



Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines

Olivier Coux
Marc Piechaczyk

O. Coux : Centre de recherche en biochimie macromoléculaire, Cnrs, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.
M. Piechaczyk : Institut de génétique moléculaire, IFR24, Cnrs, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

► Le système ubiquitine/protéasome joue un rôle majeur dans la protéolyse intracellulaire. De nombreux composants de ce système sont des complexes protéiques dont l'architecture multimérique et modulaire permet l'intégration fonctionnelle de plusieurs activités enzymatiques dans une même structure (protéasome) ou le partage d'un même module fonctionnel par plusieurs protéines (enzymes d'ubiquitylation). Ces propriétés concourent à l'étonnante efficacité et à l'extraordinaire spécificité de cette voie protéolytique. ◀

La protéolyse intracellulaire est une fonction cellulaire essentielle. Au-delà de ses rôles reconnus depuis longtemps, comme l'élimination des protéines anormales ou surnuméraires, la maturation de précurseurs en protéines biologiquement actives, et, chez les eucaryotes supérieurs, l'approvisionnement en peptides antigéniques des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), elle assure aussi une charge, dont l'importance biologique n'a été perçue que récemment, qui consiste en la destruction nécessaire et réglée de nombreuses protéines contrôlant des processus biologiques aussi importants que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la réponse aux stimulus extracellulaires [1]. Chez les eucaryotes, l'un des acteurs majeurs de la protéolyse intracellulaire est un système multi-enzymatique sophistiqué, le système ubiquitine/protéasome [2], qui fonctionne en deux grandes étapes (*figure 1A*). Le substrat est d'abord « marqué » par conjugaison covalente de chaînes d'ubiquitine (Ub), une petite protéine ubiquitaire et très conservée de 76 acides aminés, grâce à une cascade enzymatique spécialisée. Ces

chaînes permettent ensuite la reconnaissance et la dégradation des molécule polyubiquitylées par un complexe protéolytique de 2000 kDa, le protéasome 26S. La spécificité et l'efficacité du système Ub/protéasome découlent de ce fonctionnement en deux temps. En effet, la multiplicité des enzymes d'ubiquitylation permet une grande précision dans la reconnaissance des substrats. A l'inverse, le dénominateur commun représenté par la chaîne de poly-Ub simplifie le problème de la reconnaissance de la multitude des protéines dégradées par le protéasome 26S.

L'ubiquitylation des protéines

L'ubiquitylation des protéines requiert l'activité séquentielle de plusieurs types d'enzymes [2] (*figure 1B*). L'ubiquitine est tout d'abord activée et forme une liaison thioester avec une enzyme d'activation (*ubiquitin-activating enzyme* ou E1). Elle est ensuite transférée, en formant une autre liaison thioester, sur un membre d'une famille d'enzymes de conjugaison (*ubiquitin-conjugating enzymes* ou Ubc) encore appelées E2. Les E2 confèrent un premier niveau de spéci-

TIRÉS À PART

M. Piechaczyk.

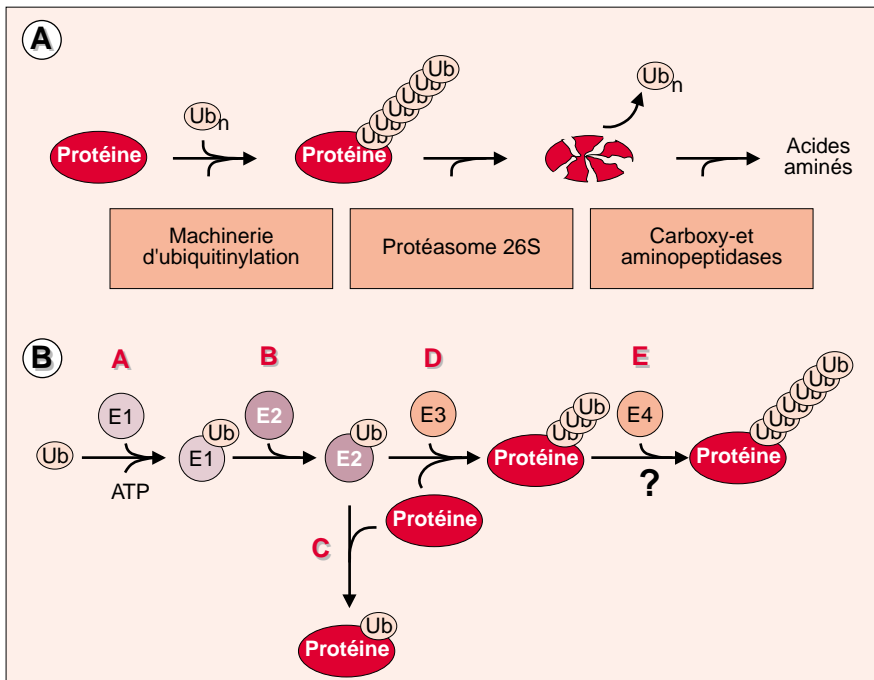


Figure 1. Le système ubiquitine/protéasome. A. Les étapes de la dégradation des protéines ubiquitinylées. Les protéines substrats sont marquées de manière covalente par des chaînes d'ubiquitine. Il n'est pas exclu que l'ajout de chaînes puisse intervenir à différents sites sur le même substrat. Dans de nombreuses situations, l'ubiquitylation est hautement réglée tant au niveau des substrats qu'à celui des enzymes d'ubiquitylation dont, respectivement, la reconnaissance et l'activité peuvent être modulées par les cascades de signalisation intracellulaire. Les protéines ubiquitinylées sont reconnues par le protéasome 26S qui les hydrolyse en oligopeptides de 3 à 20 acides aminés tandis que l'ubiquitine est recyclée. Les produits de protéolyse sont ensuite dégradés en acides aminés par des carboxypeptidases et des aminopeptidases cellulaires. **B. La cascade des enzymes d'ubiquitylation.** E1 (ubiquitin-activating enzyme) active l'Ub et la fixe par une liaison thioester (a), puis la transfère sur une E2 (ubiquitin-conjugating enzyme ou Ubc), qui fixe également l'Ub par un thioester (b). Parfois, in vitro, l'E2 peut transférer seule l'Ub sur la protéine (c), mais cette réaction est généralement peu efficace. Dans la grande majorité des cas, un troisième facteur (dit E3, ou ubiquitin-protein ligase) est nécessaire pour l'ubiquitylation efficace du substrat (d). Enfin, un dernier composant, dit E4, a récemment été identifié [24] et jouerait un rôle dans l'allongement des chaînes de poly-Ub de certains substrats (e).

ficité dans la reconnaissance des substrats. Certaines d'entre elles peuvent transférer directement l'ubiquitine sur des protéines cibles. Cependant, dans l'immense majorité des cas, un troisième composant, appelé ubiquitine ligase ou E3 est nécessaire et joue le rôle principal dans la reconnaissance des substrats. Enfin, un dernier type d'enzyme, dit E4, a récemment été identifié et jouerait un rôle restant à caractériser dans l'élongation de certaines chaînes d'ubiquitine.

Si certaines protéines sont vraisemblablement reconnues de façon constitutive par leurs enzymes d'ubi-

quitylation, un très grand nombre l'est de façon contrôlée. Ce contrôle peut s'exercer au niveau des enzymes d'ubiquitylation ou au niveau des substrats, à la suite, par exemple, de modifications post-traductionnelles. Une littérature maintenant fournie souligne le rôle crucial des cascades de signalisation intracellulaire sur la stabilité de nombreuses protéines (voir par exemple [3]).

Si l'on considère la multitude des protéines sujettes à ubiquitylation et des effets délétères que pourrait entraîner une reconnaissance aberrante des substrats, il n'est pas éton-

nant d'observer une grande diversité et/ou modularité des E3. Ces dernières se répartissent en deux grandes catégories: les E3 qui forment elles-mêmes une liaison thioester avec l'Ub avant d'assurer le transfert de cette dernière sur le substrat, et celles qui facilitent le transfert de l'Ub d'une E2 donneuse directement sur le substrat. La première catégorie, la moins importante, se limite, pour le moment, aux E3 de la famille HECT (au moins une vingtaine de membres chez l'homme), qui ont été caractérisées initialement par homologie avec le domaine carboxy-terminal de la protéine E6-AP, une E3 cellulaire dont les cibles physiologiques ne sont pas connues mais qui, dans les cellules infectées par les formes oncogéniques HPV-16 et HPV-18 du virus du papillome humain, est recrutée par une protéine virale, E6, pour provoquer l'ubiquitylation de la protéine oncosuppressive p53 [4]. Le domaine HECT (environ 40 kDa), toujours situé dans la partie carboxy-terminale, est le domaine catalytique des membres de cette famille (figure 2) tandis que la partie amino-terminale assure la reconnaissance des substrats. Outre E6-AP, la protéine HECT la mieux caractérisée est RSP5/Nedd4, qui est impliquée dans de nombreux processus biologiques, notamment l'internalisation suivie de la dégradation de protéines associées à la membrane plasmique [5], et la destruction de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II chez la levure [6].

Toutes les autres E3 caractérisées tombent dans la deuxième catégorie définie ci-dessus. Dans cette classe d'enzyme, trois types de complexes supramoléculaires (SCF, CBC et APC/C) sont maintenant bien documentés et présentent des similitudes architecturales et fonctionnelles frappantes (figure 2). En particulier, tous trois sont constitués d'un cœur hétéro-multimérique interagissant, d'une part, avec une E2 et, d'autre part, avec un ensemble de protéines impliquées dans le recrutement des substrats.

Les complexes E3 d'ubiquitylation

Les complexes SCF

Les complexes SCF constituent un premier exemple de contrôle combi-

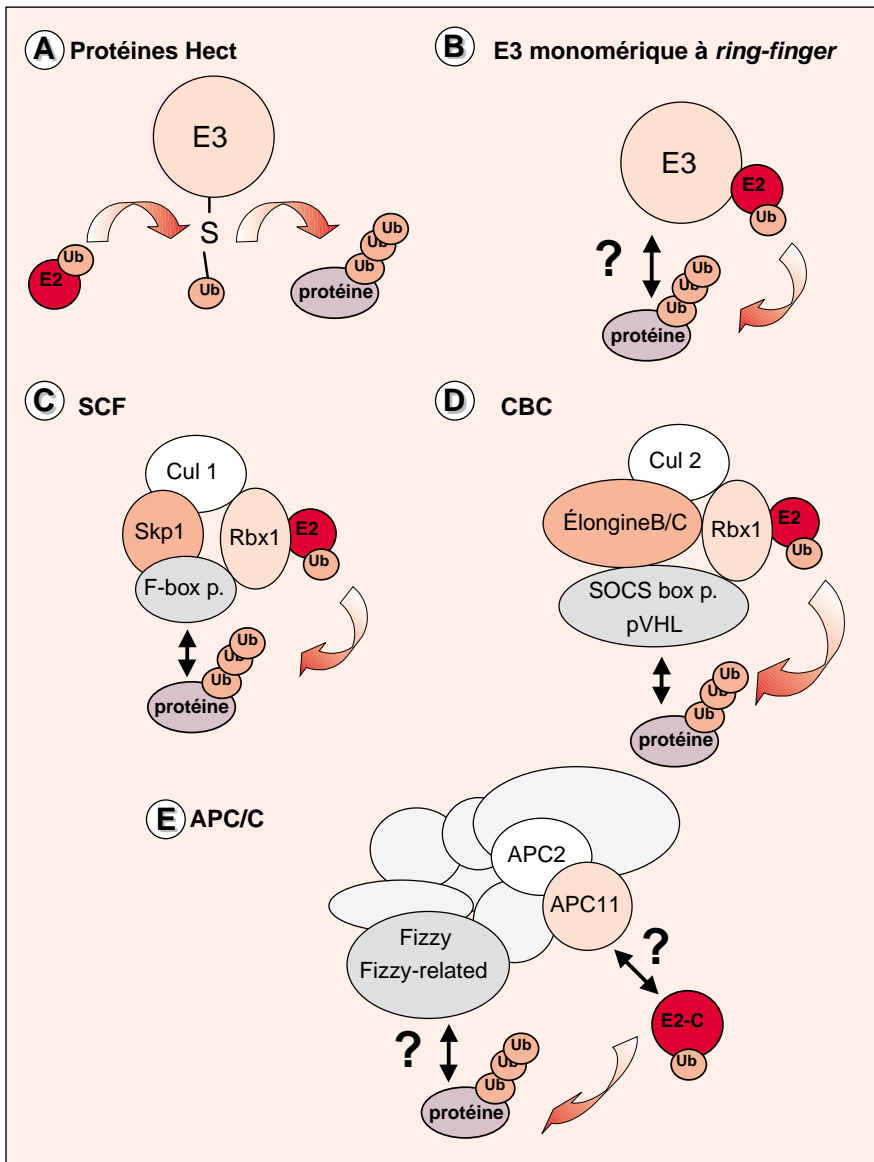


Figure 2. L'ubiquitinylation des protéines et les complexes ligases E3. Cinq groupes de protéines E3 peuvent être définis à l'heure actuelle. Les protéines E3 de type HECT (A) constituent une famille particulière dans la mesure où ces protéines sont des intermédiaires catalytiques dans le transfert de l'Ub au substrat. Les autres types semblent plutôt fonctionner comme « ponts » permettant de rapprocher ou de mettre en contact la E2 et le substrat, et possèdent tous un motif ring-finger. Dans plusieurs cas, ce motif est porté par une E3 monomérique (B), mais un très grand nombre de E3 à ring-finger sont des complexes utilisant des protéines adaptatrices pour recruter les substrats. Ces dernières sont des protéines à boîte F pour les complexes SCF (C), à boîte BC pour les complexes CBC (D). L'APC/C, une protéine E3 constituée de nombreuses sous-unités (E), est nécessaire à la dégradation de nombreuses protéines régulatrices du cycle cellulaire.

natoire de la spécificité des ligases E3 [3]. Des sous-unités adaptatrices, appelées protéines F-box par analogie de séquence avec la cycline F, reconnaissent, d'un côté, les substrats

grâce à des motifs d'interaction protéine-protéine comme les motifs WD40 ou LLR (*leucine-rich repeats*), et, de l'autre, un cœur composé de trois sous-unités (Skp1, Cul1/Cdc53,

Rbx1/Roc1/Hrt1), grâce aux boîtes F qui lie Skp1 (figure 2). Rbx1, qui est une petite protéine à Ring finger (voir plus bas), semble intervenir à la fois dans l'ancrage des composants du système et dans la stimulation de l'activité E2 qui, dans le cas du SCF est Cdc34/UbcH3. Une centaine de protéines à boîte F a déjà été trouvée dans les bases de données, ce qui conduit à spéculer que les complexes SCF sont responsables de la dégradation d'un grand nombre de protéines cellulaires. Si cette prédiction reste encore à vérifier expérimentalement, force est de constater que des substrats de natures variées ont déjà été identifiés. De plus, il est intéressant de noter qu'un même complexe SCF peut provoquer l'ubiquitinylation de plusieurs substrats différents. Par exemple, le SCF^{BTRCP} (le sigle en exposant indique la protéine adaptatrice à boîte F) reconnaît les protéines cellulaires IκBα et β-caténine, ainsi que la protéine vpu du virus VIH-1 complexée au récepteur CD4, après leur phosphorylation sur un motif DSGXXS [3] tandis que le SCF^{SKP2}, lui, reconnaît notamment l'inhibiteur de CDK p27 et le facteur de transcription E2F-1 [7].

Les complexes CBC

Une deuxième famille de complexes d'ubiquitinylation, très similaires aux complexes SCF, est la famille CBC pour culine 2 [Cul2]-élongine B-élongine C [8]. Bien que cette famille soit beaucoup moins connue, tout laisse à penser que les complexes CBC fonctionnent sur le même modèle que les complexes SCF : Cul2 est un homologue de Cul1, élongine C est un homologue de Skp1 et les deux complexes contiennent la protéine Rbx1. La E2 interagissant avec CBC est probablement UbcH5.

Les protéines adaptatrices équivalentes aux protéines à boîte F du SCF interagissent avec élongine C via un motif appelé « BC » bien caractérisé, en particulier dans le cas de la protéine oncosuppressive pVHL (von Hippel-Lindau) responsable de la reconnaissance de différents régulateurs de l'angiogenèse [8]. Le motif BC est aussi retrouvé dans un motif plus large dit *SOCS box* (pour *suppressor of cytokine signalling*), identifié initialement dans un groupe de

protéines impliquées dans la régulation négative de la signalisation intracellulaire induite par les cytokines. De façon intéressante, certaines de ces protéines interagissent avec l'hétérodimère élongine C-élongine B, ce qui amène à spéculer qu'elles puissent constituer d'autres protéines adaptatrices pour CBC.

Outre Cul1 et Cul2 qui appartiennent respectivement aux complexes d'ubiquitinylation SCF et CBC, la famille des cullines comprend au moins 4 autres membres chez les mammifères, et il est donc tentant d'imaginer que d'autres complexes E3 apparentés aux complexes SCF et CBC existent. Cette hypothèse est confortée par des résultats concernant l'ubiquitinylation de la cycline E: si dans certaines situations celle-ci fait intervenir le SCF, dans d'autres elle implique clairement Cul3 indépendamment de Skp1 et Cdc34/UbcH3 [9].

Les complexes APC/C

Un autre type de complexe E3 a été bien étudié: il s'agit du complexe APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) (figure 2) impliqué dans la dégradation de régulateurs clés de la mitose, comme les cyclines mitotiques A et B, ou l'inhibiteur de l'anaphase Pds1 [10]. Il s'agit d'un complexe d'au moins 10 sous-unités qui s'associe à une E2 spécifique appelée E2-C. La plupart des sous-unités ont été caractérisées mais leur rôle précis au sein du complexe n'est pas connu. L'APC/C reconnaît comme substrats des protéines possédant un motif dégénéré appelé *degradation box* identifié initialement dans les cyclines mitotiques, mais la base moléculaire de cette reconnaissance n'est pas connue. Elle pourrait être relayée par des protéines activatrices qui s'associent de manière substoechiométrique à l'APC/C et qui stimulent son activité de façon dépendante de la dose. A ce jour, deux activateurs de l'APC/C ont été identifiés: les protéines Fizzy/Cdc20 et Fizzy-related/Cdh1/Hct1, qui s'associent à l'APC/C à différents stades du cycle cellulaire. On distingue donc maintenant au moins deux types d'APC/C, APC/C^{CDC20} (actif en mitose), et APC/C^{Cdh1} (actif en G1), suivant l'activateur qui est associé au complexe principal.

Un rôle central pour le motif peptidique Ring finger dans l'ubiquitinylation des protéines ?

Il est remarquable que l'APC/C comporte deux sous-unités possédant des homologies avec des sous-unités des complexes SCF et CBC, Apc2 et Apc11, qui sont, respectivement, homologues aux cullines et à Rbx1. Ces homologies suggèrent que les complexes SCF, CBC et APC/C dérivent d'une même E3 ancestrale. Cela est d'autant plus intéressant que Rbx1 et Apc11 possèdent un motif appelé *Ring finger* retrouvé dans un grand nombre de E3 fonctionnant comme des protéines isolées et non pas au sein de complexes d'ubiquitinylation. Il s'agit, par exemple, de Ubr1, Hrd1, Mdm2 ou c-Cbl qui sont impliquées dans l'ubiquitinylation, respectivement, des substrats de la « règle du résidu amino-terminal » (*N-End rule*) [11], de protéines du réticulum endoplasmique [12], de la protéine oncosuppressive p53 [13] et des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase comme le récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) ou du PDGF (*platelet derived growth factor*) [14]. Le *Ring finger* est un motif de longueur et de nature variables, défini par 8 cystéines et histidines coordonnant deux atomes de zinc (les trois premiers et les trois derniers sites de coordination étant des cystéines). Il a été retrouvé dans un grand nombre de protéines dont la plupart n'avaient pas de rôle connu ou supposé dans la dégradation des protéines. Cependant, des résultats récents montrent que différentes protéines à *Ring finger* (AO7, BRCA1, Siah-1, TRC8, NF-X1, kf-1, Praja1), pour la plupart choisies au hasard, agissent comme des E3 dans des tests d'ubiquitinylation *in vitro* [15]. Cette observation suggère que la plupart des protéines possédant ce motif pourraient être des E3 ligases ou participer à leur constitution.

Le protéasome

La dégradation par le protéasome 26S des protéines ubiquitinylées peut intervenir dans le cytoplasme et le noyau et est dépendante de l'ATP [16, 17]. Le protéasome 26S, dont le rôle pré-

pondérant dans la biologie des eucaryotes supérieurs a été clairement établi grâce au développement récent d'inhibiteurs spécifiques [18], est formé par l'association de deux sous-complexes: un cœur protéolytique, le protéasome 20S, et un complexe régulateur appelé complexe 19S (figure 3).

Le protéasome 20S

Le protéasome 20S est une particule stable et abondante en forme de cylindre creux, composée de 28 sous-unités apparentées (14 différentes chez les eucaryotes) distribuées en 4 anneaux heptamériques (figure 3). Les deux anneaux centraux sont identiques, et sont formés chacun par sept sous-unités différentes (dites de type β); ils définissent une cavité interne qui renferme les sites catalytiques. Les deux anneaux extérieurs sont composés eux aussi de sept sous-unités différentes (dites de type α); ils permettent l'association du protéasome 20S à des complexes régulateurs, et contrôlent l'entrée des substrats dans la chambre de catalyse. Le protéasome 20S possède au moins 5 activités peptidasiques, caractérisées par des substrats et des inhibiteurs différents. Cependant, seules trois sous-unités catalytiques ont été identifiées. Ce sont les sous-unités β appelées X, Y et Z, qui, de manière atypique pour des protéases, utilisent le groupement hydroxyle de leur résidu thréonine amino-terminal comme nucléophile pour attaquer les liaisons peptidiques. Le protéasome, dont les différents sites catalytiques s'influencent mutuellement de façon allostérique, fonctionne de manière récurrente et produit des peptides de trois à vingt acides aminés [16, 17]. La plupart des peptides produits par le protéasome sont hydrolysés en acides aminés par des peptidases cellulaires. Cependant, chez les eucaryotes supérieurs, certains sont utilisés par le système immunitaire et s'associent aux molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I pour être présentés à la surface des cellules. De manière remarquable, le protéasome semble s'être « adapté » à cette fonction. En effet, l'interféron- γ (IFN- γ), qui stimule la réponse immunitaire, provoque le remplacement des sous-unités catalytiques X, Y et Z par des sous-unités

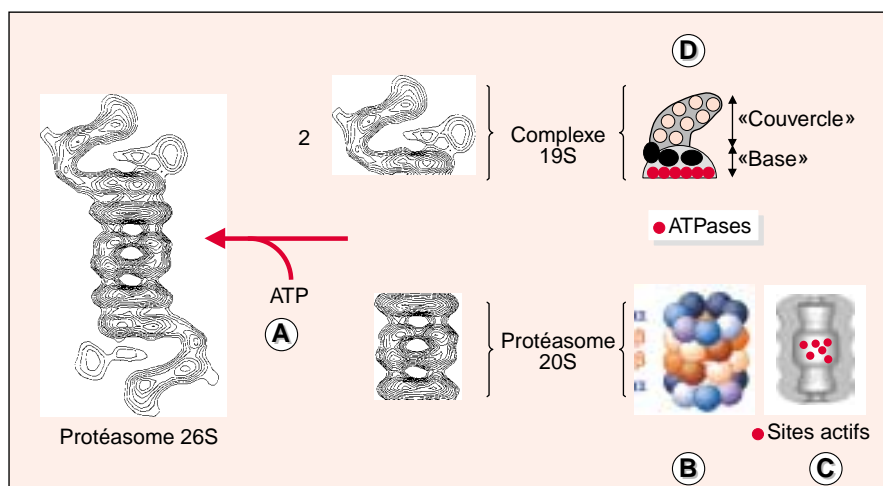


Figure 3. Organisation du protéasome 26S. Le protéasome 26S est formé par l'association du protéasome 20S et du complexe régulateur 19S. Cette association est dépendante de l'énergie (A). Sur la figure, le protéasome est présenté tel qu'il apparaît en microscopie électronique [16]. Il existe une certaine flexibilité dans l'interaction 20S/19S. Cependant, il n'est pas encore clair si cette possibilité de rotation possède un rôle fonctionnel. Le protéasome 20S est un cylindre creux formé par 4 anneaux (B) définissant une cavité interne composée de trois chambres. La chambre centrale est la plus grande et constitue le site d'hydrolyse des substrats (C); représentation en coupe). Les anneaux extérieurs sont composés de sous-unités dites de type α apparentées et sont identiques. Ils assurent l'association du 20S avec ses complexes régulateurs et contrôlent la pénétration des substrats dans la chambre de protéolyse par des mécanismes allostériques. Les deux anneaux internes sont eux aussi identiques entre eux et sont composés de sous-unités dites de type β présentant de fortes homologies structurales. Ils portent les activités protéolytiques du protéasome. Cinq activités catalytiques différentes ont été caractérisées biochimiquement à ce jour mais seulement 3 d'entre elles ont été localisées physiquement (activités chymotrypsine-like, trypsine-like et postglutamyl ou caspase-like) sur les sous-unités X, Y et Z. Ces dernières peuvent être remplacées par les sous-unités LMP7, LMP2 et MECL1 sous l'action de l'interféron γ (non représenté sur la figure). Les particules 20S ainsi formées constituent l'immunoprotéasome. L'efficacité et la vitesse d'hydrolyse des substrats par le protéasome et l'immunoprotéasome sont comparables. En revanche, la nature des oligopeptides engendrés est significativement différente. Les différents sites catalytiques ne fonctionnent pas indépendamment mais s'influencent par des mécanismes de type allostérique. Le complexe 19S est organisé en deux sous-ensembles: une « base » contenant 6 ATPases et un « couvercle » (D). La base assure le contact avec les sous-unités α du protéasome 20S et possède une activité chaperone. Cette activité est nécessaire à la destructuration des substrats qui doivent passer au travers du mince orifice formé par les sous-unités α du protéasome 20S. L'hydrolyse de l'ATP est vraisemblablement nécessaire à l'injection des substrats dans la chambre catalytique. Le couvercle est responsable de la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine et assure ainsi le recrutement des substrats ubiquitinylés. Une activité isopeptidasique est associée au complexe 19S. Elle est vraisemblablement portée par le couvercle et permet de « décrocher » (et donc de recycler) l'ubiquitine des substrats. Elle assure probablement aussi une fonction de contrôle de qualité pour recycler les protéines insuffisamment ou improprement ubiquitinylées. Un autre complexe régulateur, le complexe 11S, non représenté sur la figure, peut aussi s'associer au protéasome 20S.

qui leur sont très proches, appelées respectivement LMP7, LMP2 et MECL1. Le nouveau complexe ainsi formé, appelé l'immunoprotéasome,

semble mieux adapté à la production de peptides « présentables » par les molécules de CMH-I [19].

La compartimentalisation des sites

catalytiques du protéasome 20S dans une cavité interne présente un double avantage. En effet, la concentration de plusieurs activités protéasiques dans un nanocompartiment permet la dégradation efficace et rapide des substrats et évite la production de fragments trop longs qui pourraient conserver une activité biologique et interférer avec la physiologie cellulaire. De plus, l'accès à la cavité s'effectuant par des ouvertures étroites, les protéines cellulaires sont protégées d'une destruction incontrôlée. Cependant, il est important de souligner que l'accès contrôlé à la chambre catalytique crée une contrainte importante quant à l'approvisionnement en substrats. Ceux-ci doivent être destructurés (linéarisés) afin de pouvoir passer à travers les orifices formés par les anneaux α . De plus, il est important de souligner que ces orifices sont obstruables chez les eucaryotes par les extrémités amino-terminales des sous-unités α et qu'il est donc nécessaire d'avoir un système permettant de maintenir ouvert ou de contrôler l'accès de la chambre catalytique. Aussi, le protéasome 20S ne fonctionne probablement jamais seul dans les cellules, et interagit avec d'autres facteurs qui contrôlent son ouverture et qui le fournissent en substrats. Parmi ces facteurs, deux complexes régulateurs ont été caractérisés, les complexes 19S et 11S.

Le complexe régulateur 19S

Le complexe 19S joue un rôle prépondérant dans la dégradation des protéines ubiquitinylées. En se liant aux deux extrémités du protéasome 20S pour former le protéasome 26S, il active celui-ci, probablement en « ouvrant » les orifices des anneaux α , et il apporte des sous-unités qui permettent la reconnaissance des chaînes d'ubiquitine, la dénaturation du substrat et le recyclage de l'Ub. Ce complexe régulateur comprend environ 18 sous-unités différentes, et est formé de deux sous-ensembles: un « couvercle » requis pour la dégradation des protéines ubiquitinylées, et une « base » assurant le lien avec le protéasome 20S et comprenant six ATPases probablement arrangées en anneaux [17]. Bien que ces ATPases soient clairement apparentées, leurs fonctions ne

sont pas redondantes puisque chacune est nécessaire. Il est probable qu'elles hydrolysent l'ATP pour fournir de l'énergie nécessaire à la destruction des substrats [20], à l'activation du protéasome 20S et, vraisemblablement, à l'injection des substrats dans la chambre catalytique du protéasome 20S. Une activité isopeptidasique (capable d'hydrolyser les chaînes d'Ub) est aussi associée au complexe 19S. Elle assure le recyclage de l'Ub lors de la dégradation des substrats ubiquitinylés, et vraisemblablement aussi une fonction de « contrôle de qualité » permettant le recyclage des protéines mal ubiquitinylées, ou mal dégradées par le protéasome [21].

L'activateur 11S

Le complexe activateur 11S, aussi appelé PA28, a été mis en évidence chez les eucaryotes supérieurs. Il est composé de 2 de sous-unités de 28 kDa apparentées, appelées PA28 α et β qui forment des anneaux hexamériques ou heptamériques, qui, comme le complexe 19S, peuvent s'associer aux extrémités du protéasome 20S. *In vitro*, PA28 stimule l'hydrolyse des peptides par le protéasome 20S, de façon indépendante de l'ATP, probablement en maintenant ouverts les orifices de ce complexe. Cependant, son rôle physiologique est loin d'être compris. Comme les sous-unités du protéasome LMP-2, LMP-7 et MECL-1, la synthèse des sous-unités α et β de PA28 est stimulée par l'IFN- γ . Par ailleurs, l'association de PA28 avec le protéasome 20S favorise la production de peptides « présentables » par le CMH-I. Aussi, il est généralement admis que PA28 joue un rôle plus spécifique dans la réponse immunitaire. Récemment, des particules hybrides contenant un complexe 11S et un complexe 19S associés à un même protéasome 20S ont été mises en évidence, ce qui suggère que ces deux complexes régulateurs pourraient avoir un rôle complémentaire.

Catabolisme protéique, pathologie et perspectives thérapeutiques

Il est maintenant clair que la protéolyse intracellulaire est une fonction-

clé pour les cellules. De nombreux dysfonctionnements de la machinerie de dégradation ont été décrits ces dernières années dans des maladies variées, incluant le cancer et certaines infections virales [22]. Aussi, la possibilité de manipuler la machinerie protéolytique afin de contrôler la stabilité de protéines biologiquement importantes présente un grand intérêt thérapeutique potentiel.

L'utilisation d'inhibiteurs du protéasome a déjà permis d'observer des effets anti-inflammatoires et antitumoraux dans des modèles animaux [23]. Cependant, bien que certains de ces inhibiteurs soient aux portes des essais cliniques, la toxicité générale des inhibiteurs du protéasome est certainement à redouter. Leur administration systémique, si elle intervient, demandera donc probablement le développement de méthodes de ciblage tissulaire efficaces. En revanche, la complexité et la spécificité des mécanismes mis en jeu pour ubiquitinyler les protéines offre un plus grand potentiel d'intervention thérapeutique. A la différence d'une inhibition généralisée de la protéolyse intracellulaire par des inhibiteurs du protéasome, elle réserve, en effet, la possibilité théorique de n'agir que sur les voies cataboliques perturbées dans la maladie concernée. Un certain nombre de mutants d'enzyme E2 ou E3 ont déjà été caractérisés pour leur capacité d'interférer avec la dégradation de substrats spécifiques, ce qui valide le concept d'approche. L'explosion récente des connaissances et des travaux concernant le système Ub/protéasome, qui se traduit par le développement d'un grand nombre de tests cellulaires et acellulaires pour mesurer la dégradation des protéines, devrait permettre la mise au point rapide de criblages de drogues sur de larges échelles ■

Remerciements

Les travaux de nos équipes ont été soutenus par des crédits du Cnrs, de l'ARC et de la Ligue contre le cancer. Nous remercions nos collègues, notamment le Dr I. Jariel-Encontre, pour la lecture critique du manuscrit.

RÉFÉRENCES

1. Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2727-30.
2. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-79.
3. Margottin F, Lassot I, Durand H, et al. Phosphorylation et ciblage au protéasome: la F-box connection. *Med Sci* 1999; 15: 1008-14.
4. Scheffner M, Huijbregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75: 495-505.
5. Hicke L. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 107-12.
6. Beaudenon SL, Huacani MR, Wang G, McDonnell DP, Huijbregtse JM. Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6972-30.
7. Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W. Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF5KP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat. Cell Biol.* 1999; 1: 14-9.
8. Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, Krek W. The von hippel-lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev* 1999; 13: 1822-33.
9. Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, Roberts JM. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* 1999; 13: 2375-87.
10. Zachariae W, Nasmyth K. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 1999; 13: 2039-58.
11. Varshavsky A. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 1997; 2: 13-28.
12. Bordallo J, Plemper RK, Finger A, Wolf DH. Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 209-22.
13. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997; 420: 25-7.
14. Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Leverson JD, Hunter T, Liu YC. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-Dependent ubiquitin-protein Ligase. *Science* 1999; 286: 309-12.
15. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11364-9.
16. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and Functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 801-47.
17. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 1015-68.

RÉFÉRENCES

18. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 397-403.
19. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 739-79.
20. Braun BC, Glickman M, Kraft R, et al. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 221-6.
21. Kam YA, Xu W, Demartino GN, Cohen RE. Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* 1997; 385: 737-740.
22. Schwartz AL, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med* 1999; 50: 57-74.
23. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999; 59: 2615-22.
24. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999; 96: 635-44.

m/s 2000

Summary

The ubiquitin/proteasome pathway

Intracellular proteolysis is an essential cell function. In addition to the elimination of abnormal or excess proteins, it is involved in the control of major cell processes such as division, differentiation, apoptosis, the response to numerous external stimuli and the production of antigenic peptides. In eucaryotes, the ubiquitin/proteasome pathway plays a major part in the destruction of intracellular proteins and functions in two steps. First, substrates are marked by covalent attachment of chains of a

small protein, ubiquitin, owing to a complex cascade of enzymes. Some of these enzymes are heteromultimeric complexes sharing common functional modules. In a second step, ubiquitinated proteins are recognized and degraded by the 26S proteasome which constitute the proteolytic machinery of the system. This review describes the components of this pathway as well as the mechanisms underlying its extraordinary efficiency and selectivity in the light of the most recent discoveries.