : au début de la prophase, il s'accumule autour des chromosomes condensés, avec exclusion de la chromatine tout au long de la mitose, puis il se localise au niveau du fuseau mitotique. En effet, il s'associe aux pôles du fuseau au cours de la métaphase et de l'anaphase, puis au "mid-body" au cours de la télophase. Cette localisation semble corrélée avec la dégradation de la cycline B au cours du cycle.**

**D- Localisation du protéasome et type cellulaire**

**Enfin, il a été rapporté un certain nombre de localisations remarquables du protéasome selon le type cellulaire et son état de différenciation (exemple des myoblastes au cours de la différenciation musculaire, ou des différents types de cellules du système nerveux central), ce qui suggère que la distribution intracellulaire du protéasome refléterait le besoin d'une protéolyse augmentée et/ou diminuée de substrats spécifiques au niveau des différentes régions intracellulaires, même si on ne peut exclure une fonction non-protéolytique de ces protéasomes.**

**Le système endosomal**

Le système endosomal est un réseau complexe jouant un rôle important dans le tri de molécules incorporées dans les cellules. Ce système démarre immédiatement en dessous de la membrane plasmique et s’enfonce dans la cellule. Il peut être divisé en deux voies, chacune caractérisée par des structures bien particulières :

La voie des endosomes précoces est caractérisée par les **endosomes de tri** et les **endosomes de recyclage**.

La voie des endosomes tardifs est caractérisée par les **corps multi-vésiculaire**.

1) Voies des endosomes précoces

La voie des endosomes précoces est la première voie endosomale recrutée suite à l’endocytose des vésicules nues découlant des puits recouverts.

a) Endosomes de tri

Les endosomes de tri possèdent un contenu acide, grâce aux H+ ATPases vésiculaires, qui est nécessaire à la dissociation des complexes ligand-récepteur. Ce pH passe donc de **7,4** (pH du milieu extracellulaire) à **6,5** (pH des endosomes tardifs).

Le tri est basé sur la structure tubulo-sphérique de l’endosome et sur le flux massique. En effet, les grosses molécules restent dans la sphère et les petites molécules migrent vers les tubules.

b) Endosomes de recyclage

Les endosomes de recyclage sont morphologiquement différents des endosomes de tri en étant sous la forme de tubules interconnectés.

Les récepteurs endocytés associés aux vésicules qui rentrent dans la voie endosomale sont réexpédiés vers la membrane en quittant les endosomes de tri. Les ligands quant à eux sont adressés à d’autres compartiments de la cellule.

2) Voies des endosomes tardifs

Les endosomes tardifs (**pH de 6,5**) ne correspondent pas à une transformation de l’endosome de tri, mais bel et bien à un nouveau compartiment. En effet, ils se présentent sous la forme de grosses structures vésiculaires contenant elles-mêmes de petites vésicules ; on appelle ces complexes des **corps multi-vésiculaire**. Ces derniers sont partiellement responsables de la dégradation des protéines par hydrolyse grâce à des enzymes hydrolytiques (hydrolases) provenant de l’appareil de Golgi via des **vésicules de transport**.

Par la suite, l’endosome tardif à deux destinées différentes qui aboutissent au même résultat :

soit il fusionne avec des vésicules d’hydrolyse, se trouvant être à nouveau des vésicules de transport en provenance de l’appareil de Golgi, formant un lysosome,

soit il fusionne avec un lysosome préexistant.



*Intracellular components are degraded in lysosomes by a process called autophagy (see figure). In this process, complete regions of the cytoplasm, including cytosolic proteins and entire organelles, are surrounded by a membrane and form an autophagosome. Autophagosomes fuse with late endosomes, which then give rise to lysosomes. These primarily function in the final breakdown of the internalized cargo and can catabolize the different macromolecules found in cells. They also retain molecules that cannot be degraded. Catabolic enzymes are present in endosomes and lysosomes, and within this system there is a pH gradient, with the lysosomes being the most acidic subcompartment. The catabolic enzymes of the lysosome function optimally at acidic pH.*

## From The Following Article:

[Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain](http://www.nature.com/nrn/journal/v6/n9/full/nrn1725.html)

Mylvaganam Jeyakumar, Raymond A. Dwek, Terry D. Butters & Frances M. Platt

*Nature Reviews Neuroscience***6**, 713-725 (September 2005)

doi:10.1038/nrn1725

 **I I -Le système lysosomal**

**Les lysosomes sont des organites cellulaires associés à la digestion intracellulaire d’éléments absorbés par la cellule ou contenus dans la cellule.**

**1) Caractéristiques structurales des lysosomes**

**a) La membrane lysosomale**

**La membrane lysosomale est essentiellement composée de phospholipides. Les protéines, quant à elles, présentent pour la majorité une glycosylation dirigée vers le lumen, les protégeant des hydrolases. Les glycoprotéines enzymatiques membranaires caractérisent les lysosomes. Parmi elles on compte :**

**Des pompes à protons responsables du pH acide (entre 4,5 et 5,5) des lysosomes.**

**Des protéines LAMP (pour « Lysosomes associated membrane protein ») présentent sous deux isoformes (LAMP-1 et LAMP-2) au niveau des lysosomes matures, mais absentes des lysosomes primaires.**

**Des phosphatases acides, uniquement présentent au niveau des lysosomes primaires.**

**b) Les hydrolases**

**Les hydrolases fonctionnent à pH acide (proche de 5) et catalysent l’hydrolyse de toutes les molécules que peut contenir la cellule (protéines, acides nucléiques, glucides et lipides). Chaque type d’hydrolases est spécialisée dans l’hydrolyse d’une classe de molécules. Ainsi, les ribonucléases lysent les ARN, les désoxyribonucléases lysent les ADN, les protéases lysent les protéines, les polysaccharidases lysent les sucres et les lipases lysent les lipides.**

**2) Formation des lysosomes**

**On distingue deux voies dans la formation des lysosomes :**

**La voie endosomale correspond à la fusion du lysosome primaire, provenant du réseau trans golgien, avec un endosome tardif, permettant la formation de l’endolysosome qui formera le lysosome.**

**La voie lysosomale correspond à la fusion du lysosome primaire avec un lysosome déjà existant. Les récepteurs au mannose-6-phosphate sont ici directement renvoyés au réseau trans golgien.**

**3) Les différents types de digestions**

**a) L’hétérophagie**

**L’hétérophagie correspond à la digestion de substances exogènes qui rentrent dans la cellule soit par endocytose soit par phagocytose. Les vésicules d’endocytose fusionnent avec les endosomes qui eux-mêmes fusionnent avec les lysosomes primaires pour former les lysosomes matures.**

**b) L’autophagie**

**L’autophagosome est une expansion du réseau trans-golgien qui entoure le matériel à digérer. Il fusionne ensuite avec des lysosomes, formant des auto-phagolysosome. L’autophagie joue un grand rôle dans le renouvellement des composants cellulaires.**

# La protéolyse (ou catabolisme protéique)

Elle constitue **la principale source d’acides aminés pour l’organisme** (75 % contre 25 % pour les apports). Ses mécanismes ont été beaucoup moins étudiés que ceux de la synthèse protéique, en particulier en raison de difficultés méthodologiques mais il s’agit certainement du domaine où la progression des connaissances a été la plus rapide au cours des dix dernières années. En règle générale, les protéines sont dégradées par des enzymes protéolytiques, les protéases (ou hydrolases) réparties en trois systèmes principaux :

 **⇒ Le système lysosomal**

Les enzymes concernées sont des protéases actives en milieu acide, les cathepsines, dénommées en fonction de l’acide aminé de leur site actif (cystine protéinase : cathepsines B, C, H, L, S, aspartate protéinases : cathepsines D et E ; sérine protéinase : cathepsine G).
Ces enzymes sont localisées essentiellement à l’intérieur des vésicules lysosomales qui incorporent par endocytose les protéines à dégrader. Elles agissent essentiellement sur les **protéines intracellulaires à demi-vie longue, sur les membranes cellulaires, et sur les protéines extra cellulaires**. L’endocytose peut également concerner un fragment d’organite voire un organite entier (macro autophagie). À l’intérieur de la vésicule, les cathepsines vont dégrader la protéine substrat en peptides et en acides ami-nés qui seront libérés dans le cytosol. Le type de cathepsine et de façon générale l’importance de la protéolyse lysosomale varie selon l’organe considéré : ce mode de dégradation est particulièrement important dans les organes à renouvellement protéique rapide (foie). Il nécessite de l’énergie sous forme d’ATP pour maintenir le pH acide à l’intérieur des lysosomes.

 **⇒ Le système calpaïne-capastatine**

Les calpaïnes (au nombre de trois) sont des protéases cytosoliques dont l’activité est étroitement fonction de la concentration intracellulaire en calcium. Elles sont plus spécialisées dans la **dégradation des protéines du cytosquelette**. La calpastatine est un inhibiteur puissant des calpaïnes, l’activité protéolytique globale dépendant de l’équilibre entre calpaïnes et calpastatine.

 **⇒ Le protéasome (système ATP dépendant)**

Il s’agit d’un volumineux complexe enzymatique composé de nombreuses sous-unités dont deux formes, le protéasome 20 S et le protéasome 26 S ont été identifiées. Les substrats préférentiels de ce protéasome sont les protéines intracellulaires normales, qu’elles soient à demi-vie courte ou longue mais aussi les protéines anormales. Préalablement à l’action du protéasome 26 S, **un marquage préalable de la protéine à dégrader par l’ubiquitine** est nécessaire. L’ubiquitine est un petit peptide de 76 aminés dont la séquence est extrêmement conservée chez les eucaryotes. Il se fixe sur les protéines à dégrader (par liaison covalente au niveau des résidus lysine de la protéine). Une fois la protéine poly-ubiquitinée, elle est recon-nue par le protéasome qui la dégrade en acides aminés et en peptides courts relâchant l’ubiquitine qui peut alors être réutilisée. L’ensemble de la réaction nécessite plusieurs enzymes, protéines porteuses et co-facteurs. Surtout, la réaction consomme de l’ATP à deux niveaux, d’une part au moment de l’ubiquitination, d’autre part au moment de l’intervention du protéasome. Cette voie ATP dépendante représente probablement la majorité de la protéolyse au niveau musculaire. Elle est finement régulée par les circonstances nutritionnelles et hormonales.

 **⇒ Les signaux de la protéolyse**

Une question fondamentale et encore non résolue est la suivante : **comment les différents systèmes protéolytiques savent-ils quelle protéine dégrader et à quelle vitesse ?**En l’absence de tels systèmes de reconnaissance, on pourrait imaginer une protéolyse continue incontrôlable et rapidement léthale. Il est clair qu’il existe un mécanisme de ciblage des protéines permettant de désigner à tel ou tel système ce qui doit être dégradé ou non. Ce ciblage est fonction du poids moléculaire, du degré de glycolysation, du point isoélectrique, mais des systèmes plus spécifiques commencent à être identifiés :

* Identité de l’acide aminé N-terminal de la protéine : certains acides aminés N terminaux sont « stabilisants » (par exemple méthionine, glycine) et portés par des protéines à demi-vie longue, d’autres sont « déstabilisants » (lysine, aspartate, tryptophane) et donc portés par des protéines à demi-vie courte. L’acide aminé N terminal peut, au cours de la vie de la protéine, être modifié (asparagine transformée en aspartate), ou peut recevoir un acide aminé déstabilisant supplémentaire, ou peut au contraire être protégé par une acétylation (la désacétylation exposant alors un acide aminé déstabilisant).
* les « séquences signal » : il a été mis en évidence de courtes séquences d’acides aminés dénommées selon la nomenclature des acides aminés avec une lettre (séquence KFERQ ou PEST, le K correspondant la glycine, le F à la phénylalanine, etc.). Ces motifs, inclus dans la séquence primaire de la protéine, deviendraient exposés au fur et à mesure du vieillissement de la protéine par modification des structures secondaires et tertiaires, l’apparition du motif étant alors le signal pour la dégradation de la protéine.

Cependant, à l’heure actuelle, ces deux mécanismes ne concernent que quelques protéines et les signaux conduisant à la dégradation de la majorité des protéines restent mystérieux. Au total, les points essentiels à retenir sur la protéolyse sont :

* **la notion que la protéolyse consomme de l’énergie**. En raison de la mutiplicité des systèmes protéolytiques et de la moins bonne connaissance de la stoechiométrie des différentes réactions, il est difficile d’estimer, comme pour la synthèse protéique, un coût énergétique du protéolyse protéique. En tout état de cause, ce coût est probablement élevé.
* **la protéolyse est tout autant que la synthèse protéique un phénomène très bien régulé** par les conditions nutritionnelles et hormonales, même si cette régulation est actuellement mal connue.